

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

mgr Katarzyna Michalska

(nazwisko rodowe Niebudek)

**Rola polimorfizmów genów kodujących wybrane transportery
z nadrodziny ABC oraz rodziny OATP w predyspozycji do rozwoju
oraz skuteczności terapii szpiczaka mnogiego**

Rozprawa doktorska w oparciu o cykl publikacji naukowych

Praca wykonana

w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki

Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor:

prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski

Niniejsza praca została zrealizowana z wykorzystaniem
środków przeznaczonych na Zadanie Badawcze
Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
(502-03/3-015-02/502-34-109)
oraz środków statutowych Zakładu Biochemii Farmaceutycznej
i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
(503/3-015-02/503-31-001)

Spis treści

| | |
|--|----|
| Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej | 4 |
| Całkowity dorobek naukowy wraz z analizą bibliometryczną | 6 |
| Sylwetka naukowa doktorantki | 10 |
| Wykaz skrótów | 12 |
| Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej | 15 |
| Cele naukowe pracy | 27 |
| Część doświadczalna | 29 |
| Materiał: | 29 |
| Koncepcja i plan badań | 29 |
| Metodyka badań | 31 |
| Ocena statystyczna wyników | 32 |
| Realizacja celów naukowych – wyniki i dyskusja | 33 |
| Podsumowanie osiągniętych wyników | 39 |
| Wnioski końcowe | 41 |
| Perspektywy i plany na przyszłość | 42 |
| Streszczenie | 43 |
| Summary | 45 |
| Podziękowania | 47 |
| Piśmiennictwo | 48 |
| Kopie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej (Publikacje I-III) | 56 |
| Oświadczenia autora rozprawy doktorskiej | 82 |
| Oświadczenia współautorów | 83 |

Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Poniżej przedstawiono spis publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej pt. „Rola polimorfizmów genów kodujących wybrane transportery z nadrodziny ABC oraz rodziny OATP w predyspozycji do rozwoju oraz skuteczności terapii szpiczaka mnogiego”. Sumaryczny **IF** jest równy **6,743**, zaś punktacja **MEiN** wynosi **155** zgodnie z punktacją za rok publikacji artykułów.

Publikacja I

Niebudek K, Balcerczak E, Mirowski M, Żebrowska M. *Association of ABCB1 T-129C polymorphism and multiple myeloma risk in Polish population*. Pol J Pathol. 2018;69(4):405-9. Epub 2019/02/23. doi: 10.5114/pjp.2018.81700.

Punktacja: **IF = 0.664, MEiN = 15**

Publikacja II

Niebudek K, Balcerczak E, Mirowski M, Pietrzak J, Zawadzka I, Żebrowska-Nawrocka M. *The contribution of ABCG2 G34A and C421A polymorphisms to multiple myeloma susceptibility*. Onco Targets Ther. 2019;12:1655-60. Epub 2019/03/19. doi: 10.2147/ott.s195245.

Punktacja: **IF = 3.337, MEiN = 70**

Publikacja III

Michalska K, Balcerczak E, Jeleń A, Saed L, Pietrzak J, Żebrowska-Nawrocka M. *Effects of the SLCO1B1 A388G single nucleotide polymorphism on the development, clinical parameters, treatment, and survival of multiple myeloma cases in a Polish population*. Molecular Biology Reports. 2022. doi: 10.1007/s11033-022-08162-x.

Punktacja: **IF = 2.742, MEiN = 70**

Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Wyniki badań prezentowane w ramach niniejszej pracy zostały również przedstawione w formie 8 komunikatów zjazdowych na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych:

- II Ogólnopolska Konferencja Studentów Medycyny Laboratoryjnej – „Młodzi Diagnostyci w Łodzi”- sesja plakatowa dla doktorantów praca *„Ocena związku polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w pozycji T-129C genu ABCB1 z ryzykiem rozwoju szpiczaka mnogiego.”* Łódź, 2018.
- International Conference of Natural and Medical Sciences: Young Scientists, PhD Students and Students w Lublinie - *„Ocena ryzyka rozwoju szpiczaka mnogiego – analiza SNP C421A w genie ABCG2.”* Lublin, 2017.
- VIII Ogólnopolska Konferencja Postępy w Badaniach Biomedycznych - *“Badanie funkcjonalnych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w transporterze BCRP i wzrostu ryzyka zachorowania na szpiczaka mnogiego.”* Warszawa, 2017.
- XXI Gliwickie Spotkania Naukowe – *“Analysis of SNP G34A on the ABCG2 gene and potential susceptibility to multiple myeloma.”* Gliwice, 2017.
- 13th International Juvenes Pro Medicina - *„Assesment of ploymorphism at position G34A of the ABCG2 gene in the group of patients with multiple myeloma.”* Łódź, 2017.
- IV Ogólnopolska Konferencja Studentów Medycyny Laboratoryjnej i Młodych Diagnostów *„Wschodząca Diagnostyka” – „Wstępna analiza polimorfizmów G34A i C421A genu ABCG2 w grupie pacjentów ze szpiczakiem mnogim.”* Białystok, 2017.
- VII Konferencja Naukowa Postępy w Badaniach Biomedycznych – *„Ocena polimorfizmu C421A genu ABCG2 w grupie pacjentów ze szpiczakiem mnogim – badania wstępne.”* Warszawa, 2017.
- XX Gliwickie Spotkania Naukowe – *„Evaluation of polymorphism T-129C in the promoter of ABCB1 gene in patients with multiple myeloma.”* Gliwice, 2016.

Całkowity dorobek naukowy wraz z analizą bibliometryczną

Całkowity dorobek naukowy wraz z analizą bibliometryczną

Autorstwo lub współautorstwo 9 oryginalnych prac naukowych o łącznym współczynniku

IF = 31,689 i punktacji **MEiN = 765** zgodnie z punktacją za rok publikacji artykułów.

Prace oryginalne:

1. Niebudek K, Balcerczak E, Mirowski M, Żebrowska M. *Association of ABCB1 T-129C polymorphism and multiple myeloma risk in Polish population*. Pol J Pathol. 2018;69(4):405-9. Epub 2019/02/23. doi: 10.5114/pjp.2018.81700.
2. Niebudek K, Balcerczak E, Mirowski M, Pietrzak J, Zawadzka I, Żebrowska-Nawrocka M. *The contribution of ABCG2 G34A and C421A polymorphisms to multiple myeloma susceptibility*. Onco Targets Ther. 2019;12:1655-60. Epub 2019/03/19. doi: 10.2147/ott.s195245.
3. Michalska K, Balcerczak E, Jeleń A, Saed L, Pietrzak J, Żebrowska-Nawrocka M. *Effects of the SLCO1B1 A388G single nucleotide polymorphism on the development, clinical parameters, treatment, and survival of multiple myeloma cases in a Polish population*. Molecular Biology Reports. 2022. doi: 10.1007/s11033-022-08162-x.
4. Pietrzak J, Szmajda-Krygier D, Wosiak A, Świechowski R, Michalska K, Mirowski M, et al. *Changes in the expression of membrane type-matrix metalloproteinases genes (MMP14, MMP15, MMP16, MMP24) during treatment and their potential impact on the survival of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC)*. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2022;146:112559. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112559>.
5. Pązik M, Michalska K, Żebrowska-Nawrocka M, Zawadzka I, Łochowski M, Balcerczak E. *Clinical significance of HRAS and KRAS genes expression in patients with non-small-cell lung cancer - preliminary findings*. BMC Cancer. 2021;21(1):130. Epub 2021/02/08. doi: 10.1186/s12885-021-07858-w.
6. Pietrzak J, Mirowski M, Świechowski R, Wodziński D, Wosiak A, Michalska K, et al. *Importance of Altered Gene Expression of Metalloproteinases 2, 9, and 16 in Acute Myeloid Leukemia: Preliminary Study*. J Oncol. 2021;2021:6697975. Epub 2021/05/27. doi: 10.1155/2021/6697975.

Całkowity dorobek naukowy wraz z analizą bibliometryczną

7. Wosiak A, Wodziński D, Michalska K, Pietrzak J, Kordek R, Balcerczak E. *Assessment of the Role of Selected SMAD3 and SMAD4 Genes Polymorphisms in the Development of Colorectal Cancer: Preliminary Research*. *Pharmgenomics Pers Med*. 2021;14:167-78. Epub 2021/02/06. doi: 10.2147/pgpm.s281958.
8. Zawadzka I, Jeleń A, Pietrzak J, Żebrowska-Nawrocka M, Michalska K, Szmajda-Krygier D, et al. *The impact of ABCB1 gene polymorphism and its expression on non-small-cell lung cancer development, progression and therapy - preliminary report*. *Sci Rep*. 2020;10(1):6188. Epub 2020/04/12. doi: 10.1038/s41598-020-63265-4.
9. Pietrzak J, Mirowski M, Jeleń A, Świechowski R, Wodziński D, Niebudek K, et al. *Decreased MMP1 gene expression in acute myeloid leukaemia*. *Mol Biol Rep*. 2019;46(2):2293-8. Epub 2019/02/13. doi: 10.1007/s11033-019-04685-y.

Analiza bibliometryczna:

Łódź, 04-01-2023

JM01.545.6.2023

Spis publikacji – mgr Katarzyna Michalska

Punktacja została wykonana na podstawie spisu publikacji przedstawionego przez osobę zainteresowaną, przy użyciu list Impact Factor i MEIN za rok publikacji artykułu.

Łącznie 28 cytowań (28 bez autocytoowań), indeks Hirscha wynosi 3 (Źródło: ISI Web of Science Core Collection).
 Łącznie 37 cytowań (37 bez autocytoowań), indeks Hirscha wynosi 3 (Źródło: Scopus).

| Prace | pierwszy/ostatni autor? | IF z roku publ | MEIN z roku publ | Typ publikacji |
|--|-------------------------|----------------|------------------|----------------|
| Michalska K, Balcerczak E, Jeleń A, Saed L, Pietrzak J, Żebrowska-Nawrocka M. Effects of the SLCO1B1 A388G single nucleotide polymorphism on the development, clinical parameters, treatment, and survival of multiple myeloma cases in a Polish population. <i>Molecular Biology Reports</i> . 2022. doi: 10.1007/s11033-022-08162-x | pierwszy | 2,742 | 70 | oryginal |
| Pietrzak J, Szmajda-Krygier D, Wosiak A, Świechowski R, Michalska K, Mirowski M, et al. Changes in the expression of membrane type-matrix metalloproteinases genes (MMP14, MMP15, MMP16, MMP24) during treatment and their potential impact on the survival of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). <i>Biomedicine & Pharmacotherapy</i> . 2022;146:112559. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112559 | | 7,419 | 100 | oryginal |
| Pązik M, Michalska K, Żebrowska-Nawrocka M, Zawadzka I, Łochowski M, Balcerczak E. Clinical significance of HRAS and KRAS genes expression in patients with non-small-cell lung cancer - preliminary findings. <i>BMC Cancer</i> . 2021;21(1):130. Epub 2021/02/08. doi: 10.1186/s12885-021-07858-w | | 4,638 | 100 | oryginal |
| Pietrzak J, Mirowski M, Świechowski R, Wodziński D, Wosiak A, Michalska K, et al. Importance of Altered Gene Expression of Metalloproteinases 2, 9, and 16 in Acute Myeloid Leukemia: Preliminary Study. <i>J Oncol</i> . 2021;2021:6697975. Epub 2021/05/27. doi: 10.1155/2021/6697975 | | 4,501 | 100 | oryginal |
| Wosiak A, Wodziński D, Michalska K, Pietrzak J, Kordek R, Balcerczak E. Assessment of the Role of Selected SMAD3 and SMAD4 Genes Polymorphisms in the Development of Colorectal Cancer: Preliminary Research. <i>Pharmacogenomics Pers Med</i> . 2021;14:167-78. Epub 2021/02/06. doi: 10.2147/pgpm.s281958 | | 2,606 | 100 | oryginal |

Całkowity dorobek naukowy wraz z analizą bibliometryczną

| | | | | |
|--|----------|---------------|------------|----------|
| Zawadzka I, Jeleń A, Pietrzak J, Żebrowska-Nawrocka M, Michalska K, Szmajda-Krygier D, et al. The impact of ABCB1 gene polymorphism and its expression on non-small-cell lung cancer development, progression and therapy - preliminary report. <i>Sci Rep.</i> 2020;10(1):6188. Epub 2020/04/12. doi: 10.1038/s41598-020-63265-4. | | 4,38 | 140 | oryginal |
| Niebudek K, Balcerczak E, Mirowski M, Pietrzak J, Zawadzka I, Żebrowska-Nawrocka M. The contribution of ABCG2 G34A and C421A polymorphisms to multiple myeloma susceptibility. <i>Onco Targets Ther.</i> 2019;12:1653-60. Epub 2019/03/19. doi: 10.2147/ott.s195245. | pierwszy | 3,337 | 70 | oryginal |
| Pietrzak J, Mirowski M, Jeleń A, Swiechowski R, Wodziński D, Niebudek K, et al. Decreased MMP1 gene expression in acute myeloid leukaemia. <i>Mol Biol Rep.</i> 2019;46(2):2293-8. Epub 2019/02/13. doi: 10.1007/s11033-019-04685-y | | 1,402 | 70 | oryginal |
| Niebudek K, Balcerczak E, Mirowski M, Żebrowska M. Association of ABCB1 T-129C polymorphism and multiple myeloma risk in Polish population. <i>Pol J Pathol.</i> 2018;69(4):405-9. Epub 2019/02/23. doi: 10.5114/pjp.2018.81700. | pierwszy | 0,664 | 15 | oryginal |
| SUMA | | 31,689 | 765 | |

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁÓDZI
 Centrum Informacyjno-Biblioteczne
 Oddział Bibliografii i Bibliometrii
 90-711 Łódź, ul. Wójcickiego 2
 tel. 42 272 54 21 / 42 272 55 22
 e-mail: punktacja@umed.lodz.pl

mgr Aleksandra Andrzejewska
 Oddział Bibliografii i Bibliometrii
 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
 punktacja@umed.lodz.pl

2 z 2

Granty:

Laureatka programu grantowego Granty UMEDu (nr grantu: 564/3-000-00/564-20-013) - kierownik projektu naukowego – „*Assesment of polymorphism at position G34A of the ABCG2 gene in the group of patients with multiple myeloma*”. Opiekun: prof. dr. hab. n. farm. Ewa Balcerczak. Łódź, 2016

Komunikaty zjazdowe i nagrody:

Autorstwo/współautorstwo łącznie 11 komunikatów zjazdowych prezentowanych na 11 krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych.

Nagrody na konferencjach:

- II miejsce w II Ogólnopolskiej Konferencji Studentów Medycyny Laboratoryjnej – „Młodzi Diagnostyci w Łodzi” - sesja plakatowa dla doktorantów praca pt. „*Ocena związku polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w pozycji T-129C genu ABCB1 z ryzykiem rozwoju szpiczaka mnogiego.*” Łódź, 2018

Całkowity dorobek naukowy wraz z analizą bibliometryczną

- II miejsce w sesji Oncology and Hematology - 13th International Juvenes Pro Medicina - „*Assesment of ploymorphism at position G34A of the ABCG2 gene in the group of patients with multiple myeloma.*” Łódź, 2017
- I miejsce w IV Ogólnopolskiej Konferencji Studentów Medycyny Laboratoryjnej i Młodych Diagnostów „*Wschodząca Diagnostyka*” – „*Wstępna analiza polimorfizmów G34A i C421A genu ABCG2 w grupie pacjentów ze szpiczakiem mnogim.*” Białystok, 2017
- I miejsce w Sesji Immunologiczno – Genetycznej IV Ogólnopolskiej Konferencji LTSAM – Lubelskiego Towarzystwa Studentów Analityki Medycznej, Lublin, 2016
- II miejsce w II Ogólnopolskich Symulacjach Diagnostycznych, Wrocław, 2016

Nagrody Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi:

Nagroda III stopnia za publikację *“The contribution of ABCG2 G34A and C421A polymorphisms to multiple myeloma.”* Łódź, 2020

Nagroda III stopnia za publikację *“Decreased MMP1 gene expression in acute myeloid leukaemia.”* Łódź, 2020

Sylwetka naukowa doktorantki

Sylwetka naukowa doktorantki

Mgr Katarzyna Michalska jest absolwentką kierunku Analityka Medyczna. W 2017 roku ukończyła z wynikiem bardzo dobrym studia na Oddziale Medycyny Laboratoryjnej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi broniąc pracę magisterską pt. „Ocena polimorfizmu w pozycji G34A genu *ABCG2* w grupie pacjentów ze szpiczakiem mnogim”. Promotorem pracy magisterskiej była prof. dr hab. n. farm. Ewa Balcerczak, a opiekunem dr n. farm. Marta Żebrowska. Praca magisterska została nagrodzona I miejscem w Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich w 2017 r.

Od 2014 r. aktywnie pracowała w Studenckim Kole Naukowym przy Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod opieką prof. dr. hab. n. farm. Ewy Balcerczak. W 2016 r. została przewodniczącą Studenckiego Koła Naukowego przy Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W tym samym roku mgr Katarzyna Michalska została laureatką programu Granty UMEDu (nr grantu: 564/3-000-00/564-20-013). Kierowała projektem naukowym pt. „Assesment of polymorphism at position G34A of the *ABCG2* gene in the group of patient with multiple myeloma” pod opieką prof. dr. hab. n. farm. Ewy Balcerczak.

Mgr Katarzyna Michalska przez cały czas trwania studiów aktywnie pracowała na rzecz organizacji studenckiej Łódzkiego Towarzystwa Studentów Medycyny Laboratoryjnej - ŁTSML biorąc udział w organizacji akcji studenckich o profilu edukacyjno-profilaktycznym, inicjatywach uczelnianych, organizacji I i II Ogólnopolskiej Konferencji Studentów Medycyny Laboratoryjnej „Młodzi diagności w Łodzi”. Reprezentowała środowisko studentów Wydziału Farmaceutycznego w Radzie Wydziału. Mgr Michalska była członkiem Wydziałowego Zespołu ds. Zapewniania Jakości Kształcenia.

W 2017 r. rozpoczęła studia doktoranckie w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod opieką prof. dr hab. n. farm. Marka Mirowskiego. W 2018 roku została zatrudniona na 1/3 etatu w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na stanowisku

Sylwetka naukowa doktorantki

asystenta. Prowadziła zajęcia dydaktyczne dla studentów kierunku analityka medyczna i farmacja z przedmiotów: Biochemia, Biochemia kliniczna, Biologia molekularna, Diagnostyka molekularna, Praktyczna nauka zawodu. Dodatkowo opiekowała się członkami Studenckiego Koła Naukowego, aktywnie uczestniczyła w przygotowywanych w Zakładzie pracach magisterskich, aplikacjach grantowych składanych przez Zakład do NCN w ramach konkursów PRELUDIUM i OPUS, organizacji kursów i szkoleń specjalizacyjnych, dni otwartych Wydziału i Uczelni, prowadziła wyjazdowe zajęcia edukacyjne dla uczniów liceów promujących naukę i Uniwersytet. Mgr Katarzyna Michalska stale podnosiła swoje kompetencje naukowo-dydaktyczne corocznie biorąc udział w wielu kursach i szkoleniach edukacyjnych. Przewód doktorski został otworzony w dniu 18.12.2018 r. na Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Wykaz skrótów

Wykaz skrótów

| | |
|--------|---|
| 5'UTR | rejon 5' niepodlegający translacji (ang. <i>5' untranslated region</i>) |
| ABC | rodzina białek mających kasetę wiążącą ATP (ang. <i>ATP-Binding Cassette Family</i>) |
| AML | ostra białaczka szpikowa (ang. <i>Acute Myeloid Leukemia</i>) |
| BCRP | białko oporności raka piersi (ang. <i>Breast Cancer Resistance Protein</i>) |
| CAR-T | chimeryczny receptor antygenowy limfocytów T (ang. <i>Chimeric Antigen Receptors T cells</i>) |
| CML | przewlekła białaczka szpikowa (ang. <i>Chronic Myeloid Leukemia</i>) |
| CNV | zmiennosc liczby kopii (ang. <i>Copy Number Variations</i>) |
| COSMIC | katalog mutacji somatycznych w raku (ang. <i>Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer</i>) |
| CRAB | kryteria uszkodzenia narządowego w szpiczaku mnogim CRAB (ang. <i>C- calcium elevation, R- renal insufficiency, A- anemia, B- bone disease</i>) |
| DLBCL | chłoniak rozlany z dużych komórek B (ang. <i>Diffuse Large B-cell Lymphoma</i>) |
| FISH | fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> (ang. <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>) |
| GST | transferaza glutationowa (ang. <i>Glutathione S-Transferases</i>) |

Wykaz skrótów

| | |
|---------|---|
| IMWG | Międzynarodowa Grupa Robocza ds. Szpiczaka (ang. <i>International Myeloma Working Group</i>) |
| KRN | Krajowy Rejestr Nowotworów |
| LDH | dehydrogenaza mleczanowa (ang. <i>Lactate Dehydrogenase</i>) |
| MDR 1 | białko oporności wielolekowej 1 (ang. <i>Multidrug Resistance Protein 1</i>) |
| MGUS | gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu (ang. <i>Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance</i>) |
| MM | szpiczak mnogi (ang. <i>Multiple Myeloma</i>) |
| MRP | białko związane z opornością wielolekową (ang. <i>Multidrug Resistant Protein</i>) |
| NCBI | Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej (ang. <i>National Center for Biotechnology Information</i>) |
| NIK | Najwyższa Izba Kontroli |
| NSCLC | niedrobnokomórkowy rak płuca (ang. <i>Non-Small-Cell Lung Cancer</i>) |
| OAT | rodzina organicznych transporterów anionowych (ang. <i>Organic Anion Transporter Family</i>) |
| OATP | rodzina polipeptydów transportujących aniony organiczne (ang. <i>Organic Anion Transporting Polypeptide Family</i>) |
| OATP1B1 | polipeptyd transportujący aniony organiczne 1 B1 (ang. <i>Organic Anion Transporter Polypeptide 1 B1</i>) |
| OCT | rodzina organicznych transporterów kationowych (ang. <i>Organic Cation Transporter Family</i>) |

Wykaz skrótów

| | |
|---------------|---|
| PC | rak trzustki (ang. <i>Pancreatic Cancer</i>) |
| PCR | reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PepT | rodzina transporterów peptydowych (ang. <i>Peptide Transporter Family</i>) |
| P-gp | glikoproteina-P (ang. <i>P-glycoprotein</i>) |
| RFLP | polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. <i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i>) |
| R-ISS | zmodyfikowany międzynarodowy system oceny zaawansowania dla szpiczaka mnogiego (ang. <i>Revised International Staging System</i>) |
| SCLC | drobnokomórkowy rak płuca (ang. <i>Small Cell Lung Cancer</i>) |
| SLiM | zmodyfikowane kryteria uszkodzenia narządowego w szpiczaku mnogim (ang. <i>S- Sixty, Li- Light Chains, M- Magnetic Resonance</i>) |
| SMM | tlący szpiczak mnogi (ang. <i>Smoldering Multiple Myeloma</i>) |
| SNP | polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>) |
| tDDI | interakcje lek-lek za pośrednictwem transportera (ang. <i>Transporter-mediated Drug–Drug Interactions</i>) |
| TNF- α | czynnik martwicy nowotworów α (ang. <i>Tumor Necrosis Factor α</i>) |
| VNTR | zmienna liczba powtórzeń tandemowych (ang. <i>Variable Number of Tandem Repeats</i>) |
| WHO | Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>) |

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

Nowotwory są obecnie jednym z najważniejszych problemów zdrowotnych na świecie. Całkowite ryzyko zachorowania na raka w wieku 0–74 lat wynosi 20.2% (odpowiednio 22.4% u mężczyzn i 18.2% u kobiet). W 2018 r. zdiagnozowano łącznie 18 milionów nowych przypadków nowotworów. Pod względem śmiertelności nowotwory stanowią drugą po chorobie niedokrwiennej serca przyczynę zgonów na świecie (8.97 mln zgonów). Najprawdopodobniej staną się pierwszą przyczyną zgonów na świecie do 2060 r. (estymacja ok. 18.63 mln zgonów) [1, 2]. Liczba zachorowań na nowotwory złośliwe w Polsce w ciągu ostatnich trzech dekad wrosła ponad dwukrotnie [3]. Według raportu Najwyższej Izby Kontroli (NIK) w Polsce zachorowalność na choroby onkologiczne do 2025 roku prawdopodobnie wzrośnie o ponad 25 procent, a nowotwory staną się wówczas główną przyczyną zgonów w Polsce [4].

Wśród alarmujących statystyk epidemiologicznych dotyczących nowotworów coraz więcej danych odnosi się do nowotworów hematologicznych. Zgodnie z obowiązującą klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO – ang. *World Health Organization*), wyodrębniono dwie podstawowe grupy nowotworów hematologicznych: nowotwory układu krwiotwórczego oraz nowotwory układu chłonnego. W bazie Krajowego Rejestru Nowotworów (KRN) nowotwory krwi podzielone zostały następująco: nowotwory tkanki limfatycznej i krwiotwórczej, chłoniaki Hodgkina, chłoniaki nie-Hodgkina, szpiczak plazmocytowy i nowotwory z komórek plazmatycznych, białaczki, białaczka limfatyczna, białaczka szpikowa [3].

Nowotwory złośliwe z komórek plazmatycznych obejmują szereg chorób: gammopatię monoklonalną o nieokreślonym znaczeniu (MGUS – ang. *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*), tłęcego szpiczaka mnogiego (SMM – ang. *Smoldering Multiple Myeloma*), szpiczaka mnogiego (MM – ang. *Multiple Myeloma*) oraz białaczkę z komórek plazmatycznych [5]. Szpiczak mnogi określony także mianem szpiczaka plazmocytozowego należy do grupy złośliwych gammopatii monoklonalnych. Jest nowotworem komórek krwi wywodzącym się ze szpiku kostnego, w którym nadmiernie mnożą się i gromadzą zmienione nowotworowo komórki plazmatyczne [6]. Stanowi około 10-13 % nowotworów

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

hematologicznych i około 1-2 % spośród wszystkich nowotworów [5, 7, 8]. Zachorowalność w Europie w wynosi 4.5-6.0/100 000 populacji. Każdego roku odnotowuje się ponad 48 000 nowych przypadków i około 31 000 zgonów z powodu tego nowotworu [9]. W Polsce zachorowalność wynosi 1-8/100 000 przypadków rocznie. W latach 2010-2018 stwierdzono ponad 16 tysięcy zachorowań i ponad 11 tysięcy zgonów z powodu szpiczaka mnogiego i nowotworów komórek plazmatycznych [10]. Wraz z chłoniakiem rozlanym z dużych komórek B (DLBCL - ang. *Diffuse Large B-cell Lymphoma*) szpiczak mnogi jest drugim pod względem częstości zachorowań nowotworem układu limfoidalnego po przewlekłej białaczce limfocytowej (CML - ang. *Chronic Myeloid Leukemia*). Według danych z Krajowego Rejestru Nowotworów, w Polsce w roku 2018 zanotowano 1 583 nowych zachorowań [11].

Większość zachorowań na szpiczaka występuje u osób starszych, mediana około 66–70 lat. Ryzyko zachorowania na ten nowotwór wzrasta wraz z wiekiem począwszy od szóstej dekady życia osiągając najwyższą wartość w ósmej dekadzie życia. Choroba występuje częściej u mężczyzn niż u kobiet oraz dwukrotnie częściej u Afroamerykanów w porównaniu z osobnikami rasy białej [12, 13]. Na początku rozwoju choroby występują objawy nieswoiste, często nie sugerujące rozwijającego się procesu nowotworowego, takie jak ból kości, zmęczenie, czy utrata masy ciała. Objawy te początkowo mogą być ignorowane lub pomijane zarówno przez pacjentów jak i lekarzy, przez co szpiczak mnogi często diagnozowany jest przypadkowo, w znacznie zaawansowanym stadium rozwoju [14]. Dodatkowo, brak jest obecnie skutecznych metod diagnostycznych umożliwiających wykrycie choroby dostatecznie wcześnie, a przez to pozwalających na prowadzenie efektywnych badań przesiewowych w grupach wysokiego ryzyka rozwoju tego nowotworu [8].

W późniejszych stadiach rozwoju choroby najbardziej charakterystyczne dla MM są zmiany osteolityczne w kościach, anemia, skaza krwotoczna, wzrost lepkości krwi, upośledzenie układu odpornościowego, nawracające infekcje, niewydolność nerek czy objawy wynikające z hiperkalcemii [5, 15]. W wielu przypadkach komórki plazmatyczne produkują charakterystyczną dla szpiczaka nieprawidłową immunoglobulinę monoklonalną (białko M): IgG, IgM, IgA, rzadziej IgE czy IgD lub białko łańcucha lekkiego (kappa lub lambda). Skutkuje to nadmierną lepkością krwi i ostatecznie prowadzi do uszkodzenia wielu narządów [5].

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

W przebiegu MM dochodzi do uszkodzenia narządów końcowych, klasyfikowanych zbiorczo jako kryteria CRAB (CRAB - ang. *C- calcium elevation, R- renal insufficiency, A- anemia, B- bone disease*). Obejmują one hiperkalcemię, niewydolność nerek, anemię i zmiany kostne. Wraz z innymi parametrami związanymi z chorobą kryteria CRAB nadal są pomocne przy rozpoznaniu choroby [8]. Definicja uszkodzenia narządowego związanego ze szpiczakiem plazmocytowym została przez Międzynarodową Grupę Roboczą ds. Szpiczaka zaktualizowana i rozszerzona w 2014 r. o tzw. kryteria SLiM (SLiM - ang. *S- Sixty, Li- Light Chains, M- Magnetic Resonance*), gdzie obok kryteriów oceny CRAB dodatkowo ocenia się odsetek klonalnych plazmocytołów, stosunek stężenia klonalnych do nieklonalnych wolnych łańcuchów lekkich oraz obecność nacieków w badaniu rezonansu magnetycznego [11].

Do oceny stopnia zaawansowania szpiczaka mnogiego zgłoszony został w 1975 roku System Durie-Salmon (DSS – ang. *Durie-Salmon Staging System*). Ocena w systemie Durie-Salmon obejmuje pomiar ilości białka M w surowicy i/lub moczu, stężenie wapnia, hemoglobiny i kreatyniny we krwi oraz obecność zmian kostnych w badaniach obrazowych [16]. Metoda DSS dzieli MM na trzy stopnie zaawansowania na podstawie parametrów klinicznych. Jednym z ograniczeń związanych z metodą DSS, jest subiektywność w określaniu zakresu choroby kości, stąd istniała konieczność zastosowania bardziej obiektywnego narzędzia. Wprowadzono dodatkowo nowy międzynarodowy system oceny zaawansowania szpiczaka (ISS – ang. *International Staging System*). ISS jest prostym systemem stratyfikacji ryzyka stosowanym do diagnozy i prognozowania MM na podstawie dwóch parametrów – mikroglobuliny β_2 i albuminy w surowicy. W 2015 r. IMWG (IMWG - ang. *International Myeloma Working Group*) opublikowało zmodyfikowany międzynarodowy systemu oceny zaawansowania dla szpiczaka mnogiego (R-ISS – ang. *Revised International Staging System*) uwzględniający dodatkowo dwa kolejne czynniki prognostyczne: ocenę ryzyka genetycznego za pomocą hybrydyzacji fluorescencyjnej *in-situ* (FISH – ang. *Fluorescent In Situ Hybridization*) oraz poziomu dehydrogenazy mleczanowej (LDH – ang. *lactate dehydrogenase*) [8, 16].

Szpiczak mnogi jest złożonym genetycznie nowotworem i dotychczas nie poznano w pełni molekularnych podstaw jego rozwoju. Przyjmuje się, że wieloetapowe zmiany genetyczne prowadzą powszechnie do progresji MGUS do szpiczaka mnogiego [17]. Uwagę zwraca się na jednoczesny udział wielu czynników, w tym środowiskowych, fizycznych,

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

chemicznych, biologicznych i genetycznych jako przyczyn leżących u podstaw rozwoju MM [18]. Najprawdopodobniej w wyniku wieloetapowej ewolucji genomowej i zmian mikrośrodowiskowych dochodzi do proliferacji złośliwych komórek plazmatycznych [17]. Osoby z rodzeństwem lub rodzicami ze szpiczakiem mnogim mogą być bardziej narażone na rozwój tego nowotworu niż osoby, które nie mają historii rodzinnej w kierunku tego rozpoznania. Donoszono, że krewni pierwszego stopnia pacjentów z MM mają względne ryzyko od dwóch do czterech razy wyższe niż pacjenci, u których w rodzinie nie stwierdzono zachorowań na MM, co podkreśla rolę czynników genetycznych w predyspozycji do rozwoju choroby. Jednak większość osób z tym nowotworem nie ma krewnych z pozytywnym wywiadem w kierunku szpiczaka mnogiego [19].

W ostatnich latach prowadzono wiele badań oceniających związek między czynnikami dziedzicznymi, a ryzykiem zachorowania na nowotwory. Zmienne genetyczne, od substytucji pojedynczych nukleotydów do aberracji chromosomowych, mogą mieć większy wkład w rozwój raka niż zmienne środowiskowe [20]. Nieprawidłowości cytogenetyczne są wykrywane w 90% komórek plazmatycznych w szpiczakiem mnogim. Ponadto szpiczak wykazuje znaczną niejednorodność klonalną, która charakteryzuje się występowaniem klonów o zróżnicowanych nieprawidłowościach genomowych, które mogą wpływać na wrażliwość komórek nowotworowych na stosowaną chemioterapię oraz rokowanie pacjenta [5, 21].

Ze względu na rodzaj aberracji cytogenetycznych szpiczak plazmocytowy został podzielony na dwie duże kategorie: typ hiperdiploidalny, o lepszym rokowaniu, w którym występują trisomie chromosomów nieparzystych oraz typ niehiperdiploidalny, który charakteryzuje się obecnością translokacji genów immunoglobulinowych i ma agresywny przebieg kliniczny. Podczas progresji i kolejnych nawrotów w klonie nowotworowym pojawiają się wtórne aberracje, w tym te związane ze złym rokowaniem: delecja 17p, delecje 13q, delecja 1p i amplifikacja 1q [22]. Do najczęściej zgłaszanych w MM zmian genomowych należą: *KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *FAM46C*, *BRAF*, *DIS3*, *ATM* i *CCND1* [23]. W szczególności translokacje t(14;16), t(14;20) i delecja 17p13 związane są z niekorzystnym rokowaniem [8].

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

Tabela 1. Aberracje cytogenetyczne w szpiczaku mnogim [16, 17].

| Nieprawidłowość cytogenetyczna | Wartość prognostyczna |
|--------------------------------|-----------------------|
| Trisomie | Ryzyko standardowe |
| t(11;14) | Ryzyko standardowe |
| t(6;14) | Ryzyko standardowe |
| t(4;14) | Ryzyko pośrednie |
| del 13 | Ryzyko standardowe |
| del 17p13 | Wysokie ryzyko |
| t(14;16) | Wysokie ryzyko |
| t(14;20) | Wysokie ryzyko |

Poznanie szlaków nowotworzenia na poziomie molekularnym przyczynia się do lepszego zrozumienia mechanizmów prowadzących do powstania nowotworu, rozwoju nowoczesnej diagnostyki i terapii, poprawy skuteczności leczenia i rokowania pacjentów. Pomimo faktu dynamicznego rozwoju badań genetycznych w szpiczaku mnogim nadal potrzebne są dalsze badania translacyjne, aby móc wykorzystać dane genomowe jako narzędzie medycyny precyzyjnej [24].

Polimorfizm genetyczny wiąże się z występowaniem w populacji co najmniej 2 różnych alleli w danym *locus* z częstością większą niż 1%. Warunkują one zmienność genetyczną i fenotypową w obrębie danej populacji. Polimorfizmy dotyczą zmian w obrębie pojedynczych nukleotydów oraz dłuższych odcinków DNA. Większość z nich stanowią polimorfizmy o charakterze zmian jednego nukleotydu (SNP – ang. *Single Nucleotide Polymorphism*). Pozostałe polimorfizmy związane są z insercjami/delecjami, wariantami liczby kopii długich sekwencji DNA (CNV – ang. *Copy Number Variation*), zmiennymi liczbami powtórzeń tandemowych (VNTR - ang. *Variable Number of Tandem Repeats*) [25]. Najczęstszymi dziedzicznymi wariacjami sekwencji są SNPs, które stanowią około 90 % wszystkich zmienności ludzkiego genomu i występują co 100 do 300 pz [26].

SNPs dzieli się funkcyjnie na synonimiczne, nie wpływające na sekwencje aminokwasową białka oraz niesynonimiczne, gdzie w wyniku obecności SNP występuje zmieniony aminokwas, w tym kodon stop. Polimorfizmy w zależności od miejsca ich występowania w strukturze danego genu mogą modyfikować procesy transkrypcji i syntezy odpowiednich białek. Warianty polimorficzne zlokalizowane w regionach promotorowych

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

genów mogą skutkować obniżeniem lub podwyższeniem transkrypcji genu przez zmianę miejsc wiązania dla czynników transkrypcyjnych. Zmiany zlokalizowane w eksonach mogą prowadzić do powstania białka o odmiennych właściwościach np. białka o obniżonej aktywności lub nieprawidłowego białka pozbawionego funkcji enzymatycznej czy regulatorowej. Natomiast warianty polimorficzne zlokalizowane w intronach mogą wpływać na zmianę procesów regulatorowych transkrypcji modyfikując proces składania mRNA lub wpływać na funkcję czynników wzmacniających – enhancerów [27].

Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu znalazły zastosowanie jako markery genetyczne ze względu na ich dużą częstotliwość i stosunkowo równomierne rozmieszczenie w genomie człowieka. Stały się wykorzystywane do dokładnego mapowania *loci* chorobowych i do badań asocjacji genów kandydujących. Badania asocjacji i analiza powiązań przy użyciu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu są interesujące w aspekcie ich diagnostycznego wykorzystania, ponieważ charakteryzują się stabilnym dziedziczeniem przez pokolenia [28]. Duża liczba SNPs dostępnych w publicznych bazach danych sprawia, że badania asocjacji i dokładne mapowanie *loci* chorobowych są bardzo praktyczne i szeroko wykorzystywane [29].

W celu prawidłowego funkcjonowania organizm ludzki nieustannie musi transportować przez bariery biologiczne różne substancje, zarówno związki endogenne, jak również ksenobiotyki. Istnieje wiele grup transporterów błonowych podzielonych na rodziny ze względu na homologię budowy i specyfikę transportowanych substratów. Główne rodziny błonowych transporterów komórkowych to:

- rodzina białek mających kasetę wiążącą ATP (ABC – ang. *ATP-binding cassette family*)
- rodzina polipeptydów transportujących aniony organiczne (OATP – ang. *organic anion transporting polypeptide family*)
- rodzina transporterów peptydowych (PepT – ang. *peptide transporter family*)
- rodzina organicznych transporterów anionowych (OAT – ang. *organic anion transporter family*)
- rodzina organicznych transporterów kationowych (OCT – ang. *organic cation transporter family*) [30].

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

Białka z rodzin ABC i OATP transportują cząsteczki takie jak jony, węglowodany, aminokwasy, witaminy, peptydy, polisacharydy, hormony, tłuszcze i ksenobiotyki biorące udział w wielu podstawowych procesach fizjologicznych w prawidłowych komórkach, jak również wpływających na wzrost i przeżycie komórek nowotworowych [31].

Transportery z rodziny ABC należą do transporterów wypływowych (odkomórkowych). Aktywnie transportują substancje z komórek, wykorzystując ATP jako źródło energii. Efflux, czyli zjawisko aktywnego usuwania substancji z komórek wywołane obecnością pomp błonowych jest jednym z mechanizmów warunkujących oporność wielolekową. Do tej pory u ludzi zidentyfikowano 48 typów transporterów ABC, które następnie podzielono na siedem podrodzin w oparciu o strukturę genów, sekwencję aminokwasową, organizację domen i analizę filogenetyczną (od ABCA do ABCG). Każdy transporter ABC ma specyficzny wzór obecności i lokalizacji tkankowej. Transportery ABC występują m. in. w jelicie cienkim, wątrobie, czy nerkach odgrywając ważną rolę we wchłanianiu, dystrybucji, wydalaniu ksenobiotyków z żółcią, czy klirensie nerkowym. Niektóre transportery ABC prezentują wysoką obecność w obrębie bariery krew-tkanki, chroniąc wrażliwe tkanki przed toksycznymi związkami i utrzymując homeostazę komórkową [32, 33].

Transportery OATP kodowane przez geny *SLCO* stanowią ważną rodzinę transporterów, która pośredniczy w transporcie przezbłonowym endogennych składników odżywczych, ksenobiotyków i różnych leków. Rodzina OATP składa się z 11 członków reprezentujących różne funkcje transportowe i prezentujących obecność w wielu różnych tkankach. Typowymi substratami OATP są m. in. kwasy żółciowe, hormony steroidowe, prostaglandyny, testosteron i hormony tarczycy, które mogą mieć znaczenie dla proliferacji komórek nowotworowych. Co więcej odkryto, że transportery OATP wykazują charakterystyczną obecność w wielu tkankach nowotworowych i przypuszcza się, że mogą pełnić rolę markerów nowotworowych [34]. Między innymi z tego powodu oraz ich wysokiej aktywności transportowej dla wielu leków przeciwnowotworowych transportery OATP rozważa się jako istotne cele terapeutyczne w projektowaniu leków przeciwnowotworowych [35]. Co ciekawe, substraty OATP są często substratami niektórych transporterów ABC, takich jak białka związane z opornością wielolekową (MRP - ang. *Multidrug Resistant Protein*), czy białka oporności raka piersi (BCRP - ang. *Breast Cancer Resistance Protein*). W ten sposób

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

wydajny transport substratu jest realizowany przez kooperatywne funkcje wychwytu za pośrednictwem białek OATP i wypływu za pośrednictwem białek ABC [36].

W przebiegu wielu zróżnicowanych mechanizmów może dochodzić do zmiany funkcji transporterów błonowych, co skutkować może zaburzeniami homeostazy komórek i organizmu. Z jednej strony w wyniku spowolnienia lub zahamowania eliminacji ksenobiotyków z komórki, wynikających z ograniczenia bądź utraty komórkowych mechanizmów ochronnych, dochodzić może do nagromadzenia szkodliwych substancji w komórce. Z drugiej strony ograniczenia te dotyczyć mogą również transportu substancji endogennych niezbędnych do prawidłowego wzrostu, różnicowania i funkcjonowania komórek. Dysfunkcje transportowe w komórce mogą istotnie zwiększać ryzyko wystąpienia uszkodzeń, czy zaburzeń w jej prawidłowym funkcjonowaniu prowadząc do rozwoju procesu nowotworowego [37].

Rola transporterów błonowych jest istotna nie tylko ze względu na ich udział w fizjologicznych procesach komórek, ryzyku rozwoju nowotworów, jak również ich kluczowej roli w transporcie leków przeciwnowotworowych. Jednym z poważniejszych problemów współczesnego leczenia systemowego nowotworów jest zjawisko oporności na stosowane leki np. poprzez indukowanie mechanizmu oporności wielolekowej. Istotą oporności lekowej zależnej od transportu leku jest zmniejszenie jego efektywnego wewnątrzkomórkowego stężenia z powodu ograniczonego przepływu leku do wnętrza komórki nowotworowej, bądź jego nasilonego wyrzutu na zewnątrz przy aktywnym udziale transporterów błonowych. Mechanizm ten może dotyczyć także transportu leku z cytoplazmy do jądra komórki czy innych organelli wewnątrzkomórkowych [38]. Uważa się, że transportery leków są kluczowe dla akumulacji leków w komórkach, a ich aktywność jest często bezpośrednio związana ze skutecznością terapeutyczną, toksycznością leków i interakcjami między lekami [39]. Wśród substratów transporterów ABC i OATP jest wiele leków stosowanych w chemioterapii nowotworów, w tym szpiczaka mnogiego [40].

Potencjalny związek pomiędzy polimorfizmami genetycznymi i ich wpływem na ekspresję genów oraz funkcję i aktywność białek, a rozwojem nowotworów stanowi istotny problem badawczy. Pomimo częściowego poznania podłoża genetycznego szpiczaka mnogiego konieczne jest weryfikowanie kolejnych zmian genetycznych, mogących wpływać na ryzyko zachorowania, progresję, skuteczność terapii czy rokowanie pacjentów. Zmiany

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

genetyczne w obrębie genów kodujących transportery ABC i OATP mogą przyczyniać się do zmian funkcji transportu wielu substancji istotnych dla prawidłowego funkcjonowania komórek i utrzymania homeostazy oraz mieć skutki w dystrybucji leków przeciwnowotworowych, co dodatkowo może mieć przełożenie na skuteczność i bezpieczeństwo stosowanej terapii. Zatem lepsze zrozumienie roli SNPs w transporterach komórkowych może mieć znaczenie dla poznania mechanizmów rozwoju, oceny ryzyka rozwoju i progresji nowotworu, jak również optymalnej chemioterapii [31].

Gen *ABCB1* (*ABCB1* - ang. *ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 1*) koduje białko oporności wielolekowej 1 (*MDR1* - ang. *Multidrug Resistance Protein 1*). Gen zlokalizowany jest w regionie chromosomalnym 7q21.1 i koduje zbudowaną z 1280 aminokwasów glikoproteinę P (*P-gp* - ang. *P-glycoprotein*). *P-gp* jest transporterem wypływowym związanym z mechanizmem oporności wielolekowej [41]. Wykorzystując energię z ATP usuwa obce substancje, w tym leki przeciwnowotworowe z komórek. Polimorfizmy genetyczne *ABCB1* mogą prowadzić do zmian w ekspresji genu lub funkcji *P-gp*, przyczyniając się w ten sposób do międzyosobniczej zmienności. Dotychczas najszerzej badane w genie *ABCB1* były trzy SNPs: C1236T (rs1128503), C3435T (rs1045642) oraz G2677T/A (rs2032582) [42, 43]. Rolę SNPs w *ABCB1* badano w guzach litych m. in. w raku piersi, raku jajnika, raku prostaty, raku żołądka, raku jelita oraz nowotworach hematologicznych: białaczce, chłoniaku, szpiczaku mnogim [44]. W badaniu przeprowadzonym na populacji kaukaskiej Jamroziak i wsp., 2009 badali wpływ polimorfizmów *ABCB1* w pozycjach C1236T, G2677T/A i C3435T. W badaniu analiza regresji logistycznej nie wykazała istotnego wpływu wariantów alleli i genotypów na prawdopodobieństwo rozwoju MM [45].

Innym ważnym SNP genu *ABCB1* jest T-129C (rs3213619) zlokalizowany w regionie promotorowym 5'UTR (5' untranslated region). Dowiedziono, że allel C T-129C prowadzi do obniżonej ekspresji *P-gp* [46]. Niższe poziomy mRNA są prawdopodobnie związane z osłabieniem funkcji ochronnej *P-gp* i akumulacją ksenobiotyków w komórkach oraz wyższym ryzykiem rozwoju choroby [47]. Dotychczas wykazano, między innymi, że polimorfizm T-129C był związany z niższą ekspresją mRNA *P-gp* zarówno w gruczolakoraku jelita grubego, jak i przyległych nienowotworowych tkankach jelita grubego [48]. Natomiast w badaniu nad znaczeniem polimorfizmu T-129C genu *ABCB1* w przypadkach raka jajnika nie stwierdzono jego

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

znaczenia w przypadku rozwoju tego typu nowotworu [49]. Polimorfizm T-129C nie był dotychczas badany jako czynnik ryzyka rozwoju MM.

Gen *ABCG2* (*ABCG2* - ang. *ATP- Binding Cassette Subfamily G Member 2*) znajduje się w regionie chromosomalnym 4q22 i koduje zbudowane z 657 aminokwasów białko transportowe *ABCG2*, zwane również białkiem BCRP. BCRP ma szeroką specyfikę substratową i jest jednym z najważniejszych białek wypływowych modulujących transport składników odżywczych oraz farmakokinetykę i toksykokinetykę. Jest istotnym czynnikiem związanym z interakcjami lek-lek za pośrednictwem transportera (tDDI – ang. *transporter-mediated drug-drug interactions*). Wzorzec ekspresji tkankowej genów i lokalizacji komórkowej BCRP jest porównywalny z P-gp [33].

Kilka badań wykazało, że poziom ekspresji *ABCG2* wiąże się ze złym rokowaniem w przypadku raka oraz, że ekspresję BCRP można uznać za czynnik prognostyczny w przypadku niektórych nowotworów. Dotychczas badano znaczenie wpływu wariantów polimorficznych i poziomu ekspresji *ABCG2* na ryzyko rozwoju, stopień zaawansowania, progresję nowotworu, a także skuteczność i toksyczność stosowanej chemioterapii oraz czas przeżycia pacjentów w przypadkach: ostrej białaczki szpikowej (AML- ang. *Acute Myeloid Leukemia*), przewlekłej białaczki szpikowej (CML - ang. *Chronic Myeloid Leukemia*), chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (DLBCL - ang. *Diffuse Large B-cell Lymphoma*), niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC - ang. *Non-Small-Cell Lung Cancer*), drobnokomórkowego raka płuca (SCLC - ang. *Small Cell Lung Cancer*), raka piersi (BC – ang. *Breast Cancer*), czy raka trzustki (PC- ang. *Pancreatic Cancer*) [32].

Gen *ABCG2* został przebadany pod kątem SNPs w 90 różnych populacjach etnicznych. Istnieje ponad 80 naturalnie występujących polimorfizmów pojedynczego nukleotydu genu *ABCG2*. Wariant C421A (rs2231142) skutkuje zmianą strukturalną białka, przez co jest rozpoznawane jako nieprawidłowe i może ulegać degradacji. Przekłada się to na niższy poziom ekspresji w błonie komórkowej w porównaniu z białkiem typu dzikiego. Zmutowany wariant G34A (rs2231137) powoduje dyslokację białka BCRP w błonie komórkowej i generuje białko o znacznie zmniejszonej zdolności do transportu wybranych leków/ksenobiotyków w porównaniu z typem dzikim. Inne SNPs genu *ABCG2* wywołujące upośledzenie czynnościowe białka to C376T (rs72552713) i G1000GT (rs319997). Powodują one podstawienia kodonu stop

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

w genie *ABCG2*, jednak częstość alleli jest bardzo niska we wszystkich grupach etnicznych. Na podstawie dostępnych danych uznaje się, że polimorfizmy *ABCG2* G34A i C421A mają potencjalnie największe znaczenie kliniczne [50-53].

Gen *SLCO1B1* znajduje się w regionie chromosomalnym 12p12.1 i koduje zbudowane z 691 aminokwasów białko transportowe OATP1B1 (OATP1B1 – ang. *Organic Anion Transporter Polypeptide 1 B1*). Polipeptydy transportujące aniony organiczne (OATP - ang. *Organic Anion Transporting Polypeptide Family*) stanowią ważną rodzinę transporterów napływowych (dokomórkowych), która pośredniczy w transporcie przez błonowy różnych endogennych składników odżywczych i leków klinicznych, w tym leków przeciwnowotworowych [54]. Liczne warianty sekwencji w postaci SNPs, zostały zidentyfikowane i potwierdzone, jako wpływające na farmakokinetykę leku poprzez zmianę aktywności transportowej odpowiednich OATP. Warianty *SLCO1B1* były szeroko badane pod kątem wpływu na farmakokinetykę wielu leków, zwłaszcza na częstość występowania działań niepożądanych leków u pacjentów leczonych statynami. Badano także wpływ na absorpcję, dystrybucję, eliminację i toksyczność chemioterapeutyków oraz przeżycie pacjentów [55-57]. Spośród nich dobrze scharakteryzowanymi niesynonimicznymi wariantami *SLCO1B1* są A388G (rs2306283) oraz T521C (rs4149056). A388G i T521C tworzą cztery główne haplotypy: *1A – typ dziki (388A/521T), *1B (388G/521T), *5 (388A/521C) i *15 – typ zmutowany (388G/521C) [58]. Udowodniono, że kliniczne znaczenie mają głównie *5 lub *15 w przypadkach miopatii wywołanej przez statyny [59].

Wariant T521C genu *SLCO1B1* występuje w eksonie 5. Skutkuje on zmniejszeniem maksymalnej prędkości transportu, co przekłada się również na niższą aktywność transportową białka. Wariant A388G genu *SLCO1B1* występuje w eksonie 4 i wiązany jest ze zmienioną aktywnością transportową OATP1B1. Część badań wykazała związek ze zwiększoną aktywnością transportową białka, w innych badaniach nie zaobserwowano zmiany aktywności transportowej wynikającej z wpływu A388G na funkcję OATP1B1. Dlatego rola A388G pozostaje kontrowersyjna [55, 60].

W ciągu ostatnich dwóch dekad strategie leczenia MM szybko ewoluowały. Przeżywalność pacjentów z MM uległa znacznej poprawie dzięki dostępowi do skutecznych środków terapeutycznych, takich jak inhibitory proteasomu, immunomodulatory, przeciwciała

monoklonalne czy autologiczny przeszczep komórek macierzystych. Dają one lepszą odpowiedź kliniczną w porównaniu z tradycyjnymi środkami cytotoksycznymi. Trwają zaawansowane badania nad wprowadzeniem w leczeniu chorych z nawrotowym lub opornym szpiczakiem plazmocytowym terapii CAR-T (CAR-T ang. *Chimeric Antigen Receptors T cells*) za pośrednictwem zmodyfikowanych autologicznych limfocytów. Niemniej jednak szpiczak mnogi nadal pozostaje chorobą nieuleczalną, wykazującą dużą niejednorodność w obrazie klinicznym, przebiegu i przeżyciu. Zgodnie z prognozami liczba osób żyjących z tym nowotworem będzie wciąż rosła, m.in. z powodu starzenia się społeczeństwa, coraz lepszej diagnostyki i leczenia [15, 24, 61, 62].

Aktualne badania sugerują możliwość wykorzystania polimorfizmów jako markerów prognostycznych dla lepszego leczenia MM. Campo i wsp., 2018 znaleźli kilka *loci*, takich jak rs12521798 i rs17748074, powiązanych z neuropatią obwodową indukowaną bortezomibem u pacjentów ze szpiczakiem [63]. Zmorzyński i wsp., 2019 donieśli o genetycznym związku polimorfizmów transferazy glutationowej (GST – ang. glutathione S-transferases) i czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α - ang. Tumor Necrosis Factor α) z wynikami i przeżyciem pacjentów z MM [64]. Polimorfizm genu *SLC7A5* (rs4240803), kodującego białko należące do rodziny transporterów OATP, będącego jednym z mediatorów wychwytu melfalanu, został opisany jako wpływający na ekspresję *SLC7A5* (*SLC7A5* - ang. *Solute Carrier Family 7 Member 5*), przyczyniając się w ten sposób do klinicznie lepszej odpowiedzi pacjentów ze szpiczakiem na terapię opartą na melfalanie [65].

Cele naukowe pracy

Cele naukowe pracy

Geny kodujące transportery komórkowe posiadają wiele miejsc polimorficznych, które mogą wpływać na funkcję transporterów zarówno w komórkach zdrowych, jak i nowotworowych. Zmiany ilości i/lub aktywności białek transportowych mają liczne konsekwencje, m.in. zmniejszona aktywność może prowadzić do akumulacji szkodliwych substancji w komórce, co skutkować może uszkodzeniem komórki, mutacjami i onkogenezą. Dodatkowo wzrost aktywności białek jest zwykle przyczyną braku lub niedostatecznej odpowiedzi na stosowaną chemioterapię.

Celem naukowym rozprawy doktorskiej było zbadanie wybranych polimorfizmów genów kodujących transportery błonowe z nadrodziny ABC oraz rodziny OATP (gp-P, BCRP, OATP1B1) i określenie ich wpływu na predyspozycje rozwoju oraz skuteczność terapii przeciwnowotworowej w szpiczaku mnogim. Badania zostały prowadzone na poziomie DNA z zastosowaniem technik biologii molekularnej.

Cele szczegółowe obejmowały (**Publikacja I, II, III**):

1. Ocenę częstości występowania genotypów i alleli SNP T-129C (rs3213619) w regionie promotorowym genu *ABCB1* kodującego komórkowe białko transportowe z nadrodziny ATP – glikoproteinę – P. (**Publikacja I**)
2. Ocenę częstości występowania genotypów i alleli SNP G34A (rs2231137) genu *ABCG2* kodującego komórkowe białko transportowe z nadrodziny ATP – białko BCRP. (**Publikacja II**)
3. Ocenę częstości występowania genotypów i alleli SNP C421A (rs2231142) genu *ABCG2* kodującego komórkowe białko transportowe z nadrodziny ATP – białko BCRP. (**Publikacja II**)
4. Ocenę częstości występowania genotypów i alleli SNP A388G (rs2306283) genu *SLCO1B1* kodującego komórkowe białko transportowe z nadrodziny OATP – białko OATP1B1. (**Publikacja III**)
5. Przeprowadzenie bioinformatycznej analizy *in silico* oceniającej wpływ SNPs na strukturę i funkcję białka przy użyciu programów stosowanych do oceny efektu funkcjonalnego polimorfizmu. (**Publikacja III**)

Cele naukowe pracy

6. Analizę statystyczną uzyskanych wyników oraz poszukiwanie związku z danymi demograficzno-klinicznymi oraz przeżyciem pacjentów w szpiczaku mnogim.

(Publikacja I, II, III)

Część doświadczalna

Część doświadczalna

Materiał:

Badaniami objęto:

- 91 pacjentów (**Publikacja I**)
- 181 pacjentów (**Publikacja II**)
- 157 pacjentów (**Publikacja III**)

z rozpoznaniem szpiczaka plazmocytozowego leczonych w Klinice Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 1992-2002. Materiał badany stanowiło archiwalne DNA wyizolowane z krwi obwodowej pacjentów pobranej na EDTA.

Dodatkowo jako grupę odniesienia wykorzystano:

- 94 prób (**Publikacja I**)
- 97 prób (**Publikacja II**)
- 141 prób (**Publikacja III**)

DNA wyizolowanego od zdrowych osób, będących dobrowolnymi dawcami krwi w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi.

Na przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badania uzyskano niezbędne zgody Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi: RNN/93/20/KE, RNN/88/16/KE, RNN/285/13/KE. Wszyscy pacjenci udzielili świadomej pisemnej zgody na udział w badaniach.

Koncepcja i plan badań

Schemat przeprowadzonych badań przedstawiono poniżej:

- 1) Analiza SNP T-129C (rs3213619) w regionie promotorowym genu *ABCB1* (**Publikacja I**)
- 2) Analiza SNP G34A (rs2231137) w eksonie 2 genu *ABCG2* (**Publikacja II**)
- 3) Analiza SNP C421A (rs2231142) w eksonie 5 genu *ABCG2* (**Publikacja II**)
- 4) Analiza SNP A388G (rs2306283) w eksonie 5 genu *SLCO1B1* (**Publikacja III**)

KONCEPCJA I PLAN BADAŃ

analiza wybranych SNPs w genach
kodujących transportery komórkowe

ABCB1 (rs3213619)

ABCG2 (rs2231137)

ABCG2 (rs2231142)

SLCO1B1 (rs2306283)

Analiza piśmiennictwa i baz naukowych on-line



Wybór starterów do reakcji PCR



Wybór enzymu restrykcyjnego



Optymalizacja warunków reakcji dla metody PCR-RFLP



Przeprowadzenie reakcji PCR



Elektroforeza produktów reakcji PCR



Trawienie enzymem restrykcyjnym



Elektroforeza produktów po trawieniu enzymem restrykcyjnym



Analiza uzyskanych rezultatów z tworzeniem bazy wyników do późniejszych analiz



Przeprowadzenie analizy statystycznej



Część doświadczalna

Metodyka badań

Do analizy poszczególnych genotypów w badaniu zastosowano metodę PCR-RFLP (ang. *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragments Length Polymorphism*). Szczegółowy opis odczynników, aparatury, przygotowania próbek oraz procedur badawczych został zamieszczony poniżej oraz zawarty jest w publikacjach, które są przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej.

1) Analiza SNP T-129C (rs3213619) w regionie promotorowym genu *ABCB1* - (Publikacja I)

| PCR-RFLP | | | | | | | | |
|----------------|------------------------------|----------------------|--------------|-------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------|-------------|
| Primery: | | Warunki reakcji PCR: | | | Trawienie enzymem restrykcyjnym: | | | |
| | | Etap: | Temperatura: | Czas: | Enzym restrykcyjny | Miejsca cięcia enzymu restrykcyjnego | | |
| Forward primer | 5' TTTCACACTTGCCTTTCTAGAG 3' | wstępna denaturacja | 94 °C | 5 min | 35 cykli | <i>MspI</i> | 5' C↓CGG 3' | |
| | | denaturacja | 94 °C | 40 s | | | | |
| | | annealing | 58 °C | 40 s | | | | |
| Reverse primer | 5' CGGCCTCTGCTCTTTGAG 3' | elongacja | 72 °C | 30 s | | | | 3' GGC↑C 5' |
| | | końcowa elongacja | 72 °C | 5 min | | | | |

2) Analiza SNP G34A (rs2231137) genu *ABCG2* - (Publikacja II)

| PCR-RFLP | | | | | | | | |
|----------------|-----------------------------------|----------------------|--------------|-------|----------------------------------|--------------------------------------|-----------------|-------------------|
| Primery: | | Warunki reakcji PCR: | | | Trawienie enzymem restrykcyjnym: | | | |
| | | Etap: | Temperatura: | Czas: | Enzym restrykcyjny | Miejsca cięcia enzymu restrykcyjnego | | |
| Forward primer | 5' AAATGTTTCATAGCCAGTTTCTTGGGA 3' | wstępna denaturacja | 94 °C | 5 min | 35 cykli | <i>BseMI</i> | 5' GCAATGNN ↓3' | |
| | | denaturacja | 94 °C | 40 s | | | | |
| | | annealing | 60 °C | 40 s | | | | |
| Reverse primer | 5' ACAGTAATGTCGAAGTTTTATCGCA 3' | elongacja | 72 °C | 30 s | | | | 3' CGTTAC ↑ NN 5' |
| | | końcowa elongacja | 72 °C | 5 min | | | | |

Część doświadczalna

3) Analiza SNP C421A (rs2231142) genu *ABCG2* - (Publikacja II)

| PCR-RFLP | | | | | | | | |
|----------------|----------------------------|----------------------|--------------|-------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------|---------------|
| Primery: | | Warunki reakcji PCR: | | | Trawienie enzymem restrykcyjnym: | | | |
| | | Etap: | Temperatura: | Czas: | Enzym restrykcyjny | Miejsca cięcia enzymu restrykcyjnego | | |
| Forward primer | 5' ATGTTGTGATGGGCACTCTG3' | wstępna denaturacja | 94 °C | 5 min | 35 cykli | <i>MseI</i> | 5' T ↓ TAA 3' | |
| | | denaturacja | 94 °C | 40 s | | | | |
| | | annealing | 58 °C | 40 s | | | | |
| Reverse primer | 5' TGCTGATCATGATGCTTCAG 3' | elongacja | 72 °C | 30 s | | | | 3' AAT ↑ T 5' |
| | | końcowa elongacja | 72 °C | 5 min | | | | |

4) Analiza SNP A388G (rs2306283) genu *SLCO1B1* - (Publikacja III)

| PCR-RFLP | | | | | | | | |
|----------------|-------------------------------|----------------------|--------------|-------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------|----------------|
| Primery: | | Warunki reakcji PCR: | | | Trawienie enzymem restrykcyjnym: | | | |
| | | Etap: | Temperatura: | Czas: | Enzym restrykcyjny | Miejsca cięcia enzymu restrykcyjnego | | |
| Forward primer | 5' TTTCACTACTTGCCCTTCTAGAG 3' | wstępna denaturacja | 94 °C | 5 min | 35 cykli | <i>TaqI</i> | 5' T ↑ CGA 3' | |
| | | denaturacja | 94 °C | 40 s | | | | |
| | | annealing | 58 °C | 40 s | | | | |
| Reverse primer | 5' CGGCCTCTGCTTCTTTGAG 3' | elongacja | 72 °C | 30 s | | | | 3' AG C ↑ T 5' |
| | | końcowa elongacja | 72 °C | 5 min | | | | |

Ocena statystyczna wyników

Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą programu STATISTICA 10 statistical software (StatSoft Inc. 2011), STATISTICA 13 statistical software (StatSoft Inc. 2018). We wszystkich analizach wartość $p \leq 0,05$ uznawano za statystycznie istotną.

Szczegółowe informacje na temat zastosowanych testów znajdują się w poszczególnych publikacjach będących podstawą rozprawy doktorskiej.

Realizacja celów naukowych – wyniki i dyskusja

Nowotworzenie to złożony proces, który obejmuje czynniki genetyczne, epigenetyczne, środowiskowe oraz ich wzajemne interakcje. Od lat zwraca się uwagę na związek wariantów genetycznych, takich jak SNPs z ryzykiem nowotworów. Dotychczasowe badania wykazały wiele istotnych klinicznie powiązań między polimorfizmami, a ryzykiem zachorowania na raka. Dowody epidemiologiczne wykazały, że proces detoksykacji i eliminacji ksenobiotyków prowadzony za pośrednictwem transporterów jest zaangażowany w rozwój nowotworów [20]. W niniejszej pracy doktorskiej dokonano analizy czterech polimorfizmów genów kodujących wybrane transportery komórkowe w szpiczaku plazmocyowym.

W przypadku analizy SNP T-129C (rs3213619) w regionie promotorowym genu *ABCB1* przebadano 91 prób DNA pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym szpiczakiem mnogim oraz 94 prób DNA pochodzących od zdrowych dawców krwi stanowiących grupę kontrolną. W przypadku obu grup dominujący był genotyp dziki TT: 98 % - grupa badana i 96 % grupa kontrolna. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów pomiędzy grupą badaną, a grupą kontrolną. Nie wykazano także różnic pomiędzy analizowanym polimorfizmem, a płcią ($p=0.8870$), wiekiem w podziale na grupy poniżej i powyżej 63 roku życia ($p=0.1572$) oraz typem immunoglobuliny wydzielanej przez komórki plazmatyczne ($p=0.6901$). Uzyskane wyniki sugerują, że SNP T-129C (rs3213619) genu *ABCB1* nie wpływa na zwiększone ryzyko zachorowania na szpiczaka mnogiego ($p=0.4297$). **(Publikacja I)**

Uzyskane w badaniu wyniki są zgodne z danymi opublikowanymi przez Koyama i wsp., 2006, gdzie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między grupą osób zdrowych a grupą chorych na raka przełyku lub z grupą chorych na raka jelita grubego [48]. Podobne wyniki uzyskali Liu i wsp., 2016 w badaniu roli SNP w genie *ABCB1* w podatności na pierwotną jaskrę otwartego kąta. W badaniu tym nie stwierdzono istotnych różnic w częstościach *ABCB1* T-129C w grupie badanej i kontrolnej [66]. Badania nad rolą polimorfizmu T-129C w genie *ABCB1* prowadzono również w raku jajnika. Podobnie, nie wykazano różnic w częstości występowania alleli między pacjentami z rakiem jajnika, a grupą kontrolną dla SNP T-129C [49]. Natomiast Yamaguchi i wsp., 2006, wykazali, że pacjenci z rakiem jajnika u których

Realizacja celów naukowych – wyniki i dyskusja

występowały warianty TC/CC SNP T-129C genu *ABCB1* wykazywali niższą wartość parametru farmakokinetycznego AUC dla paklitakselu w porównaniu z wariantem dzikim [67]. W przeciwieństwie do uzyskanych w ramach pracy doktorskiej wyników, Hu i wsp., 2013 wykazali, że polimorfizm *ABCB1* T-129C był związany z ryzykiem DLBCL [68].

Ocenę polimorfizmów G34A (rs2231137) oraz C421A (rs2231142) genu *ABCG2* wykonano w 181 próbach DNA pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym szpiczakiem mnogim oraz 97 próbach DNA pochodzących od zdrowych dawców krwi stanowiących grupę kontrolną. W przypadku polimorfizmu G34A wykazano 100 % obecność genotypu dzikiego GG zarówno w grupie badanej jak i grupie kontrolnej. Nie wykazano tym samym różnicy pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów pomiędzy grupą badaną, a grupą kontrolną. Uprzednio Hampras i wsp., 2010 wykazali, że warianty AG lub AA dla G34A w genie *ABCG2*, w porównaniu z genotypem typu dzikiego GG, wiązały się z poprawą przeżywalności jak również zwiększoną toksycznością chemioterapii u pacjentów z AML [69]. Niestety analizowany SNP rzadko badany był dotychczas w nowotworach hematologicznych i trudno jest szeroko dyskutować uzyskane w badaniu wyniki.

W przeprowadzonej analizie dla polimorfizmu C421A genu *ABCG2* dominującym genotypem był CC stanowiąc odpowiednio 88.4 % w grupie badanej i 97.9 % w grupie kontrolnej. Genotyp CA występował częściej wśród pacjentów ze szpiczakiem mnogim (10.5 %) niż w grupie kontrolnej (2.1 %). Podobnie genotyp zmutowany AA występował częściej wśród pacjentów ze szpiczakiem mnogim (1.1 %) w odniesieniu do grupy kontrolnej (0.0 %). W badaniu wykazano, że SNP C421A genu *ABCG2* był istotnie statystycznie związany z ryzykiem rozwoju szpiczaka mnogiego ($p=0.0218$). Nie wykazano natomiast związku pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów ($p=0.1255$) i alleli (allel C $p=0.1307$; allel A $p=0.3865$), a płcią. Dodatkowo nie wykazano związku pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów ($p=0.9939$) i alleli ($p=0.8674$), a typem immunoglobuliny wydzielanej przez komórki plazmatyczne (**Publikacja II**).

Do tej pory przeprowadzono wiele badań epidemiologicznych w celu oceny związku między polimorfizmami genu *ABCG2*, a ryzykiem różnych typów nowotworów. Jednak dokładna zależność między podatnością na raka, a polimorfizmami *ABCG2* pozostaje niejasna. Au i wsp., 2014 wskazali, że SNP C421A genu *ABCG2* może wpływać na odpowiedź molekularną terapii imatynibem w przewlekłej białaczce szpikowej. Badacze wskazali również

Realizacja celów naukowych – wyniki i dyskusja

na przydatność kliniczną genotypowania między innymi tego SNP w przewidywaniu odpowiedzi na imatynib wśród pacjentów z CML [70]. Salimizand i wsp., 2015 analizując dystrybucję genotypów polimorfizmu C421A genu *ABCG2* u pacjentów z CML wykazali, że genotyp CC występował częściej w grupie pacjentów z CML w odniesieniu do grupy kontrolnej. W badaniu nie wykazano związku między czynnikami prognostycznymi takimi jak wiek, płeć, odpowiedź na leczenie i leukocytoza [71].

Potwierdzenie prezentowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wyników znaleźć można w późniejszym badaniu Abbassy i wsp., 2022, gdzie autorzy wykazali istotną statystycznie korelację między SNP C421A genu *ABCG2*, a ryzykiem wystąpienia szpiczaka mnogiego w populacji egipskiej. Autorzy sugerują również, że SNP C421A genu *ABCG2* może być pomocny w przewidywaniu ryzyka rozwoju szpiczaka mnogiego [72]. Hu i wsp., 2007 prowadząc podobne badanie na grupie pacjentów z rozlanym chłoniakiem z dużych limfocytów B (DLBCL) wykazali zwiększone ryzyko podatności na rozwój DLBCL związane z wariantem C421A *ABCG2* dla genotypów CA i AA w porównaniu z wariantem dzikim. Dodatkowo pacjenci z genotypem AA G34A *ABCG2* wykazywali krótszy czas przeżycia w porównaniu z osobami z genotypami GG/GA. W badaniu stwierdzono łączny wpływ G34A i C421A *ABCG2* na przeżycie całkowite. Genotypy AA polimorfizmu G34A i CC polimorfizmu C421A *ABCG2* związane były ze znacznie zmniejszonym całkowitym przeżyciem pacjentów w porównaniu z genotypami GG + GA oraz AA+CA [73].

Podobne wyniki uzyskali Ghafouri i wsp., 2016 wykazując, że allel A polimorfizmu C421A *ABCG2* występował istotnie częściej u pacjentek z rakiem piersi niż u osób zdrowych. Dodatkowo u pacjentek z genotypem AA C421A *ABCG2* występowało większe ryzyko progresji raka piersi [74]. Podobnie Wu i wsp., 2015 wykazali, że genotyp GA lub AA G34A *ABCG2*, genotyp AA C421A *ABCG2* oraz haplotypy 34A-421C i 34G-421A związane były z istotnie zwiększonym ryzykiem rozwoju raka piersi. Dodatkowo u pacjentów z rakiem piersi leczonych neoadiuwantową chemioterapią opartą na antracyklinach, u których obserwowano większą skuteczność terapii genotyp AA C421A *ABCG2* występował częściej. Pacjenci z genotypem AA G34A *ABCG2* z dodatnim receptorem estrogenowym lub progesteronowym po pooperacyjnej chemioterapii opartej na antracyklinie wykazywali dłuższe przeżycie całkowite [75]. W innym badaniu Zhai i wsp., 2012 wykazali, że wśród dzieci z ostrą białaczką limfocytową allel G SNP G34A był istotnie związany z ryzykiem rozwoju białaczki, podczas gdy dla polimorfizmu C421A

Realizacja celów naukowych – wyniki i dyskusja

nie wykazano związku z ryzykiem rozwoju choroby [76]. Tian i wsp., 2012 wykazali, że warianty CA + AA w porównaniu z CC C421A genu *ABCG2* były związane z dłuższą o 6 miesięcy medianą przeżycia bez progresji u kobiet z zaawansowanym rakiem jajnika leczonych chemioterapią opartą na platynie i taksanach [77].

Niektóre badania wykazały odmienne rezultaty. Chen i wsp., 2012 przeprowadzili metaanalizę opartą na dostępnych danych z badań oceniających związek między tym polimorfizmem, a ryzykiem nowotworów. Uzyskane wyniki wykazały, że polimorfizm C421A *ABCG2* jest czynnikiem ochronnym dla rozwoju raka. Dodatkowo w analizie przeprowadzonej według typu nowotworu, pochodzenia etnicznego i źródła kontroli potwierdzono te rezultaty [20]. Fu i wsp., 2019 przeprowadzili metaanalizę w celu oceny korelacji między polimorfizmami G34A oraz C421A genu *ABCG2*, a efektami terapeutycznymi niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC). Metaanaliza wykazała brak związku między polimorfizmem genu *ABCG2*, a wynikami terapii w NSCLC [78]. Podobnie Gardner i wsp., 2008 nie wykazali znaczących różnic w częstości występowania, a tym samym ryzyka raka prostaty w oparciu o zmienność genetyczną C421A genu *ABCG2* [79]. Korenaga i wsp., 2005 wykazali, że częstość występowania genotypu CC C421A *ABCG2* była istotnie wyższa u pacjentów z niebrodawkowatym rakiem nerkowokomórkowym niż w grupie kontrolnej co wskazuje, że osoby z genotypem CC C421A *ABCG2* są narażone na ryzyko rozwoju niebrodawkowego raka nerkowokomórkowego [80]. W innym badaniu Salimizan i wsp., 2016 wykazali, że genotyp CC C421A *ABCG2* był znacznie częstszy u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową w porównaniu z grupą kontrolną, a genotyp AA C421A *ABCG2* wiązał się z niższym ryzykiem rozwoju przewlekłej białaczki szpikowej [71].

W przeprowadzonej analizie w celu określenia roli SNP A388G (rs2306283) w eksonie 5 genu *SLCO1B1* w rozwoju i skuteczności terapii szpiczaka mnogiego przebadano 157 prób DNA pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym szpiczakiem mnogim oraz 141 prób DNA pochodzących od zdrowych dawców krwi stanowiących grupę kontrolną. W przypadku obu grup dominujący był genotyp dziki AA: 50.3 % - grupa badana i 51.8 % grupa kontrolna. Genotyp AG występował rzadziej wśród pacjentów ze szpiczakiem mnogim (21.0 %) odniesieniu do grupy kontrolnej (22.7 %). Natomiast genotyp zmutowany GG występował częściej wśród pacjentów ze szpiczakiem mnogim (28.7 %) w odniesieniu do grupy kontrolnej (25.5%). Nie wykazano związku pomiędzy częstością występowania poszczególnych

Realizacja celów naukowych – wyniki i dyskusja

genotypów ($p=0.8211$) i alleli (allel A $p=0.5442$; allel G $p=0.8020$), a ryzykiem szpiczaka mnogiego. Nie wykazano także różnic pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów ($p=0.9147$) i alleli (allel A $p=0.6738$; allel G $p=0.7813$), a płcią. W przeprowadzonej analizie wykazano związek pomiędzy obecnością przynajmniej jednego allelu A w grupie pacjentów z MM poniżej 63 roku życia ($p=0.0357$). Nie wykazano natomiast związku pomiędzy badanym SNP, a parametrami laboratoryjnymi takimi jak poziom hemoglobiny ($p=0.2020$), poziom kreatyniny ($p=0.07133$), typem wydzielanej immunoglobuliny przez nowotworowe komórki plazmatyczne ($p=0.6939$), stopniem zaawansowania szpiczaka plazmocytozowego wg. Klasyfikacji Durie-Salmona ($p=0.2075$).

W przypadku analizy zależności badanego polimorfizmu z prawdopodobieństwem całkowitego czasu przeżycia (OS) nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w przeżywalności w zależności od genotypu ($p=0.1192$) lub alleli (allel A $p=0.3122$; allel G $p=0.5587$). Aczkolwiek OS był krótszy dla pacjentów z genotypem AA w porównaniu z genotypem AG i GG. Znalazło to potwierdzenie w analizie alleli, gdzie obecność przynajmniej jednego allelu A wiązała się z krótszym przeżyciem, a obecność przynajmniej jednego allelu G wiązana była z dłuższym przeżyciem. W dalszych analizach OS wykazano, że genotyp GG polimorfizmu A388G genu *SLCO1B1* związany był z dłuższym przeżyciem w przypadku stosowania schematu MP w odniesieniu do innych analizowanych rodzajów terapii w szpiczaku mnogim ($p=0.0271$). Nie wykazano związku pomiędzy zastosowanym schematem leczenia, a całkowitym przeżyciem pacjentów ($p=0.1171$), aczkolwiek OS był dłuższy w przypadku stosowania schematu VAD. Przeprowadzona analiza *in silico* nie wykazała wpływu badanego SNP na strukturę i funkcję białka (**Publikacja III**).

Badany polimorfizm nie został dotychczas zweryfikowany w szpiczaku mnogim ani w innych nowotworach hematologicznych. Jedynie Schulte i wsp., 2021 wskazali związek między klirensiem metotreksatu stosowanego w dużych dawkach u pacjentów z białaczką i chłoniakiem limfoblastycznym, a wariantami *SLCO1B1* T521C i A388G. Obecność wariantu T521C wiązana była ze zmniejszonym klirensem, podczas gdy wpływ wariantu A388G zależał dodatkowo od genotypu T521C. Wyniki silnie sugerowały interakcję między tymi dwoma genotypami [81]. Badając SNP T521C genu *SLCO1B1* Suzuki i wsp., 2015 wykazali, że genotyp TC/CC był związany z niższą średnią dawką 6-merkaptopuryny w chemioterapii podtrzymującej u dzieci z ALL. [82] Również Yang i wsp., 2017 wykazali istotny statystycznie

wpływ polimorfizmu T521C genu *SLCO1B1* na hepatotoksyczność w wyniku stosowania metotrexatu u pacjentów z chłoniakiem nieziarniczym [83]. Uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wyniki dotyczące roli SNP A388G genu *SLCO1B1* można porównać jedynie z wynikami uzyskanymi w badaniach guzów litych. Podobne do uzyskanych w niniejszej pracy wyniki uzyskali Falkowski i wsp., 2012 wykazując, że warianty genotypów A388G *SLCO1B1* nie były związane z ryzykiem rozwoju raka jelita grubego [84]. Podobnie Ozhan i wsp., 2013 również nie wykazali istotnej roli tego SNP w raku jelita grubego [85].

Istnieją także sprzeczne doniesienia, wykazujące związek SNP A388G ryzykiem czy odpowiedzią na leczenie w nowotworach. W badaniu Bui i wsp., 2014 wykazali zwiększone ryzyko raka pęcherza moczowego u osób z genotypami GG/AG polimorfizmu *SLCO1B1*. Autorzy sugerują, że polimorfizmy *SLCO1B1* mogą odgrywać ważną rolę w rozwoju raka pęcherza moczowego oraz, że poziomy ekspresji *SLCO1B1* i obecności OATP1B1 mogą być potencjalnymi biomarkerami do oceny ryzyka tej choroby [86]. W innym badaniu Huang i wsp., 2013 wykazali, że genotypy GA/AA polimorfizmu A388G genu *SLCO1B1* były związane z wyższym wskaźnikiem szybkiej odpowiedzi i dłuższym przeżyciem bez progresji u pacjentów z przerzutowym rakiem jelita grubego leczonych schematami FOLFIRI/mCapeIRI [87].

Podsumowanie osiągniętych wyników

Podsumowanie osiągniętych wyników

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej przeprowadzono ocenę roli czterech polimorfizmów pojedynczego nukleotydu genów kodujących wybrane transportery z nadrodziny ABC oraz rodziny OATP w predyspozycji do rozwoju oraz skuteczności terapii szpiczaka mnogiego:

- T-129C (rs3213619) w regionie promotorowym genu *ABCB1* (**Publikacja I**)
- G34A (rs2231137) w eksonie 2 genu *ABCG2* (**Publikacja II**)
- C421A (rs2231142) w eksonie 5 genu *ABCG2* (**Publikacja II**)
- A388G (rs2306283) w eksonie 5 genu *SLCO1B1* (**Publikacja III**)

na podstawie, której uzyskano następujące rezultaty:

Wykazano związek:

- pomiędzy występowaniem polimorfizmu C421A genu *ABCG2*, a ryzykiem zachorowania na szpiczaka mnogiego
- genotyp GG polimorfizmu A388G genu *SLCO1B1* związany jest z dłuższym przeżyciem w przypadku stosowania schematu MP w odniesieniu do innych analizowanych rodzajów terapii w szpiczaku mnogim
- pomiędzy występowaniem polimorfizmu A388G genu *SLCO1B1* w przypadku występowania przynajmniej jednego allelu A wśród pacjentów z MM, a wiekiem w grupach poniżej i powyżej 63 roku życia

Wykazano brak związku:

- pomiędzy występowaniem polimorfizmu T-129C genu *ABCB1*, a ryzykiem zachorowania na szpiczaka mnogiego, płcią, wiekiem pacjentów w podziale na grupy poniżej i powyżej 63 roku życia oraz rodzajem wydzielanej przez nowotworowe komórki plazmatyczne immunoglobuliny
- pomiędzy występowaniem polimorfizmu G34A genu *ABCG2*, a ryzykiem zachorowania na szpiczaka mnogiego

Podsumowanie osiągniętych wyników

- pomiędzy występowaniem polimorfizmu C421A genu *ABCG2*, a płcią oraz rodzajem wydzielanej przez nowotworowe komórki plazmatyczne immunoglobuliny
- pomiędzy występowaniem polimorfizmu A388G genu *SLCO1B1*, a ryzykiem zachorowania na szpiczaka mnogiego, aczkolwiek genotyp GG występował częściej w grupie pacjentów z MM
- pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów A388G genu *SLCO1B1*, a wiekiem pacjentów z MM w podgrupie ³ 63 roku życia oraz < 63 roku życia
- pomiędzy występowaniem polimorfizmu A388G genu *SLCO1B1*, a płcią, poziomem hemoglobiny, poziomem kreatyniny, rodzajem wydzielanej przez nowotworowe komórki plazmatyczne immunoglobuliny oraz stopniem zaawansowania według klasyfikacji Durie-Salmon
- pomiędzy badanym SNP a całkowitym przeżyciem pacjentów z MM, aczkolwiek OS był krótszy dla pacjentów z genotypem AA w porównaniu do AG i GG, co potwierdzono również w analizie alleli, gdzie obecność allelu A wiązała się z krótszym przeżyciem całkowitym w porównaniu do obecności allelu G
- pomiędzy zastosowanym schematem terapii, a całkowitym przeżyciem pacjentów, aczkolwiek OS był najdłuższy w przypadku zastosowania schematu VAD
- polimorfizmu A388G genu *SLCO1B1* na strukturę i funkcję białka w przeprowadzonej analizie bioinformatycznej *in silico*

Wnioski końcowe

Prezentowane badania miały na celu ocenę związku wybranych polimorfizmów genów kodujących transportery błonowe z ryzykiem rozwoju, danymi klinicznymi oraz skutecznością terapii szpiczaka plazmocytoowego. Rezultaty uzyskane na podstawie przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej badań wykazały, że oprócz C421A (rs2231142) genu *ABCG2* badane SNPs nie predysponują do zwiększonego indywidualnego ryzyka rozwoju szpiczaka mnogiego. Nie wpływają również na całkowity czas przeżycia pacjentów ze szpiczakiem plazmocytoowym. Wykazano, że genotyp GG polimorfizmu A388G genu *SLCO1B1* związany jest z dłuższym przeżyciem w przypadku stosowania schematu MP w odniesieniu do innych analizowanych rodzajów terapii w szpiczaku mnogim.

Przy wnioskowaniu należy uwzględnić pewne ograniczenia badania, głównie w odniesieniu do archiwalnego charakteru materiału badanego i wynikające z tego różnice w standardach diagnostyki i leczenia szpiczaka mnogiego, liczby badanych przypadków, dostępności pełnych danych klinicznych i wyników badań laboratoryjnych. Te elementy mogą ograniczać możliwość wykrycia istotności badanych SNPs w szpiczaku plazmocytoowym i tym samym utrudniać formułowanie ostatecznych wniosków. Mimo to, przedstawione wyniki wnoszą nowe informacje na temat udziału polimorfizmów, które nie były dotychczas badane w szpiczaku mnogim w populacji polskiej.

Różnorodność SNPs w genach kodujących transportery błonowe, grupach etnicznych populacji człowieka, możliwych wzorców dziedziczenia wymusza dalsze badania w celu weryfikacji ich roli w MM oraz uzyskania bardziej kompleksowych profili transporterów komórkowych wraz z lepszym zrozumieniem mechanizmów molekularnych leżących u podstaw zmienionej ich funkcji m. in. analizy mRNA i białek w odniesieniu do aktualnie obowiązujących kryteriów diagnostycznych, prognostach i terapeutycznych w MM.

Perspektywy i plany na przyszłość

Uwzględniając uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wyniki oraz bazując na licznych doniesieniach naukowych, ocena roli polimorfizmów genów kodujących transportery komórkowe w nowotworach zasługuje na większe zainteresowanie. Do uzyskania pełnej charakterystyki ich roli konieczne są dalsze badania, które pozwolą lepiej zrozumieć mechanizmy molekularne leżące u podstaw zmienionej funkcji transporterów w ryzyku rozwoju, progresji nowotworów, farmakodynamice i skuteczności terapii przeciwnowotworowej. Badania oceniające rolę wariantów polimorficznych transporterów komórkowych należy poszerzyć o dalsze analizy, w tym analizy wariantów haplotypowych, ocenę wpływu SNPs na poziomy ekspresji genów i funkcje kodowanych przez nie białek poprzez ich modelowanie *in silico*, czy analizy efektywności terapii przeprowadzone na komórkach nowotworowych hodowanych *in vitro*.

Uzyskane wyniki w przyszłości mogą przyczynić się do stworzenia profili genetycznych transporterów komórkowych i ich wykorzystania jako nowych markerów genetycznych o wartości diagnostycznej, prognostycznej, predykcyjnej, czy jako narzędzie przydatne do wyodrębnienia pacjentów ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na MM. Zweryfikowane profile genetyczne transporterów komórkowych mogą stać się przydatne w doborze terapii z uwzględnieniem indywidualnej odpowiedzi na leki, co poprawi skuteczność leczenia nowotworu i szanse przeżycia pacjentów.

Streszczenie

Streszczenie

Zmiany w funkcji białek transportowych mogą prowadzić do zaburzeń homeostazy komórkowej, utraty mechanizmów ochronnych w komórce poprzez spowolnienie lub zahamowanie eliminacji szkodliwych substancji z komórki, co może skutkować ich nagromadzeniem w komórce. Może to istotnie zwiększać ryzyko wystąpienia uszkodzeń i mutacji prowadzących do rozwoju procesu nowotworowego. Warianty genetyczne w postaci SNPs skutkujących zmianami w budowie, funkcji białek lub ekspresji genów kodujących białka transportowe mogą zatem wpływać na ryzyko rozwoju nowotworów. Z drugiej strony SNPs w obrębie genów kodujących białka transportowe mogą wpływać na skuteczność terapii przeciwnowotworowej modyfikując m. in. efektywny transport chemioterapeutyków, odpowiedź komórkową na zastosowaną chemioterapię, czy indukując mechanizm oporności wielolekowej.

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki, celem naukowym rozprawy doktorskiej była ocena roli polimorfizmów genów kodujących wybrane transportery komórkowe z nadrodziny ABC oraz rodziny OATP w predyspozycji do rozwoju oraz skuteczności terapii szpiczaka mnogiego. Poszczególne SNPs wybrano na podstawie danych dostępnych w piśmiennictwie oraz z wykorzystaniem genetycznych baz danych on-line (COSMIC, NCBI). W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dokonano oceny czterech polimorfizmów w obrębie trzech wybranych genów, kodujących białka transportowe z rodzin ABC i OATP. Wykorzystując technikę PCR-RFLP oceniono następujące polimorfizmy genów: *ABCB1* (rs3213619), *ABCG2* (rs2231137, rs2231142) oraz *SLCO1B1* (rs2306283). Badaniami objęto łącznie 181 pacjentów z rozpoznaniem szpiczaka plazmocytozy leczonych w Klinice Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 1992-2002. Materiałem badanym było archiwalne DNA wyizolowane z krwi obwodowej pobranej na EDTA. Dodatkowo jako grupę odniesienia wykorzystano łącznie 141 prób DNA wyizolowanego od zdrowych osób.

Przeprowadzona w ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej analiza pozwoliła na sformułowanie wstępnych wniosków. Wykazano istotny statystycznie związek pomiędzy występowaniem polimorfizmu SNP C421A (rs2231142) genu *ABCG2*, a zwiększonym ryzykiem rozwoju szpiczaka mnogiego oraz związek pomiędzy występowaniem polimorfizmu A388G

(rs2306283) genu *SLCO1B1*, a wiekiem w grupach poniżej i powyżej 63 roku życia. Dodatkowo wykazano związek tego polimorfizmu w całkowitym przeżyciu pacjentów wykazując, że genotyp GG polimorfizmu A388G genu *SLCO1B1* związany jest z dłuższym przeżyciem w przypadku stosowania schematu MP w odniesieniu do innych analizowanych rodzajów terapii w szpiczaku mnogim.

W pozostałych przypadkach nie wykazano istotnych statystycznie różnic we frekwencji poszczególnych genotypów i alleli badanych SNPs pomiędzy grupą badaną, a grupą kontrolną, jak również z wiekiem, płcią, dostępnymi danymi klinicznymi, rodzajem stosowanej terapii i przeżyciem pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym. Prawdopodobnie nie mają one związku z rozwojem, przebiegiem i skutecznością leczenia szpiczaka mnogiego. Niezbędne są jednak dalsze badania, aby uzyskać bardziej kompleksowe profile genetyczne transporterów błonowych i ich zróżnicowanej regulacji w komórkach nowotworowych.

Summary

Summary

Changes in the function of transport proteins can lead to disorders of cellular homeostasis, loss of protective mechanisms in the cell by slowing down or inhibiting the elimination of harmful substances from the cell, which may result in their accumulation in the cell. This may significantly increase the risk of damage and mutations leading to the development of cancer. Genetic variants such as SNPs resulting in changes in protein structure, activity or changes in expression of genes encoding transport proteins may affect the risk of cancer development. On the other hand, SNPs within the genes encoding transport proteins may affect the effectiveness of anticancer therapy by modifying the effective transport of chemotherapeutic agents, the cellular response to chemotherapy, or by inducing the mechanism of multidrug resistance.

Taking into account the above premises, the aim of the doctoral dissertation was to assess the role of polymorphisms of genes encoding selected cellular transporters from the ABC superfamily and the OATP family in the predisposition of multiple myeloma development and effectiveness of anticancer therapy. Individual SNPs were selected on the basis of data available in the literature and with the use of on-line genetic databases (COSMIC, NCBI). In the research carried out as part of the doctoral dissertation, four polymorphisms within three selected genes encoding transport proteins from the ABC and OATP families were assessed. Using the PCR-RFLP technique, the following gene polymorphisms were assessed: *ABCB1* (rs3213619), *ABCG2* (rs2231137, rs2231142) and *SLCO1B1* (rs2306283). The study involved 181 patients diagnosed with multiple myeloma treated at the Hematology Department of the Medical University of Lodz in the years 1992-2002. The tested material was DNA isolated from peripheral blood collected on EDTA. In addition, 141 samples of DNA isolated from healthy individuals were used as a reference group.

The research carried out and the analysis of the obtained results allowed for the formulation of preliminary conclusions. A statistically significant association was found between the occurrence of the SNP C421A polymorphism (rs2231142) of the *ABCG2* gene and an increased risk of developing multiple myeloma, as well as the association between the presence of the A388G polymorphism (rs2306283) of the *SLCO1B1* gene and age in the groups below and above 63 years of age. In addition, the association of this polymorphism

Summary

with the overall survival of patients was demonstrated, showing that the GG genotype of the A388G polymorphism of the *SLCO1B1* gene is associated with longer survival when using the MP regimen in relation to other analyzed types of therapy in multiple myeloma.

In the remaining cases, there were no statistically significant differences in the frequency of individual genotypes and alleles of the tested SNPs between the study group and the control group, as well as age, sex, available clinical data, type of therapy scheme and survival of patients with multiple myeloma. They probably have no connection with the development, course and effectiveness of multiple myeloma treatment. However, further studies are needed to obtain more comprehensive genetic profiles of membrane transporters and their differential regulation in cancer cells.

Podziękowania

Podziękowania

Składam najserdeczniejsze podziękowania promotorowi mojej pracy doktorskiej Panu **prof. dr hab. n. farm. Markowi Mirowskiemu** oraz Pani **prof. dr hab. n. farm. Ewie Balcerczak** i Pani **dr n. farm. Marcie Żebrowskiej-Nawrockiej** za pomoc naukową, cenne uwagi przy przygotowaniu niniejszej pracy, publikacji naukowych oraz za pomoc, cierpliwość i życzliwość w trakcie realizacji badań i pracy w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Wszystkim pozostałym współautorom publikacji będących podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej dziękuję za inspirującą, przyjacielską i owocną współpracę podczas realizacji badań i tworzenia manuskryptów.

Dziękuję również wszystkim pracownikom Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za okazaną pomoc, wsparcie, cenne uwagi i serdeczność.

Piśmiennictwo

1. Mattiuzzi, C. and G. Lippi, *Current Cancer Epidemiology*. J Epidemiol Glob Health, 2019. 9(4): p. 217-222.
2. Fitzmaurice, C., et al., *Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study*. JAMA Oncol, 2017. 3(4): p. 524-548.
3. *Krajowy Rejestr Nowotworów*. 15.09.2021]; Available from: <http://onkologia.org.pl/nowotwory-zlosliwe-ogolem-2/>.
4. *Najwyższa Izba Kontroli*. 15.09.2021]; Available from: <https://www.nik.gov.pl/aktualnosci/jak-skuteczniej-zapobiegac-i-leczyc-nik-o-walce-z-nowotworami.html>.
5. Michels, T.C. and K.E. Petersen, *Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment*. Am Fam Physician, 2017. 95(6): p. 373-383.
6. Palumbo, A. and K. Anderson, *Multiple myeloma*. N Engl J Med, 2011. 364(11): p. 1046-60.
7. Wang, S., et al., *IL-17A Increases Multiple Myeloma Cell Viability by Positively Regulating Syk Expression*. Transl Oncol, 2019. 12(8): p. 1086-1091.
8. Gupta, N. and A. Sharma, *Emerging biomarkers in Multiple Myeloma: A review*. Clin Chim Acta, 2020. 503: p. 45-53.
9. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018*. Eur J Cancer, 2018. 103: p. 356-387.
10. Krajowy Rejestr Nowotworów, s.i., dostęp na dzień 3.09. 2021 r.; Available from: <http://onkologia.org.pl/raporty/>.
11. Giannopoulos, K., et al., *Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczakowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocytoowego oraz innych dyskracji plazmocytowych na rok 2021*. 2021, Polska Grupa Szpiczakowa.
12. Riccomi, G., G. Fornaciari, and V. Giuffra, *Multiple myeloma in paleopathology: A critical review*. Int J Paleopathol, 2019. 24: p. 201-212.

Piśmiennictwo

13. Vincent Rajkumar, S., *Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management*. Am J Hematol, 2014. 89(10): p. 999-1009.
14. Joshua, D.E., et al., *Biology and therapy of multiple myeloma*. Med J Aust, 2019. 210(8): p. 375-380.
15. Chen, D., et al., *Roles of miRNA dysregulation in the pathogenesis of multiple myeloma*. Cancer Gene Ther, 2021.
16. Levin, A., P. Hari, and B. Dhakal, *Novel biomarkers in multiple myeloma*. Transl Res, 2018. 201: p. 49-59.
17. Brigle, K. and B. Rogers, *Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma*. Semin Oncol Nurs, 2017. 33(3): p. 225-236.
18. Kozłowska, J. and I. Łączmańska, *Niestabilność genetyczna – jej znaczenie w procesie powstawania nowotworów oraz diagnostyka laboratoryjna*. Nowotwory. Journal of Oncology, 2010. 60(6): p. 548.
19. Gerkes, E.H., et al., *Familial multiple myeloma: report on two families and discussion of screening options*. Hered Cancer Clin Pract, 2007. 5(2): p. 72-8.
20. Chen, P., et al., *The contribution of the ABCG2 C421A polymorphism to cancer susceptibility: a meta-analysis of the current literature*. BMC Cancer, 2012. 12: p. 383.
21. Manier, S., et al., *Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. 14(2): p. 100-113.
22. Bianchi, G. and K.C. Anderson, *Understanding biology to tackle the disease: Multiple myeloma from bench to bedside, and back*. CA Cancer J Clin, 2014. 64(6): p. 422-44.
23. Weaver, C.J. and J.D. Tariman, *Multiple Myeloma Genomics: A Systematic Review*. Semin Oncol Nurs, 2017. 33(3): p. 237-253.
24. Castaneda, O. and R. Baz, *Multiple Myeloma Genomics - A Concise Review*. Acta Med Acad, 2019. 48(1): p. 57-67.
25. Bukowski, K. and K. Woźniak, *[Polymorphism of genes encoding proteins of DNA repair vs. occupational and environmental exposure to lead, arsenic and pesticides]*. Med Pr, 2018. 69(2): p. 225-235.
26. Cheok, M.H., et al., *Pharmacogenetics in acute lymphoblastic leukemia*. Semin Hematol, 2009. 46(1): p. 39-51.

Piśmiennictwo

27. Nedoszytko, M., *Znaczenie prognostyczne polimorfizmu wybranych genów w chorobie niedokrwiennej serca na podstawie prospektywnej, dwuletniej obserwacji pacjentów poddanych elektywnej koronarografii*. 2014.
28. Reis, S.T., et al., *Role of Genetic Polymorphisms in the Development and Prognosis of Sporadic and Familial Prostate Cancer*. PLoS One, 2016. 11(12): p. e0166380.
29. Chen, X. and P.F. Sullivan, *Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput*. Pharmacogenomics J, 2003. 3(2): p. 77-96.
30. Roth, M., A. Obaidat, and B. Hagenbuch, *OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies*. Br J Pharmacol, 2012. 165(5): p. 1260-87.
31. Gong, I.Y. and R.B. Kim, *Impact of genetic variation in OATP transporters to drug disposition and response*. Drug Metab Pharmacokinet, 2013. 28(1): p. 4-18.
32. Liu, X., *ABC Family Transporters*. Adv Exp Med Biol, 2019. 1141: p. 13-100.
33. Han, L.W., C. Gao, and Q. Mao, *An update on expression and function of P-gp/ABCB1 and BCRP/ABCG2 in the placenta and fetus*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2018. 14(8): p. 817-829.
34. Thakkar, N., A.C. Lockhart, and W. Lee, *Role of Organic Anion-Transporting Polypeptides (OATPs) in Cancer Therapy*. Aaps j, 2015. 17(3): p. 535-45.
35. Liu, T. and Q. Li, *Organic anion-transporting polypeptides: a novel approach for cancer therapy*. J Drug Target, 2014. 22(1): p. 14-22.
36. Liu, X., *SLC Family Transporters*. Adv Exp Med Biol, 2019. 1141: p. 101-202.
37. Andersen, A.P., J.M. Moreira, and S.F. Pedersen, *Interactions of ion transporters and channels with cancer cell metabolism and the tumour microenvironment*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014. 369(1638): p. 20130098.
38. Dębska, S., et al., *[Transmembrane transporters ABCC - structure, function and role in multidrug resistance of cancer cells]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2011. 65: p. 552-61.
39. Choi, Y.H. and A.M. Yu, *ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development*. Curr Pharm Des, 2014. 20(5): p. 793-807.

Piśmiennictwo

40. Buxhofer-Ausch, V., et al., *Tumor-specific expression of organic anion-transporting polypeptides: transporters as novel targets for cancer therapy*. J Drug Deliv, 2013. 2013: p. 863539.
41. Huang, R., et al., *Association of ABCB1 and CYP450 Gene Polymorphisms and their DNA Methylation Status with Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head in the Chinese Population*. Genet Test Mol Biomarkers, 2020. 24(12): p. 789-797.
42. Madrid-Paredes, A., et al., *Association of ABCB1 and VEGFA gene polymorphisms with breast cancer susceptibility and prognosis*. Pathol Res Pract, 2020. 216(4): p. 152860.
43. Shan, X.X., et al., *ABCB1 Gene Is Associated With Clinical Response to SNRIs in a Local Chinese Han Population*. Front Pharmacol, 2019. 10: p. 761.
44. Reed, K. and A.M. Parissenti, *The effect of ABCB1 genetic variants on chemotherapy response in HIV and cancer treatment*. Pharmacogenomics, 2011. 12(10): p. 1465-83.
45. Jamroziak, K., et al., *Polymorphisms and haplotypes in the multidrug resistance 1 gene (MDR1/ABCB1) and risk of multiple myeloma*. Leuk Res, 2009. 33(2): p. 332-5.
46. Chen, C.C., et al., *Multidrug resistance 1 gene variants, pesticide exposure, and increased risk of DNA damage*. Biomed Res Int, 2014. 2014: p. 965729.
47. Fromm, M.F., *Genetically determined differences in P-glycoprotein function: implications for disease risk*. Toxicology, 2002. 181-182: p. 299-303.
48. Koyama, T., et al., *MDR1 T-129C polymorphism can be predictive of differentiation, and thereby prognosis of colorectal adenocarcinomas in Japanese*. Biol Pharm Bull, 2006. 29(7): p. 1449-53.
49. Kufelnicka-Babout, M., et al., *The significance of T129C and G2677T polymorphism of the MDR1 gene in ovarian cancer patients*. Przegląd Menopauzalny, 2008. 12(6): p. 295.
50. Mao, Q. and J.D. Unadkat, *Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update*. Aaps j, 2015. 17(1): p. 65-82.
51. Safar, Z., et al., *ABCG2/BCRP: variants, transporter interaction profile of substrates and inhibitors*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2019. 15(4): p. 313-328.
52. Hira, D. and T. Terada, *BCRP/ABCG2 and high-alert medications: Biochemical, pharmacokinetic, pharmacogenetic, and clinical implications*. Biochem Pharmacol, 2018. 147: p. 201-210.

Piśmiennictwo

53. Sari, F.M., H.T. Yanar, and G. Ozhan, *Investigation of the functional single-nucleotide polymorphisms in the BCRP transporter and susceptibility to colorectal cancer*. Biomed Rep, 2015. 3(1): p. 105-109.
54. Niemi, M., M.K. Pasanen, and P.J. Neuvonen, *Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake*. Pharmacol Rev, 2011. 63(1): p. 157-81.
55. Schulte, R.R. and R.H. Ho, *Organic Anion Transporting Polypeptides: Emerging Roles in Cancer Pharmacology*. Mol Pharmacol, 2019. 95(5): p. 490-506.
56. Zhang, X., et al., *Association of CYP2D6*10, OATP1B1 A388G, and OATP1B1 T521C polymorphisms and overall survival of breast cancer patients after tamoxifen therapy*. Med Sci Monit, 2015. 21: p. 563-9.
57. Lu, H., et al., *Banxia Xiexin Decoction Is Effective to Prevent and Control Irinotecan-Induced Delayed Diarrhea in Recurrent Small Cell Lung Cancer*. Integr Cancer Ther, 2018. 17(4): p. 1109-1114.
58. Lee, H.H. and R.H. Ho, *Interindividual and interethnic variability in drug disposition: polymorphisms in organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1; SLCO1B1)*. Br J Clin Pharmacol, 2017. 83(6): p. 1176-1184.
59. Aklillu, E., et al., *Frequency of the SLCO1B1 388A>G and the 521T>C polymorphism in Tanzania genotyped by a new LightCycler®-based method*. Eur J Clin Pharmacol, 2011. 67(11): p. 1139-45.
60. Nagy, A., et al., *Marked differences in frequencies of statin therapy relevant SLCO1B1 variants and haplotypes between Roma and Hungarian populations*. BMC Genet, 2015. 16: p. 108.
61. Legarda, M.A., M.J. Cejalvo, and J. de la Rubia, *Recent Advances in the Treatment of Patients with Multiple Myeloma*. Cancers (Basel), 2020. 12(12).
62. Mateos, M.V., et al., *Insights on Multiple Myeloma Treatment Strategies*. Hemasphere, 2019. 3(1): p. e163.
63. Campo, C., et al., *Bortezomib-induced peripheral neuropathy: A genome-wide association study on multiple myeloma patients*. Hematol Oncol, 2018. 36(1): p. 232-237.

Piśmiennictwo

64. Zmorzyński, S., et al., *The Association of GSTT1, GSTM1, and TNF- α Polymorphisms With the Risk and Outcome in Multiple Myeloma*. *Front Oncol*, 2019. 9: p. 1056.
65. Poi, M.J., et al., *A Single Nucleotide Polymorphism in SLC7A5 Was Associated With Clinical Response in Multiple Myeloma Patients*. *Anticancer Res*, 2019. 39(1): p. 67-72.
66. Liu, H., et al., *ABCB1 variants confer susceptibility to primary open-angle glaucoma and predict individual differences to latanoprost treatment*. *Biomed Pharmacother*, 2016. 80: p. 115-120.
67. Yamaguchi, H., et al., *Genetic variation in ABCB1 influences paclitaxel pharmacokinetics in Japanese patients with ovarian cancer*. *Int J Gynecol Cancer*, 2006. 16(3): p. 979-85.
68. Hu, L.L., B. Yu, and J. Yang, *MDR1 polymorphisms associated with risk and survival in diffuse large B-cell lymphoma*. *Leuk Lymphoma*, 2013. 54(6): p. 1188-93.
69. Hampras, S.S., et al., *Genetic polymorphisms of ATP-binding cassette (ABC) proteins, overall survival and drug toxicity in patients with Acute Myeloid Leukemia*. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 2010. 1(3): p. 201-7.
70. Au, A., et al., *Association of genotypes and haplotypes of multi-drug transporter genes ABCB1 and ABCG2 with clinical response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients*. *Biomed Pharmacother*, 2014. 68(3): p. 343-9.
71. Salimizand, H., et al., *Concurrent effects of ABCB1 C3435T, ABCG2 C421A, and XRCC1 Arg194Trp genetic polymorphisms with risk of cancer, clinical output, and response to treatment with imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia*. *Tumour Biol*, 2016. 37(1): p. 791-8.
72. Abbassy, H.A., et al., *Study of Breast Cancer Resistance Protein ABCG2 C421A Single Nucleotide Polymorphism RS2231142 in Multiple Myeloma*. *Indian J Hematol Blood Transfus*, 2022. 38(4): p. 658-667.
73. Hu, L.L., et al., *BCRP gene polymorphisms are associated with susceptibility and survival of diffuse large B-cell lymphoma*. *Carcinogenesis*, 2007. 28(8): p. 1740-4.
74. Ghafouri, H., et al., *Association of ABCB1 and ABCG2 single nucleotide polymorphisms with clinical findings and response to chemotherapy treatments in Kurdish patients with breast cancer*. *Tumour Biol*, 2016. 37(6): p. 7901-6.

Piśmiennictwo

75. Wu, H., et al., *Genetic Variations in ABCG2 Gene Predict Breast Carcinoma Susceptibility and Clinical Outcomes after Treatment with Anthracycline-Based Chemotherapy*. Biomed Res Int, 2015. 2015: p. 279109.
76. Zhai, X., et al., *Gene polymorphisms of ABC transporters are associated with clinical outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia*. Arch Med Sci, 2012. 8(4): p. 659-71.
77. Tian, C., et al., *Common variants in ABCB1, ABCC2 and ABCG2 genes and clinical outcomes among women with advanced stage ovarian cancer treated with platinum and taxane-based chemotherapy: a Gynecologic Oncology Group study*. Gynecol Oncol, 2012. 124(3): p. 575-81.
78. Fu, L., et al., *A meta-analysis of ABCG2 gene polymorphism and non-small cell lung cancer outcomes*. Genet Mol Biol, 2020. 42(4): p. e20180234.
79. Gardner, E.R., et al., *Association of the ABCG2 C421A polymorphism with prostate cancer risk and survival*. BJU Int, 2008. 102(11): p. 1694-9.
80. Korenaga, Y., et al., *Association of the BCRP C421A polymorphism with nonpapillary renal cell carcinoma*. Int J Cancer, 2005. 117(3): p. 431-4.
81. Schulte, R.R., et al., *Effect of SLCO1B1 Polymorphisms on High-Dose Methotrexate Clearance in Children and Young Adults With Leukemia and Lymphoblastic Lymphoma*. Clin Transl Sci, 2021. 14(1): p. 343-353.
82. Suzuki, R., et al., *Influence of SLCO1B1 polymorphism on maintenance therapy for childhood leukemia*. Pediatr Int, 2015. 57(4): p. 572-7.
83. Yang, L., et al., *SLCO1B1 rs4149056 genetic polymorphism predicting methotrexate toxicity in Chinese patients with non-Hodgkin lymphoma*. Pharmacogenomics, 2017. 18(17): p. 1557-1562.
84. Falkowski, S., et al., *Common variants in glucuronidation enzymes and membrane transporters as potential risk factors for colorectal cancer: a case control study*. BMC Cancer, 2017. 17(1): p. 901.
85. Ozhan, G., et al., *Influence of the functional polymorphisms in the organic anion transporting polypeptide 1B1 in the susceptibility to colorectal cancer*. Genet Test Mol Biomarkers, 2013. 17(3): p. 214-8.

Piśmiennictwo

86. Bui, H.T., et al., *SLCO1B1, SLCO2B1, and SLCO1B3 polymorphisms and susceptibility to bladder cancer risk*. *Cancer Invest*, 2014. 32(6): p. 256-61.
87. Huang, L., et al., *SLCO1B1 and SLC19A1 gene variants and irinotecan-induced rapid response and survival: a prospective multicenter pharmacogenetics study of metastatic colorectal cancer*. *PloS one*, 2013. 8(10): p. e77223-e77223.

Kopie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej (Publikacje I-III)

Kopie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej (Publikacje I-III)

Publikacja I

Niebudek K, Balcerczak E, Mirowski M, Żebrowska M. *Association of ABCB1 T-129C polymorphism and multiple myeloma risk in Polish population*. Pol J Pathol. 2018;69(4):405-9. Epub 2019/02/23. doi: 10.5114/pjp.2018.81700.

ORIGINAL PAPER

ASSOCIATION OF *ABCB1* T-129C POLYMORPHISM AND MULTIPLE MYELOMA RISK IN POLISH POPULATION

KATARZYNA NIEBUDEK, EWA BALCERCZAK, MAREK MIROWSKI, MARTA ŻEBROWSKA

Laboratory of Molecular Diagnostic and Pharmacogenomics, Medical University of Lodz, Poland

The possible interaction between gene polymorphism and cancer risk development is a very interesting issue. The genetic variants of the ATP-binding cassette superfamily B member 1 (*ABCB1*) are known to be involved in developing cancer risk and individual differences in chemotherapeutic response. Polymorphisms may affect the reduction of the activity and/or expression of important protective cellular proteins. The increased exposure to toxic compounds, including carcinogens is associated with an increased risk of developing cancers. The present study was aimed to evaluate the possible effect of *ABCB1* T-129C single nucleotide polymorphism in risk of cancer development in Polish patients diagnosed with multiple myeloma. 91 multiple myeloma patients and 94 healthy controls were enrolled in this case-control study. The *ABCB1* T-129C genotypes were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method (PCR-RFLP). The distribution of particular genotypes between multiple myeloma patients and controls group was not significantly different for T-129C SNP ($p = 0.4297$). The studied polymorphism does not seem to affect the increased risk of multiple myeloma development.

Key words: *MDR1*, *ABCB1*, P-gp, single-nucleotide polymorphism, plasma cell myeloma.

Introduction

Plasma cell myeloma (multiple myeloma – MM) is a cancer of blood cells derived from bone marrow. It belongs to the group of malicious monoclonal gammopathy. Memory B cells are considered to be responsible for clonal proliferation. The expansion of neoplastic cells in bone marrow and the production of monoclonal immunoglobulin are responsible for disease symptoms manifestation [1]. As a result of disseminated marrow infiltrated by tumor cells, its function is disturbed – anemia, coagulation disorders, immunity disorders. Other characteristic symptoms of myeloma are osteolytic lesions, hypercalcemia, and renal failure [2]. Multiple myeloma is the second cause of neoplasms of the hematopoietic system

in terms of the frequency of disease, it accounts for 1% of all cancers and approximately 10% of all hematologic malignancies. In Europe, 4.6/100 000 males and 3.2/100 000 females develop MM every year. The median age of patients at the time of diagnosis is about 65 years [3, 4]. The molecular mechanism of disease development has not yet been fully understood, attention is paid to the simultaneous participation of many environmental and genetic factors. Genetic variants like SNPs may be a protective or risk factor in the cancer development and be correlated with response to chemotherapy [5, 6].

ATP-binding cassette transporters play an important role in outflowing of xenobiotics and toxic compounds from cells [7]. ATP-binding cassette sub-family B member 1 – *ABCB1* gene, also named

as *MDR1* gene - Multidrug Resistance Gene 1 is located on the chromosome 7q21.1 *ABCB1* consists of 28 introns and 28 exons and encodes transmembrane P-gp – P-glycoprotein with molecular weight 170 kDa or 1280 amino acids [7]. Firstly this protein was described in drug-resistant cells [8]. P-gp occurs in both normal tissues and cancer cells. The *ABCB1* gene is widely expressed in human organs and tissues, significantly in the apical membranes of excretory tissues: brain microvessel endothelium cells, intestinal epithelial cells, renal proximal tubular epithelial cells, placenta and testes [5, 9]. This protein is responsible for efflux endogenous metabolites and toxic xenobiotics, including carcinogens from cells, what is a protective mechanism against carcinogenesis. On the other hand, P-gp plays an important role in drug response through the reduction the effect of the drug through modulating absorption, metabolism and promoting elimination from cells [10, 11]. P-gp also plays a role in the development of immune response by activating lymphocytes. Among the substrates for P-gp are: lipids, sterols, analgesics, antidepressants, anticancer drugs and immunomodulators such as doxorubicin, vinblastine, vincristine, epirubicin, etoposide and imatinib, are widely used in chemotherapy, including multiple myeloma therapy [11, 12, 13].

Genetic changes that affect the activity or expression of P-gp may contribute to the risk of developing cancer as well as potential response to chemotherapy [14, 15, 16, 17]. Recent studies suggest that genetic components may play an important role in the etiopathology of MM [17]. SNPs in *ABCB1* gene are highly diverse in different ethnic populations. So far, more than 50 SNPs have been identified in *ABCB1* gene [11, 18]. Some of them have been studied more widely, others not enough. The aim of this study was to determine the potential significance of SNP T-129C of *ABCB1* gene (rs3213619) in the development of multiple myeloma. According to the state of our knowledge, the role of this polymorphism in promoter region at *ABCB1* gene in multiple myeloma has not been studied in the Polish population.

Material and methods

Study subject

91 blood samples collected from patients (50 females; 41 males, median age of the group: 63 years) with multiple myeloma diagnosed at the Cathedral of Hematology Medical University of Lodz, Poland were recruited to the study. Various treatment regimens have been used in the therapy of patients, such as: MP (melphalan; cisplatin), VAD (vincristine; doxorubicin; dexamethasone). In almost half

of the study group, the clinical stage was assessed to III, according to Durie-Salomon classification.

The healthy control group consisted of 94 blood samples obtained from healthy individuals (56 females, 38 males, median age of group: 33 years) from the local blood bank were ethnic and geographically matched with the group of multiple myeloma patients. The investigation was in accordance with the Declaration of Helsinki, the Good Laboratory Practice rules and was approved by the Ethical Committee of the Medical University of Lodz No: RNN/88/16/KE. All patients provided a written informed consent before their inclusion in the study.

Genotyping

ABCB1 T-129C (rs3213619) polymorphism was evaluated applying the PCR-RFLP technique. DNA was isolated from peripheral blood according to "Blood Mini" protocol (A&A Biotechnology, Poland). DNA samples, until analysis, were stored at -20°C . PCR reaction for both investigated and control groups was performed according to 2xPCR Super Master Mix (Biotool.com, USA) protocol in the volume 20 μl PCR mixture. The PCR mixture composed of 5 μl of 2xPCR Super Master Mix, 0.5 mM of each primer, 50 ng of DNA template and distilled water up to 20 μl . Negative control (without DNA) was included in every experiment. PCR products were evaluated during electrophoresis in 2% agarose gel with ethidium bromide. Products of PCR reaction for SNP T-129C in *ABCB1* gene had the size of 258 bp.

PCR products were digested by restriction enzyme, specific to the studied polymorphism: *MspII*. The digestion mixture consist of: 16 μl of PCR product, 2 μl of 10 \times PCR buffer, 0.2 μl of specified enzyme 10 U/ μl and 1.8 μl of distilled water up to 20 μl . Digestion by restriction enzyme was performed for SNP T-129C: at 37°C for 16 h. Amplified DNA fragments after digestion by restriction enzyme were underwent electrophoresis on 2% agarose with ethidium bromide. The details of PCR-RFLP method are given in Table I.

Statistical analysis

STATISTICA 10 statistical software (StatSoft Inc. 2011) was used for data analysis. The χ^2 Pearson test with the Yates correction was applied to evaluate the conformity between the observed and expected genotype frequencies in the investigated and control groups according to Hardy-Weinberg equilibrium. Differences in genotype frequencies among MM patients and control group and association of the various genotypes with clinical data were determined using the χ^2 Pearson test with the Yates correction test. All p-values were two-sides and $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Table I. Primers sequences and basic PCR-RLFP reaction conditions

| PRIMERS: | SNP T-129 C IN <i>ABC1</i> GENE | |
|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| | GENOTYPE: | LENGTH AFTER DIGESTION: [BP] |
| Forward primer: | | |
| 5' TTCACTACTTGCCCTTCTAGAG 3' | TT | 258 |
| Reverse primer: | CT | 32, 226, 258 |
| 5' CGGCCTCTGCTTCTTTGAG 3' | CC | 32, 226 |

Results

In this study all blood samples from investigated and control groups were successfully analyzed for T-129C of *ABC1* gene. The frequency of particular genotypes in both groups was consistent with the Hardy-Wineberg equilibrium ($p = 1.000$).

First, genotype and allele frequencies for studied SNP between group of patients with multiple myeloma and healthy individuals were compared. In both groups the dominant genotype was homozygote TT (98% – multiple myeloma patients; 96% – healthy individuals). There was no significant statistical difference between multiple myeloma cohort and healthy individuals ($p = 0.4297$, $p = 0.4296$). All results are shown in Table II.

Secondly, the group of patients with multiple myeloma was divided, according to gender, into two subgroups (Table III), than the frequencies of geno-

types for SNP T-129C were compared. Similarly, there was no statistically significant differences between the presence of a specific genotype and gender ($p = 0.8870$).

In the next step of the analysis the multiple myeloma cohort was divided according to age. Frequencies of particular genotypes of studied SNP were compared between the subgroup of patients with age 63 years and under this and subgroup of patients with age over 63 years. No statistically significant differences were found ($p = 0.1572$).

In the last part of the research, the group of patients with multiple myeloma were divided according to the type of the produced by myeloma cells immunoglobulin into four subgroups. Results are summarized in Table III. Then the analysis of genotype frequencies of SNP T-129C and these subgroups of patients were performed, no statistically significant differences were found ($p = 0.6901$).

Table II. Frequencies of genotypes alleles of *ABC1* gene SNP T-129C in the group of patients with multiple myeloma and healthy individuals

| <i>ABC1</i> T-129C | MULTIPLE MYELOMA PATIENTS N = 91 | HEALTHY INDIVIDUALS N = 94 | P |
|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------|
| CC | 0 (0%) | 0 (0%) | |
| CT | 2 (2%) | 4 (4%) | 0.4297 |
| TT | 89 (98%) | 90 (96%) | |
| C | 2 (1%) | 4 (2%) | 0.4296 |
| T | 180 (99%) | 184 (98%) | |

Discussion

The P-gp protein encoded by the *ABC1* gene is an active exporter responsible for the transport of substances from the cytoplasm outside the cell or to specific intracellular compartments. The physiological function of P-gp is protection cells against harmful substances – metabolites or toxins of both endogenous and exogenous origin. The presence of membrane P-gp contributes to the removal of xenobiotics, ensuring the proper functioning of the intestines, kidneys, liver barrier or blood-brain barrier [12]. P-gp is involved in the regulation of the immune

Table III. The frequency of particular genotypes in the investigated group

| GENOTYPE | PREVALENCE OF THE INVESTIGATED SNP T-129C IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS (N = 91) | | | | | |
|----------|---|--------|--|-----|-----|-----|
| | GENDER | | TYPE OF THE IMMUNOGLOBULIN PRODUCED BY MYELOMA CELLS | | | |
| | MALE | FEMALE | IgG | IgA | IgD | LCD |
| TT | 40 | 49 | 51 | 19 | 18 | 1 |
| CT | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| CC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 41 | 50 | 53 | 19 | 18 | 1 |

response and the process of proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells [19].

Previous knowledge about P-gp protein suggests that a wild variance of T-129C *ABCB1* can protect cells from carcinogen accumulation [20]. Therefore, it is likely mutant form of this SNP in *ABCB1* may reduce ability to eliminate carcinogens, what could promote carcinogenesis. On the other hand, SNPs in the *ABCB1* gene might influence the efficiency of chemotherapy by inducing multidrug resistance and could become a prognostic factor [12, 21].

So far, genetic variants in *ABCB1* have been studied in various diseases such as Parkinson's disease, mood disorders, breast cancer and colorectal cancer [22, 23]. *ABCB1* SNPs (C1236T, G2677T/A, C3435T) have also been studied in hematological diseases such as chronic myeloid leukemia (CML), chronic lymphocytic leukemia (CLL), acute lymphocytic leukemia (ALL), diffuse large B lymphoma (DLBCL) and multiple myeloma (MM) [5, 18, 20, 24]. From the previously published data, it can be assumed that polymorphisms in the gene regulatory region can also affect the expression and function of P-gp e.g. T-2410C, T-1910C, T-692C and T-129C and could be associated with hematological tumors [8].

The T-129C SNP in *ABCB1* gene is located in the promoter region. The role of this polymorphism in cancer development and progression has not been sufficiently recognized. It was confirmed that this SNP increases the risk of DNA damage in response to carcinogens such as pesticides [24]. Also some data about neuropathic pain induced by chemotherapy in multiple myeloma have been reported [25] what confirmed that investigation of genes from the group of ABC transporters could help to solve that problem. Especially, that some data from the literature indicate that some genes [26] may also be involved in sensitivity to the use of treatment. However, in case of our study we did not get information about neuropathic pain in the group of investigated patients during chemotherapy. Therefore, we could not evaluate it and this could become the next step in the future analysis.

Distribution of individual genetic variants of the SNP T-129C varies within the populations. The results obtained in our study were consistent with the distribution of the frequency of genotypes for the healthy members of the Polish population in the study conducted by Tan *et al.* in which the distribution of individual genotypes was as follows: TT 93.5%, CT 6.5%, CC 0% [27]. In another research on the French population, the following distribution was obtained: TT 92%, CT 8%, CC 0% [28]. The presence of a CC homozygous has not been demonstrated for the Caucasian ethnic group. In contrast to the Japanese population, where the presence

of CC homozygotes has been observed with frequencies CC 1.3% [29].

Our results indicate a lack of association between the studied T-129C polymorphism and the increased risk of multiple myeloma development ($p = 0.4297$). Contrary to our results, Hu *et al.* showed that polymorphisms of *ABCB1* T-129C is connected with the risk of DLBCL [30]. In turn, results obtained in our study are consistent with the data published by Komoto *et al.* where there were no statistically significant differences between the group of healthy people and the group of patients with oesophageal cancer or with a group of patients with colorectal cancer. Similar results were obtained by Liu *et al.* in the study of the role of SNP in *ABCB1* gene in susceptibility to primary open-angle glaucoma. In this study there were no significant differences in *ABCB1* T-129C frequencies in investigated and control groups [31]. Studies on the role of T-129C polymorphism in the *ABCB1* gene were also conducted in ovarian cancer. Similarly, there were no differences in the incidence of alleles between patients with ovarian cancer and the control group for SNP T-129C [32]. In the next step it could be important to compare of studied SNPs of *ABCB1* gene with others recently investigated polymorphisms, including promising *CD4* gene, tested on an animal model [33].

We are aware of the limitations of the study, however, we hope that our research on the role of genetic variants in this incurable cancer will contribute to the increasing of knowledge about multiple myeloma.

This study was supported by statutory funds of the Department of Pharmaceutical Biochemistry and Molecular Diagnostics, Medical University of Lodz no. 503/3-015-02/503-31-001.

The authors declare no conflict of interests.

References

1. Matsui W, Wang Q, Barber JP, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res* 2008; 68: 190-197.
2. Eslick R, Talaulikar D. Multiple myeloma: from diagnosis to treatment. *Aust Fam Physician* 2013; 42: 684-688.
3. Martino A, Campa D, Buda G, et al. Polymorphisms in xenobiotic transporters *ABCB1*, *ABCG2*, *ABCC2*, *ABCC1*, *ABCC3* and multiple myeloma risk: a case-control study in the context of the International Multiple Myeloma rESEarch (IMMEnSE) consortium. *Leukemia* 2013; 27: 1615-1616.
4. Vincent Rajkumar S. Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2014; 89: 999-1009.
5. Ghafouri H, Ghaderi B, Amini S, et al. Association of *ABCB1* and *ABCG2* single nucleotide polymorphisms with clinical findings and response to chemotherapy treatments in Kurdish patients with breast cancer. *Tumour Biol* 2016; 37: 7901-7906.
6. Landgren O, Weiss BM. Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various

- ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis. *Leukemia* 2009; 23: 1691-1697.
7. Zhai X, Wang H, Zhu X et al. Gene polymorphisms of ABC transporters are associated with clinical outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia. *Arch Med Sci* 2012; 8: 659-671.
 8. Balcerczak E, Panczyk M, Piaskowski S, et al. ABCB1/MDR1 gene polymorphisms as a prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2010; 25: 1167-1176.
 9. Li Y, Pang S, Huang W, et al. Novel and functional ABCB1 gene variant in sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2014; 566: 61-66.
 10. Ryu HC, Kwon HY, Choi IK, et al. Analyses of single nucleotide polymorphisms and haplotype linkage of the human ABCB1 (MDR1) gene in Korean. *Arch Pharm Res* 2006; 29: 1132-1139.
 11. Llaudo I, Colom H, Gimenez-Bonafe P, et al. Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study. *Transpl Int* 2013; 26: 177-186.
 12. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, et al. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21: 152-161.
 13. Li H, Krstin S, Wang S, et al. Capsaicin and piperine can overcome multidrug resistance in cancer cells to doxorubicin. *Molecules* 2018; 23: E557.
 14. Zhao L, Li K, Li W, et al. Association between the C3435T polymorphism of ABCB1/MDR1 gene (rs1045642) and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis based on 11,339 subjects. *Tumour Biol* 2013; 34: 1949-1957.
 15. Wang J, Guo X, Yu S, et al. MDR1 C3435T polymorphism and inflammatory bowel disease risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 2679-2685.
 16. Zhang BB, Xuan C, Deng KF, et al. Association between the MDR1 gene variant C3435T and risk of leukaemia: a meta-analysis. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2013; 22: 617-625.
 17. Pongstaporn W, Pakakasama S, Chaksangchaichote P, et al. MDR1 C3435T and C1236T polymorphisms: association with high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16: 2839-2843.
 18. Au A, Aziz Baba A, Goh AS, et al. Association of genotypes and haplotypes of multi-drug transporter genes ABCB1 and ABCG2 with clinical response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients. *Biomed Pharmacother* 2014; 68: 343-349.
 19. Ross DD. Modulation of drug resistance transporters as a strategy for treating myelodysplastic syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004; 17: 641-651.
 20. Yin G, Xiao Z, Ni Y, et al. Association of MDR1 single-nucleotide polymorphisms and haplotype variants with multiple myeloma in Chinese Jiangsu Han population. *Tumour Biol* 2016; 37: 9549-9554.
 21. Wu H, Liu Y, Kang H, et al. Genetic variations in ABCG2 gene predict breast carcinoma susceptibility and clinical outcomes after treatment with anthracycline-based chemotherapy. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 279109.
 22. Jin SS, Song WJ. Association between MDR1 C3435T polymorphism and colorectal cancer risk: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96: e9428.
 23. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1794: 860-871.
 24. Chen CC, Huang CH, Wu MT, et al. Multidrug resistance 1 gene variants, pesticide exposure, and increased risk of DNA damage. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 965729.
 25. Wang Q, Wang J, Gao D, Li J. Inhibition of PAR2 and TRPA1 signals alleviates neuropathic pain evoked by chemotherapeutic bortezomib. *J Biol Regul Homeost Agent* 2017; 31: 977-983.
 26. Zhang Y, Wang Z, Zhang L, et al. Impact of connexin 43 coupling on survival and migration of multiple myeloma cells. *Arch Med Sci* 2017; 13: 1335-1346.
 27. Tan EK, Drozdziak M, Bialecka M, et al. Analysis of MDR1 haplotypes in Parkinson's disease in a white population. *Neurosci Lett* 2004; 372: 240-244.
 28. Jeannesson E, Albertini L, Siest G, et al. Determination of ABCB1 polymorphisms and haplotypes frequencies in a French population. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; 21: 411-418.
 29. Komoto C, Nakamura T, Sakaeda T, et al. MDR1 haplotype frequencies in Japanese and Caucasian, and in Japanese patients with colorectal cancer and esophageal cancer. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006; 21: 126-132.
 30. Hu LL, Yu B, Yang J. MDR1 polymorphisms associated with risk and survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2013; 54: 1188-1193.
 31. Liu H, Yang ZK, Li Y et al. ABCB1 variants confer susceptibility to primary open-angle glaucoma and predict individual differences to latanoprost treatment. *Biomed Pharmacother* 2016; 80: 115-120.
 32. Kufelnicka-Babou M, Beata S, Kulig A, et al. The significance of T129C and G2677T polymorphism of the MDR1 gene in ovarian cancer patients. *Prz Menopauz* 2008; 6: 295-300.
 33. Xu J, Zhang H, Gu Y, et al. Correlation analysis of CD4 gene polymorphism and blood routine indexes in pigs (*Sus scrofa*). *J Biol Regul Homeost Agents* 2017; 32: 327-333.

Address for correspondence

Marta Żebrowska
 Laboratory of Molecular Diagnostic and Pharmacogenomics
 Medical University of Lodz
 Muszynskiego 1
 90-151 Lodz, Poland
 e-mail: marta.zebrowska@umed.lodz.pl

Kopie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej (Publikacje I-III)

Publikacja II

Niebudek K, Balcerczak E, Mirowski M, Pietrzak J, Zawadzka I, Żebrowska-Nawrocka M.
The contribution of ABCG2 G34A and C421A polymorphisms to multiple myeloma susceptibility.
Onco Targets Ther. 2019;12:1655-60. Epub 2019/03/19. doi: 10.2147/ott.s195245.

The contribution of *ABCG2* G34A and C421A polymorphisms to multiple myeloma susceptibility

This article was published in the following Dove Medical Press journal:
OncoTargets and Therapy

Katarzyna Niebudek
Ewa Balcerczak
Marek Mirowski
Jacek Pietrzak
Izabela Zawadzka
Marta Żebrowska-
Nawrocka

Laboratory of Molecular Diagnostics and Pharmacogenomics, Department of Pharmaceutical Biochemistry and Molecular Diagnostics, Interfaculty Cathedral of Laboratory and Molecular Diagnostics, Medical University of Lodz, Lodz 90-151, Poland

Background: Breast cancer resistance protein BCRP, belonging to superfamily G of the adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) transporters, is an efflux pump and plays a critical role in protecting cells against xenobiotics and toxic compounds including (pro)carcinogens. BCRP is expressed in many tissues, including hematopoietic stem cells. Genetic variants such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) can change the gene expression and/or reduce their products' activity which may affect an individual's susceptibility to xenobiotics and the development of carcinoma. These changes may affect the exposure of blood cells to toxic compounds, which increases the risk of multiple myeloma. The aim of this study was to determine polymorphisms at positions G34A and C421A of the *ABCG2* gene in multiple myeloma in the Polish population for the first time.

Materials and methods: Material for the study included DNA isolated from nucleus of cells of peripheral blood of patients diagnosed with multiple myeloma (investigated group N=181) and from healthy people (control group N=97). Research into the polymorphisms was conducted using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique.

Results: The present study showed a statistically significant association between SNP C421A of the *ABCG2* gene and the risk of developing multiple myeloma ($P=0.0218$). No statistically significant relationship was found for the other parameters analyzed, such as age, gender, or type of secreted immunoglobulin.

Conclusion: Preliminary studies indicate that SNP C421A may become a potential predictor for the development of multiple myeloma.

Keywords: BCRP, polymorphism, *ABCG2*, multiple myeloma risk, plasma cell myeloma, single nucleotide polymorphism

Introduction

The *ABCG2* gene located on chromosome 4q22 encodes the 655-amino-acid breast cancer resistance protein BCRP.¹ Like other G-subfamily proteins of adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) transporters, BCRP is a half transporter containing one nucleotide-binding domain and one transmembrane domain fused into a single polypeptide chain. BCRP has a functional form as a homodimer with a molecular mass of 144 kDa.² In humans, BCRP functions as a protective pump. Physiologically, it occurs in many normal human tissues including the placenta, liver, brain, syncytiotrophoblast, small intestine, and breast tissue.³ This protein determines the existence of barriers: the brain, the testicles, and the placenta.⁴ BCRP is suggested to provide the fundamental physiological barrier function that can protect cells. High expression of BCRP affects tissues of organs responsible for detoxification processes.⁵ BCRP is one of the major proteins responsible for the active transport of a broad spectrum of chemical compounds across extracellular and intracellular membranes, for

Correspondence: Marta Żebrowska-Nawrocka
Laboratory of Molecular Diagnostics and Pharmacogenomics, Department of Pharmaceutical Biochemistry and Molecular Diagnostics, Interfaculty Cathedral of Laboratory and Molecular Diagnostics, Medical University of Lodz, Muszynskiego 1, Lodz 90-151, Poland
Tel +48 42 677 91 30
Email marta.zebrowska@umed.lodz.pl

submit your manuscript | www.dovepress.com
Dovepress    
<http://dx.doi.org/10.21447/OTT.3195345>

OncoTargets and Therapy 2019;12:1655–1660

1655

 © 2019 Niebudek et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <https://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v3.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>). By accessing the work you hereby accept the Terms. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (<https://www.dovepress.com/terms.php>).

example: heme, porphyrin, riboflavin, hormones (estrogens), and chemotherapeutics (methotrexate, imatinib, doxorubicin, topotecan).^{6,7} Among the substrates for BCRP there are also carcinogenic xenobiotics. The BCRP transporter, by regulating the concentration of xenobiotics in the cell, fulfills the physiological protective role for the cell against toxicity of environmentally or clinically administered drugs.⁵ BCRP plays also an important protective role for hematopoietic stem cells against xenobiotics and hypoxia.^{3,8,9}

The genetic background significantly determines the kinetic properties of BCRP, starting from the single nucleotide polymorphism (SNP) to large chromosome aberrations that change protein properties and functions leading to an increased risk of cancer.^{3,10}

SNPs are the most frequent inherited sequence variations in a particular gene and occur every 100–300 bp.¹¹ The *ABCG2* gene protein was tested for SNPs in 90 different ethnic populations. Within the *ABCG2* gene, more than 40 nonsynonymous and synonymous SNPs in promoter regions, exons, and intron sequences have been identified.^{12,13}

The two most common SNPs are G34A and C421A. The G34A polymorphism in exon 2 (rs2231137) results in an amino acid change in position 12 from valine to methionine (Val12Met). This results in the formation of a protein with a significantly reduced ability to translocate the substance across the cell membrane. The C421A polymorphism in exon 5 (rs2231142) which leads to a glutamine-to-lysine amino acid substitution is associated with low levels of BCRP expression.^{2,10,14}

Loss of the physiological function of BCRP resulting from SNPs G34A and C421A in *ABCG2* gene variants may affect susceptibility to cancer development such as acute myeloid leukemia (AML), chronic myelogenous leukemia (CML), diffuse large B-cell lymphoma, breast cancer, prostate cancer, colorectal cancer, nonpapillary renal cell cancer, pancreatic cancer, and non-small-cell lung carcinoma. Therefore, several studies have tried to identify the role of SNPs with susceptibility, survival, and treatment outcomes of carcinoma.^{15,16}

Multiple myeloma is a cancerous disease derived from a single clone of cancer cells from the bone marrow. Multiple myeloma belongs to the group of malignant monoclonal gammopathies.³ The incidence in Europe ranges between 4.5 and 5.8/100,000. In epidemiological studies in Poland carried out since the 1990s, there has been a steady increase in multiple myeloma incidence. Multiple myeloma represents 1% of all malignancies and up to 14% of hematological malignancies. The disease is slightly more common in men. The pathogenesis of multiple myeloma is not yet fully known. However, it is assumed to be a multifactorial disease where environmental, genetic, and long-term antigenic stimulation of the immune

system in the course of bacterial and viral infections interact. The risk of first-degree multiple myeloma is 3–7 times higher in kinship relatives, which supports the concept of involvement of genetic factors in the development of the disease.

Therefore, it is reasonable to assume that the genetic variants of the *ABCG2* gene can cause altered exposure of hematopoietic cells to xenobiotics and thereby reduce or increase the risk of multiple myeloma development.³

The aim of this study was to determine the potential significance of SNPs G34A and C421A of the *ABCG2* gene in the development of multiple myeloma. To the best of our knowledge, the role of this polymorphism in multiple myeloma has not so far been studied in the Polish population.

Materials and methods

Materials

Blood samples (N=181) were collected from patients (85 females, 96 males; median age of group: 63 years) with multiple myeloma diagnosed at the Clinic of Hematology, Medical University of Lodz, Poland. The control group consisted of 97 blood samples obtained from healthy individuals (58 females, 39 males, median age of group: 33 years) from the local blood bank, and geographically and ethnically matched the group of patients with multiple myeloma. The investigation was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee of the Medical University of Lodz (No RNN/88/16/KE and RNN/285/13/KE). All patients provided a written informed consent before their inclusion in the study.

DNA isolation

DNA was isolated from peripheral blood according to the “Blood Mini” protocol (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland). DNA samples were stored at –20°C until analysis.

Genotyping of G34A and C421A

Polymerase chain reaction

Polymerase chain reaction (PCR) for both investigated polymorphisms was performed according to the 2×PCR Super Master Mix (Biotools, Jupiter, FL, USA) protocol. The mixture for PCR reaction consisted of: 5 µL of 2×PCR Super Master Mix (which included in its composition: buffer, MgCl₂, dNTPs, *Taq* DNA polymerase); 0.5 mM of each primer, specific to the particular SNP; 50 ng of DNA template; and distilled water up to 20 µL. Negative control was included in every experiment. PCR products for both SNPs were evaluated during electrophoresis on 2% agarose gel. Products of PCR reaction for SNPs G34A and C421A had a size of 291 bp and 184 bp, respectively.

Table 1 Details of methodology used in genotyping by polymerase chain reaction analysis

| Primer sequence | Annealing temperature (°C) | Restriction enzyme | Genotype | Fragment length (bp) |
|---|----------------------------|--------------------|----------------|--|
| BCRP SNP G34A | | | | |
| Forward primer: 5'-AAATGTTTCATAGCCAGTTTCTTGGA-3' Reverse primer: 5'-ACAGTAATGTCGAAGTTTTATCGCA-3' | 60 | <i>BseMI</i> | GG GA AA | 291 291, 261, 30 261, 30 |
| BCRP SNP C421A | | | | |
| Forward primer: 5'-ATGTTGTGATGGGCACTCTG-3' Reverse primer: 5'-TGCTGATCATGATGCTTTCAG-3' | 58 | <i>MseI</i> | CC CA AA | 100, 84 100, 84, 64, 36 84, 64, 36 |

Abbreviations: BCRP, breast cancer resistance protein; bp, base pair; SNP, single nucleotide polymorphism.

Restriction fragment length polymorphism

PCR products for both polymorphisms were digested by restriction enzyme specific to the studied polymorphism: *BseMI* for SNP G34A and *MseI* for SNP C421A. The digestion mixture consisted of 16 µL of PCR product, 2 µL of buffer, 0.1 µL of specified enzyme, and 1.9 µL of distilled water up to 20 µL for G34A; and 16 µL of PCR product, 2 µL of buffer, 0.5 µL of specified enzyme, and 1.5 µL of distilled water up to 20 µL. Digestion by restriction enzyme was performed for SNPs G34A and C421A, respectively, at 55°C for 16 h and at 30°C for 16 h. Genotypes for both studied polymorphisms were identified by electrophoresis (on 2% and 4% agarose gel for G34A and C421A, respectively) of amplified DNA fragments after digestion by restriction enzyme. The details of the band patterns are presented in Table 1.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using STATISTICA 10 (2011; StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). The Hardy–Weinberg equation was calculated in the experimental and control groups in the study only for SNP C421A. The χ^2 Pearson test with the Yates correction was applied to evaluate conformity between the observed and expected genotype frequencies according to the Hardy–Weinberg rule. To determine the significance of differences in genotype frequencies between the group of multiple myeloma patients and the group of healthy individuals, the χ^2 Pearson test with the Yates correction was used. In all conducted tests, $P < 0.05$ was assumed significant.

Ethics statement

The investigation was in accordance with the Declaration of Helsinki and the Good Laboratory Practice rules, and was approved by the Ethical Committee of the Medical University of Lodz (Nos RNN/88/16/KE and RNN/285/13/KE).

All patients provided a written informed consent before their inclusion in the study.

Results

This study recruited a total of 181 people diagnosed with multiple myeloma and 97 healthy people as a control group. All samples obtained from patients with multiple myeloma and from healthy individuals were included in the statistical analysis. The multiple myeloma and healthy control groups were analyzed using the Hardy–Weinberg equation model. Both groups were in Hardy–Weinberg equilibrium. Only SNP C421A of the *ABCG2* gene was significantly associated with the increased risk of multiple myeloma development ($P=0.0218$). For SNP G34A in the *ABCG2* gene (rs2231137), none of the patients or controls was carrying the minor (A) variant. For SNP C421A (rs2231142), our data showed that 10.5% and 1.1% of the patients with multiple myeloma had CA and AA genotypes respectively, while only 2.1% and 0% patients from the healthy control group had these genotypes (Table 2).

The group of patients with multiple myeloma was divided according to gender. Then, the correlation between gender and the incidence of individual genotypes and alleles for the C421A polymorphism in the *ABCG2* gene was analyzed. No statistically significant relationship in the case of analysis for genotypes and also in case of the presence of the C allele or the A allele was found ($P=0.1255$, $P=0.1307$, and $P=0.3865$ respectively).

For 84 trials, clinical data were given about the type of immunoglobulin secreted by myeloma cells. In this case, no association was found between the different genotypes of SNP C421A of the *ABCG2* gene and the type of immunoglobulin produced (Table 3).

Due to the lack of substantive association of the obtained results, they were not correlated with other available clinical

Table 2 Incidence of genotypes and alleles for G34A and C421A polymorphisms of the *ABCG2* gene in multiple myeloma patients and healthy individuals

| ABCG2 SNPs | Multiple myeloma patients, N=181 (%) | Healthy individuals, N=97 (%) | P (χ^2 Pearson with the Yates correction) | OR (95% CI) |
|-------------------|---|--------------------------------------|--|--------------------|
| SNP C421A | | | | |
| CC | 160 (88.4) | 95 (97.9) | <i>0.0218</i> | 1 (-) |
| CA | 19 (10.5) | 2 (2.1) | | 5.64 (1.28–24.75) |
| AA | 2 (1.1) | 0 (0.0) | | 2.97 (0.14–62.62) |
| C | 339 (93.6) | 192 (99.0) | <i>0.0040</i> | 1 (-) |
| A | 23 (6.4) | 2 (1.0) | | 6.51 (1.52–27.93) |
| HWEP | 0.7537 | 1.000 | | |
| SNP G34A | | | | |
| GG | 181 (100.0) | 97 (100.0) | NA ^a | NA ^a |
| GA | 0 (0.0) | 0 (0.0) | | |
| AA | 0 (0.0) | 0 (0.0) | | |
| G | 362 (0.0) | 194 (0.0) | NA ^a | NA ^a |
| A | 0 (0.0) | 0 (0.0) | | |
| HWEP | NA | NA | | |

Notes: *P*<0.05 (written italic) indicates a significant impact on the risk of multiple myeloma development. ^aDue to the obtained distribution of genotypes in the studied groups, statistical analysis was impossible.

Abbreviations: HWEP, Hardy–Weinberg equilibrium; NA, not applicable; SNP, single nucleotide polymorphism.

data: disease advancement according to the Durie-Salmon classification, general condition of the patients according to the WHO, therapy regimen, or laboratory parameters such as C-reactive protein, lactate dehydrogenase, hemoglobin, albumin, and β 2-microglobulin level (because data were not available from the whole group of patients with multiple myeloma).

Discussion

Multiple myeloma remains an incurable disease with an average survival of 4–6 years. Extensive epidemiological studies have shown that the processes of detoxification and elimination of xenobiotics from cells are associated with tumors.¹⁷ BCRP acts as a pump that actively removes toxic compounds, including carcinogens from cells. SNPs can alter the expression and activity of the relevant genes and their proteins, and

predispose them to the development of tumors.⁹ Much research has been done to clarify the role of SNPs and the development of various cancers including hematologic and solid tumors.¹⁵

Thus far, there have been only a few epidemiological studies to investigate the association between G34A and C421A polymorphisms in the *ABCG2* gene and the risk of various types of cancer. The exact association between cancer susceptibility and *ABCG2* polymorphisms remains unclear. The results appear to depend on the ethnic origin and type of cancer. Previous studies have shown important differences in the frequencies of genotype of G34A and C421A. For G34A, the Han Chinese population appears to have the highest frequency (34%), while the variant allele is extremely rare in the sub-Saharan African population (<1%) and is relatively rare in the African-American (5%) and

Table 3 Incidence of genotypes of single nucleotide polymorphism C421A in the *ABCG2* gene in patients with multiple myeloma by type of immunoglobulin secreted by myeloma cells

| SNP C421A | Multiple myeloma patients (N=84) | | | | P (χ^2 Pearson with the Yates correction) |
|------------------|---|----------------|----------------|-------------------------|--|
| | IgG (%) | IgA (%) | IgD (%) | Light chains (%) | |
| CC | 48 (57.1) | 13 (15.4) | 1 (1.2) | 14 (16.7) | 0.9939 |
| CA | 4 (4.8) | 2 (2.4) | 0 (0.0) | 2 (2.4) | |
| AA | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | |
| C | 52 | 15 | 1 | 16 | 0.8674 |
| A | 4 | 2 | 0 | 2 | |

Caucasian populations in the United States (12%). Variant A of the G34A polymorphism in the European population, according to the dbSNP database, could account for about 5% of the population. However, it may occur at a lower level, such as in the Turkish or Dutch population. To the best of our knowledge, the G34A analysis of the *ABCG2* gene presented in this publication is the first study of this type in the Polish population.¹⁸ The allelic frequencies in the Mexican-Indian, Mexican, and Latin populations were 90%, 10%, and 40%, respectively. Importantly, the A allele of C421A is widespread in the Japanese and Chinese populations (35%). For the Caucasian population it is below 10% and it is rarest for the sub-Saharan African and African-American populations, accounting for 5%.¹⁰

The present study focused on the role of the two most common polymorphisms of the *ABCG2* gene in the development of multiple myeloma. G34A is not related to the risk of developing multiple myeloma, whereas C421A was significantly associated with multiple myeloma ($P=0.0218$).

In contrast to the obtained results, the GA and AA genotype variants of SNP G34A in the *ABCG2* gene were associated with increased toxicity in AML. On the other hand, these genotypes were linked with improved survival in AML. In the same study, the *ABCG2* C421A polymorphism was associated with decreased drug resistance and a higher risk of death when compared to the wild type.¹⁹

Kim et al²⁰ demonstrated that SNP G34A variants may be relevant in response to imatinib therapy used in CML. They showed that the GA and AA genotypes were significantly associated with the lower rate of complete cytogenetic response to imatinib. In contrast, data available in another publication showed that there was no difference in the frequencies of SNP G34A between CML patients with good response and resistance to imatinib, but the AA genotype variant of SNP C421A was associated with the lower risk of resistance development to imatinib for patients with CML.¹

Similar studies have been carried out on a group of children with acute lymphoblastic leukemia among SNPs G34A and C421A in BCRP. Only SNP G34A in the *ABCG2* gene was related to a higher risk of acute lymphoblastic leukemia, which remains in contrast to the results of the research conducted by us on a group of patients with multiple myeloma.²¹ Hu et al⁹ obtained similar results. The researchers reported that the C421A A allele increased the risk of developing diffuse large B-cell lymphoma.

Regarding studies on the role of polymorphisms within the *ABCG2* gene in solid tumors, Wu et al¹⁴ found an

increased frequency of G34A GA and AA genotypes in patients with breast cancer. The G34A allele polymorphism was significantly different in these patients and was associated with an increased risk of cancer. Similarly, the homozygous variant of the C421A AA genotype was associated with a higher risk of developing breast carcinoma.¹⁴ Another study on the role of C421A polymorphism in a group of Kurdish breast cancer patients showed that the AA genotype is significantly associated with an increased risk of developing breast cancer.²²

Similar results were obtained by Sari et al¹⁰ in a study into the role of SNPs in the BCRP transporter and susceptibility to colorectal cancer. In this study, *ABCG2* C421A was statistically significantly associated with colorectal cancer risk. In particular, patients with A alleles were much more likely to have the disease than those with C alleles. In contrast, the *ABCG2* G34A genotypes in the cases and controls did not differ significantly, and thus polymorphism was not associated with the risk of colorectal cancer.¹⁰

C421A in the *ABCG2* gene plays contrasting roles in prostate cancer. First, enhanced tumor cell proliferation results from decreasing folate efflux and increased intracellular folate levels. On the other hand, in patients treated with docetaxel intratumoral, the level of docetaxel and tumor cell sensitivity increased and so did the patients' survival time.²³ Different results for C421A and prostatic cancer were obtained by Gardner et al²⁴ as there were no significant differences in the prevalence of prostate cancer based on the genetic variability of *ABCG2* in a non-Hispanic Caucasian cohort. Hahn et al²⁵ demonstrated that hormone-refractory prostate cancer patients carrying the *ABCG2* C421A genotype were more likely to survive beyond 15 months compared with those carrying the C421A CC genotype.

In contrast, another analysis of the role of SNP C421A in the *ABCG2* gene performed by Korenaga et al²⁶ proved that the CC genotype was associated with a higher risk of developing nonpapillary renal cell cancer.

Conclusion

Our study has shown that SNP C421A of the *ABCG2* gene predisposed to an increased individual risk of developing multiple myeloma. These results encourage further research into SNP C421A in the BCRP encoding gene and the risk of developing multiple myeloma, despite the fact that the small number of examined individuals may have limited the possibility to detect the effects of SNPs on the risk of multiple myeloma. However, further studies on the relationship between polymorphism and the risk of multiple

myeloma are required to confirm our findings prior to the use of polymorphism to identify subgroups with an increased risk of multiple myeloma.

Acknowledgment

This research was supported by statutory funds of the Department of Pharmaceutical Biochemistry and Molecular Diagnostics, Medical University of Lodz (503/3-015-02/503-31-001), research task of Medical University of Lodz (502-03/3-015-02/502-34-109) and by a grant from Medical University of Lodz (named: "grant UMED") (564/3-000-00/564-20-013).

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Au A, Aziz Baba A, Goh AS, et al. Association of genotypes and haplotypes of multi-drug transporter genes ABCB1 and ABCG2 with clinical response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients. *Biomed Pharmacother*. 2014;68(3):343–349.
- Taylor NMI, Manolaridis I, Jackson SM, et al. Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature*. 2017;3(7659):504–509.
- Martino A, Campa D, Buda G, et al. Polymorphisms in xenobiotic transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2, ABCB1, abcc3 and multiple myeloma risk: a case-control study in the context of the International multiple myeloma rESEarch (IMMENSE) Consortium. *Leukemia*. 2012;26(6):1419–1422.
- Ross DD. Modulation of drug resistance transporters as a strategy for treating myelodysplastic syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2004;17(4):641–651.
- Sarkadi B, Özvegy-Laczka C, Németh K, Váradi A. ABCG2 – a transporter for all seasons. *FEBS Lett*. 2004;567(1):116–120.
- Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg MF, Mao Q. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr Drug Metab*. 2010;11(7):603–617.
- Lockhart AC, Tirona RG, Kim RB. Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in cancer and chemotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2003;2(7):685–698.
- Tang L, Bergevoet SM, Gilissen C, et al. Hematopoietic stem cells exhibit a specific ABC transporter gene expression profile clearly distinct from other stem cells. *BMC Pharmacol*. 2010;10(1):12.
- Hu LL, Wang XX, Chen X, et al. BCRP gene polymorphisms are associated with susceptibility and survival of diffuse large B-cell lymphoma. *Carcinogenesis*. 2007;28(8):1740–1744.
- Sari FM, Yanar HT, Ozhan G. Investigation of the functional single-nucleotide polymorphisms in the BCRP transporter and susceptibility to colorectal cancer. *Biomed Rep*. 2015;3(1):105–109.
- Cheok MH, Pottier N, Kager L, Evans WE. Pharmacogenetics in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2009;46(1):39–51.
- Hardwick LJ, Velamakanni S, van Veen HW. The emerging pharmacotherapeutic significance of the breast cancer resistance protein (ABCG2). *Br J Pharmacol*. 2007;151(2):163–174.
- Noguchi K, Katayama K, Sugimoto Y. Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2014;7:53–64.
- Wu H, Liu Y, Kang H, et al. Genetic variations in ABCG2 gene predict breast carcinoma susceptibility and clinical outcomes after treatment with anthracycline-based chemotherapy. *BioMed Res Int*. 2015;2015(1):1–12.
- Natarajan K, Xie Y, Baer MR, Ross DD. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(8):1084–1103.
- Fehér Á, Juhász A, László A, et al. Association between the ABCG2 C421A polymorphism and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2013;550:51–54.
- Chen P, Zhao L, Zou P, et al. The contribution of the ABCG2 C421A polymorphism to cancer susceptibility: a meta-analysis of the current literature. *BMC Canc*. 2012;12(1):383.
- Bosch TM, Kjellberg LM, Bouwers A, et al. Detection of single nucleotide polymorphisms in the ABCG2 gene in a Dutch population. *Am J Pharmacogenomics*. 2005;5(2):123–131.
- Hampras SS, Sucheston L, Weiss J, et al. Genetic polymorphisms of ATP-binding cassette (ABC) proteins, overall survival and drug toxicity in patients with acute myeloid leukemia. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2010;1(3):201–207.
- Kim DH, Sriharsha L, Xu W, et al. Clinical relevance of a pharmacogenetic approach using multiple candidate genes to predict response and resistance to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clin Canc Res*. 2009;15(14):4750–4758.
- Zhai X, Wang H, Zhu X, et al. Gene polymorphisms of ABC transporters are associated with clinical outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia. *Arch Med Sci*. 2012;4(4):659–671.
- Ghafouri H, Ghaderi B, Amini S, et al. Association of ABCB1 and ABCG2 single nucleotide polymorphisms with clinical findings and response to chemotherapy treatments in Kurdish patients with breast cancer. *Tumor Biol*. 2016;37(6):7901–7906.
- Sobek KM, Cummings JL, Bacich DJ, O'Keefe DS. Contrasting roles of the ABCG2 Q141K variant in prostate cancer. *Exp Cell Res*. 2017;354(1):40–47.
- Gardner ER, Ahlers CM, Shukla S, et al. Association of the ABCG2 C421A polymorphism with prostate cancer risk and survival. *BJU Int*. 2008;102(11):1694–1699.
- Hahn NM, Marsh S, Fisher W, et al. Hoosier Oncology Group randomized phase II study of docetaxel, vinorelbine, and estramustine in combination in hormone-refractory prostate cancer with pharmacogenetic survival analysis. *Clin Canc Res*. 2006;12(20 Pt 1):6094–6099.
- Korenaga Y, Naito K, Okayama N, et al. Association of the BCRP C421A polymorphism with nonpapillary renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2005;117(3):431–434.

OncoTargets and Therapy

Publish your work in this journal

OncoTargets and Therapy is an international, peer-reviewed, open access journal focusing on the pathological basis of all cancers, potential targets for therapy and treatment protocols employed to improve the management of cancer patients. The journal also focuses on the impact of management programs and new therapeutic agents and protocols on

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/oncotargets-and-therapy-journal>

Dovepress

patient perspectives such as quality of life, adherence and satisfaction. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Kopie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej (Publikacje I-III)

Publikacja III

Michalska K, Balcerczak E, Jeleń A, Saed L, Pietrzak J, Żebrowska-Nawrocka M. *Effects of the SLCO1B1 A388G single nucleotide polymorphism on the development, clinical parameters, treatment, and survival of multiple myeloma cases in a Polish population.* Molecular Biology Reports. 2022. doi: 10.1007/s11033-022-08162-x.



Effects of the *SLCO1B1* A388G single nucleotide polymorphism on the development, clinical parameters, treatment, and survival of multiple myeloma cases in a Polish population

Katarzyna Michalska¹ · Ewa Balcerzak¹ · Agnieszka Jeleń¹ · Lias Saed¹ · Jacek Pietrzak¹ · Marta Żebrowska-Nawrocka²

Received: 5 October 2022 / Accepted: 24 November 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Background Multiple myeloma is one of the most common hematological malignancies worldwide. Genetic alterations may lead to the progression from monoclonal gammopathy to multiple myeloma. Additionally, the genetic background of the disease might influence therapy outcomes, including survival time. *SLCO1B1*, belonging to the OATPs family, is a membrane protein that mediates the uptake of a wide range of endogenous and exogenous (including drugs) compounds.

Methods and results In this study, the A388G single nucleotide polymorphism in the *SLCO1B1* gene in Polish multiple myeloma patients was determined. This polymorphism affects the amino acid change of the protein, so it may be responsible for treatment effectiveness or risk of disease development. A388G was evaluated by the PCR–RFLP method. The presented study showed a statistically significant association between the GG genotype with longer survival of patients with multiple myeloma with Melphalan-Prednisone therapy compared to other treatment regimens ($p=0.0271$). There was no statistically significant association in the frequency of genotypes ($p=0.8211$) and alleles: allele A ($p=0.5442$); allele G ($p=0.8020$) between multiple myeloma patients and a control group.

Conclusions The A388G polymorphism does not seem to affect the increased risk of the development of multiple myeloma. However, the occurrence of the GG genotype may prolong of patients overall survival in the case of Melphalan-Prednisone therapy.

Keywords Multiple myeloma · *SLCO1B1* · OATP · SNP · Survival · Drug

Background

Multiple myeloma (MM) is a malignant plasma cell disorder characterized by the clonal proliferation of plasma cells in bone marrow [1–3]. MM is one of the most

The first draft of the article was submitted to a pre-print platform—Research Square (Number <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-470671/v1>). This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

✉ Marta Żebrowska-Nawrocka
marta.zebrowska@umed.lodz.pl
Katarzyna Michalska
katarzyna-niebudek@wp.pl
Ewa Balcerzak
ewa.balcerzak@umed.lodz.pl
Agnieszka Jeleń
agnieszka.jelen@umed.lodz.pl
Lias Saed
lias.saed@umed.lodz.pl
Jacek Pietrzak
jacek.pietrzak@umed.lodz.pl

- ¹ Laboratory of Molecular Diagnostics and Pharmacogenomics, Department of Pharmaceutical Biochemistry and Molecular Diagnostics, Medical University of Lodz, Muszynskiego 1, 90-151 Lodz, Poland
- ² Laboratory of Molecular Diagnostics and Pharmacogenomics, Department of Pharmaceutical Biochemistry and Molecular Diagnostics, Interfaculty Cathedral of Laboratory and Molecular Diagnostics, Medical University of Lodz, Muszynskiego 1, 90-151 Lodz, Poland

Published online: 07 December 2022



common hematological malignancies in adults worldwide and accounts for 1.8% of all cancer cases and approximately 10% of hematologic malignancies [3, 4]. In Europe, more than 48,000 new cases and approximately 31,000 deaths are reported each year from multiple myeloma [5, 6].

Multistep genetic alterations lead to the progression from MGUS—monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma in some persons. The monoclonal protein produced by plasma cells is an abnormal immunoglobulin either of which causes excessive viscosity and end-organ damage. The most common type of heavy chain produced in myeloma is IgG, followed by IgA, then IgD and light chain only. IgM, and IgE are very rare. The MM presents with hypercalcaemia, renal failure, anemia and bone lesions, collectively known as CRAB criteria. The most common abnormality in basic laboratory tests results is anemia, i.e. a reduced number of red blood cells or reduced amount of hemoglobin they contain. Similarly, elevated creatinine levels, indicative of impaired kidney function as a result of damage by monoclonal proteins, have been observed frequently [7].

Over the past two decades, strategies for MM therapy have rapidly evolved and led to improved clinical outcomes including prolonged survival, but predicting the treatment response of individual patients at the time of diagnosis remains difficult and needs an understanding of genetic background [8]. This could contribute to a more complete molecular description of the disease and improved therapy. In that context study of membrane transporters may have great clinical importance, because to function properly, the human body has to constantly transport various substances, both xenobiotics, and endogenous compounds, through biological barriers.

There are many groups of membrane transporters divided into families due to the homology of structure and the specifics of transported substrates. In humans, the solute carrier (SLC) family of membrane transport proteins consists of approximately 300 individual proteins and is organized into 43 families [9]. The organic anion transporting polypeptide (OATP) superfamily includes important transporters which substrates are many endogenous and xenobiotic substances, including: bile acids, organic pigments, nucleotides, prostaglandins, hormone precursors, hormones, environmental toxins, and anticancer drugs. Therefore, OATPs are capable to transport a wide variety of compounds affecting growth and survival of both normal and cancer cells [10–13].

The pharmaceutical substances transported by OATP include: antibiotics, antidiabetic drugs, anti-inflammatory drugs, antifungals, antivirals, antihistamines, antihypertensives, fibrates, statins, cardiac glycosides, immunosuppressants, anticancer drugs, including those used in the treatment of multiple myeloma e.g. methotrexate, doxorubicin, and docetaxel [9, 10, 14–16]. OATPs as the main of influx

drug transporters significantly contribute to the absorption, distribution, and elimination (ADME) of pharmaceutical agents and the involvement of drug–drug interaction (DDI). The expression of OATPs transporters in neoplasms may also influence the intracellular concentration of drugs, thus influencing their effectiveness [9, 14, 17, 18].

OATPs are expressed in various tissues and organs, such as the liver, intestine, blood–brain barrier, kidney, placenta, and other organs [9, 19, 20]. It is now well recognized, that certain OATPs are differentially regulated in normal and cancer tissues [20]. There is evidence that the expression of some OATPs may be varied in several types of cancers, suggesting their potential pathogenic roles during the development and progression of cancer [10, 21]. OATPs expression levels have been shown to be altered in many different types of cancer, and some are correlated with cancer stage and outcomes. So far, research on the role of OATP1B1 has focused on their role in pharmacokinetics, treatment efficacy, and clinical outcomes in the treatment of solid tumors. So far, less research has been done on the role of these transporters in hematological malignancies [22–24].

Several of naturally occurring single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding OATPs have been reported and extensively investigated for their impact on the expression and function of OATP transporters. Many studies have shown that SNPs from OATP are associated with an effect on the presence and function of proteins, and that some SNPs are associated with an altered distribution of chemotherapy drugs and, consequently, with increased side effects [12]. So far, it has been reported that polymorphic variants of the genes encoding OATP1A2, OATP1B1, and OATP1B3 are clinically significant [10].

The *SLCO1B1* gene located on chromosome 12 (gene locus 12p12) consists of 15 exons and 14 introns, and encodes a protein with 691 amino acids [25, 26]. The *SLCO1B1* gene spans 15 exons and 190 common variants with minor allele frequency, greater than 5% [26, 27]. Although many SNPs have been identified in *SLCO1B1*, only several are known to have functional effects and clinical significance, e.g. *SLCO1B1* rs2306283 (A388G, N130D) or rs4149056 (T521C, V174A) [16, 26, 28]. Differently regulated OATPs may play a pathogenic role in cancer development or progression, and potentially serve as therapeutic targets for cancer [29]. SNP A388G (rs2306283) has been reported to affect the transport function of the protein, which is due to changes in the structure of transmembrane domains, but the functional consequences of this variant remain controversial [28, 30, 31].

Our work aimed to determine *SLCO1B1* A388G gene polymorphism in multiple myeloma patients. The research may allow us to better understand the molecular mechanisms underlying the altered function, expression of OATPs in cancer development, transport of anticancer drugs, and therapy

efficiency, to try to use the assessment of transporters' status as potential molecular markers of the diagnostic, prognostic, and predictive nature or in cancer treatment involving individual response to drugs.

Material and method

The investigated group: 157 blood samples were collected from patients with multiple myeloma diagnosed at the Department of Hematology, Medical University of Lodz, Poland between 1992 and 2002 according to the International Myeloma Working Group Classification criteria. Due to the lack of complete clinicopathological data for all patients, some statistical analyzes were performed on less numerous groups.

The control group: 141 blood samples were obtained from healthy individuals from the local blood bank, who geographically and ethnically matched the group of patients with MM.

The investigation was carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee of the Medical University of Lodz No: RNN/93/20/KE, RNN/88/16/KE; RNN/285/13/KE. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

DNA isolation

The DNA was isolated from peripheral blood using the microcolumn method under the "Blood Mini" protocol (A&A Biotechnology, Poland). The DNA samples, until further analysis, were stored at -20°C . The DNA quantity and quality/purity were determined by Nanophotometer (IMPLEN, Germany).

Genotyping of A388G

To determine the A388G polymorphism in the *SLCO1B1* gene, the PCR-restriction fragment length polymorphism method (PCR-RFLP) was used. For analyzing the *SLCO1B1* variants, the forward primer 5'-CATGCTGGGAAATTGACAGAAAGT-3' and the reverse primer 5'-GAAAACGCGTAGTTTAAACCTGT-3' were used. The PCR reaction was performed in a total reaction volume of 20 μl volume containing: 50 ng of genomic DNA, 10 μl of REDTaq® ReadyMix™ (Sigma- Aldrich, USA), 0.7 μl of 10 μmol of forward and reverse primers, and distilled water up to a final volume. A negative control was included in each experiment. The PCR product for the A388G SNP of the *SLCO1B1* gene was 462 bp in size. In the next step, PCR products were digested with the *TaqI* restriction enzyme (*EURX Sp. z o. o.*, Poland) at 65°C for 16 h. The digested PCR products

were separated by electrophoresis using a 3% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized by a UV transilluminator. Electrophoretic analysis of genotypes was performed. The bands patterns presentation was: AA (*wild-type*) 194 + 268, AG (*heterozygote*) 23 + 171 + 194 + 268, GG (*mutant*) 23 + 171 + 268.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using STATISTICA 13 software (*StatSoft Inc. 2018*). To determine differences between genotype and allele frequencies of A388G among multiple myeloma patients and the control group as well as the significance of differences A388G polymorphism and clinical-pathological features of the MM patients the chi-square test was used. The Kaplan–Meier analysis was performed to estimate overall survival (OS). The OS was defined as the interval from the date of diagnosis to the date of death or the last clinical appointment. The effects of A388G polymorphism on survival were examined using the chi-square test for genotypes and log-rank test for alleles using the proportional hazards model. In all conducted tests, a *p* value of <0.05 was considered significant.

In silico analysis

The effect of A388G polymorphism on the protein was estimated by in silico programs:

- SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant; https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_dbSNP.html).
- PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).
- PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer; <http://provean.jcvi.org/index.php>).
- Mutation Taster (<https://www.mutationtaster.org/MutationTaster69/index.html>).

Results

In our results, similarly to Caucasians, the *SLCO1B1* in A388G SNP G allele was observed with a lower frequency in the Polish population [11, 26, 28, 32]. The frequencies of alleles and genotypes of the studied A388G SNP between the investigated and control groups were compared. There were no statistically significant differences in the frequencies of the genotype ($p=0.8211$) and alleles: A ($p=0.5442$) and G ($p=0.8020$) between groups. However, the GG genotype occurred slightly more often in the group of MM patients than in the control group (28.7%; 25.5%, respectively). The GG genotype was associated with a 1.15-fold higher incidence of this disease compared to the AG and AA genotypes. The details are presented in Table 1.

Table 1 Frequency of genotype and allele distributions of the A388G SNP between the investigated and control group

| SLCO1B1 SNP A388G | | Multiple myeloma N = 157 [%] | Healthy individuals N = 141 [%] | <i>p</i> | OR [95%] |
|----------------------|-----------|---------------------------------|------------------------------------|----------|----------|
| Genotype | AA | 79 [50.3] | 73 [51.8] | 0.8211 | 1 |
| | AG | 33 [21.0] | 32 [22.7] | | |
| | GG | 45 [28.7] | 36 [25.5] | | |
| Allele ^a | A present | 191 [60.8] | 178 [63.1] | 0.5442 | – |
| | A absent | 123 [39.2] | 104 [36.9] | | |
| | G present | 123 [39.2] | 104 [36.9] | 0.8020 | – |
| | G absent | 191 [60.8] | 178 [63.1] | | |

^aTotal N for present/absent alleles calculated as the sum of present/absent alleles in each genotypes

The reduced number of cases used in further statistical analyzes resulted from the limited availability of clinical data. Among the group of 97 MM patients, 47 were men (48.5%) and 50 were women (51.5%). No statistically significant differences were found in the distribution of genotypes ($p=0.9147$) and the frequency of alleles A allele or the G allele ($p=0.6738$ and $p=0.7813$, respectively) depending on the patient gender.

The next compared parameter was age. The median age of MM patients at diagnosis was 63 years ($N=79$; age range 40 to 87 years). The patients were divided into two subgroups: the first subgroup of patients aged ≤ 63 years and the second subgroup aged over 63 years. The genotype AA tended to occur more frequently in the subgroup of patients aged ≤ 63 years ($p=0.0742$). The allele analysis showed that the occurrence of at least one A allele was statistically significantly more frequent ($p=0.0357$) in the subgroup of patients under 63 years of age (79%) than in the subgroup over 63 years (58%).

Many laboratory parameters allow clinicians to monitor the disease progress, assessing the effectiveness of treatment and prognosis in multiple myeloma. The most common abnormality in basic laboratory test results is anemia, i.e. a reduced number of red blood cells or reduced amount of hemoglobin they contain. Similarly, elevated creatinine levels, indicative of impaired kidney function as a result of damage by monoclonal proteins, have been observed frequently. In the next stage of the analysis, the group of patients with MM for whom clinical trials were available were divided into subgroups according to hemoglobin and creatinine levels ($N=61$ and $N=59$, respectively). In the case of the hemoglobin level (Hb), the first subgroup of patients had it lower than or equal to 9.2 g/dL, the second subgroup had the Hb level over 9.2 g/dL; and as regards the creatinine concentration, the first subgroup had it lower than or equal to 2 mg/dL, the second subgroup had this level over 2 mg/dL. When we compared the distribution of the A388G SNP according to the hemoglobin level in the subgroups of MM patients, no significant differences for investigated genotypes and alleles were observed ($p=0.2020$). However,

the A allele tended to be more frequent in the subgroup of patients with a hemoglobin level lower or equal to 9.2 g/dL ($p=0.0771$). In the case of the creatinine concentration analysis, no statistical significance was demonstrated ($p=0.7133$).

Further analysis according to the stage of advancement of MM in line with the Durie-Salmon classification was performed ($N=52$). In this part of the analysis also no significant differences were observed in the genotype frequencies ($p=0.2075$). It is worth noting that at least one A allele was more frequent in the subgroup of patients who were classified as stage III (80%) than in stage I (60%) or stage II (43%) according to the Durie-Salmon classification ($p=0.0974$). The distributions of genotype and allele frequencies of the analyzed clinical-pathological features are summarized in Table 2.

MP Melphalan-Prednisone, *VAD* Vincristine-Adriamycin-Dexamethasone, *Other* Melphalan/or Bortezomib/or Bortezomib + VAD

The type of myeloma diagnosis does not usually influence treatment, but it can affect the course of the disease in an individual patient. Clinical data on the type of immunoglobulins secreted by myeloma cells were available for 78 trials. The group of patients with MM was divided into three subgroups according to the type of the produced immunoglobulins. The produced immunoglobulin subtype was IgG for 46 patients (59%), IgA for 17 patients (22%), and light chains for 15 patients (19%). Also, in this case, no statistical association was found between the different genotypes and alleles of the A388G SNP of the *SLCO1B1* gene and the type of produced immunoglobulins ($p=0.6939$). Details are in in Table 3.

The dependence of the polymorphism at position A388G of the *SLCO1B1* gene with the probability of overall survival time was analyzed as the last part. The Kaplan–Meier plot shows the probability of survival in the group of patients with multiple myeloma from the diagnosis to the last follow-up. There was no statistically significant difference in survival according to genotypes ($p=0.1192$) or the presence of at least one A or G allele

Table 2 The frequency of the studied A388G SNP in patients with multiple myeloma according to the clinical-pathological features

| | N | Prevalence of the investigated A388G SNP in multiple myeloma patients | | | | p | Gpresent [%] | Gabsent [%] | p | | |
|--|-----------|---|---------|--------|------------|--------|--------------|-------------|--------|---------|--------|
| | | AA [%] | AG [%] | GG [%] | Absent [%] | | | | | | |
| Gender | | | | | | | | | | | |
| | Female | 50 | 28 [56] | 8 [16] | 14 [28] | 0.9147 | 36 [72] | 14 [28] | 0.6738 | 28 [56] | 0.7813 |
| | Male | 47 | 25 [53] | 7 [15] | 15 [32] | | 32 [68] | 15 [32] | | 25 [53] | |
| Age | ≤63 years | 39 | 26 [67] | 5 [12] | 8 [21] | 0.0742 | 31 [79] | 8 [21] | 0.0357 | 26 [67] | 0.0311 |
| | >63 years | 40 | 17 [43] | 6 [14] | 17 [43] | | 23 [58] | 17 [42] | | 17 [42] | |
| Hemoglobin | ≤9.2 g/dL | 31 | 20 [65] | 5 [16] | 6 [19] | 0.2020 | 25 [80] | 6 [20] | 0.0771 | 20 [65] | 0.2517 |
| | >9.2 g/dL | 30 | 15 [50] | 3 [10] | 12 [40] | | 18 [60] | 12 [40] | | 15 [50] | |
| Stage of advancement according to Durie-Salmon | I | 5 | 3 [60] | 0 [0] | 2 [40] | 0.2075 | 3 [60] | 2 [40] | 0.0974 | 2 [40] | 0.6203 |
| | II | 7 | 3 [43] | 0 [0] | 4 [57] | | 3 [43] | 4 [57] | | 3 [43] | |
| | III | 40 | 25 [63] | 7 [17] | 8 [20] | | 32 [80] | 8 [20] | | 25 [63] | |
| Creatinine | No | 44 | 24 [55] | 6 [13] | 14 [32] | 0.7689 | 30 [68] | 14 [32] | 0.9136 | 24 [55] | 0.7133 |
| | Yes | 15 | 9 [60] | 1 [7] | 5 [33] | | 10 [67] | 5 [33] | | 9 [60] | |
| Type of chemotherapy | MP | 28 | 12 [43] | 6 [21] | 10 [36] | 0.6707 | 18 [64] | 10 [36] | 0.3574 | 12 [43] | 0.4569 |
| | VAD | 41 | 23 [56] | 8 [20] | 10 [24] | | 31 [78] | 10 [24] | | 23 [56] | |
| | Other | 8 | 5 [63] | 1 [17] | 2 [25] | | 7 [88] | 1 [12] | | 5 [63] | |

Table 3 The frequency of genotypes and alleles of SNP A388G in the *SLCO1B1* gene in patients with multiple myeloma in relation to the type of immunoglobulins secreted by myeloma cells

| SLCO1B1 SNP A388G | Multiple myeloma patients (N = 78) | | | p | |
|-------------------|------------------------------------|-----------|------------------|-----------|--------|
| | Immunoglobulin subtype | | | | |
| | IgG [%] | IgA [%] | Light chains [%] | | |
| Genotype | AA | 27 [34.6] | 7 [9.0] | 8 [10.2] | 0.6939 |
| | AG | 14 [17.9] | 6 [7.7] | 5 [6.4] | |
| | GG | 5 [6.4] | 4 [5.1] | 2 [2.6] | |
| Allele* | A present | 32 [41.1] | 11 [14.1] | 10 [12.8] | 0.9284 |
| | A absent | 14 [17.9] | 6 [7.7] | 5 [6.4] | |
| | G present | 19 [24.3] | 10 [12.8] | 7 [9.0] | 0.4642 |
| | A absent | 27 [34.7] | 7 [9.0] | 8 [10.2] | |

*Total N for present/absent alleles calculated as the sum of present/absent alleles in each genotypes

($p = 0.3122$, $p = 0.5587$, respectively). However, the time of survival was shorter in the subgroup of patients with the AA genotype (median: 321 days) compared to the subgroups of patients with the GG genotype (median: 628 days) or the AG genotype (median: 526 days) (Fig. 1). This is confirmed by the results of the analysis for A388G SNP alleles, where the time of survival was shorter in the presence of at least one A allele (A allele present: median 379 days; A allele absent: median 526 days) (Fig. 2), and it was longer in the presence of at least one G allele (G allele present: median 597 days; G allele absent: median 321 days) (Fig. 3).

The data on the type of scheme of chemotherapy used during the treatment was available for 77 MM patients. The Melphalan-Prednisone—MP scheme was applied in 28 (36%) cases, Vincristine-Adriamycin-Dexamethasone—VAD scheme was used in 41 (53%) cases. Different treatment regimens were used in the remaining cases 8 (11%). Patients with MM for whom information about the treatment was available were divided according to the A388G genotype and in these subgroups, the influence of the applied treatment regimen on survival was assessed. In the group of patients with the GG genotype, the survival time was statistically significantly longer ($p = 0.0271$) in the case of the MP (704 days) regimen compared to the VAD regimen (669 days) or other regimens (3 days) (Fig. 4). No statistical significance was demonstrated in the analysis concerning the association between the A388G SNP and the treatment scheme according to genotypes ($p = 0.6707$) or the presence of at least one A or G allele ($p = 0.3574$, $p = 0.4569$, respectively). When the effect of the treatment regimen on survival was assessed, it was shown that the longest median survival (471 days) was when the VAD regimen was applied compared to the MP regimen (451 days) and other treatments

Fig. 1 Kaplan–Meier plot for multiple myeloma patients with different genotypes for A388G polymorphism of the *SLCO1B1* gene

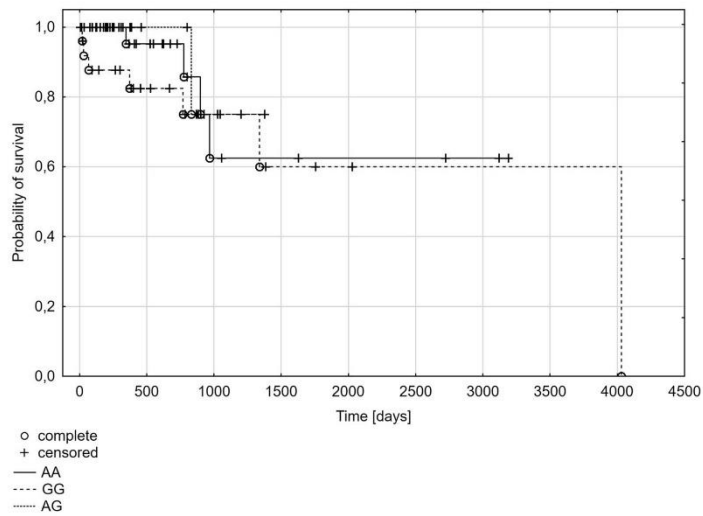
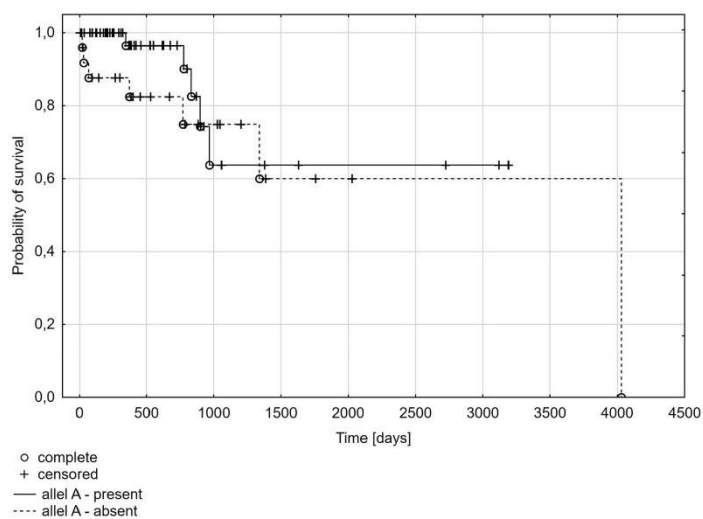


Fig. 2 Kaplan–Meier plot for multiple myeloma patients with the present/ absent A allele in the A388G polymorphism of the *SLCO1B1* gene



(95 days). However, it was not statistically significant ($p=0.1171$).

Due to contradictory reports on the importance of this polymorphism on the amount and function of the protein as the last part, an in silico analysis was performed for assessing the potential impact of investigated SNP on encoded protein function. All analyses showed that A388G polymorphism does not affect on *SLCO1B1* protein structure and function. Details are in Table 4.

Discussion

OATPs are membrane proteins that mediate the uptake of a wide range of endogenous compounds and many xenobiotics, thus ensuring the regulation of delivery of required substrates and thereby cellular homeostasis [18, 19]. Changes in the amount and / or activity of transport proteins have numerous consequences, e.g. they affect the

Fig. 3 Kaplan–Meier plot for multiple myeloma patients with the present/absent G allele in the A388G polymorphism of the *SLCO1B1* gene

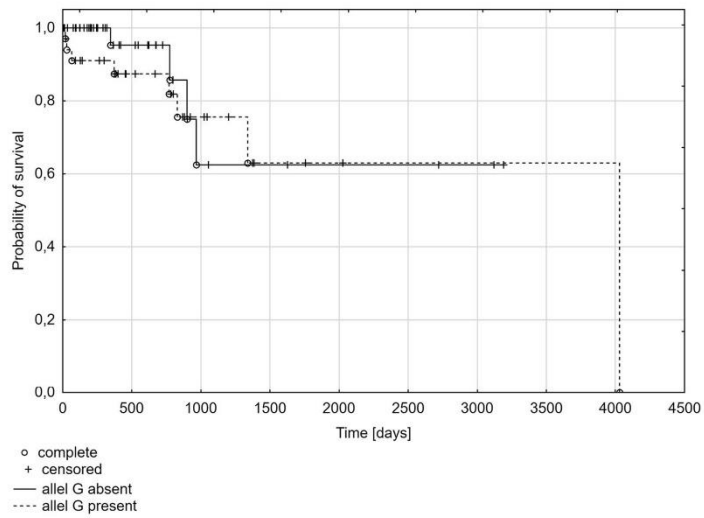


Fig. 4 Kaplan–Meier plot for multiple myeloma patients with GG genotype for A388G polymorphism of the *SLCO1B1* gene according to the different treatment regimen

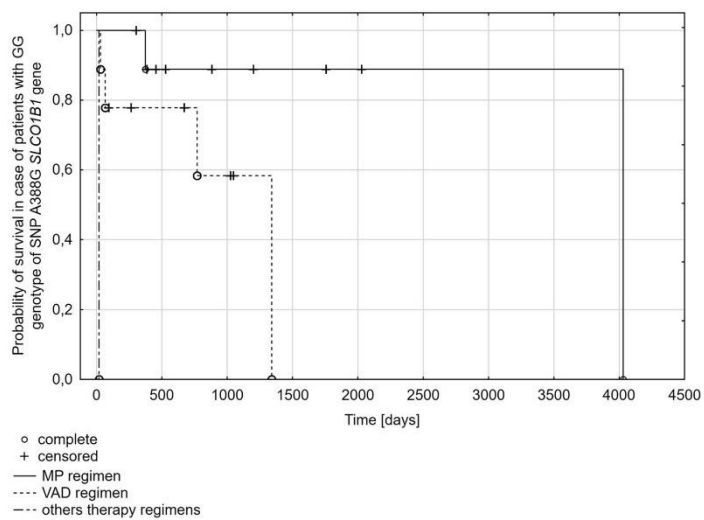


Table 4 In silico evaluation on the effect of nonsynonymous SNP A388G of *SLCO1B1* gene

| SNP | TOOL | SCORE | PREDICTION |
|-------|-----------------|--------|-------------------|
| A388G | SIFT | 0.561 | Tolerated |
| | PolyPhen-2 | 0.000 | Benign |
| | PROVEAN | -1.784 | Neutral |
| | Mutation Taster | 23 | Probably harmless |

cell defense potential by regulating the amount of harmful substances in the cell, which may lead to cell damage, mutation, and oncogenesis. So far, it has been shown that the expression of some OATPs can be altered in a variety of disease states, including many different types of cancer. OATPs have been found to be alter expressed in a variety of human solid tumors, including breast, liver, colon, pancreatic, and ovarian cancers, but a smaller number

of analyzes concerns hematological cancers. Additionally, the level of protein activity is usually related to the response to the chemotherapy administered [10, 12, 17, 20, 28, 33–35].

In several cancers, altered expression of OATP levels has been correlated with cancer stage and clinical outcomes. The results suggest the potential role of OATP in cancer development and progression and their potential role as new targets in cancer treatment [10, 12, 17, 20, 28, 34, 35]. Recently, Chen et al. showed that the OATP1B3 expression was significantly reduced in neoplastic tissues compared to that in adjacent non-neoplastic tissues. Moreover, the OATP1B3 lower expression was significantly correlated with the tumor size, relapse, tumor differentiation, and tumor node metastasis (TNM) rate in hepatocellular carcinoma [36].

The expression, substrate specificity, and activity of OATP transporters in tumors may affect the intracellular concentration of drugs, and, therefore, influence their effectiveness. OATP1B1 mediates hepatic uptake of many drugs and can influence transporter-mediated drug-drug-interactions (DDIs), therefore is responsible for the multiple side effects of multi-drug therapy, often used in cancer treatment [37]. Furthermore, expression levels of these influx transporters may play a crucial role in chemoresistance mechanisms [13]. Patients with OATP polymorphisms have been found to have altered pharmacokinetics due to their impact on absorption, distribution, and excretion of anticancer drugs, thus cancer outcomes [11, 20, 21, 38]. Bortezomib as a proteasome inhibitor is used in multiple myeloma treatment. Alam et al. in an in vivo study investigated that bortezomib has a low potential to cause OATP-mediated clinical drug-drug interactions (DDIs) [39].

The availability of results on the role of polymorphisms in these important transporters in cancers is limited, especially in the case of hematologic malignancies. Some single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding OATPs have been reported to be clinically relevant and have been investigated for their impact on the expression, and protein function. Only several are known to have functional effects and clinical significance, e.g. *SLCO1B1* rs2306283 (A388G, N130D) or rs4149056 (T521C, V174A) [16, 17, 26, 28]. The A388G and T521T C form four main haplotypes: *1A (388A/521T)—wild-type, *1B (388G/521T), *5 (388A/521C) and *15 (388G/521C) [11, 15]. The clinical importance of *SLCO1B1*, mainly *5 or *15, for statin-induced myopathy is well demonstrated [39]. The A388G SNP was reported with the altered transport function caused by changes in the structure of the protein's transmembrane-spanning domains [28].

The G allele at A388G (referred to as the *1B variant) causes a substitution that may increase the OATP1B1 activity, however, role of this variant remains moot [30]. Studies on the functional consequences of the *1B haplotype

have been partially controversial as some studies have shown reduced activity, others have shown increased activity, and many have shown no change in transport activity [40]. Absolute protein quantification showed that OATP1B1 protein levels were significantly higher in the GG genotype vs. the AA genotype in A388G SNP, confirming the increased transport function of N130D-OATP1B1 in vivo [11, 31]. These results can confirm that the presence of the G allele influencing the increase in the expression of the protein responsible for the intracellular transport of chemotherapeutic agents leads to more efficient transport and a higher concentration of the drug in the cell, which makes the drug therapy more effective. Some studies revealed that OATP1B1 could enhance the transport of drugs by transporters, and an in vivo experiment reached the same conclusion [15, 41]. Therefore, study aimed to assess the potential impact of the one of most common functional A388G SNP variants in *SLCO1B1* gene on the risk of multiple myeloma development and clinical outcomes.

The discrepancy in some results may be due to the differences in ethnicity, as *SLCO1B1* allele frequencies are known to vary between different populations [28]. In our research, the G allele prevalence was close to the frequencies reported in other Caucasian populations: 39.2% in the multiple myeloma group and 36.9% in the control group. The obtained results are consistent with the data published by Nagy et al. where the frequency of the G allele in the A388G SNP of the *SLCO1B1* gene was 36.2% in Hungarian populations [26].

The study showed a statistically significant association between the GG genotype with longer survival of patients with multiple myeloma with MP therapy compared to other treatment regimens ($p=0.0271$). Statistical significance was found also for the presence of at least one A allele and age at diagnosis ≤ 63 years ($p=0.0357$). These are only the results of statistical analysis between two subgroups of patients with MM. However, it may potentially indicate that despite the presence of the A—wild allele theoretically associated with the normal (protective) function of the protein, patients got sick anyway for multiple myeloma in the subgroup of younger patients (<63 years of age) who, due to their younger age, were in a group with a potentially lower risk of developing the disease. The study showed that the AA genotype and the A allele were more common in the control population, while the GG genotype and the G allele were more common in multiple myeloma patients. However, the obtained results did not show a statistically significant association between the studied polymorphism and the risk of multiple myeloma ($p=0.8211$). In addition, no significant association with clinical-pathological features was found.

The studied polymorphism has not been verified in multiple myeloma or other hematologic neoplasms so far. Therefore, we are not able to relate our results to other studies in MM. Our results can only be compared with those obtained

in studies on solid tumors. Falkowski et al. have shown that the A388G variant genotypes of *SLCO1B1* were not associated with colorectal cancer (CRC); similar results were obtained by Özhan et al. in colorectal cancer [21, 42]. In another study on two common polymorphisms of *OATP4A1*, no association between CRC predisposition and tumor recurrence was found [38]. Noci et al. showed that A388G is associated with overall survival for patients with metastatic CRC treated with irinotecan. Previously in Innocenti et al. study, this SNP has been reported to be associated with neutropenia in patients treated with irinotecan [29].

In the presented study, the dependence of the A388G in the *SLCO1B1* gene on the probability of overall survival time has been assessed. The OS was longer if the G allele was present in the genotype, however, there was no statistically significant difference in survival according to genotypes or alleles. Our results were consistent with those obtained by Zhang X. et al., which showed no difference in overall survival between wild-type and *SLCO1B1* A388G carriers in breast cancer patients [43]. On the contrary, Teft et al. have found that progression-free survival (PFS) was significantly longer in *SLCO1B1* 388G/G colorectal cancer patients after irinotecan-based chemotherapy [44].

Most of the research has been devoted to the role of transporters, polymorphic variants, and haplotypes in the pharmacokinetics of drugs, including chemotherapeutic agents used in the treatment of hematological malignancies [45–47]. A recent study in adult patients with hematologic malignancies receiving high-dose methotrexate suggests that patients with the *SLCO1B1* A388G or T521C variants exhibit differential metabolomic profiles that may modulate the risk for methotrexate-induced toxicities. Similar findings have been reported in cancer patients treated with irinotecan, the plasma concentration of active metabolite SN-38 was higher and the risk of severe neutropenia was increased by T521C, while the A388G variant does not affect transport activity for SN-3. The results obtained in the studies indicate that the importance of OATP transporters is worthy of further attention from the researchers [10, 47, 48].

The expression, polymorphisms, substrate spectrum, importance in drug transport, DDIs, and multi-drug resistance mechanisms, turn out to be not the only interesting OATP application in medicine [49]. Zhang et al. presented a next different view on the usefulness of OATP transporters in cancer. They have shown that due to the overexpression of OATPs in many types of cancer cells and their active transport function, the diagnostic substance can more effectively penetrate the cell membranes of cancer cells, unlike healthy cells. The results may contribute to the development of a promising diagnostic tool for the differentiation of cancer cells in the early stages of diagnosis [50].

Despite the enormous advances in MM treatment in recent decades and the availability of new drugs and their

combinations, including new generations of proteasome subunit inhibitors, immunomodulatory drugs or antibodies with incorporating autologous stem cell transplantation (ASCT), MM is still an incurable disease that requires lifelong management. The authors are aware of the limitations of the results presented in the study. The results presented in the study do not fully correspond to the currently used therapy standards, prognostic indicators, such as International Staging System (ISS) or Revised International Staging System (R-ISS) or more appropriate indicators for the analysis of survival, such as progression-free time or time to progression, but not only overall survival. However, the study limitations mainly result from the fact that the material used in the study was collected in the years 1992–2002 and also the limitations of access to complete clinical data and laboratory results, which the authors had no influence.

Increased studies are necessary to obtain more comprehensive profiles of OATPs differentially regulated in cancer cells and further investigate the role of OATPs in multiple myeloma. This will allow researchers to better understand molecular mechanisms underlying an altered expression of OATPs in hematologic cancer development, anticancer drug transport, and therapy efficiency to determine how these transporters can be used as potential molecular markers. Further analyzes of polymorphic variants in OATP transporters are planned, including haplotype analyzes, effects on protein expression, and function. Nevertheless, the authors believe that the presented manuscript brings new information about the share of polymorphism in the Polish population, which has not been studied so far in this disease entity.

Conclusion

According to our knowledge, this is the first such study in multiple myeloma patients, especially in the Polish population. Our study showed that SNP A388G of the *SLCO1B1* gene does not predispose to an increased individual risk of developing multiple myeloma and does not affect the values of selected clinical parameters. However, the occurrence of the GG genotype may prolong patient's overall survival in the case of Melphalan-Prednisone therapy. Due to contradictory reports on the importance of this polymorphism on the amount and function of the protein, an *in silico* analysis was performed which did not show the effect of SNP on the structure and function of the protein. Further studies are necessary to obtain more comprehensive profiles of OATPs differentially regulated in cancer cells, along with a better understanding of molecular mechanisms underlying the altered function of OATPs in cancer.

Acknowledgements Not applicable.

Author contributions All authors contributed to the study conception and design. Conceptualization, KM and EB; Funding acquisition, EB; Formal analysis and Investigation, KM, EB, AJ, LS, JP and MZ-N; Supervision, EB; Writing—original draft, KM, AJ, LS, JP and MZ-N; Writing—review and editing, EB and MZ-N. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding This research was supported by statutory funds of the Department of Pharmaceutical Biochemistry and Molecular Diagnostics, Medical University of Lodz, 503/3-015-02/503-31-001.

Data availability The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Declarations

Competing interests The authors declare that they have no competing interests.

Ethical approval The investigation was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and the Good Laboratory Practice rules and was approved by the Ethical Committee of the Medical University of Lodz No: No: RNN/93/20/KE, RNN/88/16/KE; RNN/285/13/KE.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Castaneda O, Baz R (2019) Multiple myeloma genomics - a concise review. *Acta Med Acad* 48:57–67. <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.242>
- Legarda MA, Cejalvo MJ, de la Rubia J (2020) Recent advances in the treatment of patients with multiple myeloma. *Cancers (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/cancers12123576>
- Chen D, Yang X, Liu M, Zhang Z, Xing E (2021) Roles of miRNA dysregulation in the pathogenesis of multiple myeloma. *Cancer Gene Ther*. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-00291-4>
- Wang S, Ma Y, Wang X, Jiang J, Zhang C, Jiang Y, Huang H, Hong L (2019) IL-17A increases multiple myeloma cell viability by positively regulating syk expression. *Transl Oncol* 12:1086–1091. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.04.023>
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, Gavin A, Visser O, Bray F (2018) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* 103:356–387. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.005>
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2020) Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 70:7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Michels TC, Petersen KE (2017) Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 95:373–383
- Kasamatsu T, Kimoto M, Takahashi N, Minato Y, Gotoh N, Takizawa M, Matsumoto M, Sawamura M, Yokohama A, Handa H, Tsukamoto N, Saitoh T, Murakami H (2018) IL17A and IL23R gene polymorphisms affect the clinical features and prognosis of patients with multiple myeloma. *Hematol Oncol* 36:196–201. <https://doi.org/10.1002/hon.2469>
- Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B (2012) OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol* 165:1260–1287. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x>
- Thakkar N, Lockhart AC, Lee W (2015) Role of organic anion-transporting polypeptides (OATPs) in cancer therapy. *Aaps J* 17:535–545. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9740-x>
- Lee HH, Ho RH (2017) Interindividual and interethnic variability in drug disposition: polymorphisms in organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1; SLCO1B1). *Br J Clin Pharmacol* 83:1176–1184. <https://doi.org/10.1111/bcp.13207>
- Obaidat A, Roth M, Hagenbuch B (2012) The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52:135–151. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010510-100556>
- Buxhofer-Ausch V, Secky L, Wlcek K, Svoboda M, Kounnis V, Briasoulis E, Tzakos AG, Jaeger W, Thalhammer T (2013) Tumor-specific expression of organic anion-transporting polypeptides: transporters as novel targets for cancer therapy. *J Drug Deliv* 2013:863539. <https://doi.org/10.1155/2013/863539>
- Lin X, Xiang Z, Wang B, Chen H, Zhou T, Hong M (2019) Interaction of swine organic anion transporting polypeptide 1a2 with tetracycline, macrolide and β -lactam antibiotics. *Toxicol Appl Pharmacol* 379:114649. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114649>
- Gao CM, Pu Z, He C, Liang D, Jia Y, Yuan X, Wang G, Xie H (2017) Effect of OATP1B1 genetic polymorphism on the uptake of tamoxifen and its metabolite, endoxifen. *Oncol Rep* 38:1124–1132. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5727>
- Gregory BJ, Chen SM, Murphy MA, Atchley DH, Kamdem LK (2017) Impact of the OATP1B1 c.521T>C single nucleotide polymorphism on the pharmacokinetics of exemestane in healthy postmenopausal female volunteers. *J Clin Pharm Ther* 42:547–553. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12569>
- Zhou F, Zhu L, Wang K, Murray M (2017) Recent advance in the pharmacogenomics of human Solute Carrier Transporters (SLCs) in drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev* 116:21–36. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.004>
- Alam K, Crowe A, Wang X, Zhang P, Ding K, Li L, Yue W (2018) Regulation of organic anion transporting polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-mediated transport: an updated review in the context of OATP-mediated drug-drug interactions. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms19030855>
- Wang X, Wolkoff AW, Morris ME (2005) Flavonoids as a novel class of human organic anion-transporting polypeptide OATP1B1 (OATP-C) modulators. *Drug Metab Dispos* 33:1666–1672. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.005926>
- Schulte RR, Ho RH (2019) Organic anion transporting polypeptides: emerging roles in cancer pharmacology. *Mol Pharmacol* 95:490–506. <https://doi.org/10.1124/mol.118.114314>
- Falkowski S, Woillard JB, Postil D, Tubiana-Mathieu N, Terbonne E, Pariente A, Smith D, Guimbaud R, Thalamas C, Rouguieg-Malki K, Marquet P, Picard N (2017) Common variants in glucuronidation enzymes and membrane transporters as potential risk factors for colorectal cancer: a case control study. *BMC Cancer* 17:901. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3728-0>

22. Drenberg CD, Paugh SW, Pounds SB, Shi L, Orwick SJ, Li L, Hu S, Gibson AA, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Evans WE, Sparreboom A, Baker SD (2016) Inherited variation in OATP1B1 is associated with treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 99:651–660. <https://doi.org/10.1002/cpt.315>
23. Zhang H, He X, Li J, Wang Y, Wang C, Chen Y, Niu C, Gao P (2014) SLCO1B1c. 521T>C gene polymorphisms are associated with high-dose methotrexate pharmacokinetics and clinical outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 52:770–776
24. Schulte RR, Choi L, Utreja N, Van Driest SL, Stein CM, Ho RH (2021) Effect of SLCO1B1 polymorphisms on high-dose methotrexate clearance in children and young adults with leukemia and lymphoblastic lymphoma. *Clin Transl Sci* 14:343–353. <https://doi.org/10.1111/cts.12879>
25. Pu Z, Zhang X, Chen Q, Yuan X, Xie H (2015) Establishment of an expression platform of OATP1B1 388GG and 521CC genetic polymorphism and the therapeutic effect of tamoxifen in MCF-7 cells. *Oncol Rep* 33:2420–2428. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3864>
26. Nagy A, Sipeky C, Szalai R, Melegh BI, Matyas P, Ganczer A, Toth K, Melegh B (2015) Marked differences in frequencies of statin therapy relevant SLCO1B1 variants and haplotypes between Roma and Hungarian populations. *BMC Genet* 16:108. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0262-4>
27. Romaine SP, Bailey KM, Hall AS, Balmforth AJ (2010) The influence of SLCO1B1 (OATP1B1) gene polymorphisms on response to statin therapy. *Pharmacogenomics J* 10:1–11. <https://doi.org/10.1038/tpj.2009.54>
28. Sissung TM, Troutman SM, Campbell TJ, Pressler HM, Sung H, Bates SE, Figg WD (2012) Transporter pharmacogenetics: transporter polymorphisms affect normal physiology, diseases, and pharmacotherapy. *Discov Med* 13:19–34
29. Noci S, Dugo M, Bertola F, Melotti F, Vannelli A, Dragani TA, Galvan A (2016) A subset of genetic susceptibility variants for colorectal cancer also has prognostic value. *Pharmacogenomics J* 16:173–179. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.35>
30. Liutkeviciene R, Vilkeviciute A, Slavinskaite A, Petrauskaitė A, Tatarunas V, Kriaučiūniene L (2018) Evaluation of serum SLCO1B1 levels and genetic variants of SLCO1B1 rs4149056 and rs2306283 in patients with early and exudative age-related macular degeneration. *Gene* 676:139–145. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.07.031>
31. Crowe A, Zheng W, Miller J, Pahwa S, Alam K, Fung KM, Rubin E, Yin F, Ding K, Yue W (2019) Characterization of plasma membrane localization and phosphorylation status of organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 c.521 T>C nonsynonymous single-nucleotide polymorphism. *Pharm Res* 36:101. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2634-3>
32. Pasanen MK, Neuvonen PJ, Niemi M (2008) Global analysis of genetic variation in SLCO1B1. *Pharmacogenomics* 9:19–33. <https://doi.org/10.2217/14622416.9.1.19>
33. Basmaci C, Pehlivan M, Tomatir A, Sever T, Okan V, Yilmaz M, Oguzkan-Balci S, Pehlivan S (2016) Effects of TNFalpha, NOS3, MDR1 gene polymorphisms on clinical parameters, prognosis and survival of multiple myeloma cases. *Asian Pac J Cancer Prev* 17:1009–1014. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.3.1009>
34. Hagenbuch B, Stieger B (2013) The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol Aspects Med* 34:396–412. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.009>
35. Green SM, Kaipainen A, Bullock K, Zhang A, Lucas JM, Matson C, Banks WA, Mostaghel EA (2017) Role of OATP transporters in steroid uptake by prostate cancer cells in vivo. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 20:20–27. <https://doi.org/10.1038/pcan.2016.42>
36. Chen S, Li K, Jiang J, Wang X, Chai Y, Zhang C, Deng Q, Shuai L, Feng K, Ma K, Zhang L (2020) Low expression of organic anion-transporting polypeptide 1B3 predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol* 18:127. <https://doi.org/10.1186/s12957-020-01891-y>
37. Alam K, Farasyn T, Crowe A, Ding K, Yue W (2017) Treatment with proteasome inhibitor bortezomib decreases organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B3-mediated transport in a substrate-dependent manner. *PLoS ONE* 12:e0186924. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186924>
38. Buxhofer-Ausch V, Németh O, Sheikh M, Andriukovics H, Reiner A, Ausch C, Mechtcheriakova D, Tordai A, Gleiss A, Özvegy-Laczka C, Jäger W, Thalhammer T (2020) Two common polymorphic variants of OATP4A1 as potential risk factors for colorectal cancer. *Oncol Lett* 20:252. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12115>
39. Aklillu E, Mugusi S, Ngaimisi E, Hoffmann MM, König S, Ziesenitz V, Mikus G, Haefeli WE, Weiss J (2011) Frequency of the SLCO1B1 388A>G and the 521T>C polymorphism in Tanzania genotyped by a new LightCycler®-based method. *Eur J Clin Pharmacol* 67:1139–1145. <https://doi.org/10.1007/s00228-011-1065-9>
40. Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ (2011) Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacol Rev* 63:157–181. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002857>
41. Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, Yoshida K, Horie T, Sugiyama Y (2013) Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm Drug Dispos* 34:45–78. <https://doi.org/10.1002/bdd.1823>
42. Ozhan G, Kara M, Sari FM, Yanar HT, Alpertunga B (2013) Influence of the functional polymorphisms in the organic anion transporting polypeptide 1B1 in the susceptibility to colorectal cancer. *Genet Test Mol Biomarkers* 17:214–218. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2012.0334>
43. Zhang X, Pu Z, Ge J, Shen J, Yuan X, Xie H (2015) Association of CYP2D6*10, OATP1B1 A388G, and OATP1B1 T521C polymorphisms and overall survival of breast cancer patients after tamoxifen therapy. *Med Sci Monit* 21:563–569. <https://doi.org/10.12659/msm.893473>
44. Teft WA, Welch S, Lenehan J, Parfitt J, Choi YH, Winquist E, Kim RB (2015) OATP1B1 and tumour OATP1B3 modulate exposure, toxicity, and survival after irinotecan-based chemotherapy. *Br J Cancer* 112:857–865. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.5>
45. Sai K, Saito Y, Maekawa K, Kim SR, Kaniwa N, Nishimaki-Mogami T, Sawada J, Shirao K, Hamaguchi T, Yamamoto N, Kunitoh H, Ohe Y, Yamada Y, Tamura T, Yoshida T, Matsumura Y, Ohtsu A, Saijo N, Minami H (2010) Additive effects of drug transporter genetic polymorphisms on irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics in Japanese cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 66:95–105. <https://doi.org/10.1007/s00280-009-1138-y>
46. Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Ballesteros J, Piñan MA, Garcia-Miguel P, Navajas A, Garcia-Orad A (2011) Polymorphisms of the SLCO1B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 57:612–619. <https://doi.org/10.1002/pbc.23074>
47. Han JY, Lim HS, Shin ES, Yoo YK, Park YH, Lee JE, Kim HT, Lee JS (2008) Influence of the organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) polymorphisms on irinotecan pharmacokinetics and clinical outcome of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 59:69–75. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2007.07.019>

Kopie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej (Publikacje I-III)

Molecular Biology Reports

48. Martinez D, Muhrez K, Woillard JB, Berthelot A, Gyan E, Choquet S, Andrès CR, Marquet P, Barin-Le Guellec C (2018) Endogenous metabolites-mediated communication between OAT1/OAT3 and OATP1B1 may explain the association between SLCO1B1 SNPs and methotrexate toxicity. *Clin Pharmacol Ther* 104:687–698. <https://doi.org/10.1002/cpt.1008>
49. Na Nakorn C, Waisayarat J, Dejthevaporn C, Srisawasdi P, Wongwaisayawan S, Sukasem C (2020) Genetic variations and frequencies of the two functional single nucleotide polymorphisms of SLCO1B1 in the Thai population. *Front Pharmacol* 11:728. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00728>
50. Zhang H, Liu J, Hu B, Wang L, Yang Z, Han X, Wang J, Bai W, Guo W (2018) Dual-channel fluorescence diagnosis of cancer cells/tissues assisted by OATP transporters and cysteine/glutathione. *Chem Sci* 9:3209–3214. <https://doi.org/10.1039/c7sc05407f>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Oświadczenia autora rozprawy doktorskiej



Łódź, 2 stycznia 2023 r.

mgr anal. med. Katarzyna Michalska
Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

prof. dr hab. n. med. Anna Kilanowicz-Sapota
Przewodnicząca Rady Nauk Farmaceutycznych

OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Ja, niżej podpisana **Katarzyna Michalska** informuję Przewodniczącą Rady Naukowej ds. Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, że ani badania stanowiące podstawę mojej pracy doktorskiej, ani sama praca pt.

Rola polimorfizmów genów kodujących wybrane transportery z nadrodziny ABC oraz rodziny OATP w predyspozycji do rozwoju oraz skuteczności terapii szpiczaka mnogiego

nie były przedmiotem postępowania o wszczęcie przewodu doktorskiego w żadnej wyższej uczelni, instytucji badawczym i/lub jednostce badawczo-rozwojowej.

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Katarzyna Michalska

Oświadczenia współautorów



Łódź, 2 stycznia 2023 r.

mgr anal. med. Katarzyna Michalska
 Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej
 Wydział Farmaceutyczny
 Uniwersytet Medyczny w Łodzi

prof. dr hab. n. med. Anna Kilanowicz-Sapota
 Przewodnicząca Rady Nauk Farmaceutycznych

OŚWIADCZENIE

współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy: Niebudek K, Balcerczak E, Mirowski M, Żebrowska M. *Association of ABCB1 T-129C polymorphism and multiple myeloma risk in Polish population*. Pol J Pathol. 2018;69(4):405-9. Epub 2019/02/23. doi: 10.5114/pjp.2018.81700. przedstawia się jak poniżej:

| Autor | Udział % | Opis udziału własnego | Podpis |
|--------------------------------|----------|--|--------------------|
| Katarzyna Michalska (Niebudek) | 50 | przegląd literatury, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie wyników oraz przygotowanie manuskryptu | Michalska |
| Ewa Balcerczak | 20 | opracowanie koncepcji i metodyki badań, nadzór merytoryczny nad przebiegiem badań, pomoc w analizie i interpretacji wyników, korekta manuskryptu | Ewa Balcerczak |
| Marek Mirowski | 5 | współudział w przygotowaniu manuskryptu | Mirowski |
| Marta Żebrowska-Nawrocka | 25 | opracowanie koncepcji i metodyki badań, nadzór merytoryczny nad przebiegiem badań, pomoc w analizie i interpretacji wyników, opracowanie statystyczne wyników, korekta manuskryptu | Żebrowska-Nawrocka |

Oświadczenia współautorów



Łódź, 2 stycznia 2023 r.

mgr anal. med. Katarzyna Michalska
Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

prof. dr hab. n. med. Anna Kilanowicz-Sapota

Przewodnicząca Rady Nauk Farmaceutycznych

OŚWIADCZENIE

współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy: Niebudek K, Balcerczak E, Mirowski M, Pietrzak J, Zawadzka I, Żebrowska-Nawrocka M. *The contribution of ABCG2 G34A and C421A polymorphisms to multiple myeloma susceptibility*. *Oncotargets Ther.* 2019;12:1655-60. Epub 2019/03/19. doi: 10.2147/ott.s195245.

przedstawia się jak poniżej:

| Autor | Udział % | Opis udziału własnego | Podpis |
|--------------------------------|----------|---|-----------------------|
| Katarzyna Michalska (Niebudek) | 50 | przegląd literatury, opracowanie metodyki badań, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie i korekta manuskryptu | <i>Michalska</i> |
| Ewa Balcerczak | 10 | opracowanie metodyki badań, wsparcie w przygotowaniu naukowym, nadzór merytoryczny nad przebiegiem badań, pomoc w analizie i interpretacji wyników, korekta manuskryptu | <i>Ewa Balcerczak</i> |
| Marek Mirowski | 3 | współudział w przygotowaniu i korektach manuskryptu | <i>Mirowski</i> |
| Jacek Pietrzak | 9 | pomoc przy przeprowadzeniu badań i tworzenia manuskryptu | <i>Jacek Pietrzak</i> |

Oświadczenia współautorów



| | | | |
|--------------------------|----|---|---------------------------------|
| Izabela Zawadzka | 3 | pomoc przy przeprowadzeniu badań i tworzenia manuskryptu | <i>Izabela Zawadzka</i> |
| Marta Żebrowska-Nawrocka | 25 | opracowanie metodyki badań, wsparcie w przygotowaniu naukowym, nadzór merytoryczny nad przebiegiem badań, pomoc w analizie i interpretacji wyników, opracowanie statystyczne wyników, korekta manuskryptu | <i>Marta Żebrowska-Nawrocka</i> |

Oświadczenia współautorów



Łódź, 2 stycznia 2023 r.

mgr anal. med. Katarzyna Michalska
 Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej
 Wydział Farmaceutyczny
 Uniwersytet Medyczny w Łodzi

prof. dr hab. n. med. Anna Kilanowicz-Sapota

Przewodnicząca Rady Nauk Farmaceutycznych

OŚWIADCZENIE

współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy: Michalska K, Balcerczak E, Jeleń A, Saed L, Pietrzak J, Żebrowska-Nawrocka M. *Effects of the SLCO1B1 A388G single nucleotide polymorphism on the development, clinical parameters, treatment, and survival of multiple myeloma cases in a Polish population*. Molecular Biology Reports. 2022. doi: 10.1007/s11033-022-08162-x. przedstawia się jak poniżej:

| Autor | Udział % | Opis udziału własnego | Podpis |
|---------------------|----------|--|----------------|
| Katarzyna Michalska | 49 | przegląd literatury, opracowanie metodyki badań, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie wyników oraz w przygotowanie i korekta manuskryptu | Michalska |
| Ewa Balcerczak | 10 | przygotowanie naukowe, pomoc w badaniach i analizach statystycznych przygotowanie i korekta manuskryptu | Ewa Balcerczak |
| Agnieszka Jeleń | 5 | przeprowadzenie analiz bioinformatycznych i statystycznych oraz przygotowanie manuskryptu | A Jeleń |
| Lias Saed | 3 | pomoc przy przeprowadzeniu badań i tworzenia manuskryptu | Lias Saed |
| Jacek Pietrzak | 8 | pomoc przy przeprowadzeniu badań i tworzenia manuskryptu | Jacek Pietrzak |

Oświadczenia współautorów

UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI

| | | | |
|--------------------------|----|---|---------------------------|
| Marta Żebrowska-Nawrocka | 25 | przygotowanie naukowe, pomoc przy przeprowadzaniu badań, wykonanie analiz statystycznych oraz przygotowaniu manuskryptu | <i>Żebrowska-Nawrocka</i> |
|--------------------------|----|---|---------------------------|