

Исследование однонуклеотидных полиморфизмов генов ABC-транспортеров в опухоли молочной железы: связь с экспрессией

Цыганов М.М.^{1,2*}, Ибрагимова М.К.^{1,2}, Дерюшева И.В.¹, Литвяков Н.В.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г.Томск, Россия;

* TsyganovMM@yandex.ru

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г.Томск, Россия

Наши предыдущие исследования показали, что изменение экспрессии генов ABC-транспортеров (*ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2*) связано с эффективностью неоадьювантной химиотерапии. Тем не менее, механизмы регуляции экспрессии данных генов химиорезистентности остаются неясным. Как полагают многие исследователи, в данный процесс могут быть вовлечены однонуклеотидные полиморфизмы. **Материалы и методы.** Основываясь на этом, было проведено микроматричное исследование полиморфизмов в генах ABC-транспортеров. Всего в исследование было включено 84 пациента с раком молочной железы. В качестве исследуемого материала были использованы биопсийные опухолевые образцы до лечения и операционные после химиотерапии. Оценка экспрессии генов проводили методом ПЦР в режиме реального времени. **Результаты.** Было проанализировано 195 полиморфизмов 7 генов множественной лекарственной устойчивости. Было установлено 8 полиморфизмов, а именно, *ABCB1 rs2235035*, *ABCB3 rs241430*, *ABCB3 rs241429*, *ABCC1 rs17205838*, *ABCC1 rs35596*, *ABCC2 rs4919395*, *ABCC2 rs2756103* и *ABCG2 rs59409230*, которые участвуют в регуляции экспрессии собственных генов. **Выводы.** Таким образом, в нашем исследовании были установлены новые SNP оказывающие влияние на экспрессию генов ABC-транспортеров, что может дать дополнительные сведения о механизмах регуляции экспрессии генов ABC и формировании химиорезистентности.

Ключевые слова: рак молочной железы, микроматричные исследования, однонуклеотидные полиморфизмы, семейство генов ABC-транспортеров, неоадьювантная химиотерапия.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00765 «Влияние глобального уровня метилирования генома на частоту вариаций числа копий ДНК (CNV) в опухолевых клетках».

The study single nucleotide polymorphisms ABC-transporter genes in breast cancer: correlation with expression

Tsyganov M.M.^{1,2*}, Ibragimova M.K.^{1,2}, Deryusheva I.V.¹, Litviakov N.V.^{1,2}

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia;

* TsyganovMM@yandex.ru

² Tomsk State University, Tomsk, Russia

Our previous research establishes that changes of expression of the ATP-binding cassette genes family (*ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2*) is connected with the neoadjuvant chemotherapy effect. However, the mechanism of regulation of resistance gene expression remains unclear. As many researchers believe, single nucleotide polymorphisms can be involved in this process. **Materials and methods.** Thereupon, microarray analysis is used to study polymorphisms in ATP-binding cassette genes. The study group 84 patients with breast cancer. The test material as tumor biopsy samples were used to treat and operation after chemotherapy. The evaluation of genes expression was performed by real time PCR. **Results.** Total 195 single nucleotide polymorphisms 7 gene family of ABC-transporters have been analyzed. It is thus found that MDR gene expression is connected with 8 polymorphisms, i.e. *ABCB1 rs2235035*, *ABCB3 rs241430*, *ABCB3 rs241429*, *ABCC1 rs17205838*, *ABCC1 rs35596*, *ABCC2 rs4919395*, *ABCC2 rs2756103* and *ABCG2 rs59409230* which participate in the regulation of expression of own genes. **Conclusions.** Therefore, this work shows that the majority of mutations and polymorphisms of ABC genes have a substantial impact on the ATP-binding cassette transporter regulation, it can give more information about the mechanisms of ABC regulation of gene expression and the formation of chemoresistance.

Keywords: breast cancer, microarray, single nucleotide polymorphisms, ATP-binding cassette genes family, neoadjuvant chemotherapy.

Введение

В настоящее время множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам считают одной из наиболее важных причин неэффективности терапии злокачественных новообразований. Молекулярные механизмы МЛУ, главным образом, связаны с гиперэкспрессией в опухолевых клетках генов, продукты которых функционируют как энергозависимый насос и осуществляют выброс цитостатических препаратов из клетки против градиента концентрации. Это транспортные гены семейства ABC — ATP-Binding Cassette transporter, способные осуществлять выброс из клеток лекарственных средств против их градиента [1].

Наши исследования показали, что исходный уровень экспрессии генов МЛУ слабо коррелирует с эффективностью неоадьювантной химиотерапии (НХТ). Однако были получены данные о связи эффекта НХТ с изменением экспрессии генов МЛУ в опухоли при проведении химиотерапии. Если при воздействии НХТ экспрессия генов МЛУ в опухоли снижается, то у больных отмечается клинический ответ на химиотерапию, если же при воздействии химиопрепаратов экспрессия генов МЛУ в опухоли повышается, то у таких больных ответ на химиотерапию отсутствует (стабилизация или прогрессирование) [2]. Кроме этого, нами было установлено, что у большинства больных наблюдается однонаправленное

Таблица 1

Клинико-патологические параметры больных РМЖ

Клинико-патологический параметр		Количество больных, абс. число (%)
Возраст, лет	≤45	31 (36,9)
	>45	53 (63,1)
Менструальный статус	Пременопауза	47 (56,0)
	Постменопауза	36 (42,9)
Гистологический тип	Инвазивный протоковый рак	63 (75,0)
	Инвазивный дольковый рак	4 (4,8)
	Медулярный рак	2 (2,4)
	Другие типы	14 (16,7)
Размер опухоли	T ₁	10 (11,9)
	T ₂	63 (75,0)
	T ₃	3 (3,6)
	T ₄	8 (9,5)
Лимфогенное метастазирование	N ₀	29 (34,5)
	N ₁	32 (38,1)
	N ₂	5 (6,0)
	N ₃	7 (8,3)
Рецепторы эстрогена	+	48 (57,1)
	—	32 (38,1)
	Нет данных	4 (4,8)
Рецепторы прогестерона	+	48 (57,1)
	—	32 (38,1)
	Нет данных	4 (4,8)
HER2	0/+	63 (75,0)
	++	10 (11,9)
	+++	6 (7,1)
	Нет данных	5 (6,0)
Гистологическая форма	Уницентрическая	53 (63,1)
	Мультицентрическая	31 (36,9)
Схема НАХТ	СAX	24 (28,6)
	FAC	42 (50,0)
	Таксотер	18 (21,4)

изменение экспрессии 5 генов ATP-Binding Cassette в процессе лечения: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* также в соответствии с эффектом [3].

В связи с этим интересным представляется изучение механизмов регуляции экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости. Одними из механизмов регуляции являются метилирование промоторных областей [4], микроРНК [5], различные сигнальные каскады и внутриклеточные мессенджеры [6]. Индивидуальные особенности организма опухоленосителя, связанные с регуляцией генов МЛЮ, могут также определяться однонуклеотидными полиморфизмами (SNP — Single Nucleotide Polymorphism) самих генов ABC. За последние несколько лет идентифицировано большое количество SNP в генах ABC, которые имеют значение для экспрессии и работы транспортеров, а также связаны с эффективностью химиотерапии рака молочной железы и общей выживаемостью: *ABCG2 R482T* или *R482G*, *ABCB1 rs1045642*, *ABCC1 rs35605*, *GSTP1 rs1695*, *ABCG2 rs2725264*, *ABCC2 (rs1885301, rs717620 и rs3740066)* и др. [7, 8].

Таким образом, целью настоящей работы была оценка влияния SNP в генах ABC на их экспрессию в опухолевой ткани молочной железы при проведении неоадьювантной химиотерапии.

Материалы и методы

В исследование включены 84 больных РМЖ IIA–IIIB стадии, с морфологически верифицированным диагнозом, в возрасте 28–68 лет (табл. 1).

В соответствии с «Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania» [9] все больные получали 2–4 курса неоадьювантной химиотерапии по схемам FAC (фторурацил, доксорубин, циклофосфан), САХ (циклофосфан, доксорубин, кселода) или монотерапию таксотером. Затем проводилась операция, далее больным проводили 2 курса адьювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.), получено разрешение локального этического комитета НИИ онкологии. Были использованы биопсийные опухолевые образцы (~10 мм³), взятые до лечения под контролем УЗИ, а также операционный материал (~60–70 мм³) после НХТ. Образцы опухоли помещали в раствор RNAlater (Ambion, USA) и сохраняли при температуре -80°C (после 24-часовой инкубации при +4°C) для дальнейшего выделения РНК и ДНК.

Выделение РНК и ДНК. РНК выделяли из 84 парных образцов до лечения и после НХТ с использованием набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany) в соответствии с инструкцией производителя. ДНК выделяли из 84 биопсийных образцов опухолевой ткани с использо-

ванием набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany). Концентрацию и чистоту выделения ДНК и РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA). Для ДНК показатели составили: от 50 до 150 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 2,10–2,35$; $A_{260}/A_{230} = 2,15–2,40$, РНК: концентрация составила от 80 до 250 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 1,75–1,95$; $A_{260}/A_{230} = 1,90–2,31$. Целостность нуклеиновых кислот оценивалась методом капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA). Фрагменты ДНК имели массу более 48 т.п.н., показатель RIN для РНК составил 5,6–7,8.

Оценка экспрессии генов ABC. Уровень экспрессии генов: *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* оценивали методом количественной обратной-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (qPCR) по технологии TaqMan на амплификаторе RotorGene-6000 (Corbett Research, Australia). ПЦР ставили как описано в нашей статье в трех репликах в объеме 15 мкл, с оригинальными праймерами и зондами, в качестве гена-рефери использовали *GAPDH* [2], относительная экспрессия генов ABC была оценена методом Pfaffl [10]. В качестве калибратора использовалась пулированная от 10 пациентов РНК, выделенная из нормальной ткани молочной железы, полученной во время операции от больных, которым не проводилась НХТ.

Микроматричный анализ. Для генотипирования опухоли по SNP генов ABC проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array, которые содержат более 750 тыс. однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), в том числе и для гена *ABCB1* — 39, *ABCB3* — 12 SNP; *ABCC1* — 56; *ABCC2* — 16; *ABCC5* — 13; *ABCG1* — 23 и для *ABCG2* — 36 SNP (табл. 2). Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, USA). Для обработки результатов микрочипирования использовали программу «Chromosome Analysis Suite 3.1» (Affymetrix, USA), которая разработана специально для анализа результатов чипирования на матрице CytoScan™ HD Array.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 8.0» (StatSoft Inc., США). Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое и среднюю квадратичную ошибку. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона—Манна—Уитни.

Результаты

В результате проведенного исследования было оценено влияние полиморфизмов генов ABC на их собственную экспрессию. Всего было проанализировано

195 SNP 7 генов семейства ABC-транспортёров. Для всех полиморфизмов статистическая обработка показателей осуществлялась посредством сравнения частотного генотипа против редкого. В табл. 2 представлены rs SNP, изучаемых генов ABC.

Было выявлено 8 однонуклеотидных полиморфизмов, оказывающих влияние на экспрессию генов ABC. Для гена *ABCB1* установлен один полиморфизм rs2235035. В группе пациентов с редким генотипом в опухоли начальный уровень экспрессии данного гена ниже, чем в группе с частым генотипом. Идентифицировано два SNP гена *ABCB3*: rs241430 и rs241429, которые оказывают влияние на послеоперационный уровень экспрессии данного гена в опухолевой ткани молочной железы. Для *ABCB3* rs241430 при мутантном генотипе в опухолях уровень экспрессии статистически значимо ниже, чем при генотипе дикого типа ($p = 0,04$). При этом для rs241429 наблюдается противоположная ситуация: редкий генотип ассоциирован с низким послеоперационным уровнем экспрессии гена *ABCB3*. Согласно базе данных SNP (<http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP/>), оба полиморфизма выполняют функцию транскрипционных регуляторов и могут оказывать существенное влияние на экспрессию собственного гена.

Самая многочисленная группа SNP была изучена в гене *ABCC1*, хотя на уровень экспрессии данного гена влияют всего два SNP, rs17205838 и rs35596. Было установлено, что в опухолях с генотипом CC rs17205838 начальный уровень экспрессии достоверно ниже, чем

в опухолях с частым генотипом ($p = 0,008$). Для rs35596 было показано, что при генотипе дикого типа уровень экспрессии после НХТ ниже, чем в опухолях с редким генотипом.

ABCC2 rs4919395 и *ABCC2* rs2756103 показали связь с начальным уровнем экспрессии гена *ABCC2*. В обоих случаях минорный генотип был ассоциирован с пониженной экспрессией данного гена. Rs 59409230 гена *ABCG2* оказывал влияние на уровень экспрессии гена *ABCG2* после НХТ. В опухолях с мутантным генотипом AA данного SNP уровень экспрессии *ABCG2* статистически значимо отличался от уровня экспрессии в опухолях с генотипом дикого типа ($p < 0,02$) (табл. 3).

Таким образом, было установлено, что многие генные полиморфизмы и мутации в самих генах ABC имеют большое значение в регуляции работы ABC-транспортёров.

Обсуждение

Всего в нашем исследовании было проанализировано 195 полиморфизмов 7 генов ABC-транспортёров и их влияние на экспрессию генов. В настоящее время одним из хорошо изученных полиморфизмов гена *ABCB1* является rs1045642 [11], который также был изучен и в нашей работе. Полученные нами данные, с одной стороны подтверждают результаты ранее проведенных исследований об отсутствии связи между rs1045642 и экспрессией *ABCB1* [12]. В другом исследовании на выборке 221

Изученные SNP генов ATP-Binding Cassette, представленные в микроматрице CytoScan™ HD Array Таблица 2

Гены	SNP
<i>ABCB1</i>	rs2235047, rs1045642, rs4437575, rs6949448, rs73705238, rs4148750, rs7779562, rs2373588, rs10280101, rs10225473, rs35280822, rs73705240, rs7787082, rs4148735, rs2235035, rs10276036, rs13237132, rs6950978, rs10260862, rs10280623, rs10264990, rs1202172, rs1202171, rs4728705, rs17327442, rs1202181, rs17327624, rs17149792, rs4728709, rs13233308, rs10264856, rs17149840, rs10267099, rs10486996, rs11973812, rs117546457, rs28381744, rs10278483, rs17149864
<i>ABCB3</i>	rs73410776, rs58415233, rs-, rs16870923, rs73738910, rs73738912, rs1044043, rs241432, rs241430, rs4148871, rs241429, rs9378275
<i>ABCC1</i>	rs215101, rs215095, rs215094, rs12922404, rs215088, rs129116, rs16967227, rs7195962, rs6498594, rs215052, rs169984, rs215063, rs1874001, rs246220, rs4781712, rs7198766, rs3784863, rs8059648, rs246214, rs246240, rs11642957, rs3784864, rs924136, rs2062541, rs9932856, rs246230, rs17205838, rs35589, rs35592, rs3743526, rs35595, rs35596, rs35597, rs35599, rs35600, rs35610, rs35625, rs35626, rs35627, rs35628, rs4148353, rs4148358, rs7202970, rs4148366, rs2074085, rs4148371, rs11864374, rs3784867, rs3887893, rs13337489, rs212081, rs11075298, rs212083, rs212085, rs212086, rs212087
<i>ABCC2</i>	rs4919395, rs2756103, rs74770285, rs4148389, rs2804400, rs6584327, rs2273697, rs57420310, rs11597282, rs4148396, rs7476245, rs55804858, rs113032965, rs17216177, rs17216282, rs72838141
<i>ABCC5</i>	rs7646621, rs1402001, rs1402002, rs1402003, rs4912515, rs16858271, rs2280392, rs16858273, rs1464322, rs17217796, rs3792582, rs6775518, rs73048476
<i>ABCG1</i>	rs4148082, rs9975740, rs4148087, rs7278922, rs8127716, rs4148102, rs9976024, rs4148104, rs225443, rs225444, rs225445, rs2839481, rs225396, rs225398, rs8126601, rs2234718, rs2839482, rs17114631, rs7277991, rs7275482, rs4148137, rs914189, rs3788010
<i>ABCG2</i>	rs2725267, rs45621036, rs2231156, rs7681519, rs2622628, rs34472643, rs3114015, rs12505410, rs2622621, rs1481012, rs1871744, rs1564481, rs2725252, rs4148149, rs6857600, rs34633905, rs2622604, rs3114019, rs2622608, rs59409230, rs2622609, rs7657531, rs7682521, rs7658584, rs1481017, rs13147650, rs2127863, rs6854688, rs1481011, rs6819328, rs4693936, rs4693205, rs4491984, rs76262124, rs35892152, rs10032109

Таблица 3

Влияние SNP на уровень экспрессии в pre- и post-NAC образцах опухоли молочной железы

SNP (rs)		Экспрессии до лечения (Mean $\pm$ SE)	p-level	Экспрессия после ХТ (Mean $\pm$ SE)	p-level
<i>ABCB1</i> rs2235035	GG	3,591 $\pm$ 0,957	0,027	4,456 $\pm$ 1,567	0,55
	AA	1,489 $\pm$ 0,663		2,439 $\pm$ 1,485	
<i>ABCB3</i> rs241430	CC	1,074 $\pm$ 0,194	0,07	1,181 $\pm$ 0,371	0,04
	TT	0,547 $\pm$ 0,229		0,343 $\pm$ 0,125	
<i>ABCB3</i> rs241429	GG	1,163 $\pm$ 0,214	0,06	0,304 $\pm$ 0,138	0,017
	AA	0,542 $\pm$ 0,271		1,326 $\pm$ 0,416	
<i>ABCC1</i> rs17205838	GG	1,141 $\pm$ 0,219	0,008	1,028 $\pm$ 0,182	0,421
	CC	0,023 $\pm$ 0,012		0,025 $\pm$ 0,001	
<i>ABCC1</i> rs35596	TT	1,089 $\pm$ 0,239	0,346	0,922 $\pm$ 0,194	0,044
	CC	1,002 $\pm$ 0,283		2,4 $\pm$ 1,073	
<i>ABCC2</i> rs4919395	GG	1,901 $\pm$ 0,442	0,042	2,447 $\pm$ 0,711	0,43
	AA	0,932 $\pm$ 0,423		2,044 $\pm$ 1,401	
<i>ABCC2</i> rs2756103	AA	1,901 $\pm$ 0,442	0,041	2,447 $\pm$ 0,711	0,43
	CC	0,932 $\pm$ 0,423		2,044 $\pm$ 1,401	
<i>ABCG2</i> rs59409230	CC	1,503 $\pm$ 0,36	0,376	1,785 $\pm$ 0,466	0,019
	AA	2,34 $\pm$ 0,696		3,131 $\pm$ 0,904	

больных РМЖ было установлено, что мутантный генотип ТТ ассоциирован с высоким уровнем экспрессии Р-гликопротеида, тогда как носительство дикого и гетерозиготного генотипов было сопряжено с хорошим эффектом ХТ и высокими показателями безрецидивной выживаемости ($p < 0,05$) [13].

При этом данное исследование влияния SNP rs2235035 на экспрессию гена *ABCB1* укладывается в результаты других исследований на других локализациях опухолей. При колоректальном раке показана важная роль данного полиморфизма в прогрессировании заболевания [14]. Недавние исследования показали значимое влияние полиморфизмов гена *ABCC1*: rs246221, rs4148350 и rs45511201 для экспрессии *ABCC1*. При этом в опухолях с мутантными генотипами каждого из представленных полиморфизмов наблюдается повышенный уровень экспрессии *ABCC1* [15]. Исследования SNP и экспрессии гена *ABCC2* в опухоли молочной железы, показали наличие связи между мутантным генотипом GG rs3740065 и безрецидивной выживаемостью, по сравнению с опухолями с генотипом AA [16]. Основываясь на предыдущих исследованиях данного полиморфизма, можно предположить, что полиморфный вариант гена *ABCC2* rs3740065 связан с увеличением транспортной активности [17]. По изученным нами полиморфизмам гена *ABCC2* информации нет. Chen S.V. et al. в 2015 г. провели исследование ассоциации полиморфизмов генов ABC, в том числе *ABCG1*, с токсичностью иринотекана [18]. Данных по полиморфизму *ABCG2* rs59409230 в литературе нет, даже в базе <http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP/> этот полиморфизм не упоминается.

Для других SNP гена *ABCG2* было показано, что полиморфизмы в промоторной области *ABCG2* 15622C>T и *ABCG2* 1379A>G, оказывают существенное влияние на уровень экспрессии собственного гена в процессе химиотерапии [19]. Стоит отметить, что предыдущее наше исследование на меньшей выборке пациентов также показала ассоциацию полиморфизмов *ABCB3* rs241430 и rs241429, а также *ABCG2* rs59409230 с экспрессией [20].

Таким образом, в нашем исследовании были установлены новые SNP оказывающие влияние на экспрессию генов ABC-транспортёров, что может дать дополнительные сведения о механизмах регуляции экспрессии генов ABC и формировании химиорезистентности.

Список литературы

1. Wind N, Holen I. Multidrug resistance in breast cancer: from in vitro models to clinical studies. International journal of breast cancer. 2011;2011:1-12.
2. Litviakov NV, Cherdyntseva NV, Tsyganov MM, Denisov EV, Garbukov EY, Merzlikova MK, Volkomorov VV, Vtorushin SV, Zavyalova MV, Slonimskaya EM. Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response. Cancer chemotherapy and pharmacology. 2013;71(1):153-163.
3. Litviakov NV. Gradient phenomenon of multidrug resistance gene expression in breast cancer during neoadjuvant chemotherapy is related to disease progression. Siberian journal of oncology. 2013;4(4):58.
4. Sharma G, Mirza S, Parshad R, Srivastava A, Datta Gupta S, Pandya P, Ralhan R. CpG hypomethylation of *MDR1* gene

in tumor and serum of invasive ductal breast carcinoma patients. *Clinical biochemistry*. 2010;43(4):373-379.

5. Ma J, Dong C, Ji C. MicroRNA and drug resistance. *Cancer gene therapy*. 2010;17(8):523-531.

6. Sui H, Fan Z, Li Q. Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells. *Journal of International Medical Research*. 2012;40(2):426-435.

7. Di Francia R, Siesto R, Valente D, Spart D, Berretta M. Pharmacogenomics panel test for prevention toxicity in patient who receive Fluoropirimidine/Oxaliplatin-based therapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012;16(9):1211-1217.

8. Taheri M, Mahjoubi F, Omranipour R. Effect of MDR1 polymorphism on multidrug resistance expression in breast cancer patients. *Genet Mol Res*. 2010;9(1):34-40.

9. Schwartz GF, Hortobagyi GN. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26-28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania. *The Breast Journal*. 2004;10(4):273-294.

10. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45-e45.

11. Kim HJ, Im SA, Keam B, Ham HS, Lee KH, Kim TY, Kim YJ, Oh DY, Kim JH, Han W. ABCB1 polymorphism as prognostic factor in breast cancer patients treated with docetaxel and doxorubicin neoadjuvant chemotherapy. *Cancer science*. 2015;106(1):86-93.

12. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;297(3):1137-1143.

13. Cizmarikova M, Wagnerova M, Schonova L, Habalova V, Kohut A, Linkova A, Sarissky M, Mojzis J, Mirossay L, Mirossay A. MDR1 (C3435T) polymorphism: relation to the risk of breast cancer

and therapeutic outcome. *The pharmacogenomics journal*. 2010;10(1):62-69.

14. Chen Z, Le H, Zhang Y, Qian L, Sekhar KR, Li W. Lung resistance protein and multidrug resistance protein in non-small cell lung cancer and their clinical significance. *Journal of International Medical Research*. 2011;39(5):1693-1700.

15. Vulsteke C, Lambrechts D, Dieudonne A, Hatse S, Brouwers B, Van Brussel T, Neven P, Belmans A, Schoffski P, Paridaens R. Genetic variability in the multidrug resistance associated protein-1 (ABCC1/MRP1) predicts hematological toxicity in breast cancer patients receiving (neo-) adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide (FEC). *Annals of Oncology*. 2013;24(6):1513-1525.

16. Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK, Hosono N, Tsunoda T, Kubo M, Tanigawara Y, Flockhart DA, Desta Z, Skaar TC. Significant effect of polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(8):1287-1293.

17. Brauch H, Murtter TE, Eichelbaum M, Schwab M. Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clinical chemistry*. 2009;55(10):1770-1782.

18. Chen S, Villeneuve L, Jonker D, Couture F, Laverdiere I, Cecchin E, Innocenti F, Toffoli G, Levesque E, Guillemette C. ABCC5 and ABCG1 polymorphisms predict irinotecan-induced severe toxicity in metastatic colorectal cancer patients. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2015;25(12): 573-583.

19. Noguchi K, Katayama K, Sugimoto Y. Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. *Pharmacogenomics and personalized medicine*. 2014; 7: 53-64.

20. Sun S, Shi W, Wu Z, Zhang G, Yang B, Jiao S. Prognostic significance of the mRNA expression of ERCC1, RRM1, TUBB3 and TYMS genes in patients with non-small cell lung cancer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2015;10(3):937-941.