

UNIVERZITA KARLOVA  
KATEDRA FARMAKOLÓGIE A TOXIKOLÓGIE  
Farmaceutická fakulta



**ŠTÚDIUM INTERAKCIÍ PARP INHIBÍTOROV S ABC LIEKOVÝMI EFLUXNÝMI  
TRANSPORTÉRMÍ**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Lucia Dziaková

### **Čestné vyhlásenie**

Svojim podpisom prehlasujem, že táto práca je mojim autorským dielom. Všetky zdroje, ktoré som pri písaní použila sú riadne citované a uvedené v zozname použitej literatúry. Táto práca nebola nikdy použitá k získaniu viacerých iných alebo rovnakých titulov.

V Hradci Králové

Lucia Dziaková

## **Pod'akovanie**

Chcela by som sa poďakovať svojmu školiteľovi, RNDr. Jakubovi Hofmanovi, Ph.D. za starostlivý prístup, odborné konzultácie, trpezlivosť a čas, ktorý mi v priebehu vypracovávania mojej diplomovej práce venoval. Ďalej by som sa chcela poďakovať Mgr. Simone Suchej a Mgr. Dimitriosovi Vagiannisovi za pomoc pri práci v laboratóriu.

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Lucia Dziaková

Školiteľ: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

**Názov diplomovej práce:** Štúdium interakcií PARP inhibítorov s ABC liekovými efluxnými transportérmi.

ABC efluxné transportéry sú integrálne membránové proteíny, ktoré využitím energie získanej z ATP prenášajú nespočetné množstvo telu vlastných látok von z buniek, no pozornosť je však upriamovaná hlavne na to, že prenášajú xenobiotika. Ich nadmerná expresia v nádorovom tkanive prispieva k mnohopočetnej liekovej rezistencii (MDR), ktorá vo väčšine prípadov vedie k zlyhaniu terapie. Inhibítory poly(ADP-ribóza)polymerázy (PARPi) predstavujú sľubný terapeutický prístup v liečbe nádorových ochorení, ktoré vykazujú defekty v homológnej rekombinácii (HR). Táto práca sa zameriava na štyri vybrané PARPi (olaparib, rucaparib, niraparib, veliparib) a ich interakčný potenciál voči ABC liekovým efluxným transportérom (ABCB1, ABCC1, ABCG2). Pre účely našej práce sme pracovali s MDCKII bunkami (parentné, transdukované skúmanými transportérmi) a využívali princíp akumulčných štúdií, ktoré sú založené na meraní intenzity fluorescencie špecifických modelových substrátov (hoechst33342, calcein AM, daunorubicín, mitoxantrón). Ako pozitívnu kontrolu sme využívali známe inhibítory daných transportérov. Mierny inhibičný potenciál sme zistili u olaparibu (ABCG2) a niraparibu (ABCB1). V prípade rucaparibu a veliparibu nedošlo k významnej inhibícii ABC liekových efluxných transportérov. Na záver môžeme konštatovať, že sa nám podarilo rozšíriť znalosť farmakokinetického profilu PARPi. Naša práca môže slúžiť ako dôležitý zdroj informácií, ktoré by po overení na viacerých modeloch mohli byť užitočné pre bezpečné klinické využívanie týchto liečiv.

# **Abstract**

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmacology & Toxicology**

**Student:** Lucia Dziaková

**Supervisor:** RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Study on interactions of PARP inhibitors with ABC drug efflux transporters.

ATP-binding cassette (ABC) transporters are integral membrane proteins that use the energy obtained from ATP to carry transport of numerous endogenous substances out of the cells, but attention is drawn primarily to the fact that they transfer also xenobiotics. Their overexpression in tumor tissue contributes to multidrug resistance (MDR), which in most cases leads to therapy failure. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors (PARPi) represent a promising therapeutic approach in the treatment of cancers that exhibit defects in homologous recombination (HR). This work focuses on four selected PARPi (olaparib, rucaparib, niraparib, veliparib) and their interaction potential towards ABC drug efflux transporters (ABCB, ABCC1, ABCG2). In our work, we worked with MDCKII cells (parent, transduced by the transporters of interest) and utilized the principle of accumulation studies based on the measurement of fluorescence intensity of specific model substrates (hoechst33342, calcein AM, daunorubicin, mitoxantrone). We used established inhibitors of studied transporters as a positive inhibitory control. Slight inhibitory potential was found for olaparib (ABCG2) and niraparib (ABCB1). There was no significant inhibition of examined ABC efflux transporters exhibited by rucaparib and veliparib. In conclusion, we can sum up that we were able to expand our knowledge of the pharmacokinetic profile of PARPi. Our work can serve as an important source of information that, once verified on multiple models, could be useful for the safe clinical use of these drugs.

## Obsah

1. Zoznam symbolov a skratiek .....	8
2. Úvod.....	10
3. Teoretická časť.....	11
3.1. ABC liekové efluxné transportéry .....	11
3.1.1. Štruktúra, lokalizácia a fyziologická funkcia ABC liekových transportérov.....	11
3.1.2. Rola ABC liekových transportérov vo farmakokinetickej liekovej rezistenci.....	15
3.2. Inhibítory poly(ADP-ribóza)polymerázy .....	20
3.2.1. Olaparib (Lynparza, AstraZeneca) .....	23
3.2.2. Rucaparib .....	25
3.2.3. Niraparib (Zejula).....	26
3.2.4. Veliparib.....	27
4. Cieľ práce.....	29
5. Experimentálna časť .....	30
5.1. Materiál a metódy.....	30
5.1.1. Chemikálie .....	30
5.1.2. Prístroje .....	30
5.1.3. Bunkové línie .....	31
5.1.4. Pasážovanie .....	31
5.1.5. Akumulačná esej s hoechstom 33342 a calceinom AM.....	32
5.1.6. Akumulačná esej s daunorubicinom a mitoxantronom.....	33
5.1.7. Štatistická analýza.....	34
6. Výsledky a diskusia .....	35
6.1. Olaparib .....	35

---

6.2.	Rucaparib.....	38
6.3.	Niraparib.....	41
6.4.	Veliparib.....	45
7.	Záver.....	47
8.	Zoznam použitej literatúry.....	48

## 1. Zoznam symbolov a skratiek

ABC	transportný proteín
ABCB1	P-glykoproteín, P-gp
ABCC1	multidrug resistance-associated protein 1, MRP1
ABCG2	breast cancer resistance protein, BCRP
ATP	adenozíntrifosfát
BER	Base Excision Repair
BRCA	breast cancer
DAU	daunorubicín
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DSB	dvojvláknové zlomy
FBS	fetálne bovinné sérum
FDA	Úrad pre kontrolu potravín a liečiv
HR	homológna rekombinácia
MDCKII	Madin - Darby canine kidney II (bunková línia)
MDR	mnohopočetná lieková rezistencia
MTX	mitoxantrón
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid
NBD	doména viažuca nukleotidy
PARP	poly(ADP-ribóza)polymerázy
PARPi	inhibítory poly(ADP-ribóza)polymerázy
PBS	fosfátový pufer



SSB      jednovláknové zlomy

TMD      transmembránová doména

## 2. Úvod

Chronické choroby boli v roku 2015 celosvetovo zodpovedné za 71% úmrtí, najmä nádorové ochorenia, kardiovaskulárne ochorenia, diabetes, chronické ochorenia obličiek a ochorenia dýchacích ciest. Najvýznamnejšie boli úmrtia na nádorové ochorenia, ktoré sa zvýšili z 5,7 milióna v roku 1990 na 8,8 milióna v roku 2015 a očakáva sa, že celosvetové zaťaženie nádorových ochorení vzrastie v nasledujúcich desaťročiach o 70% (Tu, Wen et al., 2018).

V kontexte liečby nádorových ochorení teraz svet vstupuje do novej éry takzvaného „presného lieku“, v ktorom sú správne lieky prispôsobené pacientom a dodávané konkrétne do nádorových buniek, ale nie zdravých buniek. V tomto novodobom prístupe, prevažná väčšina súčasných cielených terapií sú buď monoklonálne protilátky alebo lieky s malými molekulami. Lieky s malými molekulami sú zvyčajne schopné difundovať do buniek, a preto majú výhodnú schopnosť pôsobiť na ciele lokalizované vo vnútri bunky (Røslund a Engelsen, 2014). Medzi tieto malé molekuly patria aj inhibítory poly(ADP-ribóza)polymerázy (PARPi), ktorých cieľovou štruktúrou je DNA, teda jadro bunky, kde poly(ADP-ribóza)polymerázy (PARP) zohrávajú kľúčovú úlohu v signalizácii poškodenia a opravách jednovláknových zlomov DNA.

ATP-binding cassette (ABC) efluxné transportéry tvoria veľkú skupinu vysoko konzervovaných transmembránových proteínov, ktoré sprostredkovávajú aktívny transport mnohých štruktúrne a funkčne rozmanitých substrátov cez dvojvrstvu bunkovej membrány. Práve nadmerná expresia niektorých ABC transportérov v nádorových bunkách je potencionálnym prispievateľom k rozvoju mnohopočetnej liekovej rezistencie (MDR) voči protinádorovým liečivám. Vývoj MDR je hlavným problémom u pacientov liečených rovnakým liečebným režimom po dlhú dobu. Tento fenomén vedie u pacientov často k zlyhávaniu podávanej chemoterapie (Amawi et al., 2019).

PARPi môžu reprezentovať sľubnú cielenú terapiu, ale ich senzitivita voči transportérom, ktoré spôsobujú rezistenciu, nie je zatiaľ dobre definovaná (Dufour, Daumar et al., 2015). Preto sme sa v tejto práci zamerali na objasnenie interakčných vzťahov vybraných PARPi s ABC liekovými efluxnými transportérmi využitím akumuláčnych metód. Výsledky tejto práce by mohli rozšíriť poznatky farmakokinetických vlastností PARPi smerom k ABC efluxným transportérom.

### 3. Teoretická časť

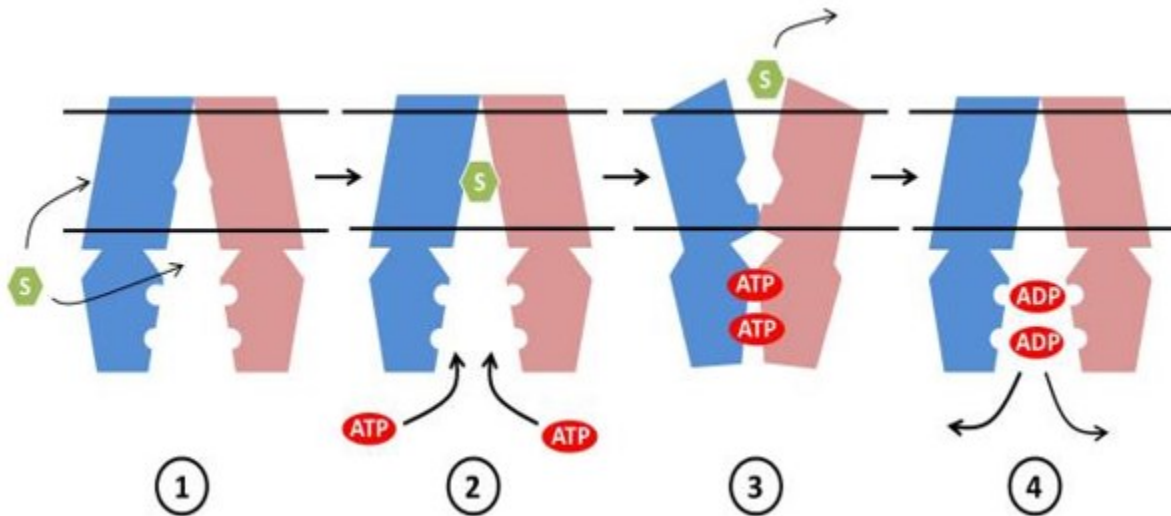
#### 3.1. ABC liekové efluxné transportéry

ATP-binding cassette (ABC) efluxné transportéry tvoria veľkú skupinu transmembránových proteínových komplexov, ktoré sú schopné vylúčiť z vnútra bunky širokú škálu ako exogénnych, tak aj endogénnych molekúl. Na prenos molekúl von z bunky využívajú energiu uloženú v adenozintrifosfáte (ATP), ide o tzv. ATP-dependentný prenos. Jedná sa o esenciálne proteíny, ktoré môžeme nájsť v každom organizme. V ľudskom organizme bolo doposiaľ rozpoznávaných 48 členov, ktorí sú rozdelení podľa určitých štruktúrnych podobností do 7 podskupín od ABCA až po ABCG (Chen, et al., 2016).

##### 3.1.1. Štruktúra, lokalizácia a fyziologická funkcia ABC liekových transportérov

Základnú architektúru funkčných ABC efluxných transportérov často tvorí dimerná transmembránová doména (TMD) a dimerná cytoplazmatická nukleotid viažuca doména (NBD). Dohromady vytvárajú samostatnú polypeptidovú jednotku TMD1-NBD1-TMD2-NBD2. Existuje však aj významný transportér, ABCG2/BCRP, ktorý sa skladá z jednej TMD a NBD. Je označovaný za tzv. polovičného transportéra, u ktorého sa transport aktivuje vytvorením disulfidových mostíkov. ABC proteíny teda môžu mať štruktúru plnej veľkosti (dva TMD a dva NBD) alebo polovičnej veľkosti (jeden TMD a jeden NBD), a v tom prípade homodimerizujú alebo heterodimerizujú, aby boli funkčné (Lefèvre, F., Boutry, M., 2018). Jediným spoločným štruktúrnym komponentom rôznych typov ABC transportérov je NBD s radou zachovaných motívov (Beis, K., 2015). Medzi tieto tri charakteristické sekvencie motívov patrí Walker A, Walker B a LSGGQ motív, tiež známy ako ABC podpis. NBD jednotka viaže až 2 molekuly ATP, pričom dochádza k hydrolýze a následne k uvoľneniu energie. Niektoré podskupiny, konkrétne ABCE a ABCF, pozostávajú len z NBD a nemajú jasnú transportnú funkciu. TMD, na rozdiel od NBD, vykazuje štruktúrne vyššie odchýlky v primárnej štruktúre a topológii. Typicky formuje 6 transmembránových segmentov, teda v plnej veľkosti 12 segmentov, ktoré pravdepodobne vytvárajú akúsi pórovitú štruktúru cez membránu (Glavinas, et al., 2004). Obsahuje miesto pre naviazanie substrátu od malých anorganických iónov, cukrov, lipidov, peptidov až po komplexné organické molekuly. Zmenou svojej konformácie vytvára prenosnú cestu cez bunkovú membránu.

Využíva sa pritom energia uvoľnená hydrolyzou ATP, ktorá funguje ako palivo poháňajúce transport molekúl von z bunky. Celý mechanizmus transportu popisuje Obr. 1.

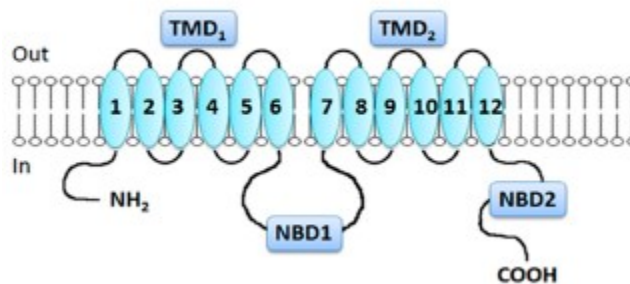


Obr. 1 Model transportného mechanizmu ABC liekových efluxných transportérov

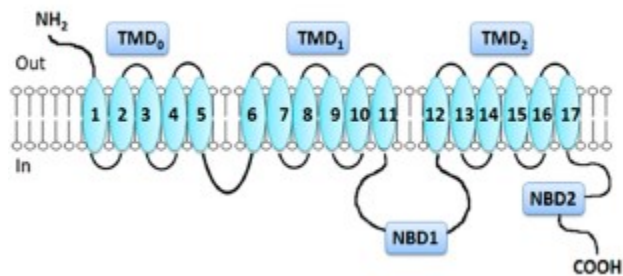
1. Substrát *S* vstupuje do štrbiny lokalizovanej medzi dvoma TMDs (konformácia smerujúca dovnútra „inward-facing“).
2. Asociácia substrátu s TMDs spustí naviazanie 2 ATP na NBDs.
3. Po naviazaní ATP nastáva dimerizácia NBDs a zmení sa konformácia TMDs smerujúc von („outward-facing“), čo vyústí v uvoľnenie substrátu z bunky.
4. Hydrolyza ATP zmení konformáciu TMDs do východiskového stavu („inward-facing“)

Prevzaté z Lefèvre, F., Boutry, M., 2018.

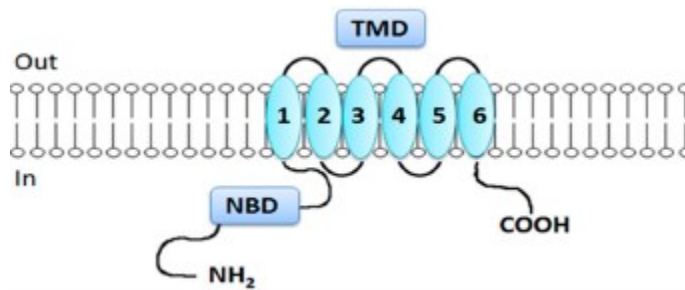
A)



B)



C)



Obr. 2 Štruktúra troch kategórií ABC transportérov, ktoré poskytujú liekovú rezistenciu.

Vzor a) znázorňuje podskupinu ABCB ako napr. ABCB1 (P-gp), ktorá pozostáva z 12 transmembránových segmentov (2 TMD) a dvoch ATP viažúcich domén (NBD).

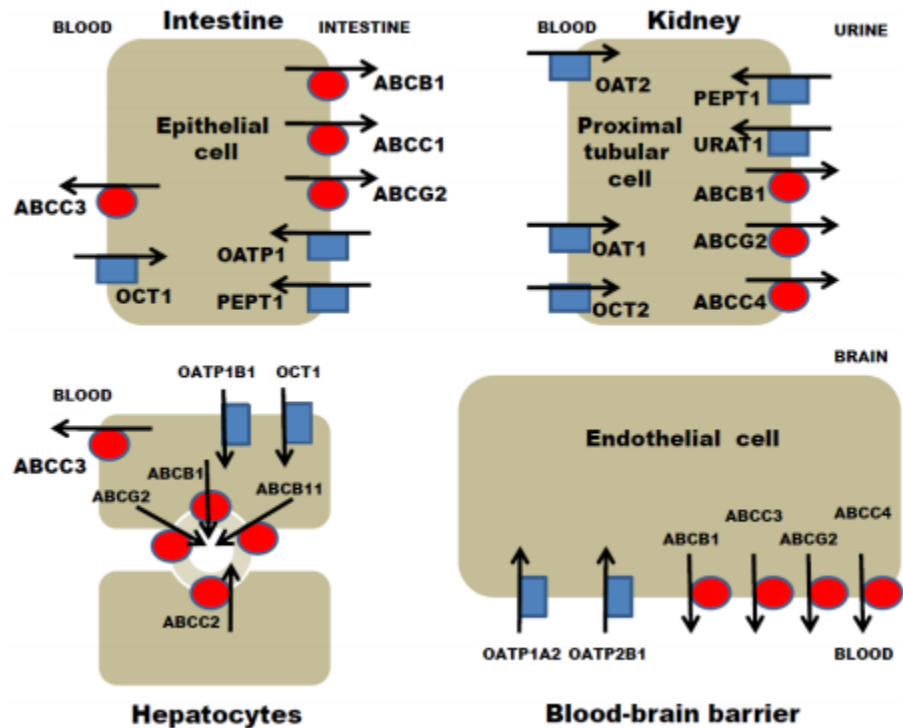
Vzor b) znázorňuje podskupinu ABCC ako napr. ABCC1 (MRP1), ktorá sa skladá z dvoch NBDs, z dvoch TMDs pozostávajúcich zo šiestich transmembránových segmentov a z TMD<sub>0</sub> pozostávajúcej z piatich transmembránových segmentov na N terminálnom konci, teda v sumáre pozostáva zo sedemnástich transmembránových segmentov.

Vzor c) znázorňuje polovičného transportéra ABCG2 (BCRP), zloženého z jednej NBD a zo šiestich transmembránových segmentov (1 TMD).

Prevzaté z Gameiro et al., 2017

Jednotlivé ABC efluxné transportéry sa môžu nachádzať na viacerých miestach v tele človeka, kde zohrávajú dobre definovanú úlohu. Prenášajú nespočetné množstvo telu vlastných látok, ale pozornosť sa upriamuje hlavne na schopnosť efluxných transportérov chrániť tkanivá pred škodlivým pôsobením xenobiotik. Navyše fungujú v synergii s lieky-metabolizujúcimi

enzýmami, čím sa zvyšuje ochrana organizmu pred toxickými látkami (Gameiro et al., 2017). Nachádzajú sa preto v relatívne veľkom množstve v orgánoch s absorpčnou, distribučnou a eliminačnou funkciou. V súčasnosti je dobre známe, že aktívny eflux ABC transportérov v tenkom čreve je jedným z hlavných prispievateľov k slabej absorpcii a nízkej biodostupnosti orálne podávaných liečiv (Glavinas, et al., 2004). Medzi ďalšie bežné lokalizácie ABC efluxných transportérov patrí pečeň a obličky, ktoré majú vplyv hlavne na exkréciu liečiv (viz obr. 3). Okrem iného ich môžeme nájsť aj na ochranných bariérach ľudského tela (hematoencefalická, hematotestikulárna, placentárna), ktoré limitujú distribúciu liečiv (Schinkel a Jonker, 2003). Nadmerná expresia niektorých ABC efluxných transportérov pozorovaných v nádorových bunkách, ako ABCB1 (P-glykoprotein/Pgp), multidrug resistance-associated protein 1(MRP1/ABCC1), brest cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), je jedným z bežných mechanizmov mnohopočetnej liekovej rezistencie (MDR-multidrug resistance). Ich príčinou dochádza k zníženiu koncentrácie chemoterapeutika v bunke, čím sa limituje a znemožňuje efektivita protinádorovej liečby (Chen, et al., 2016).



Obr. 3 Obrázok zobrazuje schematickú lokalizáciu transportérov vo fyziologických tkanivách tela.

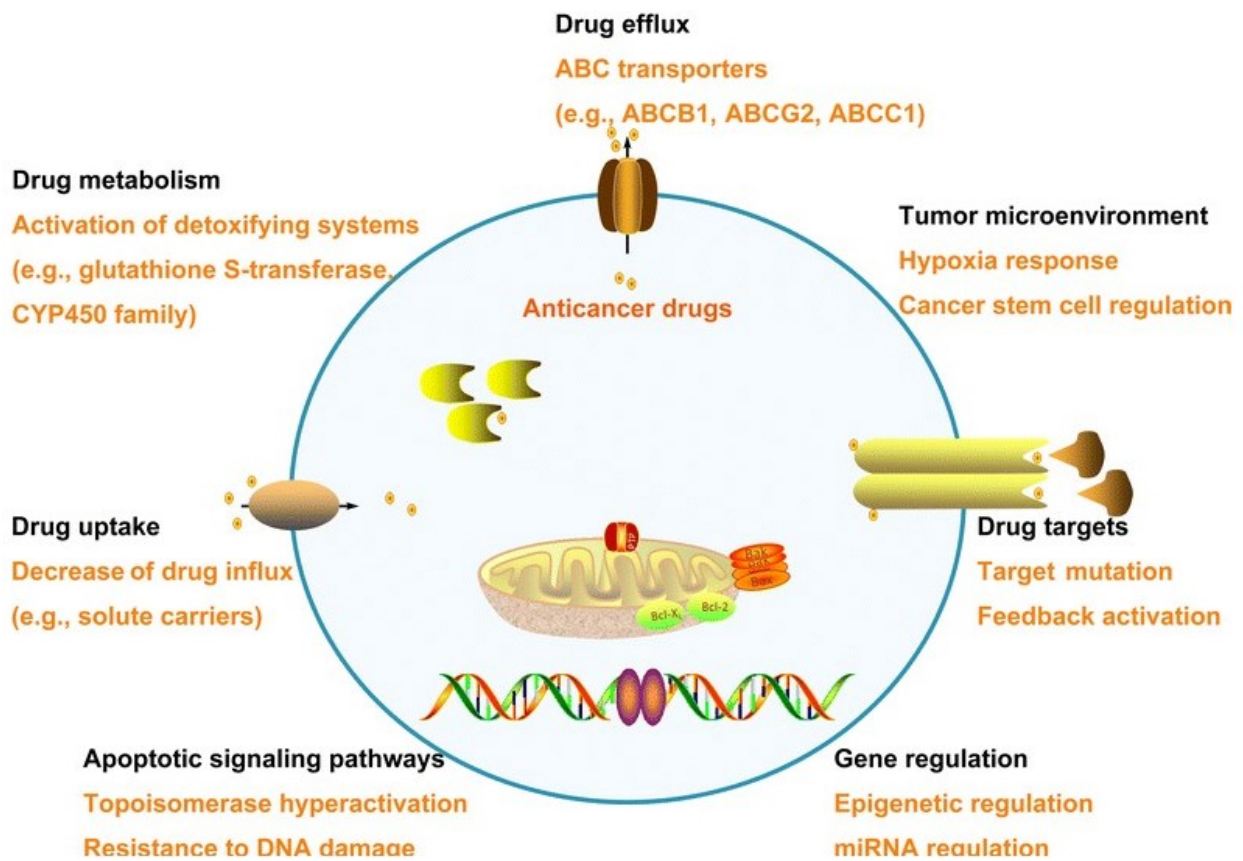
Z obrázka je zrejmé, že ABC efluxné transportéry zohrávajú dôležitú úlohu v absorpcii, distribúcii a eliminácii. ABC transportéry sú vyznačené červenými kruhmi. Transportéry iných rodín sú vyznačené modrými obdĺžnikmi.

Prevzaté z M.A. DEMEL, 2013

### 3.1.2. Rola ABC liekových transportérov vo farmakokinetickej liekovej rezistenci

Rezistencia vzniká ako farmakodynamickými, tak farmakokineticnými mechanizmami. Liekové transportéry sledované v našej práci zohrávajú kľúčovú rolu v mnohopočetnej liekovej rezistencii (MDR). Pod týmto pojmom rozumieme rezistenciu, vytvorenú nádorovými bunkami v priebehu liečby, na štruktúrne a funkčne odlišné triedy antineoplastických liečiv (Sodani et al., 2012). Fungujú hlavne na farmakokinetickej úrovni mechanizmom patologicky nadmernej expresie transportérov na cytoplazmatickej membráne nádorových buniek, s následným masívnym vylučovaním liečiv von z buniek. Tento jav znižuje koncentráciu protinádorových liečiv v nádorových bunkách, čo môže viesť až k zlyhaniu chemoterapie. Medzi ďalšie mechanizmy

MDR patrí znížené vychytávanie liečiv influxnými pumpami, zvýšený metabolizmus liečiv, blokovanie apoptotických signálnych dráh, zvýšenie adaptability epigenetickou reguláciou a reguláciou miRNA, mutácia v cieľoch liečiva alebo aktivácia spätnej väzby ďalších cieľov a signálnych dráh prípadne chemorezistencia vyvolaná zmenami v mikroprostredí (napr. reakcia na hypoxiu a regulácia rakovinových kmeňových buniek) (viz obr. 4) (Li, Y.-J., et al., 2017). Medzi ABC transportéry, ktoré zohrávajú ťažiskovú úlohu v MDR, patrí hlavne ABCB1, ABCC1 a ABCG2.



Obr. 4 Mechanizmy liekovej rezistencie v nádore.

Prevzaté z Li, Y.-J., et al., 2017

### 3.1.2.1. ABCB1 (P-glykoproteín, MDR1)

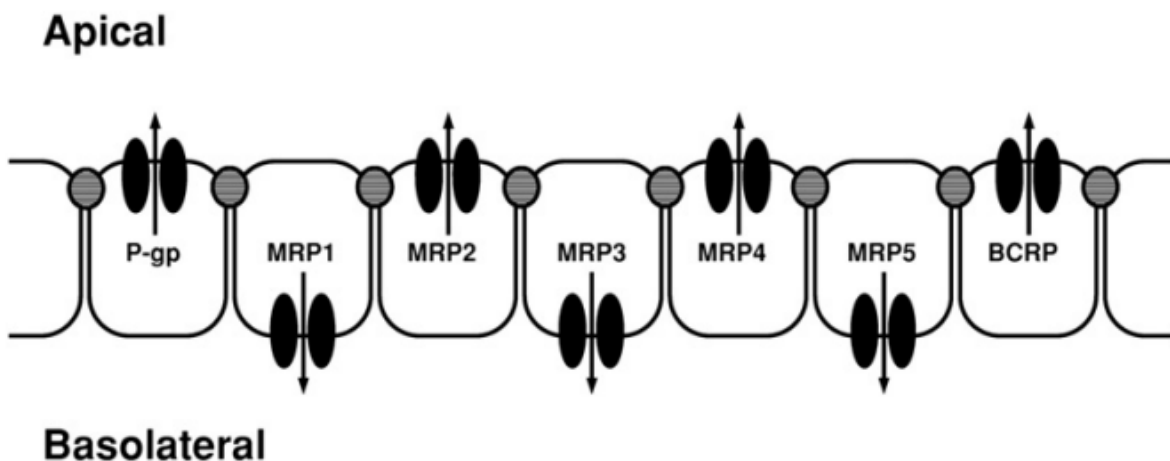
Pri hľadaní odpovedí v otázke rezistencie bunkových línii na rôzne chemické agens bola pozorovaná nadmerná expresia glykozylovaného 170 kDa proteínu (Burchenal et al., 1950). V roku 1976 Juliano a Ling vydali prvú informáciu o špecifickom spojení Pgp (P - permeabilita, gp -



glykoproteín) s rezistenciou na kolchicin sledovanou na škrečích ovariálnych bunkách (Juliano, R. L., & Ling, V., 1976). ABCB1 je lokalizovaný na apikálnej strane membrány prevažne epiteliálnych buniek, čoho dôsledkom sú substráty ABCB1 translokované z bazolaterálnej k apikálnej strane epitelu (viz obr. 5). Fyziologicky je ABCB1 exprimovaný v endotelových bunkách hematoencefalickej bariéry a placente, kde zohráva úlohu ochranného prvku týchto tkanív pred toxickými látkami. Svojou prítomnosťou v črevách a v pečeni zohráva dôležitú úlohu v presystémovej eliminácii perorálne podaných liečiv. Prítomnosťou v obličkách a pečeni sa podieľa na eliminácii látok zo systémovej cirkulácie. Predpokladá sa, že v kôre nadobličiek hrá úlohu pri transporte hormónov a homeostáze a v rezistencii na glukokortikoidy. V lymfocytoch a ďalších imunologických a krvných zložkách hrá pravdepodobne úlohu pri vírusovej rezistencii a pri prenose cytokínov a obalených vírusov (Hodges, Markova et al., 2011). Prenáša nezvyčajne široké spektrum prevažne hydrofóbných substrátov a substrátov s aromatickými kruhmi alebo pozitívne nabité pri fyziologickom pH (Choi, Y. H., Yu, A. M., 2014). Široké spektrum substrátov zahŕňa niekoľko farmakologicky odlišných zástupcov, ktoré nie sú používané len na chemoterapie, ale tiež na liečbu hypertenzie, alergie, infekcií, imunosupresie, zápalu a v neurológii (Eid et al., 2015). Expresia ABCB1 je zvyčajne najvyššia v nádoroch, ktoré sú odvodené z tkanív, ktoré ho exprimujú normálne, ako napr. epitelové bunky čriev, obličiek, nadobličiek. V iných nádoroch môže byť expresia ABCB1 na začiatku diagnózy nižšia, ale zvyšuje sa po expozícii proti nádorovým liečiv (Thomas, H., & Coley, H. M., 2003). V malígnych bunkách sprostredkováva efluxom mnohopočetnú rezistenciu na antracyklíny (doxorubicin, daunorubicin, epirubicin), *Vinca* alkaloidy (vinorelbin, vinkristin, vinblastin), kolchicíny, epipodofylotoxíny (etoposid, teniposid) a taxany (paklitaxel, docetaxel).

Terapeutické použitie inhibítorov ABCB1 na prekonanie MDR bolo prvýkrát navrhnuté v roku 1981, keď Tsuruo et al. zistili, že verapamil môže zvrátiť MDR v leukemických bunkách rezistentných na vinkristín P388/VCR (Tsuruo et al., 1981). Zástupcov, ktorí modulujú fungovanie ABCB1 môžeme rozdeliť do troch generácií. Zástupcami prvej generácie sú verapamil, cyklosporin A, chinidin, trifluorperazin, res erpin, yohimbin, tamoxifen a toremifen. Hlavným limitom tejto generácie je vysoká koncentrácia potrebná na zvrátenie MDR, ktorej výsledkom je neprijateľná toxicita. Okrem iného mnoho z týchto zástupcov sú substrátmi pre iné transportéry a enzýmové systémy, čo má za následok nepredvídateľné farmakokinetické interakcie. Presvedčivejšia druhá generácia vznikla štruktúrnymi obmenami prvej generácie s redukovanou

toxicitou a lepšou tolerabilitou (Yergeri et al., 2014). Najväčším limitom použitia tejto generácie je súbežná inhibícia CYP3A4, ktorá ovplyvňuje metabolizmus a elimináciu protinádorových liečiv. Zablokovaním CYP3A4 sa zvýši koncentrácia liečiva, a tým aj závažnosť nežiadúcich účinkov (hlavne toxicita kostnej drene) (Tamaki et al., 2011). Patria tu dexverapamil, valsopodar (PSC 833), dexniguldipin a biricodar citrát (VX 710). Do tretej generácie patrí zosuquidar (LY335979), laniquidar (R101933), tariquidar (XR9576), ONT-093 (substituovaný diarylimidazol), elacridar (GF120918), OC 144-093, mitotane (NSC 38721), annamycin a R101933. Majú vysokú účinnosť, špecifitu pre ABCB1 a neinteragujú s CYP3A4 v porovnaní so zástupcami predchádzajúcich generácií, ale aj napriek tomu v klinických štúdiách preukázali nešpecifickú toxicitu a nedostatočný účinok (Yergeri et al., 2014; Saneja et al. 2013).



Obr. 5 Subcelulárna lokalizácia ABC efluxných transportérov v obličkovom epiteli

*ABCB1 (P-gp), ABCC2 (MRP2), ABCC4 (MRP4), ABCG2 (BCRP) sú lokalizované na apikálnych membránach obličkových epiteliálnych buniek. ABCC1, 3, 5 (MRP1, 3, 5) sú lokalizované na bazolaterálnych membránach obličkových epiteliálnych buniek.*

*Prevzaté z A.H. Schinkel, J. W. Jonker, 2003*

### 3.1.2.2. ABCC1 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)

ABCC1 je 190kDa polypeptid, ktorý bol prvýkrát identifikovaný v pľúcnych nádorových bunkách rezistentných na doxorubicín, ktoré neexprimovali ABCB1 (Cole et al., 1992) a patrí medzi deväť ľudských ABCCs (multidrug resistance proteins). Tento transportér sa odlišuje

v štruktúre tým, že obsahuje okrem štyroch základných domén (2 TMD, 2 NBD) ešte prídavnú doménu TMD<sub>0</sub> na N konci (viz obr. 2), ktorá sa skladá z piatich transmembránových segmentov (preto patrí medzi „long MRPs“) (Zhang et al., 2015). V ľudskom tele je primárne exprimovaný na bazolaterálnej membráne epitelialných buniek pľúc, čriev, obličiek, pankreasu, semenníkov, placenty, močového mechúra a nadobličiek (Peterson et al., 2017). Nadmerná expresia ABCC1 bola pozorovaná v nádoroch pľúc, prs, prostaty, neuroblastómu a u niektorých typov leukémie. Funkcia ABCB1 je väčšinou limitovaná na vypudzovanie xenobiotík. ABCC1 exportuje endobiotika aj xenobiotika, a tak má vplyv na fyziologické procesy (Cole, 2014). Ich substráty sa tiež líšia v chemickej povahe. ABCB1 rozpoznáva predovšetkým hydrofóbne substráty, zatiaľ čo ABCC1 prenáša organické anióny, z ktorých väčšina si vyžaduje konjugáciu s glutationom, glukurónovou kyselinou a sulfátom (Johnson, Chen, 2017). LTC<sub>4</sub> (leukotrien C<sub>4</sub>), veľmi dôležitý mediátor pro-zápalovej odpovede, ktorý kontroluje cievnú permeabilitu a kontrakciu hladkého svalstva, je ďalší substrát s vysokou afinitou k ABCC1 (Yin., Zhang, 2011). Zapojenie ABCC1 v MDR rakovinových buniek pozostáva zo sprostredkovania efluxu konvenčných protirakovinových liečiv, ako doxorubicin, etoposid, vinkristin, metotrexát, ale aj novo objavených inhibítorov tyrozinkináz (Peterson et al., 2017). Aj keď sa zdá byť objavenie vhodného inhibítora ABCC1, ktorý by dokázal zvrátiť MDR veľmi atraktívne, tak do dnešného dňa nebola ešte žiadna molekula klinicky testovaná. Sľubné vedúce molekuly s vysokým stupňom selektivity pre ABCC1, ktoré boli objavené a zahŕňajú cyklohexylom spájané tricyklické izoxazoly a deriváty flavonoidov, zostávajú stále výhradne v preklinickom skúmaní (J. I. Fletcher et al., 2016).

### 3.1.2.3. ABCG2 (breast cancer resistance protein, BCRP)

Breast cancer resistance protein s molekulovou hmotnosťou 72 kDa je druhým členom podskupiny G ľudských ABC efluxných transportérov, ktorý zvykne byť tiež označovaný ako mitoxantron rezistentný proteín (MXR) alebo placenta špecifický ABC proteín (ABCP). Pomenovanie BCRP dostal podľa toho, že bol pôvodne naklonovaný z nádorových buniek prsníka (MCF-7) odolných voči viacerým liečivám, kde sa zistilo, že poskytuje rezistenciu voči chemoterapeutikám, ako mitoxantron a topotekan, bez prítomnosti známych MDR transportérov ABCB1 a ABCC1 (Mao, Q., Unadkat, J. D., 2014; Doyle, L.A. et al., 1998). Tento proteín zložený zo 655 aminokyselín na rozdiel od spomínaných predchádzajúcich transportérov pozostáva len z 1

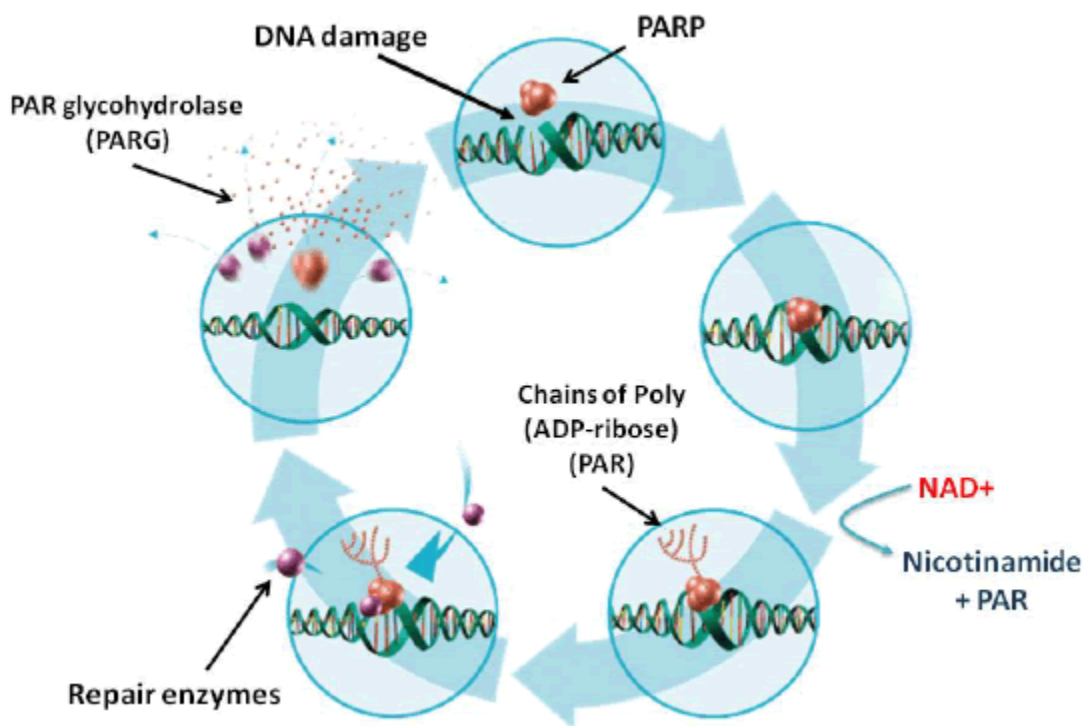
TMD a z 1 NBD (viz obr. 2) ABCG2 je vysoko exprimovaný v placentárnych syncytiotrofoblastoch, na apikálnej membráne epitelu tenkého čreva, na pečenej kanálikovej membráne, na luminálnom povrchu endotelových buniek mozgu a v proximálnych tubuloch obličiek, kde prispieva jednak k absorpcii, distribúcii a eliminácii liečiv a endogénnych zlúčenín, a aj k ochrane tkanív voči xenobiotikám (Mao, Q., Unadkat, J. D., 2014).

Svojou nadmernou expresiou v niektorých typoch nádorových buniek prispieva veľkou mierou k MDR, a to mechanizmom efluxu preukázaných chemoterapeutík: mitoxantron, metotrexát, gefitinib, imatinib, kamptotecin a 7-etyl-10-hydroxykamptotecin (SN-38, irinotekanové metabolity) (Zhang, L., Zhao, J., et al., 2017). Ďalšie triedy chemoterapeutík vrátane vinblastinu, cisplatinu a paklitaxelu, nepatria medzi substráty ABCG2 (Mao, Q., Unadkat, J. D., 2014). Medzi iné vybrané substráty ABCG2 sa radia statíny, konjugáty so sulfátom, porfyríny (International Transporter Consortium et al., 2010). Objavili sa určité dôkazy, že ABCG2 je v črevách hlavný determinant biodostupnosti a účinnosti perorálne podávaných substrátov ABCG2, napríklad topotekanu (Kruijtzter et al., 2002). Navyše, ABCG2 je vysoko exprimovaný v kmeňových nádorových bunkách (Haraguchi et al., 2006). Touto skutočnosťou sú nádorové kmeňové bunky rezistentné na chemoterapeutiká, po chemoterapii prežívajú a nakoniec sa diferencujú na zrelé nádorové bunky (Stacy et al., 2013). Úplne prvým identifikovaným špecifickým inhibítorom ABCG2 bol fumitremogin C, izolovaný z *Aspergillus fumigatus*, a to paradoxne ešte predtým, než bol ABCG2 naklonovaný (Rabindran et al., 2000). V súčasnosti sa však klinicky nepoužil žiadny inhibítor špecificky zameraný na ABCG2 (Yamazaki et al., 2011).

### 3.2. Inhibítory poly(ADP-ribóza)polymerázy

DNA buniek je neustále napádané, pričom útoky môžu pochádzať z exogénnych alebo endogénnych zdrojov. Najbežnejšou formou poškodenia DNA sú lézie na jednej báze a jednovláknové zlomy (single-strand break, SSB), zatiaľ čo dvojitý vláknový zlom (double strand break, DSB) tvoria najtoxickejšiu formu poškodenia DNA. Bez vhodných mechanizmov opráv môže poškodenie DNA spôsobiť nestabilitu genómu a prípadne aj podporovať rozvoj nádoru. SSB sú za bežných podmienok opravované cestou nahradzovania jednotlivých báz (BER, Base Excision Repair), kým DSB sú prednostne opravované homológnu rekombináciou (Homologous recombination, HR), ktorá je závislá na BRCA (breast cancer) génoch (Bochum et al., 2018).

Kľúčom k odpovedi na poškodenie DNA sú Poly(ADP-ribóza)polymerázy (PARP). Jedná sa o senzory poškodenia DNA a prevodníky signálu, ktoré fungujú na princípe syntézy negatívne nabitých rozvetvených poly(ADP-ribózových) (PAR) reťazcov (PARylácia) na cieľových proteínoch, ako forma posttranslačnej modifikácie (Lord & Ashworth, 2017; Satoh & Lindahl, 1992). Mechanizmus účinku PARP popisuje obrázok 6. Rodina PARP obsahuje 17 proteínov a všetky sú vybavené katalytickou doménou, hoci nie všetky katalyzujú ADP-ribozylovú akciu. V rámci tejto rodiny boli doteraz len PARP1, PARP2 a novšie aj PARP3 definované ako PARP závislé od poškodenia DNA (De Vos et al., 2012).



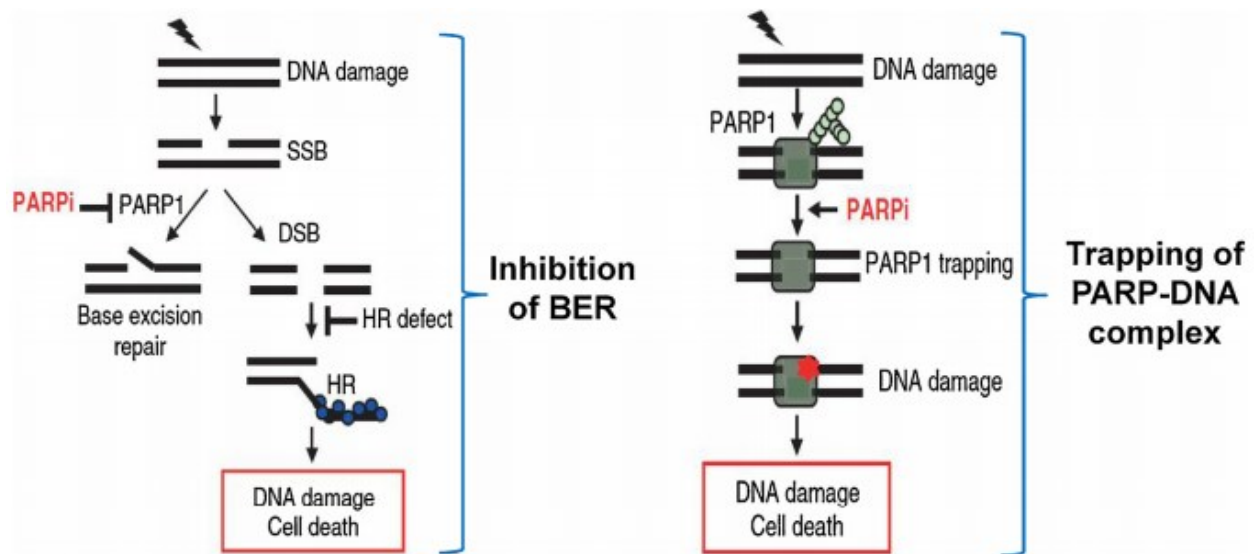
Obr. 6 Rola PARP pri oprave SSB mechanizmom BER

PARP rozpozná poškodenie DNA a priamo sa viaže na SSB. Aktivované PARP katalyzujú tvorbu poly(ADP-ribózových) (PAR) reťazcov za využitia  $NAD^+$  (nikotinamidadenindinukleotid) ako substrátu. Vo vhodnom momente tvorba PAR reťazcov taktiež riadi miestny nábor proteínov opravujúcich poškodenú DNA (napr. DNA ligáza III). Po opravení sú PAR reťazce degradované pomocou PAR glykohydrolázy (PARG).

Prevzaté z Toss, A., Cortesi, L., 2013

Inhibítory Poly(ADP-ribóza)polymerázy (PARPi) tvoria skupinu liečiv, ktoré sa zameriavajú na schopnosť bunky opravovať DNA. PARPi sú všeobecne benzamidy alebo purínové analógy nikotinamidu, ktoré súťažia s  $\text{NAD}^+$  na katalytickej doméne PARP (Mittica, Ghisoni et al., 2018). Reverzibilne inhibujú PARP1 a PARP2, proteíny hrajúce kritickú rolu v BER. Inhibíciou PARP dochádza k narušeniu opráv SSB, čo vedie ku akumulácii poškodenej DNA a k zachytávaniu PARP v jednovláknových zlomových miestach, a následne k inhibícii replikácie DNA (Lin, K. Y., & Kraus, W. L., 2017). Inhibícia PARP sa ukázala ako účinná stratégia liečby nádorov, ktoré zahŕňajú defekty mechanizmu opravy DNA (Heo Y. A. a Duggan S. T., 2018). Inhibítory PARP priťahujú veľký záujem ako potencionálne protinádorové látky od momentu, kedy Bryant et al. zaviedli koncepciu syntetickej letality (Ohmoto a Yachida, 2017). Keď je funkcia PARP pozastavená, chýba opravná cesta BER a dochádza ku akumulácii škodlivých DSB. V bunkách s chybnou HR nemôžu byť DSB opravené, čoho výsledkom je syntetická letalita (Liu, Tolaney, et al., 2013). V tomto prípade môžu nastať dve možnosti, buď je DNA opravená alternatívnymi (napr. nehomológna cesta spájania konca – NHEJ), na chybu náchylnejšími mechanizmami alebo ostáva neopravená, čo vedie k nestabilite genómu a k apoptóze buniek. Syntetickou letalitou rozumieme stav, ktorý predpokladá, že kombinácia dvoch alebo viacerých nedostatkov v nádoroch, jedného genetického a druhého liečivom indukovaného, by sa stala pre nádorové bunky letálnou, zatiaľ čo jeden nedostatok by bol sám o sebe znesiteľný (Durmus et al., 2014).

Nádorové bunky s defektnou HR sú zvlášť náchylne na inhibíciu BER sprostredkovanú PARPi (Kruse, V. et al., 2011). Zhrnutie mechanizmu PARPi popisuje obrázok 7.



Obr. 7. Mechanizmus akcie PARPi, založený na princípe syntetickej letality.

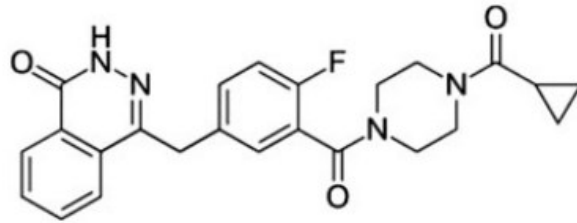
Prevzaté z D'Andrea, A. D., 2018

Od posledného preskúmania PARPi preukázali účinnosť v mnohých prostrediach, vrátane epitelialného nádoru vaječníkov senzitivného na platinu a nádoru prsníka s mutáciami BRCA1 alebo BRCA2 (Scott, C. L., et al., 2015).

Od decembra 2014 do júla 2017 boli na liečbu recidívy rakoviny vaječníkov schválené tri inhibítory poly(ADP-riboza)polymerázy (olaparib, rucaparib a niraparib) a očakáva sa schválenie pre ďalšie ochorenia (Bitler, B. G., et al., 2017).

### 3.2.1. Olaparib (Lynparza, AstraZeneca)

Je prvým perorálnym inhibítorom PARP navrhnutým tak, aby pôsobil ako kompetitívny inhibítor  $\text{NAD}^+$ , v katalytickom mieste PARP1 a PARP2 (Obr. 8). Po naviazaní na katalytickú doménu PARP1 a PARP2 účinne inhibuje PARyláciu pri nízkych nanomolárnych koncentráciach (Bochum et al., 2018). Protinádorovú aktivitu prejavuje aj schopnosťou chytiť do pasce inaktívne PARP na poškodenej DNA, vytvára komplexy PARP-DNA, ktoré sú viac toxické ako SSB a spôsobujú DSB (Murai et al., 2012). Prešiel rozsiahlymi klinickými štúdiami pričom bol testovaný na karcinóm vaječníkov, prs a prostaty. Jeho protinádorová účinnosť bola preukázaná u nádorov so zárodočnou mutáciou génu BRCA a v nižšej miere u sporadických nádorov vaječníkov.



Obr. 8 Štruktúra olaparibu

Prevzaté z Bochum et al., 2018

Olaparib bol schválený Food and Drug administration (FDA) v decembri 2014 a je indikovaný u pacientov so škodlivou zárodočnou mutáciou BRCA1 alebo BRCA2 a pokročilým karcinómom vaječníkov, ktorí dostali tri alebo viac predchádzajúcich režimov chemoterapie (Munroe, M., Kolesar, J., 2016).

Olaparib bol v roku 2017 schválený FDA na udržiavaciu liečbu dospelých pacientov s recidivujúcim epiteliálnym karcinómom vaječníkov, vajcovodov alebo primárnym peritoneálnym karcinómom, ktorí sú v úplnej alebo čiastočnej reakcii na chemoterapiu na báze platiny (Kurnit et al., 2018).

Účinnosť monoterapie olaparibom ako udržiavacej liečby sa hodnotila v randomizovaných, klinických štúdiách, do ktorých bolo zaradených viac ako 500 pacientov na celom svete, známych ako SOLO2 a STUDY 19. O tieto štúdie sa tiež opierala FDA pri schvaľovaní indikácii pre olaparib (Mittica, Ghisoni et al., 2018; Ethier et al., 2018).

SOLO2 bola medzinárodná, dvojito – zaslepená, randomizovaná, placebom kontrolovaná štúdia fázy III (Heo Y.A. a Dhillon S.T., 2018). STUDY 19 bola randomizovaná, dvojito – zaslepená, placebom kontrolovaná štúdia fázy II (Ledermann et al., 2012).

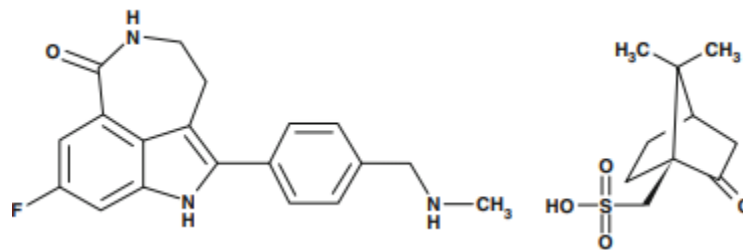
Niekoľko štúdií fázy III v súčasnosti prijíma pacientov na štúdium bezpečnosti a účinnosti monoterapie olaparibom v rôznych klinických podmienkach a typoch nádorov. Doteraz boli hlásené údaje z jednej randomizovanej štúdie fázy III (OlympiAD) (Bochum et al., 2018). V tejto štúdií sa zamerali na sľubnú protinádorovú aktivitu olaparibu, kde porovnávali monoterapiu olaparibom so štandardnou terapiou u pacientov so zárodočnou BRCA mutáciou a ľudským epidermálnym rastovým faktorom receptora typu 2 (HER2) – negatívny metastatický karcinóm prsníka, ktorí nedostali viac ako dva predchádzajúce režimy chemoterapie pre metastatické



ochorenie. Ukázalo sa, že monoterapia olaparibom poskytla významný prínos v porovnaní so štandardnou terapiou u pacientov s HER2 – negatívnym metastatickým karcinómom prsníka a zárodočnou mutáciou BRCA génu (Robson et al., 2017). Ak by bol olaparib v tejto indikácii schválený, tak by bol metastatický karcinóm prsníka jeho treťou indikáciou.

### 3.2.2. Rucaparib

Rucaparib je účinný perorálny inhibítor PARP (PARP1, PARP2, PARP3) s malou molekulou (viz obr. 9), ktorý bol vyvinutý spoločnosťou Clovis Oncology, Inc. a preukázal v preklinických aj klinických štúdiách aktivitu pri karcinóme vaječníkov, ako aj iných druhoch solídnych nádorov (Syed, Y.Y., 2017; Colombo et al., 2018). Rucaparib taktiež inhibuje tankyrázu 1, ďalšieho člena PARP (Mittica, Ghisoni et al., 2018). Okrem inhibičnej aktivity pôsobí aj mechanizmom vytvárania toxických PARP-DNA komplexov (Turk & Wisinski, 2018).



Obr. 9 Chemická štruktúra rucaparibu

Prevzaté zo Syed, S.S., 2017

Kľúčové údaje o klinickej účinnosti rucaparibu sa primárne poskytujú z troch štúdií (Study 10, ARIEL 2, ARIEL 3). Study 10 bola dvojfázová (Phase I / II), otvorená multicentrická štúdia, ktorá stanovila doporučenú dávku samotného rucaparibu na 600 mg dvakrát denne, na základe zvládnuteľnej toxicity a klinickej aktivity. ARIEL 2 bola dvojdielna otvorená medzinárodná multicentrická štúdia, ktorá patrila do fázy II klinického skúmania. Hodnotila rucaparib u pacientov s recidivujúcim, na platínu senzitívnym vysoko závažným seróznym alebo endometriálnym nádorom vaječníkov, ktorí mali najmenej jednu liečbu platinou za sebou. Study 10 a ARIEL 2 preukázali znášateľnosť a účinnosť liečby rucaparibom u pacientov s nádorom vaječníkov, čo viedlo k štúdiu ARIEL 3, v ktorej sa hodnotilo použitie rucaparibu pre udržiavacie na platínu senzitívne nastavenie liečby. ARIEL 3 bola randomizovaná, dvojito - zaslepená,

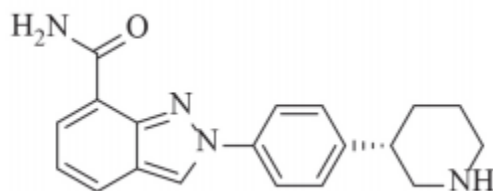
placebom kontrolovaná štúdia fázy III hodnotiaca účinnosť a bezpečnosť rucaparibu u pacientov so seróznym alebo endometriálnym nádorom vaječníkov citlivým na platínu, ktorí dostali čiastočnú alebo úplnú odpoveď na svoju liečbu platinovou chemoterapiou a mali normálnu hladinu Ca – 125 (nádorový marker) (Cosgrove & O'Malley, 2018).

V roku 2016 bol rucaparib schválený FDA na liečbu pacientov so škodlivou BRCA mutáciou (zárodočnou a /alebo somatickou) spojenou s pokročilým nádorom vaječníkov, ktorí boli liečení dvoma alebo viacerými chemoterapiami (Kurnit et al., 2018).

V roku 2018 bol rucaparib FDA schválený na udržiavaciu liečbu opakujúcich sa epiteliálnych nádorov vaječníkov, nádorov vajcovodov alebo primárnych peritoneálnych nádorov u pacientov, ktorí sú v úplnej alebo čiastočnej reakcii na chemoterapiu na báze platiny (Kurnit et al., 2018).

### 3.2.3. Niraparib (Zejula)

Niraparib je perorálne dostupný vysoko selektívny a účinný inhibítor PARP1 a PARP2. (viz. obr. 10). Tak ako aj vyššie spomínané PARPi, je schopný vytvárať toxické PARP-DNA komplexy (Turk & Wisinski, 2018).



Obr. 10 Chemická štruktúra niraparibu

Prevzaté zo Shah et al., 2018

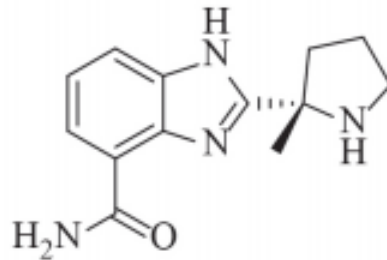
Niraparib bol schválený FDA v roku 2017 na udržiavaciu liečbu u pacientov s recidivujúcim epiteliálnym nádorom vaječníkov, vajcovodov alebo s primárne peritoneálnym nádorom citlivým na liečbu platinou, ktorí mali úplnú alebo čiastočnú odpoveď na chemoterapiu na báze platiny (Essel, K. G. a Moore, K. N., 2018).

Táto indikácia bola schválená na základe dát publikovaných v štúdiu NOVA vo fáze III klinického testovania. Jednalo sa o dvojito – zaslepenú, placebom kontrolovanú randomizovanú štúdiu. Vhodnými pacientmi boli ženy s recidivujúcim nádorom vaječníkov citlivým na platínu s prevažne vysokými stupňami seróznej histológie alebo so zárodočnou mutáciou BRCA, ktoré predtým dostali najmenej dva chemoterapeutické režimy na báze platiny. Účastníci boli náhodne vybraní na udržiavaciu liečbu niraparibom (300 mg raz denne) alebo placebom až do progresie alebo neprijateľnejšej toxicity. Táto štúdia splnila svoj primárny cieľ predĺženia prežitia bez progresie vo všetkých troch perspektívne definovaných kohortách (gBRCA – so zárodočnou mutáciou BRCA, non – gBRCA – bez zárodočnej mutácie BRCA, non – gBRCA HRD – positive – bez zárodočnej mutácie BRCA s defektnou homológnu rekombináciou) (Moore et al., 2018; Ethier et al., 2018).

NOVA sa stala prvou štúdiou fázy III, ktorá preukázala klinický prínos PARPi v populácii pacientov bez mutácie BRCA, čím sa niraparib stal prvým inhibítorom PARP, ktorý bol schválený v indikácii udržiavacej terapie po liečbe na báze platiny pre recidivujúci nádor vaječníkov, bez ohľadu na stav BRCA (Moore et al., 2018; Berek et al., 2018).

#### **3.2.4. Veliparib**

Veliparib je silný PARP inhibítor (PARP1, PARP2) s chemosenzitizačnými a protinádorovými účinkami, ktorý v porovnaní s vyššie spomínanými inhibítormi nemá FDA schválenie na použitie v terapii nádoru vaječníkov, a okrem tohto faktu sa ešte odlišuje chýbajúcim mechanizmom účinku, vytvárania toxických PARP–DNA komplexov (Turk & Wisinski, 2018). Od roku 2012 do roku 2017 bolo uverejnených 9 štúdií s veliparibom: 2 ako monoterapia a 7 v kombinovanej terapii (Christine Walsh, 2018; Taylor K.N. a Eskander R.N., 2018). Chemickú štruktúru olaparibu popisuje obrázok 11.



Obr. 11 Chemická štruktúra veliparibu

Prevzaté zo Shah et al., 2018

V roku 2015 Coleman et al. publikovali výsledky zo štúdie fázy II, kde hodnotili monoterapiu veliparibom u pacientov s perzistentným alebo recidivujúcim nádorom epitelu vaječníkov, vajcovodov alebo s primárne peritoneálnym nádorom, ktorí boli nositeľmi zárodočnej mutácie BRCA. Štúdia dospela k záveru, že účinnosť monoterapie a znášanlivosť veliparibu pre recidivujúci nádor vaječníkov spojený s BRCA mutáciou, si vyžaduje ďalšie vyšetrenie (Coleman et al., 2015).

V roku 2017 Steffensen et al. publikovali výsledky štúdie fázy 1/2 hodnotiacej monoterapiu veliparibom u pacientov so zárodočnou mutáciou BRCA a na platinu rezistentným alebo čiastočne na platinu citlivým recidivujúcim epiteliálnym nádorom vaječníkov. Zo záveru tejto štúdie vyplýva, že liečba veliparibom u ťažko preliečených pacientov s relapsom nádoru vaječníkov preukazuje značnú účinnosť s prijateľným profilom toxicity (Steffensen et al., 2017).

V iných štúdiách sa skúmala účinnosť veliparibu v kombinovanej terapii. Do dnešného dňa nebola preukázaná presvedčivá klinická účinnosť veliparibu, ale aktivita a znášanlivosť v počiatočných fázach je napriek tomu atraktívna a pravdepodobnosť schválenia FDA závisí od výsledkov prebiehajúcich štúdií fázy III.

## 4. Cieľ práce

Naším cieľom bolo stanoviť inhibičnú mieru a rozsah interakcií vybraných inhibítorov PARP (olaparib, rucaparib, niraparib, veliparib) s ľudskými efluxnými transportérmi (ABCB1, ABCG2, ABCC1). Pre tento účel sme využili akumuláčn  štúdie so štandardne pou ivanými fluorescen nymi substrátmi v MDCKII bunkových l niach s a bez overexpresie študovaných transportérov.

## 5. Experimentálna časť

### 5.1. Materiál a metódy

#### 5.1.1. Chemikálie

- Calcein AM, Thermo Fisher Scientific, (Waltham, MA, USA)
- Daunorubicín (DAU), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Fetálne bovinné sérum (FBS), PAA Laboratories (Pasching, Rakúsko)
- Fosfátový pufer (PBS), Lonza (Walkersville, MD, USA)
- Hoechst 33342, Sigma-Aldrich (Waltham, MA, USA)
- Ko143, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- LY335979, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Mitoxantrón (MTX), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- MK-571, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Niraparib, SelleckChem, (Houston, TX, USA)
- Opti-MEM, Lonza (Walkersville, MD, USA)
- Olaparib, SelleckChem, (Houston, TX, USA)
- Rucaparib, SelleckChem, (Houston, TX, USA)
- Trypsín, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Veliparib, SelleckChem, (Houston, TX, USA)

#### 5.1.2. Prístroje

- Inkubátor SANYO MCO-18AC (UV) (Honmachi, Moriguchi City, Osaka)
- Prietokový cytometer Sony SA3800 (Viedeň, Rakúsko)
- Laboratórne váhy Kern 770 (Ziegelei, Balingen, Nemecko)
- Laminár Jouan (Saint-Herblain, Francúzsko)
- Optický mikroskop Optika XDS-2 (Poteranica, BG, Taliansko)
- Destičkový reader, Infinite M200 (Tecan, Salzburg, Rakúsko)

### 5.1.3. Bunkové línie

Bunková línia MDCK (Madin - Darby canine kidney) bola prvýkrát izolovaná v septembri 1958 z obličkových buniek samičky kokeršpaniela dvojicou S. H. Madin a N. B. Darby. Spočiatku sa MDCK bunky využívali na štúdium vírusových infekcií, neskôr našli svoje široké uplatnenie v štúdiu vývoja epitelu a jeho funkcie. Pre naše experimentálne účely sme využívali podtyp MDCKII, získaný z vyšších pasáži parentných MDCK buniek. Tento podtyp bunkovej línie poskytuje neoceniteľný nástroj na pochopenie polarity, vývoja a organizácie epitelových buniek (Dukes et al., 2011). Bunky MDCKII sa často používajú v obojsmerných transportných testoch v štúdiách funkčného zapojenia efluxných transportérov (Song et al., 2018). Okrem parentných MDCKII buniek, ktoré vykazujú bazálnu expresiu psích transportérov, sme využívali aj bunky transdukované ľudskými efluxnými transportermi (MDCKII–ABCB1, MDCKII–ABCG2, MDCKII–ABCC1).

Išlo nám o porovnanie spomenutých parentných a transdukovaných buniek, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu v MDR, aby sme boli schopní stanoviť rozsah interakcií medzi ABC liekovými transportermi a ich inhibítormi. Bunky pre náš výskum poskytol Dr. Alfred Schinkel a Prof. Piet Borst z Holandského ústavu pre rakovinu sídliaceho v Amsterdame.

### 5.1.4. Pasážovanie

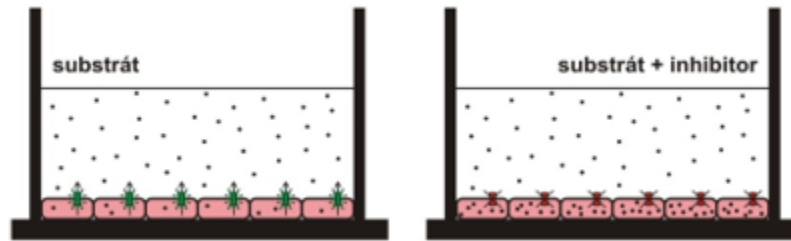
Práca s MDCKII bunkami si vyžadovala rutinnú starostlivosť o kultivačné podmienky, ktoré by mali napodobniť fyziologické (*in vivo*) prostredie, a ktoré hlavne zahrňovali pravidelnú (každé 3 – 4 dni) pasáž za sterilných podmienok. Bunky boli kultivované v DMEM médiu s prídavkom 10 % FBS bez obsahu antibiotík. Po namnožení sa buniek do minimálnej konfluencie 70 % sa začalo odsávať staré médium, bunky sa prepláchli predhriatým PBS pufrom a pridalo sa 1 ml trypsínu. Bunky sa trypsinizáciou oddelili od dna 25 cm<sup>2</sup> kultivačnej nádobky. Pridalo sa 4 ml nového média, čím sa inaktivoval trypsin a bunky sa začali resuspendovať. Takto resuspendovaná suspenzia sa potom umiestnila vo vhodnom množstve (vychádzalo sa z východiskovej konfluencie) do novej kultivačnej nádobky s celkovým objemom nového média 7 ml. Kultivácia buniek prebiehala v inkubátore s nastavenou teplotou na 37°C a v atmosfére s minimálne 5 % obsahom CO<sub>2</sub>. Úspešnosť práce zabezpečovala sterilita prostredia laminárneho boxu, v ktorom celý proces pasážovania prebiehal.

### 5.1.5. Akumulačná esej s hoechstom 33342 a calceinom AM

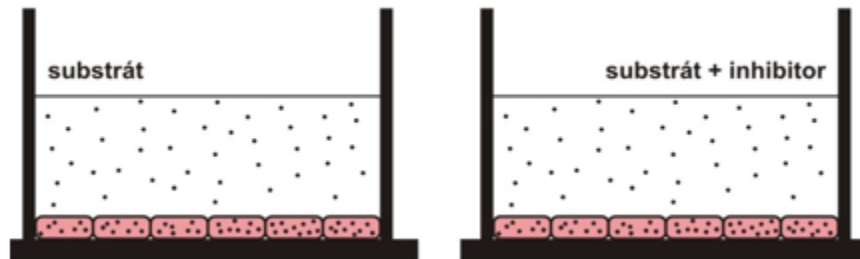
Akumulačné štúdie sú založené na meraní intenzity fluorescencie špecifických substrátov, v tomto prípade hoechsta 33342 a calceinu AM. Po pridaní inhibítorov ABC liekových efluxných transportérov, ktoré zablokujú eflux substrátov z intracelulárneho prostredia, dochádza k zvýšeniu koncentrácie, a tým aj fluorescencie týchto substrátov v bunke (viz obr. 12, 13). Hoechst 33342 je prefluorogenná látka, ktorá fluoreskuje po naviazaní na bunkové jadro (pri naviazaní sa fluorescencia výrazne zvyšuje). Jednou z výhod tohto farbiva je, že prechádza bunkovou membránou čiže zafarbuje aj živé bunky. Hoechst 33342 sa viaže na oblasti DNA bohaté na adenín – tymín (Chazotte B, 2011). Použili sme ho k detekcii inhibície efluxných transportérov ABCB1 a ABCG2. Calcein AM, acetomethoxy derivát calceinu, je substrát používaný k detekcii inhibície efluxného transportéra ABCC1. Calcein AM fluoreskuje až po transporte cez bunkovú membránu živej bunky, kde je esterázami konvertovaný na fluorescencie schopný calcein.

Aby bunky narástli do dostatočnej konfluencie (100 %) a vytvorili tak konfluentnú monovrstvu (s hrúbkou jednej bunky), boli nasadené v počte 55 000/jamka/100  $\mu$ l pre ABCC1 a parentné bunky, 50 000/jamka/100  $\mu$ l pre ABCB1, 60 000/jamka/100  $\mu$ l pre ABCG2, na 96 jamkovú doštičku a kultivované 24 hodín. Po odstránení média sa bunky dvakrát opláchli predhriatým pufrom PBS (100  $\mu$ l) použitím multikanálovej pipety. Následne sa do určitých jamiek pridávalo 90  $\mu$ l opti-MEM média, a to buď s kontrolnými inhibítormi (25  $\mu$ M MK571, 1  $\mu$ M LY335979, 1  $\mu$ M Ko143) alebo sledovanými potenciálnymi inhibítormi (rucaparib, niraparib, veliparib, olaparib) v päťstupňovom koncentračnom rozmedzí 1, 5, 10, 25, 50  $\mu$ M. Jamky, kde bol samotný Opti-MEM, nám slúžili ako kontrola (90  $\mu$ l) alebo background (100  $\mu$ l). Po 15 minútovej inkubácii (37 °C) sa do jamiek (okrem backgroundu) pridávali spomínané substráty, tzn. 2  $\mu$ M calcein AM alebo 5  $\mu$ M hoechst 33342 (uvedené koncentrácie sú cieľové) v množstve 10  $\mu$ l, a to pomocou opakovacej pipety, aby nedošlo k časovému posunu medzi vzorkami. Hladiny substrátov sa merali pri vlnových dĺžkach exc. 350/em. 465 nm pre hoechst 33342 a exc. 485 nm/em. 535 nm pre calcein AM po dobu 30 minút v jednominútových intervaloch. Na meranie fluorescencie sme použili Tecan Infinite M200. Intenzita fluorescencie by mala byť tým vyššia, čím vyššia je koncentrácia substrátov v bunke, resp. čím vyššia je inhibícia.





Obr. 12 Schematické znázornenie akumuláčného experimentu v prípade MDCKII buniek transdukovaných ľudskými ABC transportérmi. Na ľavej strane obrázka bol pridaný len substrát. Môžeme vidieť masívny eflux substrátu prostredníctvom aktívneho transportéra a jeho nízku akumuláciu v bunkách. Vpravo po pridaní inhibítora došlo k inhibícii efluxu substrátu deaktiváciou transportéra a zvýšila sa aj jeho koncentrácia v bunkách.



Obr. 13 Schematické znázornenie akumuláčného experimentu v prípade parentných MDCKII buniek. V oboch prípadoch nie je prítomný žiaden transportér, teda nie je prítomný eflux substrátu a dochádza k jeho vysokej akumulácii v bunkách.

#### 5.1.6. Akumulačná esej s daunorubicinom a mitoxantronom

Princíp akumuláčnej štúdie je rovnaký ako v podkapitole 5.1.5, líši sa len použitím iných substrátov, prípravou vzoriek a metódou detekcie substrátov. V tomto prípade sme používali cytostatické substráty DAU (MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCC1, parentné MDCKII) a MTX (parentné MDCKII, MDKCII-ABCG2). Schopnosť týchto substrátov fluoreskovať je daná tým, že obsahujú vo svojej štruktúre rovinný chromofór bohato zastúpený elektrónmi, podobný polycyklickému farbivu.

Na zrealizovanie experimentu bolo potrebné dosiahnuť minimálne 70% konfluenciu. Bunky boli preto nasadené v počte 150 000/jamka/1 ml pre MDCKII-ABCB1, 220 000/jamka/1

ml pre parentné MDCKII a MDCKII-ABCC1, 250 000/jamka/1 ml pre MDCKII-ABCG2 na 12 jamkovú doštičku v duplikáte a kultivované po dobu 24 hodín. Po odsatí média sa bunky opláchli predhriatým PBS pufrom (500  $\mu$ l). Následne sa do určitých jamiek postupne pridával čerstvý Opti-MEM v objeme 500  $\mu$ l obohatený buď o modelové inhibítory (viz. podkapitola 5.1.4.), sledované látky alebo samotný Opti-MEM, ktorý slúžil v jednom prípade ako kontrola a v druhom ako background. Bunky sa nechali 10 minút preinkubovať pri teplote 37 °C. Do jamiek, okrem backgroundu, sa pridal vhodný cytostatický substrát, a to buď 4  $\mu$ l 250  $\mu$ M DAU alebo 10  $\mu$ l 50  $\mu$ M MTX (cieľové koncentrácie 2  $\mu$ M pre DAU a 0,5  $\mu$ M pre MTX) a nasledovala 1 hodinová inkubácia. Po uplynutí času inkubácie sa bunky uložili na ľadovú dosku. Odsalo sa médium, bunky sa opláchli ľadovým PBS pufrom, pridal sa ľadový trypsin bez fenolovej červene (50  $\mu$ l). Bunky sa nechali 4 minúty trypsinizovať, a potom sa rozsuspendovali pipetovaním v 450  $\mu$ l PBS s 2% FBS. Na meranie sme použili 0,5 ml vzorku odpipetovaného do skúmavky. Hladiny substrátov sa merali pri vlnových dĺžkach exc. 488/em. 670 nm pre DAU a exc. 633 nm/em. 660 nm pre MTX. V tomto prípade sme intenzitu fluorescence merali na prístroji SONY SA3800.

#### 5.1.7. Štatistická analýza

Z hodnôt fluorescence boli vypočítané akumulčné pomery (podiel fluorescence danej varianty k neovplyvnenej kontrole v príslušnej línii), ktoré sú zobrazené v grafoch. V softvéri GraphPad Prism verzia 7 (La Jolla, CA, USA) bola analyzovaná štatistická významnosť rozdielu medzi hodnotami pomeru (rôzne varianty v porovnaní s kontrolou), a to pomocou analýzy One-way ANOVA nasledované Dunnettovým post-hoc testom. Štatisticky významné hodnoty boli označené nasledovne:  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

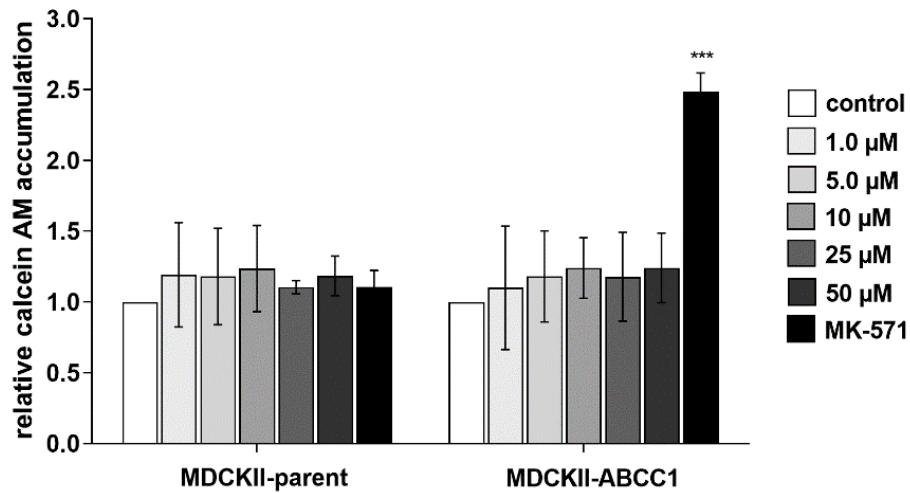
## 6. Výsledky a diskusia

Inhibícia PARP je sľubný nový terapeutický prístup v terapii nádorov, ktoré vykazujú defekty v HR. Zatiaľčo znalosti o farmakodynamickom správaní sa PARP inhibítorov sú dobre popísané, ich farmakokinetické vlastnosti, konkrétne interakcie s ABC liekovými efluxnými transportérmi, neboli doposiaľ detailne popísané. V našej práci sme preto uskutočnili sériu akumulčných experimentov s použitím bunkových línií exprimujúcich ľudské efluxné transportéry ABCB1, ABCC1 a ABCG2, a popísali interakčný potenciál týchto látok.

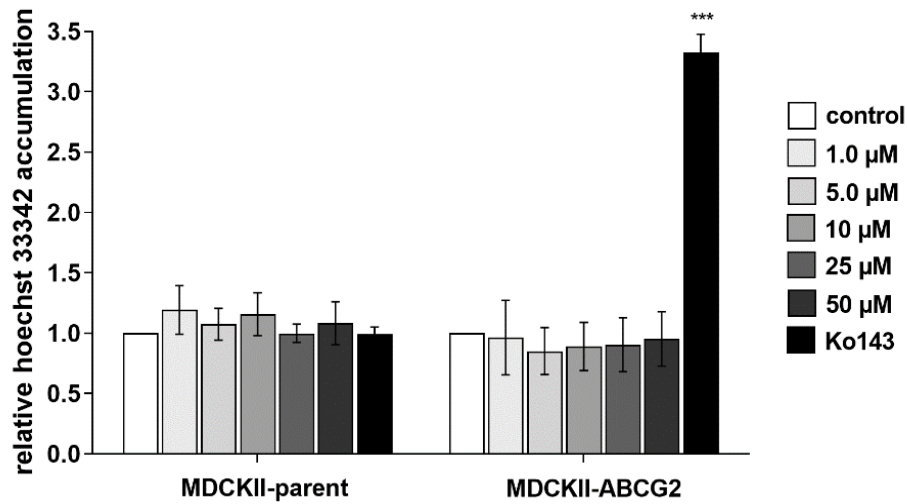
### 6.1. Olaparib

Na základe grafov A, B, C obrázka 14 je isté, že ani v jednom prípade nedochádza k signifikantnej inhibícii skúmaných efluxných transportérov olaparibom.

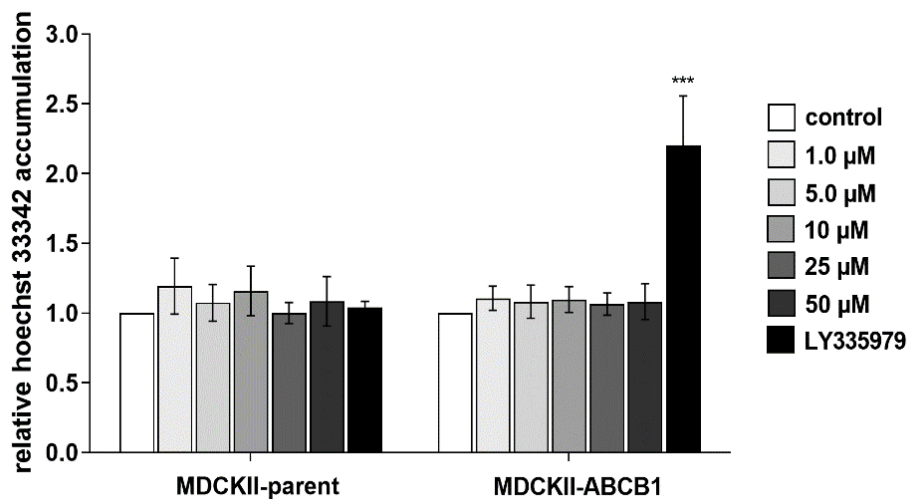
A)



B)



C)

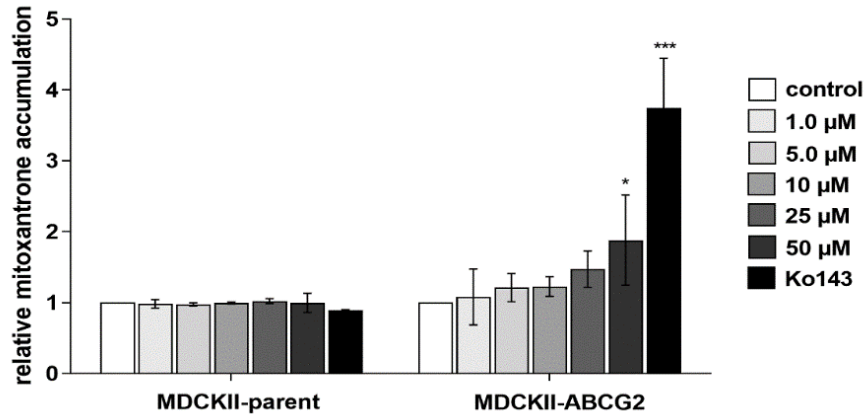


Obr. 14 Grafické znázornenie akumulácie substrátov hoechst 33342 a calcein AM inhibíciou ABC efluxných transportérov ABCC1 (A), ABCG2 (B), ABCB1 (A) olaparibom. Ako kontrolné inhibítory sme použili MK-571 (25  $\mu\text{M}$ ), Ko143 (1  $\mu\text{M}$ ), LY335979 (1  $\mu\text{M}$ ). Spracované dáta sú prezentované ako priemer z troch nezávislých experimentov  $\pm$  smerodajná odchýlka.

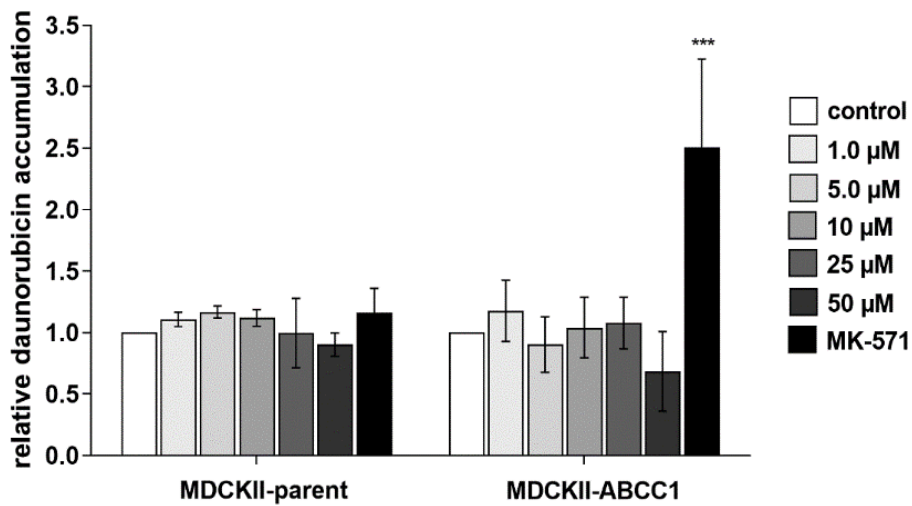
Trend vzostupu akumulácie prostredníctvom olaparibu bol pozorovaný len v prípade MDCKII-ABCG2 línie a MTX ako modelového substrátu (obr. 15 A). Napriek tomu štatisticky významnú inhibíciu sme zaznamenali len pri najvyššej koncentrácii (50  $\mu\text{M}$ ). Zaujímavé však je,

že sa táto inhibícia neprejavila v prípade použitého substrátu hoechst 33342 (obr. 14 B). Olaparib môžeme označiť ako látku s veľmi nízkym inhibičným potenciálom vo vzťahu k transportérom ABCB1, ABCG2 a ABCC1.

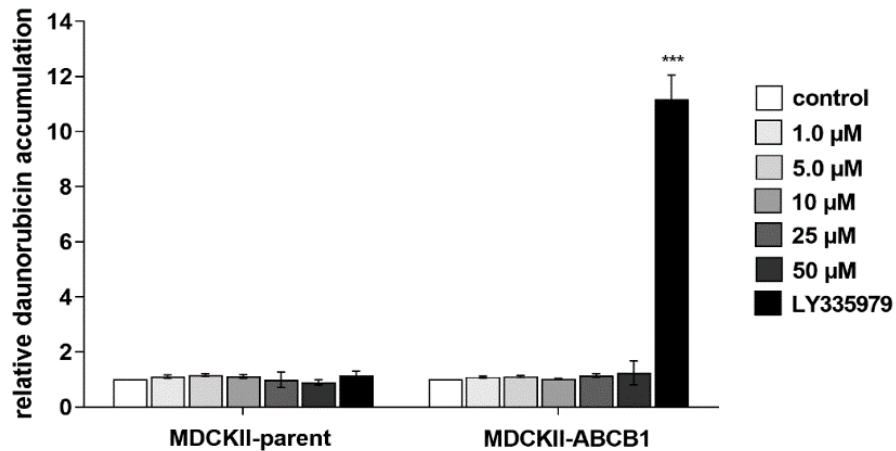
A)



B)



C)



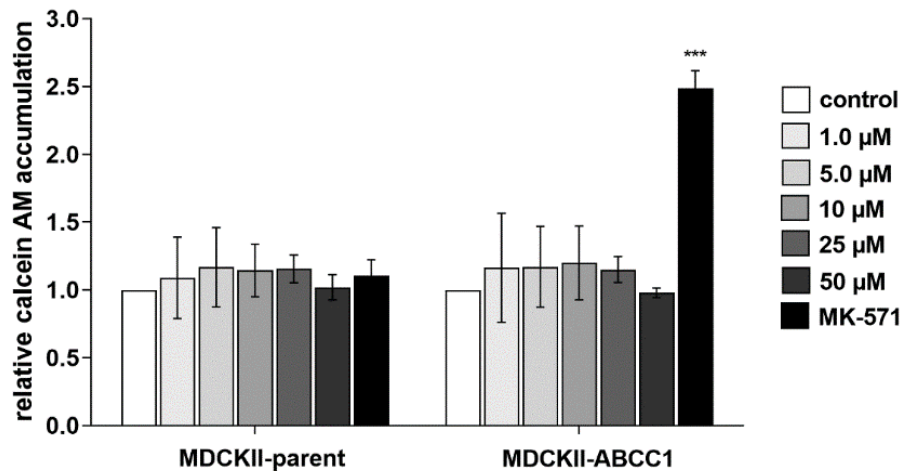
Obr. 15 Grafické znázornenie akumulácie substrátov DAU a MTX inhibíciou ABC efluxných transportérov ABCG2 (A), ABCC1 (B), ABCB1 (A) olaparibom. Ako kontrolné inhibítory sme použili MK-571 (25 μM), Ko143 (1 μM), LY335979 (1 μM). Spracované dáta sú prezentované ako priemer z troch nezávislých experimentov ± smerodajná odchýlka.

McCormick a Swaisland (2016) popísali inhibíciu ABCG2 (47% pri 100 μM), ale na rozdiel od nás sa im podarilo potvrdiť aj inhibíciu ABCB1 týmto PARPi. 100% inhibíciu ABCB1 zaznamenali pri koncentrácii 500 μM a IC<sub>50</sub> stanovili na 76,6 μM. Nám sa túto inhibíciu nepodarilo zachytiť ani v jednom prípade použitého substrátu. Môže to byť zapríčinené použitím nízkych koncentrácií olaparibu, v porovnaní s ich experimentom (McCormick, A., & Swaisland, 2016).

Ďalšie dostupné vedecké články uvádzajú, že olaparib je substrátom ABCB1, ale o inhibičnom vplyve na transportéry sa nezmieňujú (Lawlor et al., 2014; De Gooijer et al., 2018).

## 6.2. Rucaparib

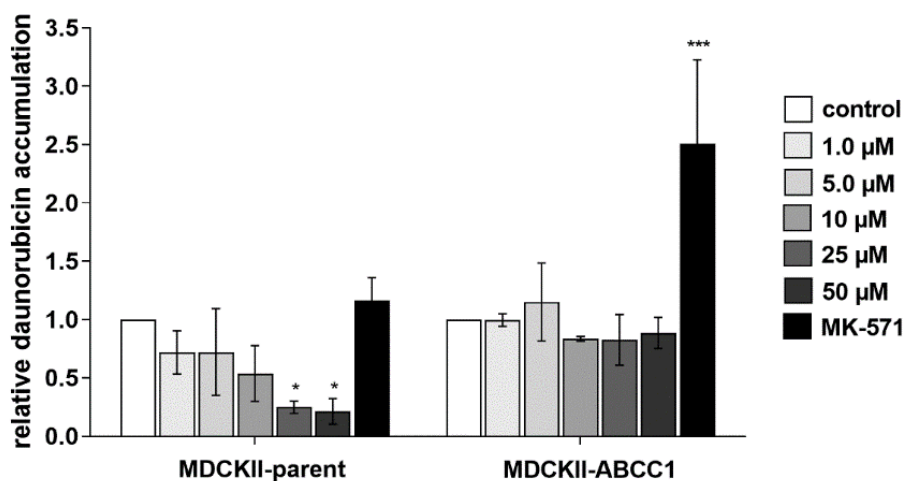
Graf na obrázku 16 nenaznačuje žiaden inhibičný vplyv rucaparibu smerom k ABCC1. Efekt rucaparibu na aktivitu transportérov nebol sledovaný s využitím substrátu hoechst 33342, pretože rucaparib v tomto prípade vykazoval interferujúce fluorescenčné vlastnosti.



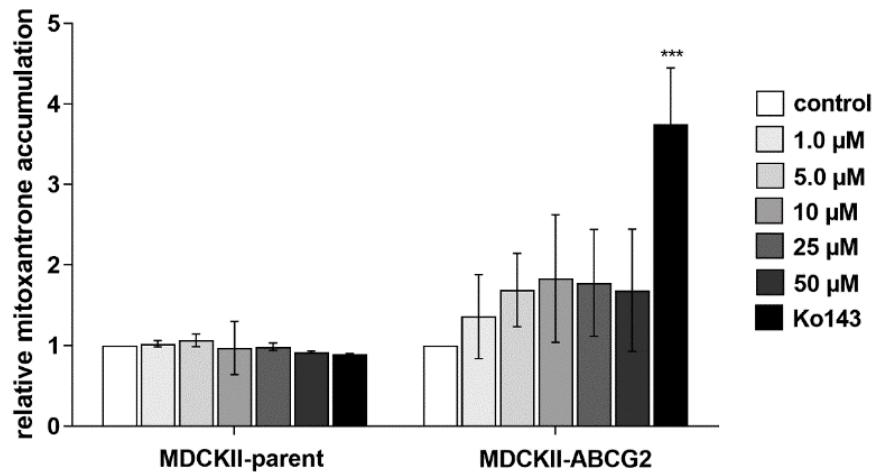
Obr. 16 Grafické znázornenie akumulácie substrátu calcein AM inhibíciou ABC efluxného transportéra ABCC1 rucaparibom. Ako kontrolný inhibítor sme použili MK-571 (25 μM). Spracované dáta sú prezentované ako priemer z troch nezávislých experimentov ± smerodajná odchýlka.

Z obrázka 17 B je zrejмый trend vzrastu akumulácie MTX v MDCKII-ABCG2 línii, ale aj napriek tomu, ani v jednej z testovaných koncentrácií nedošlo k signifikantnému nárastu. Taktiež u ostatných línii sme nepozorovali významné zmeny v akumulácii po expozícii rucaparibu (obr. 17 A, 17 C). Môžeme tak konštatovať, že rucaparib nevykazuje interakčný potenciál vo vzťahu k transportérom ABCB1, ABCG2 a ABCC1.

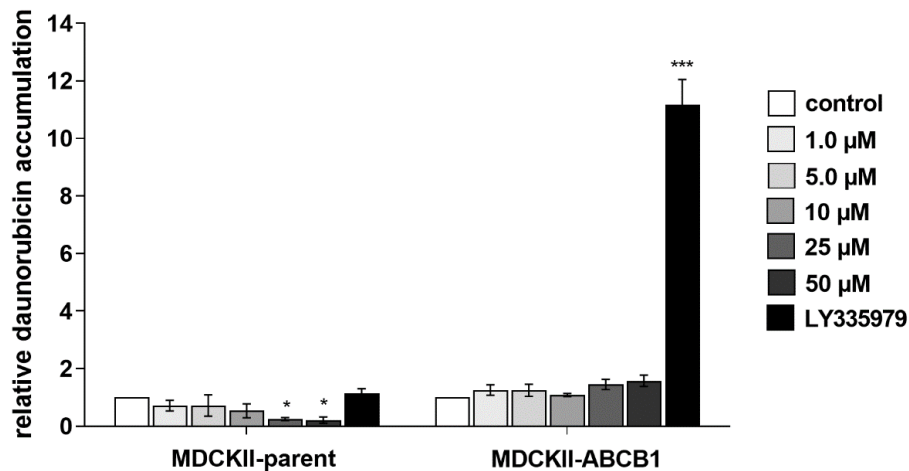
A)



B)



C)



Obr. 17 Grafické znázornenie akumulácie substrátov DAU a MTX inhibíciou ABC efluxných transportérov ABCB1 (A), ABCG2 (B), ABCB1 (A) rucaparibom. Ako kontrolné inhibítory sme použili MK-571 (25 μM), Ko143 (1 μM), LY335979 (1 μM). Spracované dáta sú prezentované ako priemer z troch nezávislých experimentov ± smerodajná odchýlka.

Aj keď v tomto experimente parentné bunky zohrávali úlohu kontroly, u ktorej väčšinou nedochádza k zmenám, v grafoch 17 A a C sme sa u parentných buniek stretli s nezvyčajným javom, ktorý stojí za povšimnutie. V oboch prípadoch došlo pri koncentráciách 25 μM a 50 μM k signifikantnému poklesu akumulácie DAU. Napadlo nás, že by sa mohlo jednať o cytotoxicitu.

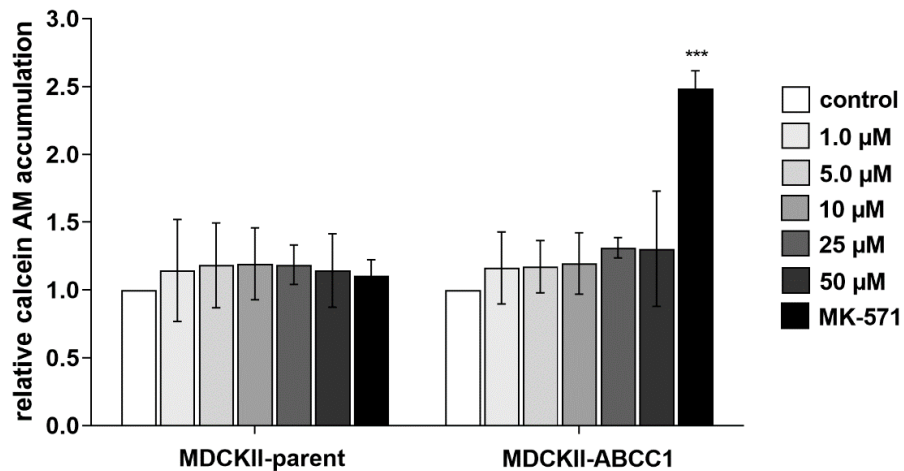


Toto podozrenie sa však nepotvrdilo, keďže z východiskových cytometrických dát vyplývalo, že bunky boli pri koncentráciách rucaparibu 25  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  približne rovnako viabilné, ako v prípade kontroly (nedošlo k posunu jednotlivých viabilných subpopulácií smerom k populácii apoptotickej, či zastupujúcej bunkovú debris). Nemožno vylúčiť, že sa jedná o interakciu s inými transportnými mechanizmami substrátu DAU (napr. inhibícia influxného systému). S touto myšlienkou sa opierame o poznatky z odborného článku demonštrujúceho, že ľudský organický kationový transportér 1 (OCT1) je zapojený do vysokoafinitného transportu DAU (Andreev et al., 2016). Informácie o funkčnej expresii endogenného Oct1 transportéra v MDCKII línii sme bohužiaľ nenašli, a preto túto hypotézu nie je možné potvrdiť. Ďalej sme sa už týmto javom nezaoberali, keďže to nebolo cieľom našej práce.

Z literatúry je známe, že rucaparib je substrátom dvoch efluxných transportérov, a to ABCB1 a ABCG2. Možnosťou inhibičnej aktivity tejto látky sa v týchto prácach nezaoberali (Syed, Y.Y., 2017; Parrish et al., 2015).

### 6.3. Niraparib

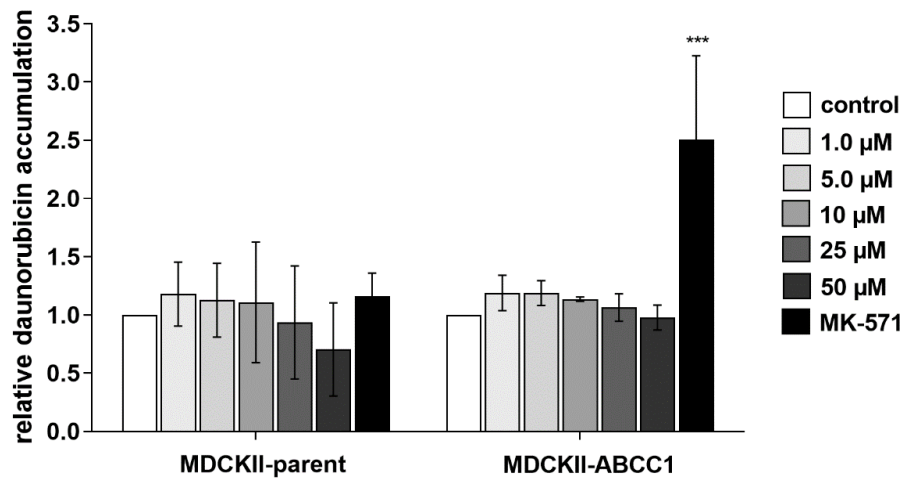
Na základe spracovaných dát obrázka 18 je jasné, že nami nebola zaznamenaná žiadna inhibícia rucaparibom smerom k ABCC1 efluxnému transportéru, a to ani pri najvyššej koncentrácií. Vplyv niraparibu na aktivitu transportérov nebol sledovaný s využitím substrátu hoechst 33342, pretože podobne ako rucaparib, i toto liečivo vykazovalo interferujúce fluorescenčné vlastnosti.



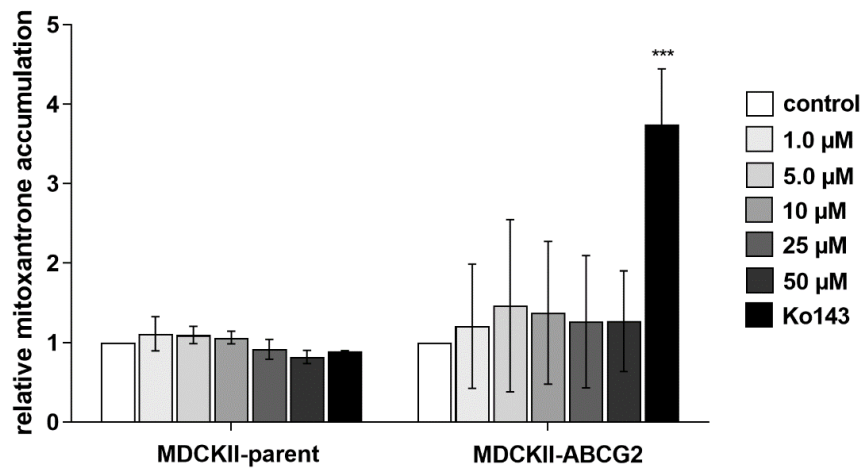
Obr. 18 Grafické znázornenie akumulácie substrátu calcein AM inhibíciou ABC efluxného transportéra ABCC1 niraparibom. Ako kontrolný inhibítor sme použili MK-571 (25 μM). Spracované dáta sú prezentované ako priemer z troch nezávislých experimentov ± smerodajná odchýlka.

Ako je vidieť na grafe C obrázka 19, u niraparibu sa so zvyšujúcou koncentráciou zvyšuje aj jeho inhibičný potenciál voči ABCB1. Nami nameraná štatisticky významná inhibícia bola už pri koncentrácií 10 μM. Na druhú stranu najvyššia nameraná hodnota inhibície (pri 50 μM) sa rovnala len cca 30% inhibičného efektu kontrolného inhibítora LY335979. Vzhľadom na hodnotu C<sub>max</sub> (2,5 μM) zistenú vo farmakokinetickej štúdií by táto interakcia pravdepodobne nemala šancu prejavíť sa v klinických podmienkach (Moore, K., Zhang, Z.-Y., et al., 2018). U ostatných línií nedošlo k vôbec žiadnej štatisticky významnej zmene akumulácie, preto je možné konštatovať, že podobne ako olaparib a rucaparib, rovnako niraparib disponuje mizivým inhibičným potenciálom voči ABCB1, ABCG2 a ABCC1.

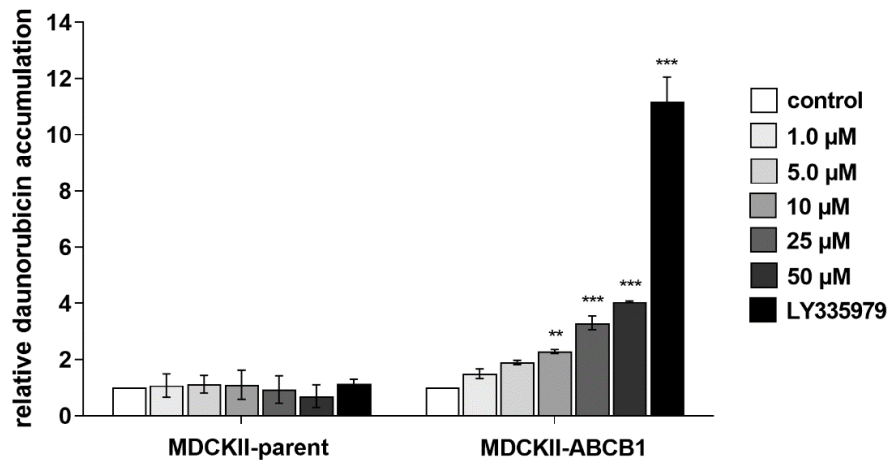
A)



B)



C)



Obr. 19 Grafické znázornenie akumulácie substrátov DAU a MTX inhibíciou ABC efluxných transportérov ABCC1 (A), ABCG2 (B), ABCB1 (A) niraparibom. Ako kontrolné inhibítory sme použili MK-571 (25 μM), Ko143 (1 μM), LY335979 (1 μM). Spracované dáta sú prezentované ako priemer z troch nezávislých experimentov ± smerodajná odchýlka.

Pri hľadaní podobnej problematiky sme narazili na článok, v ktorom autor popiera inhibíciu ABCB1 niraparibom a tvrdí, že je iba jeho substrátom (Moore et al., 2018). To v podstate koreluje s našimi výsledkami, kedy sme síce zistili štatisticky významnú inhibíciu, ale táto interakcia nie je potenciálne klinicky relevantná.

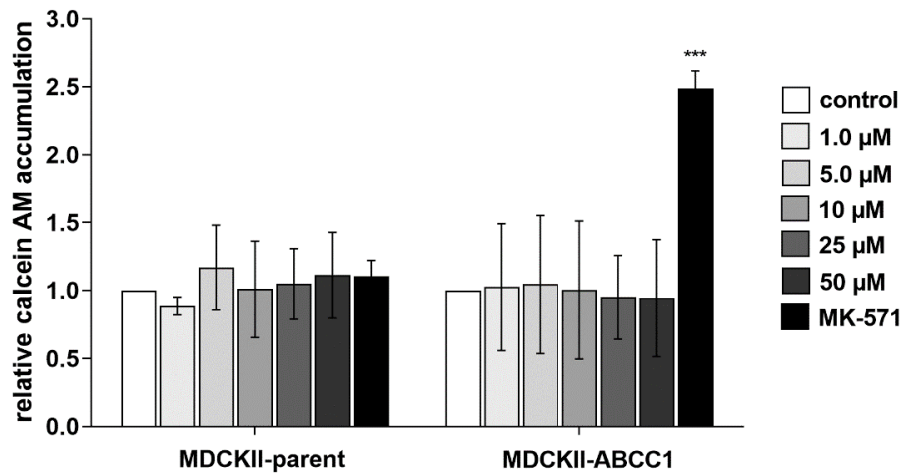
Naopak sa nám nepodarilo úplne potvrdiť hypotézu Heo Y. A. a Duggan S. T., ktorí vo svojej práci tvrdia, že niraparib inhibuje ABCG2 (Heo & Duggan, 2018). Obrázok 19 B síce naznačuje istý stúpajúci trend pri prvých dvoch najnižších koncentráciách, napriek tomu sa nejednalo o štatisticky významnú zmenu voči kontrole

Čo sa týka jeho substrátovej afinity, tak niraparib je substrátom pre ABCB1 a ABCG2 (Scott, L. J., 2017). V tomto experimente sme sa opäť nezaoberali myšlienkou inhibície ABCB1.

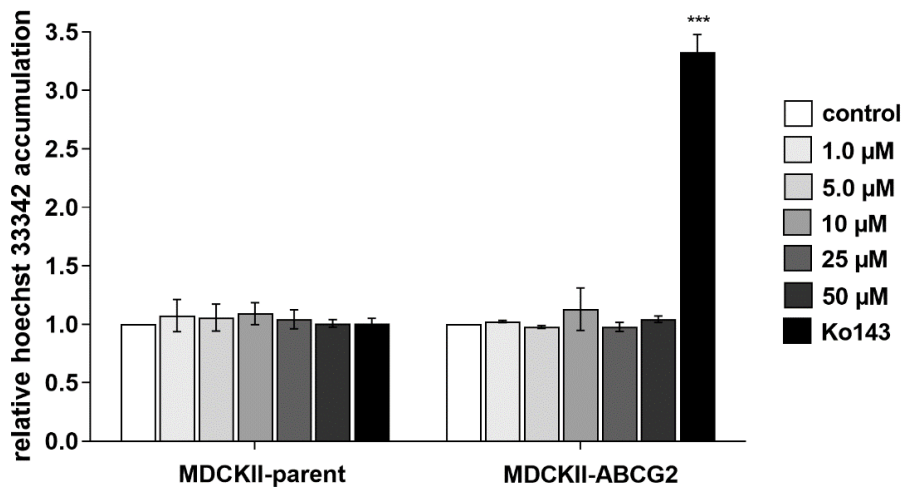
## 6.4. Veliparib

Poslednou látkou, u ktorej sme sa pokúsili preskúmať inhibičnú aktivitu cieleňú na exfluxné transportéry, je veliparib. Ako z obrázka 20 vychádza, u tohto PARPi sme žiaden inhibičný potenciál nezaznamenali ani k jednému zo skúmaných transportérov.

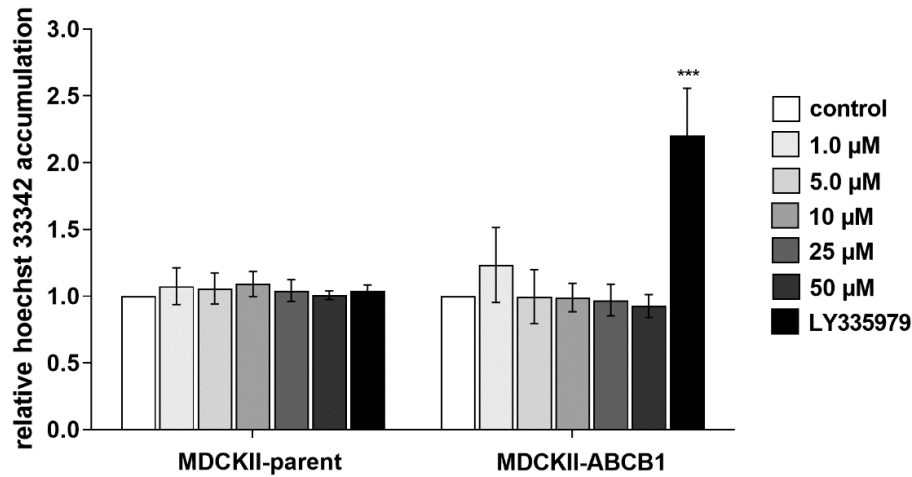
A)



B)



C)



Obr. 20 Grafické znázornenie akumulácie substrátov hoechst 33342 a calcein AM inhibíciou ABC efluxných transportérov *ABCC1* (A), *ABCG2* (B), *ABCB1* (C) veliparibom. Ako kontrolné inhibítory sme použili MK-571 (25 μM), Ko143 (1 μM), LY335979 (1 μM). Spracované dáta sú prezentované ako priemer z troch nezávislých experimentov ± smerodajná odchýlka.

Nezdá sa, že by veliparib mal významné účinky na iné receptory alebo iónové kanály vo farmakologicky relevantných koncentráciách (Wagner, L., 2015). Zo starších odborných článkov je známe, čo sa týka vzťahu k ABC efluxným transportérom, že veliparib je slabý substrát (experiment na MDCKII bunkách) *ABCB1*, pričom tento receptor neinhibuje (experiment na Caco-2 bunkách) (Li, X., et al., 2011).

Výsledky z jednej z novších štúdií naznačujú, že veliparib by mohol prekonať *ABCB1* sprostredkovanú MDR v nádorových bunkách pečene priamou inhibíciou efluxnej funkcie transportéra *ABCB1*. Tento druh účinku by mal byť určite overený, pretože veliparib by mohol byť zaradený s bežnými chemoterapeutikami do kombinačnej liečby nádoru pečene s cieľom vylúčiť MDR (Chang et al., 2019). V našom experimente, kde sme použili inú bunkovú líniu (MDCKII), sa nám túto hypotézu nepodarilo podložiť súhlasnými výsledkami.

## 7. Záver

Z vyššie uvedených výsledkov je zrejmé, že študované PARPi vykazujú zanedbateľný inhibičný potenciál voči transportérom ABCB1, ABCG2, ABCC1. Z toho môžeme vydedukovať, že testované liečiva preto nemajú potenciál stať sa páchatel'mi farmakokinetických liekových interakcií a rovnako nemožno očakávať, že by našli uplatnenie ako modulátory MDR.

Inhibičný potenciál PARPi voči ABC liekovým transportérom sa nám podarilo zachytiť len v dvoch prípadoch. V prvom prípade sa jednalo o olaparib, ktorý podľa našich výsledkov inhibuje ABCG2 v nami použitej najvyššej koncentrácii 50  $\mu$ M. Táto inhibícia sa prejavila pri použití MTX ako fluorescenčného substrátu. V druhom prípade sa jednalo o niraparib, u ktorého sa inhibičná aktivita prejavila smerom k ABCB1. Napriek tomu sa ani v jednom prípade nejedná o inhibíciu potentnú, ktorá by mala šancu prejavíť sa na *in vivo* úrovni v klinických podmienkach.

Do tohto času nejestvuje dostatočné množstvo vedecky podložených informácií týkajúcich sa miery inhibície PARPi smerom k ABC efluxným transportérom. Našou prácou sme rozšírili doterajšie nadobudnuté poznatky. Naše výsledky môžu slúžiť ako cenný zdroj informácií vo vzťahu k bezpečnému využívaniu študovaných liečiv.

## 8. Zoznam použitej literatúry

- Amawi, H., Sim, H. M., Tiwari, A. K., Ambudkar, S. V., Shukla, S. (2019). ABC Transporter-Mediated Multidrug-Resistant Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1141:549-580. doi:10.1007/978-981-13-7647-4\_12.
- Andreev, E., Brosseau, N., Carmona, E., Mes-Masson, A.-M., & Ramotar, D. (2016). The human organic cation transporter OCT1 mediates high affinity uptake of the anticancer drug daunorubicin. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep20508
- Beis, K. (2015). Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 889–893. doi:10.1042/bst20150047
- Berek, J. S., Matulonis, U. A., Peen, U., Ghatage, P., Mahner, S., Redondo, A., ... Mirza, M. R. (2018). Safety and dose modification for patients receiving niraparib. *Annals of Oncology*, 29(8), 1784–1792. doi: 10.1093/annonc/mdy181.
- Bitler, B. G., Watson, Z. L., Wheeler, L. J., & Behbakht, K. (2017). PARP inhibitors: Clinical utility and possibilities of overcoming resistance. *Gynecologic Oncology*, 147(3), 695–704. doi:10.1016/j.ygyno.2017.10.003.
- Bochum, S., Berger, S., & Martens, U. M. (2018). *Olaparib. Small Molecules in Oncology*, 217–233. doi:10.1007/978-3-319-91442-8\_15.
- Burchenal, J. H., Robinson E., Johnston, S. F., et al. (1950). The induction of resistance to 4-amin-N10–metyl-pteroylglutamic acid in strain of transmitted mouse leukemia. *Science*, 11: 116–17. doi: 10.1126/science.111.2875.116.
- Cole, S. P., Bhardway, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M., Deeley, R.G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line, *Science*, 258(5088),1650–1654. doi: 10.1126/science.1360704.
- Cole, S. P. C. (2014). Targeting Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1): Past, Present, and Future. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54(1), 95–117. doi:10.1146/annurev-pharmtox-011613-135959.



- Coleman, R. L., Sill, M. W., Bell-McGuinn, K., Aghajanian, C., Gray, H. J., Tewari, K. S., ... Swisher, E. M. (2015). A phase II evaluation of the potent, highly selective PARP inhibitor veliparib in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer in patients who carry a germline BRCA1 or BRCA2 mutation — An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology*, 137(3), 386–391. doi:10.1016/j.ygyno.2015.03.042.
- Colombo, I., Lheureux, S., & Oza, A. M. (2018). Rucaparib: a novel PARP inhibitor for BRCA advanced ovarian cancer. *Drug Design, Development and Therapy, Volume 12*, 605–617. doi:10.2147/dddt.s130809.
- Cosgrove, C. M., & O'Malley, D. M. (2018). How safe is rucaparib in ovarian cancer? Expert Opinion on Drug Safety. doi:10.1080/14740338.2018.1550067.
- D'Andrea, A. D. (2018). Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA Repair*. doi:10.1016/j.dnarep.2018.08.021.
- De Gooijer, M. C., Buil, L. C. M., Çitirikkaya, C. H., Hermans, J., Beijnen, J. H., & van Tellingen, O. (2018). ABCB1 ATTENUATES THE BRAIN PENETRATION OF THE PARP INHIBITOR AZD2461. *Molecular Pharmaceutics*. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00742.
- DEMEL, M.A., 2013. In-silico Models for the Characterization of Compounds interfering with clinical relevant ABC-Multidrug-Transporters [dissertation]. Wien: Universität wien [s. n.], 2013. 264 s. Available at: [http://othes.univie.ac.at/30426/1/2013-06-06\\_0101428.pdf](http://othes.univie.ac.at/30426/1/2013-06-06_0101428.pdf) (Cit: 28.10.2019).
- De Vos, M., Schreiber, V., & Dantzer, F. (2012). The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: Current state of the art. *Biochemical Pharmacology*, 84(2), 137–146. doi:10.1016/j.bcp.2012.03.018.
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15665–15670. doi:10.1073/pnas.95.26.15665.
- Dufour, R., Daumar, P., Mounetou, E., Aubel, C., Kwiatkowski, F., Abrial, C., ... Bamdad, M. (2015). BCRP and P-gp relay overexpression in triple negative basal-like breast cancer cell line: a prospective role in resistance to Olaparib. *Scientific Reports*, 5(1). doi:10.1038/srep12670.

Dukes, J. D., Whitley, P., & Chalmers, A. D. (2011). The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biology*, 12(1), 43. doi:10.1186/1471-2121-12-43.

Durmus, S., Sparidans, R. W., van Esch, A., Wagenaar, E., Beijnen, J. H., & Schinkel, A. H. (2014). Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) and P-glycoprotein (P-GP/ABCB1) Restrict Oral Availability and Brain Accumulation of the PARP Inhibitor Rucaparib (AG-014699). *Pharmaceutical Research*, 32(1), 37–46. doi:10.1007/s11095-014-1442-z.

Eid, S. , El-Readi, M. , Fatani, S. , Mohamed Nour Eldin, E. and Wink, M. (2015). Natural Products Modulate the Multifactorial Multidrug Resistance of Cancer. *Pharmacology & Pharmacy*, 6, 146-176. doi: 10.4236/pp.2015.63017.

Essel, K. G., & Moore, K. N. (2018). Niraparib for the treatment of ovarian cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 18(8), 727–733. doi:10.1080/14737140.2018.1490180.

Ethier, J.-L., Lheureux, S., & Oza, A. M. (2018). The role of niraparib for the treatment of ovarian cancer. *Future Oncology*. doi:10.2217/fon-2018-0101.

Fletcher, J. I., Williams, R. T., Henderson, M. J., Norris, M. D., & Haber, M. (2016). ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resistance Updates*, 26, 1–9. doi: 10.1016/j.drug.2016.03.001.

Gameiro, M., Silva, R., Rocha-Pereira, C., Carmo, H., Carvalho, F., Bastos, M., & Remião, F. (2017). Cellular Models and In Vitro Assays for the Screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP. *Molecules*, 22(4), 600. doi:10.3390/molecules22040600.

Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J., & Sarkadi, B. (2004). The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity. *Current Drug Delivery*, 1(1), 27–42. doi:10.2174/1567201043480036.

Haraguchi, N., Utsunomiya, T., Inoue, H., Tanaka, F., Mimori, K., Barnard, G. F., & Mori, M. (2006). Characterization of a Side Population of Cancer Cells from Human Gastrointestinal System. *Stem Cells*, 24(3), 506–513. doi:10.1634/stemcells.2005-0282.

Heo, Y.-A., & Dhillon, S. (2018). Olaparib Tablet: A Review in Ovarian Cancer Maintenance Therapy. *Targeted Oncology*. doi:10.1007/s11523-018-0606-x.

- Heo, Y.-A., & Duggan, S. T. (2018). Niraparib: A Review in Ovarian Cancer. *Targeted Oncology*, 13(4), 533–539. doi:10.1007/s11523-018-0582-1.
- Hodges, L. M., Markova, S. M., Chinn, L. W., Gow, J. M., Kroetz, D. L., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenetics and genomics*, 21(3), 152–161. doi:10.1097/FPC.0b013e3283385a1c.
- Chang, L., Hou, Y., Zhu, L., Wang, Z., Chen, G., Shu, C., & Liu, Y. (2019). Veliparib overcomes multidrug resistance in liver cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi:10.1016/j.bbrc.2019.10.141.
- Chazotte, B. (2011). Labeling Nuclear DNA with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(1), pdb.prot5557–pdb.prot5557. doi:10.1101/pdb.prot5557.
- Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., ... Li, J. (2016). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Letters*, 370(1), 153–164. doi:10.1016/j.canlet.2015.10.010.
- Choi, Y. H., and Yu, A. M. (2014). ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development. *Current Pharmaceutical Design*, 20(5):793-807. doi: 10.2174/138161282005140214165212.
- Christine Walsh (2018). Targeted therapy for ovarian cancer: the rapidly evolving landscape of PARP inhibitor use. *Minerva gynecologica*, 70(2):150-70 doi: 10.23736/S0026-4784.17.04152-1.
- International Transporter Consortium, Giacomini, K., Huang, S., Tweedie, D. *et al.* (2010). Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3), 215–236. doi:10.1038/nrd3028.
- Johnson, Z. L., & Chen, J. (2017). Structural Basis of Substrate Recognition by the Multidrug Resistance Protein MRP1. *Cell*, 168(6), 1075–1085.e9. doi:10.1016/j.cell.2017.01.041.
- Juliano, R. L., & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 455(1), 152–162. doi:10.1016/0005-2736(76)90160-7.

- Kurnit, K. C., Coleman, R. L., & Westin, S. N. (2018). Using PARP Inhibitors in the Treatment of Patients With Ovarian Cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 19(12). doi:10.1007/s11864-018-0572-7.
- Kruijtzter, C. M. F., Beijnen, J. H., Rosing, H., ten Bokkel Huinink, W. W., Schot, M., Jewell, R. C., Paul, E. M., Schellens, J. H. M. (2002). Increased Oral Bioavailability of Topotecan in Combination With the Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein Inhibitor GF120918. *Journal of Clinical Oncology*, 20(13), 2943–2950. doi:10.1200/jco.2002.12.116.
- Kruse, V., Rottey, S., De Backer, O., Van Belle, S., Cocquyt, V., & Denys, H. (2011). PARP INHIBITORS IN ONCOLOGY: A NEW SYNTHETIC LETHAL APPROACH TO CANCER THERAPY, *Acta Clinica Belgica*, 66:1, 2-9, doi: 10.2143/ACB.66.1.2062507.
- Lawlor, D., Martin, P., Busschots, S., They, J., O’leary, J. J., Hennessy, B. T., & Stordal, B. (2014). PARP Inhibitors as P-glycoprotein Substrates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(6), 1913–1920. doi:10.1002/jps.23952.
- Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., ... Matulonis, U. (2012). Olaparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive Relapsed Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(15), 1382–1392. doi:10.1056/nejmoa1105535.
- Lefèvre, F., & Boutry, M. (2018). Towards identification of the substrates of ATP-binding cassette transporters. *Plant Physiology*, pp.00325.2018. doi:10.1104/pp.18.00325.
- Li, X., Delzer, J., Voorman, R., de Morais, S. M., & Lao, Y. (2011). Disposition and Drug-Drug Interaction Potential of Veliparib (ABT-888), a Novel and Potent Inhibitor of Poly(ADP-ribose) Polymerase. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(7), 1161–1169. doi:10.1124/dmd.110.037820.
- Li, Y.-J., Lei, Y.-H., Yao, N., Wang, C.-R., Hu, N., Ye, W.-C., Zhang, D. M., Chen, Z.-S. (2017). Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 36(1). doi:10.1186/s40880-017-0219-2.
- Lin, K. Y., & Kraus, W. L. (2017). PARP Inhibitors for Cancer Therapy. *Cell*, 169(2), 183. doi:10.1016/j.cell.2017.03.034.

- Liu, J. F., Tolaney, S. M., Birrer, M., Fleming, G. F., Buss, M. K., Dahlberg, S. E., ... Matulonis, U. A. (2013). A Phase 1 trial of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib (AZD2281) in combination with the anti-angiogenic cediranib (AZD2171) in recurrent epithelial ovarian or triple-negative breast cancer. *European Journal of Cancer*, 49(14), 2972–2978. doi:10.1016/j.ejca.2013.05.020.
- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2017). PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*, 355(6330), 1152–1158. doi:10.1126/science.aam7344.
- Mao, Q., & Unadkat, J. D. (2014). Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *The AAPS Journal*, 17(1), 65–82. doi:10.1208/s12248-014-9668-6.
- McCormick, A., & Swaisland, H. (2016). In vitro assessment of the roles of drug transporters in the disposition and drug–drug interaction potential of olaparib. *Xenobiotica*, 47(10), 903–915. doi:10.1080/00498254.2016.1241449.
- Mittica, G., Ghisoni, E., Giannone, G., Genta, S., Aglietta, M., Sapino, A., & Valabrega, G. (2018). PARP Inhibitors in Ovarian Cancer. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 13. doi:10.2174/1574892813666180305165256.
- Moore, K. N., Mirza, M. R., & Matulonis, U. A. (2018). The poly (ADP ribose) polymerase inhibitor niraparib: Management of toxicities. *Gynecologic Oncology*, 149(1), 214–220. doi:10.1016/j.ygyno.2018.01.011.
- Moore, K., Zhang, Z.-Y., Agarwal, S., Burris, H., Patel, M. R., & Kansra, V. (2018). The effect of food on the pharmacokinetics of niraparib, a poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, in patients with recurrent ovarian cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 81(3), 497–503. doi:10.1007/s00280-017-3512-5
- Munroe, M., & Kolesar, J. (2016). Olaparib for the treatment of BRCA-mutated advanced ovarian cancer. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 73(14), 1037–1041. doi:10.2146/ajhp150550.

Murai, J., Huang, S. -y. N., Das, B. B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J. H., ... Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Research*, 72(21), 5588–5599. doi:10.1158/0008-5472.can-12-2753.

Ohmoto, A., & Yachida, S. (2017). Current status of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and future directions. *OncoTargets and Therapy*, Volume 10, 5195–5208. doi:10.2147/ott.s139336.

Parrish, K. E., Cen, L., Murray, J., Calligaris, D., Kizilbash, S., Mittapalli, R. K., ... Sarkaria, J. N. (2015). Efficacy of PARP Inhibitor Rucaparib in Orthotopic Glioblastoma Xenografts Is Limited by Ineffective Drug Penetration into the Central Nervous System. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(12), 2735–2743. doi:10.1158/1535-7163.mct-15-0553.

Peterson, B. G., Tan, K. W., Osa-Andrews, B., & Iram, S. H. (2017). High-content screening of clinically tested anticancer drugs identifies novel inhibitors of human MRP1 (ABCC1). *Pharmacological Research*, 119, 313–326. doi:10.1016/j.phrs.2017.02.024.

Rabindran, S. K. *et al.* (2000) “Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein.”, *Cancer research*, 60(1), s. 47–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10646850> (Cit: 30. november 2019).

Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., ... Conte, P. (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *New England Journal of Medicine*, 377(6), 523–533. doi:10.1056/nejmoa1706450.

Røsland, G. V., & Engelsen, A. S. T. (2014). Novel Points of Attack for Targeted Cancer Therapy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 116(1), 9–18. doi:10.1111/bcpt.12313.

Saneja, A., Khare, V., Alam, N., Dubey, R. D., & Gupta, P. N. (2013). Advances in P-glycoprotein-based approaches for delivering anticancer drugs: pharmacokinetic perspective and clinical relevance. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11(1), 121–138. doi:10.1517/17425247.2014.865014.

Satoh, M. S., & Lindahl, T. (1992). Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature*, 356(6367), 356–358. doi:10.1038/356356a0.

- Scott, C. L., Swisher, E. M., & Kaufmann, S. H. (2015). Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors: Recent Advances and Future Development. *Journal of Clinical Oncology*, 33(12), 1397–1406. doi:10.1200/jco.2014.58.8848.
- Scott, L. J. (2017). Niraparib: First Global Approval. *Drugs*, 77(9), 1029–1034. doi:10.1007/s40265-017-0752-y.
- Shah, A. P., Patel, C. N., Sureja, D. K., & Sanghavi, K. P. (2018). A Review on DNA Repair Inhibition by PARP Inhibitors in Cancer Therapy. *Folia Medica*, 60(1), 39–47. doi:10.1515/folmed-2017-0067.
- Schinkel, A. H., & Jonker, J. W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(1), 3–29. doi:10.1016/s0169-409x(02)00169-2.
- Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R. J., Chen, Z. S. (2012). Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer*, 31(2):58–72. doi:10.5732/cjc.011.10329.
- Song, Y.-K., Park, J. E., Oh, Y., Hyung, S., Jeong, Y.-S., Kim, M.-S., ... Chung, S.-J. (2018). Suppression of canine ABCB1 in MDCKII cells unmasks human ABCG2-mediated efflux of olaparib. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 368(1),79-87. doi:10.1124/jpet.118.250225.
- Stacy, A. E., Jansson, P. J., & Richardson, D. R. (2013). Molecular Pharmacology of ABCG2 and Its Role in Chemoresistance. *Molecular Pharmacology*, 84(5), 655–669. doi:10.1124/mol.113.088609.
- Steffensen, K. D., Adimi, P., & Jakobsen, A. (2017). Veliparib Monotherapy to Patients With BRCA Germ Line Mutation and Platinum-Resistant or Partially Platinum-Sensitive Relapse of Epithelial Ovarian Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 27(9), 1842–1849. doi:10.1097/igc.0000000000001089.
- Sun, K., Mikule, K., Wang, Z., Poon, G., Vaidyanathan, A., Smith, G., ... Wang, J. (2018). A comparative pharmacokinetic study of PARP inhibitors demonstrates favorable properties for niraparib efficacy in preclinical tumor models. *Oncotarget*, 9(98). doi:10.18632/oncotarget.26354.

- Syed, Y. Y. (2017). Rucaparib: First Global Approval. *Drugs*, 77(5), 585–592. doi:10.1007/s40265-017-0716-2.
- Tamaki, A., Ierano, C., Szakacs, G., Robey, R. W., & Bates, S. E. (2011). The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays In Biochemistry*, 50, 209–232. doi:10.1042/bse0500209.
- Taylor, K. N., & Eskander, R. N. (2018). PARP Inhibitors in Epithelial Ovarian Cancer. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 13(2), 145–158. doi:10.2174/1574892813666171204094822.
- Thomas, H., & Coley, H. M. (2003). Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein. *Cancer Control*, 10(2), 159–165. doi:10.1177/107327480301000207.
- Toss, A., Cortesi, L. (2013). Molecular Mechanisms of PARP Inhibitors in BRCA-related Ovarian Cancer. *Journal of Cancer Science and Therapy*, 5:409-416. doi:10.4172/1948-5956.1000234.
- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. (1981). Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Research*, 41: 1967-1972. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7214365> (Cit: 03.02.2020).
- Tu, H., Wen, C. P., Tsai, S. P., Chow, W.-H., Wen, C., Ye, Y., ... Wu, X. (2018). Cancer risk associated with chronic diseases and disease markers: prospective cohort study. *BMJ*, k134. doi:10.1136/bmj.k134.
- Turk, A. A., & Wisinski, K. B. (2018). PARP inhibitors in breast cancer: Bringing synthetic lethality to the bedside. *Cancer*, 124(12), 2498–2506. doi:10.1002/cncr.31307.
- Wagner, L. (2015). Profile of veliparib and its potential in the treatment of solid tumors. *OncoTargets and Therapy*, 1931. doi:10.2147/ott.s69935.
- Werner, T. L., Sachdev, J., Swisher, E. M., Gutierrez, M., Kittaneh, M., Stein, M. N., ... Tan, A. R. (2018). Safety and pharmacokinetics of veliparib extended-release in patients with advanced solid tumors: a phase I study. *Cancer Medicine*, 7(6), 2360–2369. doi:10.1002/cam4.1488



Yamazaki, R., Nishiyama, Y., Furuta, T., Hatano, H., Igarashi, Y., Asakawa, N., ... Sugimoto, Y. (2011). Novel Acrylonitrile Derivatives, YHO-13177 and YHO-13351, Reverse BCRP/ABCG2-Mediated Drug Resistance In Vitro and In Vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(7), 1252–1263. doi:10.1158/1535-7163.mct-10-0874.

Yergeri, M., Kapse-Mistry, S., Srivastava, R., & Govender, T. (2014). Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Frontiers in Pharmacology*, 5. doi:10.3389/fphar.2014.00159.

Yin, J., Zhang, J. (2011). Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCB1) polymorphism: from discovery to clinical application. *Journal of Central South University. Medical science*, 36(10):927-38. doi: 10.3969/j.issn.1672-7347.2011.10.002.

Zhang, L., Zhao, J., Liang, C., Liu, M., Xu, F., & Wang, X. (2017). A novel biosensor based on intestinal 3D organoids for detecting the function of BCRP. *Drug Delivery*, 24(1), 1453–1459. doi:10.1080/10717544.2017.1381199.

Zhang, Y. K., Wang, Y. J., Gupta, P., & Chen, Z. S. (2015). Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Cancer Therapy. *The AAPS journal*, 17(4), 802–812. doi:10.1208/s12248-015-9757-1.