

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum

Małgorzata Banaszkiewicz

Assessment of ferric management in multiple myeloma in  
relationship to stage of kidney failure.  
Ocena gospodarki żelazowej w szpiczaku mnogim w zależności  
od stopnia uszkodzenia nerek.

*Praca doktorska*

*w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu*

*dyscyplina nauki medyczne*

Promotor: dr hab. n. med. Katarzyna Krzanowska, prof. UJ

Pracę wykonano w Klinice Nefrologii<sup>1</sup> i Klinice Hematologii<sup>2</sup>  
Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie

Kierownik jednostki:

dr hab. n. med. Katarzyna Krzanowska, prof. UJ<sup>1</sup>

prof. dr hab. n. med. Tomasz Sacha<sup>2</sup>

Kraków, 2022

Składam serdeczne podziękowania Promotorowi pracy  
***Pani dr hab. n. med. Katarzynie Krzanowskiej, prof. UJ***  
za nieocenioną pomoc, uwagi i poświęcony czas  
w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy  
oraz Rodzicom, Siostrze i Andrzejowi za wsparcie i wiarę we mnie.

*Małgorzata Banaszkiewicz*

## Spis treści

Rozdział 1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską .....	4
Rozdział 2. Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń.....	9
Rozdział 3. Wstęp .....	11
3.1. Szpiczak mnogi i jego nerkowe manifestacje .....	11
3.2. Anemia w szpiczaku mnogim.....	12
3.3. Nowe markery gospodarki żelazowej.....	13
3.3.1. GDF15.....	13
3.3.2. sTfR .....	14
3.3.3. Hepcydyna 25.....	14
3.4. Uzasadnienie połączenia prac w cykl publikacji.....	15
Rozdział 4. Założenia i cele pracy .....	17
4.1. Założenia pracy .....	17
4.2. Cel pracy.....	20
Rozdział 5. Materiał i Metodyka .....	21
Rozdział 6. Limitacje badania.....	25
Rozdział 7. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską .....	26
Rozdział 8. Streszczenia artykułów.....	69
8.1. New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia.....	69
8.2. Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma.....	70
8.3. The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment.....	72
Rozdział 9. Wnioski.....	75
Rozdział 10. Streszczenie .....	76
Rozdział 11. Summary .....	78
Rozdział 12. Spis piśmiennictwa .....	80
Rozdział 13. Oświadczenia współautorów .....	83
Rozdział 14. Zgoda Komisji Bioetycznej, opinia i akceptacja poprawek.....	130

## Rozdział 1.

### Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

Rozprawa doktorska powstała w oparciu o monotematyczny cykl 3 prac opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych znajdujących się w bazie Scopus/Web of Science/PubMed. W jej skład wchodziły artykuły:

#### Praca przeglądowa

1. **Małgorzata Banaszekiewicz**, Jolanta Małyszko, David H. Vesole, Karolina Woziwodzka, Artur Jurczyszyn, Marcin Żórawski, Marcin Krzanowski, Jacek Małyszko, Krzysztof Batko, Marek Kuźniewski, Katarzyna Krzanowska. New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia. *Journal of Clinical Medicine*, 2019, 8, 1828, doi: 10.3390/jcm8111828.  
IF - 3,303; MNiSW/MEiN - 140

#### Prace oryginalne:

1. **Małgorzata Banaszekiewicz**, Jolanta Małyszko, David H. Vesole, Karolina Woziwodzka, Artur Jurczyszyn, Marcin Żórawski, Marcin Krzanowski, Jacek Małyszko, Krzysztof Batko, Marek Kuźniewski, Katarzyna Krzanowska. New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia. *Journal of Clinical Medicine*, 2019, 8, 1828, doi: 10.3390/jcm8111828.  
IF – 4,711; MNiSW/MEiN - 100
2. **Małgorzata Banaszekiewicz**, Jolanta Małyszko, Krzysztof Batko, Ewa Koc-Żórawska, Marcin Żórawski, Paulina Dumnicka, Artur Jurczyszyn, Karolina Woziwodzka, Aleksandra Maleszka, Marcin Krzanowski, Andrzej Kraśniak, Ryszard Drożdż, Katarzyna Krzanowska. The Key Role of Hcpidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment. *Medicina*, 2022, 58, 417, doi: 10.3390/medicina58030417.  
IF – 2,430; MEiN - 40



**Zestawienie publikacji doktoranta:**

<b>Rodzaj publikacji</b>	<b>Liczba</b>	<b>Impact Factor</b>	<b>Publikacja MNiSW/MEiN</b>
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	3	10,444	280
Prace, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	7	9,934	240
Komunikaty zjazdowe	9	-	-
<b>Razem</b>	19	20,378	520

**Nagrody zjazdowe:**

1. Pierwsza nagroda w kategorii Internal Medicine Poster Presentation na konferencji YES Meeting 11th Young European Scientist Meeting w Porto, 2016
2. Pierwsza nagroda w kategorii Internal Medicine Session na 3rd Lublin International Medical Congress for Students and Young Doctors, 2016



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Biblioteka Medyczna

952.833.83.2022

Kraków, 08.04.2022 r.

**LEK. MAŁGORZATA BANASZKIEWICZ**  
UNIwersytet Jagielloński Collegium Medicum

**WYKAZ PUBLIKACJI**

*na podstawie Bibliografii UJ CM z dnia 08.04.2022 r.*

**1.**

Banaszkiewicz Małgorzata, Krzanowska Katarzyna, Jaśkowski Piotr, Krzanowski Marcin, Chowaniec Eve, Miarka Przemysław, Sułowicz Władysław.

Pacjent po przeszczepieniu nerki ponownie dializowany otrzewnowo.

Nefrologia i Dializoterapia Polska

2016 : T. 20, nr 4, s. 269-272, bibliogr. 28 poz.

praca kazuistyczna

**MEiN:** 5.000

**2.**

Banaszkiewicz Małgorzata, Krzanowska Katarzyna, Chowaniec Eve, Krzanowski Marcin, Okoń Krzysztof, Sułowicz Władysław.

Coexistence of 2 malignant urogenital neoplasms: a testicular seminoma and adenocarcinoma of the prostate gland in a patient 1 year after kidney transplantation.

Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej

2016 : Vol. 126, nr 5, s. 367-368, il., bibliogr. 5 poz., abstr.

praca kazuistyczna

**IF:** 2.309

**MEiN:** 30.000

**3.**

Krzanowski Marcin, Krzanowska Katarzyna, Dziewierz Artur, Banaszkiewicz Małgorzata, Jurczyszyn Artur, Woźniowska Karolina, Chmiel Grzegorz, Kopeć Jerzy, Sułowicz Władysław.

Ultrafiltration rate and diabetes as useful indicators of cardiovascular-related death in hemodialysis patients below 60 years of age.

Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej

2017 : T. 71, s. 1023-1032, il., bibliogr. 47 poz., sum.

Advances in Hygiene and Experimental Medicine.

Autor korespondencyjny: Małgorzata Iciek.

Open Access Creative Commons Attribution License CC-BY-NC.

praca oryginalna

**IF:** 0.783

**MEiN:** 15.000

30-688 Kraków, ul. Medyczna 7, tel. +48 12 658 02 72, tel. kom. +48 661 890 822, sekretariat.bm@cm-uj.krakow.pl  
www.bm.cm.uj.edu.pl

**4.**

Banaszkiewicz Małgorzata, Krzanowski Marcin, Krawiec Piotr, Krzanowska Katarzyna, Okoń Krzysztof, Batko Bogdan.

Leczenie amyloidozy z ciężkim zespołem nerczycowym w przebiegu zapalnych chorób stawów - opisy przypadków.

Przegląd Lekarski

2017 : T. 74, nr 12, s. 717-721, il., bibliogr. 24 poz.

Autor korespondencyjny: Marcin Krzanowski

praca kazuistyczna

**MEIN:** 10.000

**5.**

Banaszkiewicz Małgorzata, Obajtek Klaudia, Dziewierz Artur, Krzanowski Marcin, Chowaniec Eve, Krzanowska Katarzyna, Sulowicz Władysław.

Fibrinogen and interleukin-6 as a meaningful biomarkers of cardiovascular-related death in chronic kidney disease patients treated with renal replacement therapy under 60 years of age.

Przegląd Lekarski

2017 : T. 74, nr 12, s. 621-626, il., bibliogr. 28 poz.

Autor korespondencyjny: Katarzyna Krzanowska.

praca oryginalna

**MEIN:** 10.000

**6.**

Banaszkiewicz Małgorzata, Małyszko Jolanta, Vesole Adam S., Woziwodzka Karolina, Jurczyszyn Artur, Żórawski Marcin, Krzanowski Marcin, Małyszko Jacek, Batko Krzysztof, Kuźniewski Marek, Krzanowska Katarzyna.

New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia.

Journal of Clinical Medicine

2019 : Vol. 8, nr 11, 1828, il., bibliogr. 62 poz., abstr.

Open Access Creative Commons Attribution License CC-BY 4.0.

Autor korespondencyjny: Katarzyna Krzanowska.

praca poglądowa

**IF:** 3.303

**MEIN:** 140.000

**7.**

Banaszkiewicz Małgorzata, Małyszko Jolanta, Batko Krzysztof, Koc-Żórawska Ewa, Żórawski Marcin, Dumnicka Paulina, Jurczyszyn Artur, Woziwodzka Karolina, Tisończyk Joanna, Krzanowski Marcin, Małyszko Jacek, Waszczuk-Gajda Anna, Drożdż Ryszard, Kuźniewski Marek, Krzanowska Katarzyna.

Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma.

Mediators of Inflammation

2020 : Vol. 2020, id. art. 5657864, il., bibliogr. 43 poz., abstr.

Autor korespondencyjny: Katarzyna Krzanowska.

Open Access Creative Commons Attribution License CC-BY 4.0.

praca oryginalna

**IF:** 4.711

**MEIN:** 100.000

**8.**

Wozniowicz Karolina, Małyszko Jolanta, Koc-Żórawska Ewa, Żórawski Marcin, Dumnicka Paulina, Jurczyszyn Artur, Batko Krzysztof, Mazur Paulina, Banaszkiewicz Małgorzata, Krzanowski Marcin, Gołasa Paulina, Małyszko Jacek A., Drożdż Ryszard, Krzanowska Katarzyna.

Renal impairment detectors : IGFBP-7 and NGAL as tubular injury markers in multiple myeloma patients

Medicina

2021 : Vol. 57, nr 12, id. art. 1348, il., bibliogr. 48 poz., abstr.

Autor korespondencyjny: Katarzyna Krzanowska

Open Access Creative Commons Attribution License CC-BY 4.0

praca oryginalna

**IF:** 2.430

**MEIN:** 40.000

**9.**

Banaszkiewicz Małgorzata, Małyszko Jolanta, Batko Krzysztof, Koc-Żórawska Ewa, Żórawski Marcin, Dumnicka Paulina, Jurczyszyn Artur, Wozniowicz Karolina, Maleszka Aleksandra, Krzanowski Marcin, Kraśniak Andrzej, Drożdż Ryszard, Krzanowska Katarzyna.

The key role of hepcidin-25 in anemia in multiple myeloma patients with renal impairment.

Medicina

2022 : Vol. 58, nr 3, id. art. 417, il., bibliogr. 44 poz., abstr.

Autor korespondencyjny: Katarzyna Krzanowska.

Open Access Creative Commons Attribution License CC-BY 4.0.

praca oryginalna

**IF:** 2.430

**MEIN:** 40.000

**10.**

Wozniowicz Karolina, Małyszko Jolanta, Koc-Żórawska Ewa, Żórawski Marcin, Dumnicka Paulina, Jurczyszyn Artur, Batko Krzysztof, Mazur Paulina, Banaszkiewicz Małgorzata, Krzanowski Marcin, Gołasa Paulina, Małyszko Jacek A., Drożdż Ryszard, Krzanowska Katarzyna.

Transgelin-2 in multiple myeloma : a new marker of renal impairment?

Molecules

2022 : Vol. 27, nr 1, id. art. 79, il., bibliogr. 45 poz., abstr.

Autor korespondencyjny: Katarzyna Krzanowska.

Open Access Creative Commons Attribution License CC-BY 4.0

praca oryginalna

**IF:** 4.412

**MEIN:** 140.000

Opracowanie: Oddział Informacji Naukowej  
tel. +48 12 657 23 10  
e-mail: informacja.naukowa@cm-uj.krakow.pl

## Rozdział 2.

### Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń

ACD – ang. *anaemia of chronic disease*, anemia chorób przewlekłych

AIDS – ang. *acquired immunodeficiency syndrom*, zespół nabytego niedoboru odporności

AL – ang. *amyloid light chain*, amyloidowy łańcuch lekki

CR – ang. *complete remission*, całkowita remisja

CRP – ang. *C reactive protein*, białko C-reaktywne

eGFR – ang. *estimated glomerular filtration rate* – szacowane przesączanie kłębuszkowe

EPO – ang. *erythropoetin*, erytropoetyna

FLC – ang. *free light chains*, wolne łańcuchy lekkie

GDF15 – ang. *growth differentiation factor 15*, zróżnicowany czynnik wzrostu 15

HGB – ang. *haemoglobin*, hemoglobina

HIV – ang. *human immunodeficiency virus*, ludzki wirus niedoboru odporności

HR – ang. *hazard ratio*, współczynnik ryzyka

IL-6 – ang. *interleukin 6*, interleukina 6

ISS – ang. *International Staging System*, Międzynarodowy System Stopniowania

IQR – ang. *interquartil range*, rozstęp międzykwartyłowy

LC – ang. *light chains*, wolne łańcuchy

MCH – ang. *mean cell haemoglobin*, średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej

MCHC – ang. *mean cell hemoglobin concentration*, średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej

MCV – ang. *mean cell volume*, średnia objętość krwinki czerwonej

MM – ang. *multiple myeloma*, szpiczak mnogi

MRI – ang. *magnetic resonance imagine*, rezonans magnetyczny

NGAL - ang. *neutrophil-gelatinase associated lipocalin*, lipokalina związana z żelatynazą neutrofilów

NT proBNP – ang. *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*, N-końcowy peptyd natriuretyczny typu pro-B

PD – ang. *progressive disease*, postępująca choroba

PET – ang. *positron emission tomography*, pozytronowa tomografia emisyjna

PR – ang. *partial remission*, częściowa remisja

RBC – ang. *red blood cells*, erytrocyty

RDW-CV – ang. *red cell distribution width-coefficient of variation*, współczynnik zmienności rozkładu erytrocytów

RTG – badanie rentgenowskie

SD – ang. *stable disease*, stabilna choroba

SMM – ang. *smoldering multiple myeloma*, tłąca postać szpiczaka mnogiego

sTfR – ang. *soluble transferrin receptor*, rozpuszczalny receptor transferyny

TGF-beta – ang. *transforming growth factor beta*, transformujący czynnik wzrostu beta

TK – tomografia komputerowa

## Rozdział 3.

### Wstęp

#### 3.1. Szpiczak mnogi i jego nerkowe manifestacje

Szpiczak mnogi (ang. multiple myeloma - MM) jest nowotworem złośliwym wynikającym z klonalnej proliferacji plazmocytów szpiku kostnego i stanowi 10% nowotworów hematologicznych oraz 1,8% wszystkich nowotworów złośliwych [1]. W Polsce rocznie diagnozuje się około 1500-1800 nowych przypadków. Mimo, że jest to choroba osób starszych (ok. 70% przypadków szpiczaka mnogiego występuje u osób po 65. r.ż.), to coraz częściej rozpoznawanie jest stawiane pacjentom poniżej 55 roku życia [2]. Częściej chorują mężczyźni, a początkowy etap MM jest bezobjawowy. Mediana całkowitego przeżycia pacjentów z nowo zdiagnozowaną chorobą wynosi od 6 do 8 lat [3]. Do rozpoznania MM konieczna jest obecność klonalnych plazmocytów w szpiku >10% lub potwierdzony w biopsji guz plazmocytowy kostny lub pozaszpikowy oraz  $\geq 1$  z wymienionych kryteriów:

- a. kryteria uszkodzenia narządowego związanego ze szpiczakiem: hiperkalcemia ( $>0,25$  mmol/l powyżej górnej granicy normy lub  $>2,75$  mmol/l), niewydolność nerek (klirens kreatyniny  $<40$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> lub kreatyninemia  $>177$   $\mu$ mol/l [2 mg/dl]), niedokrwistość (stęż. HGB 2 g/dl poniżej dolnej granicy normy lub  $<10$  g/dl), uszkodzenia kostne ( $\geq 1$  ognisko osteolityczne w badaniu rentgenowskim (RTG), tomografii komputerowa (TK) lub pozytonowej tomografii emisyjnej (ang. positron emission tomography, PET) z TK);
- b.  $\geq 1$  biomarker nowotworu: plazmocyty w szpiku  $>60\%$ , stosunek wolnych łańcuchów lekkich w surowicy ( $\kappa/\lambda$  albo  $\lambda/\kappa$ )  $>100$  przy stężeniu łańcuchów monoklonalnych  $>100$  mg/l;
- c.  $>1$  zmiana ogniskowa o wymiarze  $\geq 5$  mm w rezonansie magnetycznym (ang. magnetic resonance image, MRI).

Natomiast SMM rozpoznaje się na podstawie obecności białka M w surowicy  $\geq 30$  g/l lub w moczu  $>500$  mg/24 h i/lub obecności klonalnych plazmocytów w szpiku 10–60%, przy niespełnionych kryteriach uszkodzenia narządowego, nieobecności biomarkerów nowotworu oraz amyloidozy łańcuchów lekkich (ang. amyloid light chain, AL) [2].

Głównymi manifestacjami MM są: niedokrwistość (73%), bóle kości i osteolityczne zmiany kostne (odpowiednio 58% i 67%), niewydolność nerek (48%), zmęczenie (32%), hiperkalcemia (28%) i utrata masy ciała (24%) [4]. Objawy nerkowe

u chorych ze szpiczakiem mnogim takie jak: białkomocz nerczycowy, zespół nerczycowy, przewlekła czy ostra niewydolność nerek, występują w przebiegu zajęcia nerek w postaci np. nefropatii wałeczkowej, amyloidozy, choroby depozytów łańcuchów lekkich, zespołu nadlepkości, nefropatii hiperkalcemicznej oraz ostrej nefropatii dnawej [2].

### **3.2. Anemia w szpiczaku mnogim**

Niedokrwistość jest jednym z najczęstszych, wczesnych powikłań MM o wieloczynnikowej patogenezie. Wytwarzanie przez komórki plazmatyczne cytokin, które hamują erytropoezę, upośledzają homeostazę żelaza i prowadzą do rozwoju anemii chorób przewlekłych (ang. anaemia of chronic disease - ACD) [5] oraz wypieranie prawidłowych komórek szpiku kostnego przez komórki nowotworowe przyczyniają się do rozwoju tego powikłania. Do czynników ryzyka rozwoju anemii u chorych z MM należą: niskie wyjściowe stężenie hemoglobiny (<14 g/dl dla mężczyzn oraz < 12 g/dl dla kobiet), chemioterapia, płeć żeńska [6]. W badaniach laboratoryjnych obserwujemy niedokrwistość normochromiczną, prawidłowe lub obniżone stężenie żelaza w surowicy, podwyższone wartości ferrytyny w surowicy oraz hemosyderyny w makrofagach szpiku kostnego, co odpowiada zaburzeniom charakterystycznym dla ACD [7]. U większości pacjentów z anemią współistniejącą z MM wartości hemoglobiny (ang. haemoglobin – HGB) mieszczą się w przedziale między 8 a 10 g/dl, tylko u 10% chorych HGB wynosi poniżej 8 g/dl [8]. Konsekwencją anemii w MM jest pogorszenie jakości życia pacjentów wynikające ze zmęczenia, duszności, powikłań sercowo-naczyniowych, pogorszenia funkcji poznawczych oraz częstszych hospitalizacji związanych z przetaczaniem preparatów krwi. Co więcej, niedokrwistość jest również niezależnym predyktorem gorszego rokowania w MM.

Najczęstszymi przyczynami niedokrwistości związanej z MM są: wypieranie układu czerwonej krwi przez nowotworowe plazmocyty, apoptoza, aktywność prozapalna cytokin, niewystarczające wydzielanie erytropoetyny (ang. erythropoetin – EPO) w porównaniu do stopnia anemii, skrócenie czasu przeżycia erytrocytów (<10%), nieadekwatna gospodarka żelazowa, bezpośrednia supresja erytropoezy przez komórki szpiczaka [9]. Za gospodarkę żelazową w organizmie odpowiedzialne są następujące komórki: enterocyty zaangażowane we wchłanianie żelaza w jelitach, erytroblasty jako prekursor erytrocytów (ang. red blood cells - RBC), makrofagi śledziony rozkładające starzejące się RBC oraz hepatocyty monitorujące wysycenie transferyny żelazem [8].



Co więcej, w populacji pacjentów z niewydolnością nerek i anemią w przebiegu MM częściej występuje niedobór EPO (60%) w porównaniu do chorych bez niewydolności nerek, ale z anemią w MM (25%) [9]. Część badań sugeruje, że zależność niedokrwistości i upośledzenia funkcji nerek może być odwrotna: ciężka niedokrwistość jest niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju zaburzeń czynności nerek u badanych chorych z MM [10].

Leczenie chorych z anemią w przebiegu MM opiera się na terapii choroby podstawowej oraz leczeniu objawowym, takim jak: przetaczanie preparatów krwinek czerwonych (u chorych z objawami niedokrwistości i/lub HGB < 7 g/dl), podawaniu preparatów rekombinowanej ludzkiej erytropoetyny (do rozważenia przy objawowej anemii i/lub HGB <10 g/dl) oraz suplementacji doustnej lub pozajelitowej żelaza [5]. Zwiększone ryzyko śmiertelności przy stosowaniu EPO u pacjentów z nowotworami hematologicznymi obserwuje się stosunkowo rzadko. Najczęściej związane jest ze zwiększonym ryzykiem zakrzepowo-zatorowym u chorych leczonych w skojarzeniu z glikokortykosteroidami i lekami immunomodulującymi (np.: talidomidem, lenalidomidem, palidomidem). Dlatego w tej grupie pacjentów należy pamiętać o konieczności profilaktyki przeciwzakrzepowej. Nowe badania sugerują, że rekombinowane białka fuzyjne rozpuszczalnego receptora aktywiny typu II oraz IgG-Fc (sotatarcept i luspatarcept) mogą stać się nową formą leczenia niedokrwistości [11,12].

### **3.3. Nowe markery gospodarki żelazowej**

W praktyce klinicznej niedokrwistość w przebiegu MM oceniana jest poprzez oznaczenie stężenia HGB, hematokrytu, RBC, MCH, MCHC, MCV, RDW-CV oraz żelaza. Nowe markery gospodarki żelazowej mogą być pomocne we wczesnym rozpoznawaniu anemii, ocenie jej postępu i potencjalnego rokowania przeżycia pacjenta.

#### **3.3.1. GDF15**

Zróznicowany czynnik wzrostu 15 (ang. growth differentiation factor 15 - GDF15) jest członkiem rodziny transformującego czynnika wzrostu beta (ang. transforming growth factor beta, TGF-beta) i wykazuje silną ekspresję w erytroblastach, co może odgrywać ważną rolę w regulacji linii erytroidalnej [13]. Nowe badania

sugerują, że w populacji chorych na MM głównym źródłem GDF15 jest szpik kostny [14]. Dodatkowo, cytokiny prozapalne indukują ekspresję GDF15 w makrofagach, a sama cząstka może zmniejszyć ekspresję mRNA hepcydyny i w ten sposób przyczynić się do niedokrwistości [13]. Obserwuje się, że stężenie GDF15 w surowicy ma wpływ na funkcję nerek i jest predyktorem spadku filtracji kłębuszkowej [15]. W ostatnich doniesieniach została podniesiona prognostyczna rola GDF15 w amyloidozie AL niezależnie od tradycyjnych biomarkerów sercowych i nerkowych [16]. Podwyższone stężenia GDF15 w surowicy wiążą się ze słabszą odpowiedzią na leczenie w MM [17].

### **3.3.2. sTfR**

Stężenie rozpuszczalnego receptora transferyny (ang. soluble transferrin receptor – sTfR) będącego pojedynczym łańcuchem peptydowym, odzwierciedla stan funkcjonalnego przedziału żelaza w surowicy, zwiększenie liczby erytropoetycznych komórek prekursorowych oraz rosnące zapotrzebowanie na żelazo do erythropoezy [18]. Na stężenie sTfR sływa stan odżywienia oraz status immunologiczny, podczas gdy jego wartość nie jest skorelowana z wiekiem ani płcią pacjenta [19]. W sytuacji gdy zapasy żelaza w organizmie są wystarczające, sTfR odpowiada za szybkość erythropoezy. W stanach niedoboru żelaza stężenie sTfR wzrasta, co odzwierciedla nieskuteczność erythropoezy, natomiast w chorobach przewlekłych proces ten jest miernie nasilony, a stężenie sTfR jest powiązane z zapasami żelaza [20]. Oznaczenia tego markera w surowicy mogą być przydatne w różnicowaniu prawdziwych i funkcjonalnych niedoborów żelaza, ocenie stanu zapalnego i monitorowaniu odpowiedzi na leczenie EPO [19,21].

### **3.3.3. Hepcydyna 25**

Hepcydyna 25 to składający się z 25 aminokwasów hormon peptydowy produkowany głównie przez hepatocyty, a w mniejszym stopniu aktywowane neutrofile i makrofagi. Odpowiada za regulację wchłaniania żelaza z jelit, jego uwalnianie z makrofagów oraz transport przez łożysko. Produkcja hepcydyny jest regulowana przez stężenie żelaza w osoczu oraz cytokiny prozapalne (głównie interleukinę 6 (ang. interleukin 6 – IL-6)), jednakże zwiększona aktywność EPO pełni rolę hamującą jej

wytwarzanie [9]. Hepcydyna poprzez degradację ferroportyny ogranicza żelazo dostępne do erythropoezy [22]. Ten biomarker jest usuwany poprzez degradację komórkową, głównie drogą nerkową [23]. Stężenie hepcydyny w surowicy koreluje ze stężeniem ferrytyny oraz hepcydyny w moczu, dodatkowo na jego zmianę mają wpływ choroby ogólnoustrojowe (jak MM, stany zapalne, choroby nerek), zapasy żelaza w organizmie, spożycie tego pierwiastka czy zmienność dobową [22,23].

### **3.4. Uzasadnienie połączenia prac w cykl publikacji**

Według naszej najlepszej wiedzy istnieje niewiele doniesień łączących zagadnienia nowych markerów gospodarki żelazowej i anemii w szpiczaku mnogim bezpośrednio z niewydolnością nerek wśród tych chorych.

W pracy przeglądowej nr 1 opublikowanej w 2019 roku omówiono aktualny przegląd literatury dotyczącej nowych biomarkerów gospodarki żelazowej w MM oraz niedokrwistości związanej z przewlekłą chorobą nerek. Opisano patogenezę anemii w MM, a także mechanizmy działania poszczególnych markerów (hepcydyny 25, GDF15 oraz sTfR). Przedstawiono dostępną wiedzę na temat korelacji badanych wskaźników z anemią, MM oraz niewydolnością nerek. Uwzględniono znane zależności markerów między sobą.

W pracy oryginalnej nr 2 opublikowanej w 2020 roku przedstawiono wyniki oznaczeń stężenia GDF15 w surowicy krwi pacjentów z MM lub tłącą postacią szpiczaka mnogiego (ang. smoldering multiple myeloma – SMM), które skorelowano z parametrami demograficznymi, stadium MM, klasycznymi markerami anemii, stanu zapalnego, niewydolności nerek oraz śmiertelnością.

W pracy oryginalnej nr 3 opublikowanej w 2022 roku przedstawiono wyniki oznaczeń stężenia hepcydyny 25 oraz sTfR w surowicy krwi pacjentów z MM lub SMM, które podobnie jak w pracy 2 powiązано z parametrami demograficznymi, stadium MM, stosowaną chemioterapią, klasycznymi markerami niedokrwistości, stanu zapalnego, niewydolności nerek oraz śmiertelnością.

Wszystkie wymienione elementy wymagają dalszych badań oraz ich walidacji w ramach prospektywnego badania klinicznego z udziałem większej liczby pacjentów. Mamy nadzieję, że w przyszłości nowe biomarkery gospodarki żelazowej okażą się czynnikami rokowniczymi dla pacjentów chorujących na MM z niewydolnością nerek, dzięki czemu możliwe będzie wczesne wdrożenie profilaktyki, farmakoterapii

co w konsekwencji przyczyni się do podniesienia jakości życia i zwiększenia przeżycia pacjentów ze szpiczakiem mnogim.

## **Rozdział 4.**

### **Założenia i cele pracy**

#### **4.1. Założenia pracy**

Rozprawę doktorską zaplanowano jako jednotematyczny cykl publikacji w międzynarodowych czasopismach naukowych znajdujących się na liście Journal Citation Report (Thomson Reuters) oraz Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Ministerstwa Edukacji i Nauki. Badanie zaprojektowano jako prospektywne, jednośrodkowe, obserwacyjne. Podstawowym założeniem pracy była weryfikacja tezy, czy nowe markery gospodarki żelazowej mogą być wykorzystywane w ocenie anemii u pacjentów ze szpiczakiem mnogim w korelacji z uszkodzeniem nerek, czy mogą pomóc w ocenie zaawansowania choroby podstawowej oraz czy będą przydatne jako czynniki rokownicze dla tej populacji. Zaplanowano realizację pracy w kilku etapach.

W oparciu o przegląd dostępnej literatury naukowej przygotowywano pracę przeglądową dotyczącą biomarkerów gospodarki żelazowej w szpiczaku mnogim i anemii związanej z chorobą nerek. Uwzględniano markery będące tematem niniejszej rozprawy takie jak: hepcydyna 25, GDF15 i sTfR oraz ich związek z rozwojem niedokrwistości, gospodarką żelaza oraz stadium choroby podstawowej w grupie pacjentów z MM i uszkodzeniem nerek.

Oceniano przydatność poszczególnych markerów gospodarki żelazowej u chorych z MM:

**1. GDF15** będąc dalszym celem nowotworowego supresora p53 oraz członkiem rodziny TGF beta, który jest indukowany w odpowiedzi na czynniki wywołujące stres komórkowy (np. niedotlenienie, uszkodzenie tkanek, stan zapalny), został uznany za jeden z najbardziej interesujących biomarkerów nowotworowych [14].

W naszym badaniu GDF15 oznaczono w surowicy krwi. Analizowano stężenie GDF15 u pacjentów z MM i porównano je z wynikami badań w grupie kontrolnej, a także oceniono zależność stężenia tego markera w zależności od wieku. Następnie uwzględniono zależność GDF15 względem stadium zaawansowania MM wg Międzynarodowego Systemu Stopniowania (ang. International Staging System – ISS), stężenia poszczególnych markerów MM (FLC we krwi i wolne łańcuchy (ang. light chains - LC) w moczu,  $\beta$ 2-mikroglobulina) oraz odpowiedzi na leczenie. W grupie

chorych na MM badano powiązanie GDF15 z markerami anemii (HGB, żelazem), niewydolności nerek (kreatyniną, cystatyną C, klirensem kreatyniny (ang. estimated glomerular filtration rate - eGFR), lipokaliną związaną z żelatynazą neutrofilów (ang. neutrophil-gelatinase associated lipocalin – NGAL)), stanu zapalnego (IL-6, leukocytami) oraz sercowymi (N-końcowy peptyd natiuretyczny typu pro-B, ang. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide – NT proBNP). Weryfikowaliśmy potencjał GDF15 jako wskaźnika śmiertelności u chorych z MM. Poddano analizie GDF15 z pozostałymi biomarkerami (hepcydyną 25 oraz sTfR).

**2. sTfR** zapobiega w organizmie toksyczności związanej z przeładowaniem żelazem, jednakże forma TfR1, która ma większe powinowactwo do transferyny ulega nadekspresji na komórkach o wysokim wskaźniku proliferacji (np. komórkach złośliwych nowotworów hematologicznych) [8]. Dodatkowo badania wykazały podwyższone stężenie sTfR w surowicy w powiązaniu z pogłębianiem przewlekłej niewydolności nerek [24].

Stężenie sTfR oznaczono w surowicy krwi. Oceniono stężenie sTfR u pacjentów z MM i porównano z wynikami w grupie kontrolnej, a także pomiędzy chorymi na MM z i bez anemii. Korelowano sTfR ze stadium MM wg ISS, rodzajem zastosowanego leczenia, stężeniami poszczególnych markerów MM (FLC we krwi oraz LC w moczu,  $\beta$ 2-mikroglobuliną), wiekiem i płcią. W grupie chorych na MM badano również zależność sTfR z markerami anemii (HGB, średnią objętością erycyty (ang. mean cell volume - MCV), średnią masą hemoglobiny w krwince czerwonej (ang. mean cell hemoglobin - MCH), średnim stężeniem hemoglobiny w krwince czerwonej (ang. mean cell hemoglobin concentration – MCHC), współczynnikiem zmienności rozkładu erycytów (ang. red cell distribution width–coefficient of variation - RDW-CV), żelazem), niewydolnością nerek (stężeniem kreatyniny, eGFR, NGAL), markerami stanu zapalnego (IL-6). Oceniono zależność sTfR z pozostałymi biomarkerami (hepcydyną 25 oraz GDF15). Przedmiotem badania była także analiza sTfR jako czynnika predykcyjnego śmiertelności w tej grupie chorych.

**3. Hepcydyna 25** jako jedno z białek ostrej fazy jest regulowana przez IL-6, cytokinę indukującą rozwój MM (potencjalny czynnik wzrostu dla komórek szpiczaka) [8]. Co więcej, ekspresja hepcydyny jest regulowana przez GDF15 wydzielany przez komórki mikrośrodowiska nowotworu [25].

Oceniono stężenie hepcydyny w surowicy krwi u pacjentów z MM i porównano z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej, a także pomiędzy chorymi na MM z anemią i bez. Analizie poddano zależność hepcydyny ze stadium zaawansowania MM wg ISS, rodzajem zastosowanego leczenia, stężeniami poszczególnych markerów MM (FLC we krwi oraz LC w moczu,  $\beta$ 2-mikroglobuliną), wiekiem i płcią. Również w grupie chorych na MM badano powiązanie hepcydyny z markerami anemii (HGB, MCV, MCH, MCHC, RDW-CV, żelazem), wskaźnikami niewydolności nerek (stężeniem kreatyniny, eGFR, NGAL), stanu zapalnego (IL-6). Ponadto analizowano hepcydynę jako wskaźnika śmiertelności u chorych z MM oraz zależność hepcydyny z pozostałymi biomarkerami (sTfR oraz GDF15).

## **4.2. Cel pracy**

Celem pracy była ocena zastosowania nowych biomarkerów gospodarki żelazowej u chorych ze szpiczakiem mnogim w zależności od stopnia uszkodzenia nerek.

### **Cele szczegółowe:**

1. Analiza związku pomiędzy stadium MM a wybranymi markerami gospodarki żelazowej.
2. Analiza zależności pomiędzy wybranymi markerami gospodarki żelazowej a anemią w MM.
3. Analiza korelacji badanych markerów gospodarki żelazowej z uszkodzeniem nerek.
4. Analiza zależności pomiędzy wybranymi markerami gospodarki żelazowej a śmiertelnością u chorych z MM.
5. Analiza związku badanych markerów gospodarki żelazowej między sobą u pacjentów z MM.



## Rozdział 5.

### Material i Metodyka

Pracę realizowano kilkuetapowo:

1. Do badania włączono pacjentów będących w stałej opiece ambulatoryjnej Poradni Hematologicznej Oddziału Klinicznego Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

Kryteria włączenia: wiek  $\geq 18$  roku życia, zdiagnozowany MM lub SMM wg kryteriów International Myeloma Working Group.

Kryteria wyłączenia: ostre stany zapalne, chorzy z aktywnym wirusowym zapaleniem wątroby typu B lub C, z przeciwciałami anti-HIV (ang. human immunodeficiency virus, ludzki wirus niedoboru odporności) lub jawnym zespołem nabytego niedoboru odporności (ang. acquired immunodeficiency syndrom, AIDS), dodatkowo z towarzyszącymi innymi chorobami nowotworowymi, chorzy po przeszczepach narządowych, w trakcie leczenia immunosupresyjnego z innego powodu niż MM, chorzy hemodializowani.

Do badania zakwalifikowano łącznie 73 chorych.

2. Opracowano bazę danych na podstawie informacji z wizyty w Poradni Hematologicznej w momencie włączenia pacjenta do badania oraz dostępnej dokumentacji medycznej. W bazie uwzględniono m.in.:
  - dane demograficzne,
  - datę postawienia diagnozy MM lub SMM,
  - aktualny stopień zaawansowania szpiczaka,
  - zajęcie układu kostnego (ocena rentgenogramów),
  - dotychczas stosowane oraz aktualne leczenie, ze szczególnym uwzględnieniem chemioterapii,
  - odpowiedź na leczenie.
3. W momencie włączenia pacjenta do badania w ramach wizyty w Poradni Hematologicznej pobierano 1 próbkę krwi o poj. 4,9 ml „na skrzep”, 2 próbki krwi o pojemności 4,9 ml na EDTA oraz 1 próbkę moczu. Próbki po pobraniu były odwirowane, zamrożone i przechowywane w temperaturze -70C do czasu wykonania oznaczeń (wytyczne *Good Laboratory Practice*).

4. Średnia wykonania follow-up wynosiła 27 miesiącach od rozpoczęcia badania. Oceniono wyniki badań laboratoryjnych z ostatniej wizyty (szczególnie stężenia HGB) oraz zebrano dane dotyczące zgonów (jeśli wystąpiły): datę i przyczynę.

Badanie było zgodne z Deklaracją Helsińską i zasadami *Good Clinical*. Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Jagiellońskiego zatwierdziła protokół badania (nr 1072.6120.248.2017). Każdy chory otrzymał wyczerpujące informacje na temat celu projektu oraz podpisał świadomą zgodę na badanie.

Do grupy kontrolnej włączono 21 zdrowych ochotników (13 kobiet, 8 mężczyzn) w wieku 39-66 lat.

### **Metodyka badania:**

1. Ocena gospodarki żelazowej i anemii na podstawie oznaczeń:
  - a. standardowo dostępne: żelazo w surowicy, ferrytyna w surowicy, transferyna w surowicy, elementy wchodzące w skład morfologii krwi: RBC, HGB, hematokryt, MCV, MCH, MCHC, RDW-CV,
  - b. badania nowych markerów gospodarki żelazowej metodą immunoenzymatyczną ELISA, używając następujących zestawów handlowych:
    - sTfR w surowicy krwi: serum sTfR Human sTfR Immunoassay (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA)
    - GDF-15 w surowicy krwi: Quantikine ELISA Human GDF-15 Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA)
    - hepcydyna 25 w surowicy krwi: Hpcidin 25 human Cet. No. S-1337 kit (Peninsula Laboratories International, Inc., San Carlos, CA, USA).
2. Ocena aktywności szpiczaka mnogiego na podstawie oznaczeń:
  - a. FLC surowicy krwi oraz LC w moczu,
  - b. białko monoklonalne w surowicy i moczu,
  - c. wapń w surowicy krwi,
  - d. dehydrogenaza mleczanowa w surowicy krwi,
  - e.  $\beta$ 2-mikroglobulina w surowicy krwi.
3. Ocena funkcji nerek na podstawie oznaczeń:

- a. standardowo wykonywane: stężenie kreatyniny w surowicy, ocena eGFR ze wzoru Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) formuła oraz Chronic Kidney Disease—Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) Cr 2009 formuła [26], stężenie albuminy w surowicy, białka całkowitego w surowicy,
  - b. badania markerów uszkodzenia nerek metodą immunoenzymatyczną ELISA, używając następujących zestawów handlowych:
    - cystatyna C w surowicy krwi i moczu: Human Cystatin C ELISA-IVD (BioVendor Research and Diagnostic Products, Brno, Czech Republic),
    - NGAL w surowicy krwi i moczu: Human NGAL monomer-specific ELISA Kit (BioPorto Diagnostics A/S, Hellerup, Denmark).
4. Ponadto oceniano:
- a. aktywność stanu zapalnego na podstawie stężeń: leukocytozy z rozmazem krwi, białka C-reaktywnego (ang. C-reactive protein, CRP), interleukiny 6 (IL-6) w surowicy za pomocą: Quantikine ELISA Human IL-6 Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA),
  - b. NT-proBNP w surowicy za pomocą: Enzyme-linked Immunosorbent Assay ELISA Kit For NT-ProBNP Human (Cloud-Clone Corporation, Huston, TX, USA).

Oznaczenia stężenia GDF15, hepcydyny 25, sTfR, cystatyny C, IL-6, NT-proBNP w surowicy oraz NGAL w surowicy i w moczu dokonano z wykorzystaniem sprzętu zakupionego przez Uniwersytet Medyczny w Białymstoku w ramach dofinansowania RPOWP 2007-2013, Priority I, Axis 1.1, nr kontraktu. UDA-RPPD.01.01.00-20-001/15-00 z dnia 26.06.2015.

Do pomiaru podstawowych badań biochemicznych został użyty automatyczny analizator Hitachi 917 (Hitachi, Japan) and Modular P (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Parametry hematologiczne mierzono za pomocą analizatora Sysmex XE 2100 analyser (Sysmex, Kobe, Japan). Stężenie FLC w surowicy krwi, LC w moczu oraz  $\beta$ 2-microglobuliny oznaczano na analizatorze BN II (Siemens GmbH, Germany). Powyższe analizatory znajdują się w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

## **Analiza statystyczna**

W opracowaniu części statystycznej wykorzystano oprogramowanie Statistica 12.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). W przypadku danych kategorycznych podawaliśmy liczbę pacjentów oraz rozkład procentowy. Test Shapiro-Wilka został użyty do oceny normalności. Dla danych z rozkładem normalnym zastosowaliśmy średnią arytmetyczną  $\pm$  odchylenie standardowe, a dla danych z rozkładem nienormalnym medianę i rozstęp międzykwartyłowy (ang. interquartil range - IQR). Różnice między grupami oceniano za pomocą tekstu t-Studenta oraz testu Mann-Whitney's (w przypadku dwóch podgrup) lub jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) oraz testu Kruskal-Wallis (w przypadku więcej niż dwóch podgrup). Współczynnik korelacji Spearmanna lub Pearsona wykorzystano do analizy powiązań pomiędzy badanymi markerami a pozostałymi zmiennymi. Użyliśmy wielokrotnej regresji liniowej do poszukiwania niezależnych predyktorów stężenia hemoglobiny we krwi, w tym zmiennych niezależnych, które znacząco korelowały z wartościami hemoglobiny w prostej analizie. Zmienne „Right Skewed” zostały przekształcone za pomocą logarytmu normalnego przed analizą korelacji i regresji liniowej. Do oszacowania czasu przeżycia używano krzywych Kaplan-Meyera. Prosty i wielokrotny model regresji ryzyka Coxa został wykorzystany do zbadania wskaźników ogólnej śmiertelności. Wszystkie testy były testami dwustronnymi, a wyniki istotne statystycznie określano za pomocą  $p < 0.05$ .

## **Rozdział 6.**

### **Limitacje badania**

Prezentowane badanie posiada limitacje wynikające z liczebności i heterogeniczności populacji badanej - grupa zawiera pacjentów z pełnoobjawowym szpiczakiem (w różnym stadium ISS), SMM lub MGUS. Chorzy włączeni do badania stosowali także odmienne rodzaje leczenia (w tym różne schematy chemioterapii i autoPBSCT). Zastosowanie analizy statystycznej uwzględniającej różnorodność grupy badanej pozwoliło uzyskać korelacje badanych markerów niezależne od powyższych danych. Biorąc pod uwagę powyższe informacje, konieczne jest kontynuowanie badań prospektywnych nad biomarkerami gospodarki żelazowej, celem precyzyjnej oceny faktycznej możliwości ich zastosowania w ocenie populacji większej pacjentów z MM. W przyszłości być może GDF15, hepcydyna 25 oraz sTfR zostaną włączone do panelu badań w rutynowej ocenie diagnostycznej i terapeutycznej chorych ze szpiczakiem, a tym samym przyczynią się do wcześniejszego rozpoznania, leczenia i poprawy jakości życia chorych.

## Rozdział 7.

### Publikacje stanowiące rozprawę doktorską



Review

## New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia

Małgorzata Banaszkiewicz <sup>1</sup>, Jolanta Małyszko <sup>2</sup>, David H. Vesole <sup>3</sup>, Karolina Woziwodzka <sup>1</sup>, Artur Jurczyszyn <sup>4</sup>, Marcin Żórawski <sup>5</sup>, Marcin Krzanowski <sup>1</sup>, Jacek Małyszko <sup>6</sup>, Krzysztof Batko <sup>1</sup>, Marek Kuźniewski <sup>1,\*</sup> and Katarzyna Krzanowska <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Nephrology, Jagiellonian University Medical College, Kopernika 15-15c, 31-501 Cracow, Poland; mbanaszkiewicz@gmail.com (M.B.); woziwodzka.karolina@gmail.com (K.W.); mkrzanowski@op.pl (M.K.); batko.krzysztof@gmail.com (K.B.); marek.kuzniewski@uj.edu.pl (M.K.)
  - <sup>2</sup> Department of Nephrology, Dialysis and Internal Medicine, Warsaw Medical University, Banacha 1a, 02-097 Warsaw, Poland; jolmal@poczta.onet.pl
  - <sup>3</sup> John Theurer Cancer Center, Hackensack University Medical Center, 92 2nd St, Hackensack, NJ 07601, USA; dvesole@yahoo.com
  - <sup>4</sup> Department of Hematology, Jagiellonian University Medical College, Kopernika 17, 30-501 Cracow, Poland; mmjurczy@cyf-kr.pl
  - <sup>5</sup> Department of Clinical Medicine, Medical University, Szpitalna 37, 15-254 Białystok, Poland; mzorawski@wp.pl
  - <sup>6</sup> Department of Nephrology, Medical University, Żurawia 14, 15-540 Białystok, Poland; jacek.malyszko@umb.edu.pl
- \* Correspondence: kasajanda@op.pl; Tel.: +48-12-424-79-41

Received: 7 October 2019; Accepted: 29 October 2019; Published: 1 November 2019



**Abstract:** Multiple myeloma (MM) is a malignancy of clonal plasma cells accounting for approximately 10% of haematological malignancies. MM mainly affects older patients, more often males and is more frequently seen in African Americans. The most frequent manifestations of MM are anaemia, osteolytic bone lesions, kidney failure and hypercalcaemia. The anaemia develops secondary to suppression of erythropoiesis by cytokine networks, similarly to the mechanism of anaemia of chronic disease. The concomitant presence of kidney failure, especially chronic kidney disease (CKD) and MM per se, leading to anaemia of chronic disease (ACD) in combination, provoked us to pose the question about their reciprocal dependence and relationship with specific biomarkers; namely, soluble transferrin receptor (sTfR), growth differentiation factor 15 (GDF15), hepcidin 25 and zonulin. One or more of these are new biomarkers of ferric management may be utilized in the near future as prognostic predictors for patients with MM and kidney failure.

**Keywords:** anaemia; growth differentiation factor 15; hepcidin; kidney disease; mieloma multiple; soluble transferrin receptor; zonulin

### 1. Introduction

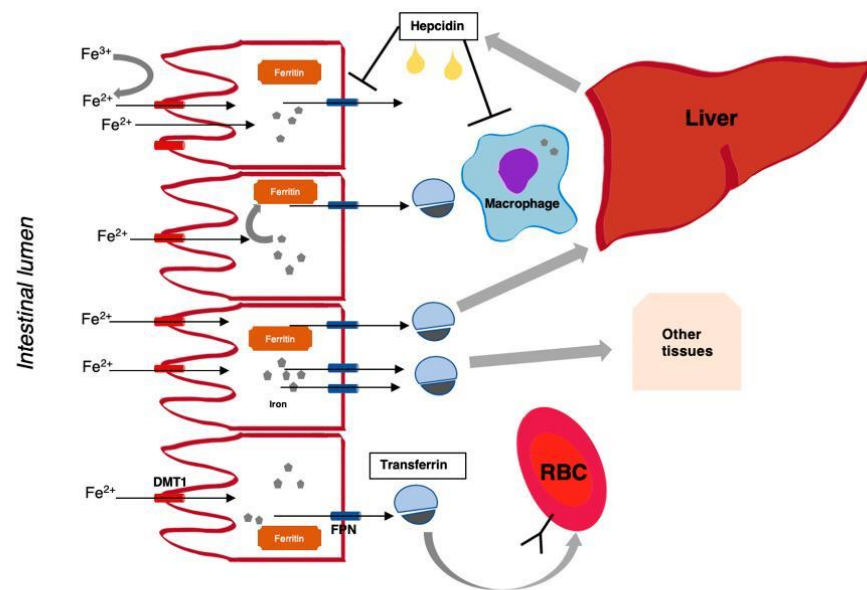
Multiple myeloma (MM) is a malignancy of clonal plasma cells accounting for 10% of haematological malignancies and 1.8% of all malignancies [1]. Because of complicated pathogenesis and multiple end-organ effects, patients with MM are treated by specialists from many areas of medicine, including haematology, nephrology, cardiology and orthopaedics. In Poland, the number of newly diagnosed patients with MM is approximately 1500–1800 per year [2]. Despite being a disease of an older population (median age 70 years old), approximately 10% of patients are under 50 years old [3,4]. Interestingly, lately, a slight increase of morbidity in 45–64 year old patients was observed [5]. With the

development of novel target therapies, the projected median life expectancy of a newly diagnosed MM patient with standard risk cytogenetic features has improved from 2.5 years to over 10 years [2].

The most frequent manifestations of MM are: anaemia (73%), bone pain and osteolytic bone lesions (58% and 67%, respectively), kidney failure (48%) and hypercalcemia (28%) (CRAB) [3]. The anaemia develops secondarily to the suppression of erythropoiesis by cytokine networks, similarly to the mechanism of anaemia of chronic disease (ACD). In the majority of MM patients, the anaemia is manifested as a haemoglobin level between 8 and 10 g/dL, while approximately 10% have a value below 8 g/dL [6]. Anaemia has a negative impact on the quality of patients' lives and is also an independent predictor of poor survival. Although disease progression exacerbates the extent of the anaemia, the use of treatment reduces the extent of bone marrow plasmacytosis and allows for improvement of haematological and renal parameters [3].

Increased use of iron in cancer cells may be responsible for findings of anaemia in the course of MM, even without coexisting kidney impairment. Iron circulation in the human body is associated with four cell types: enterocytes involved in iron absorption; erythroblasts—the precursors of red blood cells (RBCs); splenic macrophages degrading aged RBCs and releasing iron back to the bone marrow via transferrin; and hepatocytes playing a role in monitoring transferrin saturation, hepatocellular iron content, regulating iron absorption from the gut and regulating iron release from the spleen [6]. Recent scientific research has shown that disorders of iron metabolism, and consequently, anaemia, may be associated with a positive regulation of hepcidin 25 expression caused by cytokines [7]. This small peptide hormone composed of 25 amino acids synthesized in hepatocytes regulates iron absorption from the gut and iron release from the spleen [8]. Growth differentiation factor 15 (GDF15) is a member of the transforming growth factor-beta family, aberrantly secreted by bone marrow stromal cells (BMSCs) in MM and plays a role in regulation of hepcidin expression [9,10]. Soluble transferrin receptor (sTfR) reflects the functional iron compartment in serum, an increased number of erythropoietic precursor cells and an increasing iron need for erythropoiesis [11]. Zonulin is a protein, which modulates intercellular tight junctions related to the intestinal permeability of iron as well as autoimmune, inflammatory and neoplastic substances also expressed beyond the gastrointestinal tract [12]. Thus GDF15, sTfR, hepcidin 25 and zonulin may all be involved in iron metabolism, so may form new biomarkers of ferric management and one or more may ultimately serve as a predictor for MM-associated kidney failure. If one or more of these molecules are proven to be a predictive biomarker for the development of acute/chronic kidney disease, this may lead to therapeutic interventions to prevent renal insufficiency. The pathophysiology of iron metabolism is shown in Figure 1.





**Figure 1.** Overview of iron physiology. Non-haem iron (after reduction to  $\text{Fe}^{2+}$  by membrane-bound enzymes), originating from dietary intake (mostly  $\text{Fe}^{3+}$ ), enters the enterocyte of the proximal intestine via the divalent metal transporter (DMT1), and exits the cell on the basolateral side through ferroportin (FPN), which is potentiated by an oxidase, hephaestin. Depending on the state of iron need, iron can be released from the cell or sequestered in the form of ferritin (a measure of body iron stores). Iron is bound by transferrin in plasma, which enables transport and distribution to other body tissues (this also depends on the presence of transferrin receptors). Hepcidin, which is a peptide hormone produced by the liver, negatively regulates iron absorption and release from cells (e.g., macrophages) depending on iron need.

## 2. Pathogenesis of Anaemia in Multiple Myeloma

Anaemia is among the most frequent end-organ sequelae in MM [3]. It is an early and multifactorial complication of MM, which has been reported to occur in over two thirds of all patients [13]. Major pathophysiological mechanisms of MM-related anaemia are the underlying basis of plasma cell-produced cytokines that mark anaemia of chronic disease (ACD), which inhibit erythropoiesis and impair iron homeostasis [13]. The anaemia is usually normocytic and normochromic but can be macrocytic. Serum iron levels are usually normal to mildly low; serum ferritin is high and hemosiderin is significant in bone marrow macrophages, consistent with patterns similar to ACD [14]. Relative erythropoietin deficiency, renal impairment and myelosuppressive consequences of chemotherapy are other factors to account for [13]. Recent studies continue to add to the complexity of anaemia pathophysiology in MM. Studies have shown that malignant plasma cells exhibited high up-regulation of apoptogenic receptors, which lead to immature erythroblast apoptosis, which implies that cytotoxic characteristics of myeloma cells may be crucial in provoking inadequate erythropoiesis [15]. Outside of the concept of bone marrow “crowding out” by malignant cells, the tumour microenvironment also seems to functionally impair hematopoietic stem and progenitor cells, in part through TGF-beta signalling [16]. It seems that assessment of anaemia and devising of a strategy for its treatment may be more accurately undertaken through a combination of molecular and biochemical parameters of tumour burden, cytotoxicity and the myeloma-promoting bone marrow microenvironment.



The most common causes of MM-related anaemia are: displaced erythroid system by neoplastic plasmacytes, proinflammatory activity of cytokines, disabled apoptosis of the erythroid system, inadequate excretion of erythropoietin (EPO) compared to the degree of anaemia, reduction of erythrocytes' survival time (<10%), inadequacy of ferric management and direct suppression of erythropoiesis by neoplastic cells [17]. The last four causes are considered to be the main processes responsible for ACD development. Prospective survey data indicate that clinically, anaemia is associated with fatigue, dyspnoea, cardiovascular complications and cognitive dysfunction [18]. In addition, anaemia may be associated with permanent organ dysfunction or intensifying hypoxia, which may also lead to changes in neoplastic metabolism. This may subsequently contribute to refractoriness of chemotherapy and radiotherapy [17,18]. Low initial haemoglobin level (<14.0 g/dL for men; <12.0 g/dL for women), chemotherapy persistent/recurrent disease and female gender comprise risk factors for the development of anaemia in MM patients [18]. A diagnostic and clinical scheme of MM-related anaemia is shown in Figure 2.

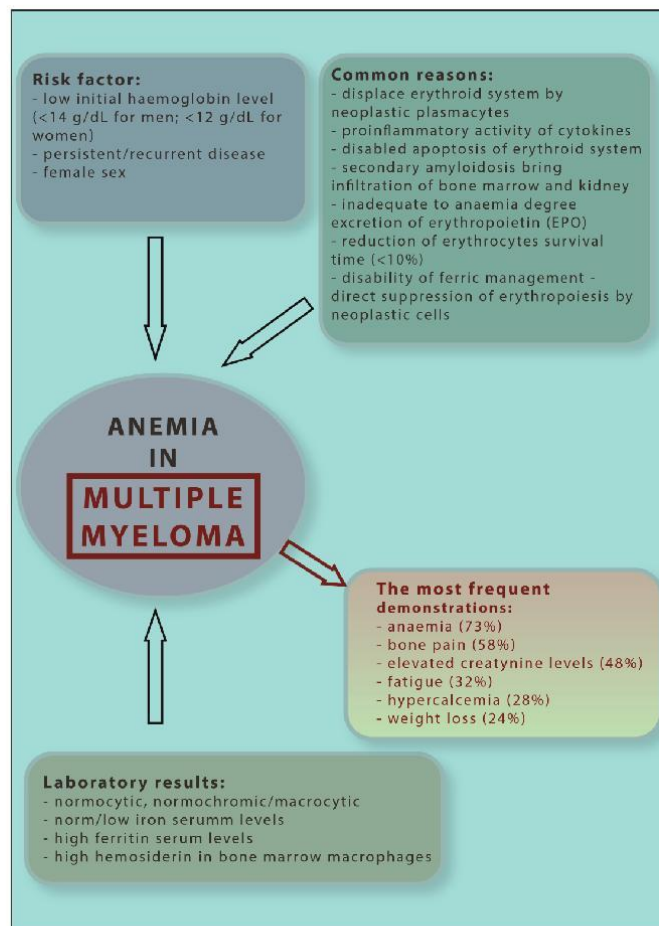


Figure 2. Diagnostic and clinical scheme of multiple myeloma anaemia.

Chemotherapy-responsive patients, with or without exogenous erythropoietin administration, often see a normalization of their haemoglobin levels with a resultant improvement in quality of life (QOL), despite the impact of patients' ages and stages of disease. It is important to acknowledge that the initiation of treatment, particularly with alkylating agents, may transiently lead to an early decrease of haemoglobin levels, followed by an increase in haemoglobin with disease response, often within the first month of therapy. This initial haemoglobin reduction is not observed during non-alkylating treatment [19].

Furthermore, treatment of anaemia in MM patients includes red blood cell (RBC) transfusions, recombinant human erythropoietin (rHuEPO) therapy and oral or parenteral iron supplementation [13]. RBC transfusions cause an immediate effect and rapid increase in haemoglobin levels. Transfusion may rarely be associated with several risks factors, including infections, mild to even life-threatening immunologic reactions, iron overload, and in rare cases, induction of graft-versus-host disease (GVHD). Transfusions are usually reserved for patients who are severely anaemic and symptomatic (haemoglobin < 7.0 g/dL) and those patients who fail to respond to chemotherapy and to erythropoietic-stimulating agents (ESAs) [17]. rHuEPO is an erythropoiesis stimulating agent (ESAs), a biological equivalent to the human endogenous hormone EPO. The application of rHuEPO leads to an increase of haemoglobin level over minimal normal concentration without the necessity of RBC transfusions [13]. ESAs are optimally incorporated with concurrent chemotherapy [13]. The treatment should be considered for haemoglobin level < 10 g/L or clinical anaemia symptoms. ESAs can increase haemoglobin levels up to 2 g/dL or more in 60–75% of MM patients. Similar guidelines should be followed for the longer acting darbepoetin [20]. A benefit of improving haemoglobin levels is the subsequent improvement in overall survival. ESAs are safe and well-tolerated with minimal toxicity risk; however, pure red cell aplasia is a rare event [21]. According to the solid tumour literature, ESAs have a negative influence on survival in patients with active forms of solid tumours. Furthermore, EPO treatment enhances the circulating levels of angiogenic cytokines, contributing to the progression of neovascularization in tumours, and as a consequence, increased neoplasm growth [22]. Thus, the risk of higher mortality associated with ESAs is predominantly observed in patients with solid tumours and is a rare complication in hematologic malignancies. The most serious side effect of this treatment is a higher risk of thrombo-embolic complications, especially in patients with MM treated with immunomodulatory agents in combination with corticosteroids (e.g., thalidomide, lenalidomide and pomalidomide). Hence, it is important to consider anti-thrombotic prophylaxis (low molecular weight heparin, factor Xa inhibitors or acetylsalicylic acid) therapy in individuals with these two anti-myeloma agents [17]. For those patients who are iron deficient, appropriate work up for blood loss should be initiated. Oral iron supplementation, at least 65 mg of elemental iron daily, should be utilized. If there is no increase in haemoglobin by at least 1 g/dL within 4–6 weeks of oral iron administration, parenteral iron should be considered. There are various formulations and schedules for parenteral iron administration. For patients with moderately-severe iron deficiency, concomitant iron supplementation and ESAs should be utilized.

Moreover, sotatercept and luspatercept are recombinant, soluble activin type-II receptor-IgG-Fc fusion proteins, which may become of new form of treatment in anaemic patients. The Medalist Trial Fenaux et al. [23] examined 229 anaemic patients with very low, low, or intermediate-risk myelodysplastic syndromes (MDS) with ring sideroblasts (RS) who required RBC transfusions and observed that treatment with luspatercept resulted in a significantly reduced transfusion burden compared with placebo in patients. Two studies (NCT01146574) and (NCT01999582) have examined treatment with sotatercept in anaemic patients with end-stage renal disease on haemodialysis; however, no study results have been posted [24].

Renal failure contributes to anaemia in MM patients. It is well known that serum EPO levels below the lower limit of normal are more frequent in the population of patients with renal impairment (60%) than in the population of all patients with MM (25%). However, renal failure does not significantly affect the response to ESA therapy [21]. Soleymanian et al. [25] showed that 88% of patients with

MM and renal insufficiency had anaemia, in comparison to only 73% of patients in the whole MM population [3] (Table 1). Together, these findings illustrate the importance of renal organ function in the severity of MM complications. Interestingly, Liu et al. described a group of 161 MM patients and confirmed that severe anaemia is an independent risk factor of renal impairment in this population [26]. Nevertheless, anaemia is not a useful tool in the diagnostic process for MM in patients with chronic kidney disease (CKD) because of its presence in both clinical scenarios.

**Table 1.** Anaemia in multiple myeloma (MM) and kidney failure.

	Population all Patients with MM	Population Patients with MM and Renal Insufficiency
Anaemia	73%	88%
Serum EPO levels under lower line	25%	60%

### 3. Heparin 25

Heparin is a 25 amino acid, negative, iron-regulating peptide hormone produced in the liver. It controls iron delivery to the blood from intestinal cells, regulates its transport from iron-storing hepatocytes, releases it from macrophages and facilitates its transport via the placenta. Production of heparin is stimulated by increased plasma iron, and altered by iron stores and proinflammatory cytokines; though increased EPO activity, it has a suppressive role [17]. The mechanism of heparin activity depends on binding and inactivating ferroportin (described as the solitary cellular iron exporter), which inhibits iron delivery to plasma from all iron-transporting cells [27]. This hormone may play a major role in anaemia associated with chronic disease and inflammation, because of its unique regulatory role on ferric management [28].

Interleukin-6 (IL-6), is increased in MM patients and is reported as the main cytokine regulating heparin expression [6]. However, high heparin expression may not only be due to IL-6 activity, as other cytokines may also contribute to anaemia in ACD. Ibricevic-Balic et al. [8] reported that increased serum heparin concentration may lead to anaemia in MM. In their study, patients with newly diagnosed MM (27 patients) and healthy controls (60 people) were examined. Anaemia was observed in 70% cases of MM patients. However, despite significantly elevated serum heparin concentration in the anaemic MM group, no correlation between heparin and IL-6 was found. Similar results were observed by Sharma et al. [29], who demonstrated a strong association between up-regulated heparin expression and anaemia in advanced stage MM. In their study, the correlation between heparin concentrations and serum IL-6 levels showed borderline significance. Moreover, strong correlation between urinary heparin with serum ferritin and C-reactive protein (CRP) was observed, confirming heparin expression as a part of an acute-phase reaction. They did not observe an association between other proinflammatory cytokines (i.e., serum tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) or interleukin-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ )) and heparin. The lack of consistent associations between IL-6 (or other cytokines) and heparin indicates that other stimuli of heparin regulation (e.g., pathways associated with iron storage) may be deciding factors. Victor et al. [30] observed a strong negative correlation between serum heparin and inflammatory markers (i.e., IL-6 and CRP) in a group of 21 newly diagnosed MM patients. In contrast, Han et al. [31,32] demonstrated that serum IL-6 positively correlated with monocyte heparin [31]. Moreover, the expression level of monocyte heparin mRNA positively correlated with serum ferritin and IL-6 levels, but was unrelated with TNF- $\alpha$  level [31] in untreated patients. Mei et al. [33] observed a significant positive correlation between plasma IL-6 level and heparin mRNA expression. Together, those studies illustrate the complex relationship between heparin and IL-6 in the development of anaemia in MM.

According to Maes et al. [14] bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) is a major mediator of the heparin stimulatory activity in MM. They reported data on 25 MM patients and found increased BMP-2 levels. It was discussed that IL-6 and BMP may stimulate heparin promoter activity in a synergistic



manner with postulated crosstalk between the two signalling pathways. Hence, the presence of IL-6 and BMP2 together in the serum may act jointly and lead to increased hepcidin expression.

Katodritou et al. [34] observed that effective MM treatment decreased the abnormally high serum hepcidin levels with subsequent improvement in anaemia. Among 34 anaemic MM patients treated using immunomodulatory drug-based therapies (thalidomide or lenalidomide combinations with cyclophosphamide or dexamethasone) or conventional therapy, 80% responded to MM treatment. In responders, elevated serum hepcidin levels significantly decreased during therapy. Moreover, hepcidin serum levels predicted the reduction of anaemia in response to therapy around the first month. A lower hepcidin level was associated with improvement of anaemia. Similar results were reported by Mei et al. [33] in 25 MM patients with significantly decreased levels of plasma hepcidin, who achieved complete remission after six cycles of bortezomib and dexamethasone chemotherapy. It should be noted that these studies have small sample sizes, which may be considerably affected by individual disease characteristics and the underlying treatment regimen. However, it can be observed that an optimal treatment outcome, which likely reflects a reduction in tumour load, leads to improvement, and potential resolution of anaemia.

Interestingly, Haraguchi et al. [35] showed that MM patients with renal insufficiency had significantly higher pro-hepcidin (hepcidin prohormone) levels compared to patients with appropriate renal function or impairment. However, no correlation between pro-hepcidin levels and serum iron, ferritin or haemoglobin concentrations were observed. Since hepcidin is cleared through the kidney route, urinary hepcidin levels may not correctly reflect the serum levels in renal disease because of changes in filtration via glomerular membrane or reabsorption and degradation in the proximal tubules. However, assessing pro-hormone levels may be limited in the interpretation of the biological activity of hepcidin. Lukaszuk et al. [36] reported on 69 patients with early stages of CKD, and showed higher serum hepcidin levels in patients with functional iron deficiency, when comparing to patients with absolute iron deficiency. They observed that hepcidin was predicted by circulating markers of inflammation, such as ferritin, fibrinogen and IL-6.

An overview of the characteristics of hepcidin is displayed in Table 2, with a focus on its biomarker potential, and factors that may influence its adequate assessment. Studies described in this section point to the difficulties of the adequate interpretation of hepcidin concentrations, which require an understanding of the clinical scenario (i.e., state of hematologic disease, iron deficiency status and kidney function) (direction of changes described in Table 3). Interplay between circulating inflammatory molecules and pathways signalling the status of iron stores may exert stimuli of variable degrees, to which the response in hepcidin regulation is not fully known. Overall, a response to myeloma treatment, and reduced tumour burden, seem to be paralleled by an improvement of anaemia, which could be predicted with hepcidin assessments. However, difficulties in the accurate assessment of hepcidin require studies with uniform methodology to determine the clinical feasibility of this macromolecule [28,37].

**Table 2.** New biomarkers of processes involved in myeloma-associated complications with a focus on ferric management and anaemia.

Biomarker	Sample	Characteristics
Hepcidin25 [28,37]	serum, urine	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 25 amino acid peptide hormone</li> <li>○ sources of hepcidin include hepatocytes (major), activated neutrophils and macrophages</li> <li>○ acts on ferroportin, leading to its degradation, which may restrict the iron available for erythropoiesis</li> <li>○ clearance through cellular degradation and the kidney route</li> <li>○ serum levels correlate well with the urinary form [37] and with ferritin, which indicates its relationship with body iron stores</li> <li>○ systemic conditions (i.e., myeloma, inflammation and kidney disease), iron stores, iron intake and diurnal variability may affect hepcidin levels.</li> </ul>
GDF15 [38–41]	serum, urine	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ divergent member of the TGF-beta family</li> <li>○ bone marrow stromal cells may be a major source in MM, while serum concentrations correlate with bone marrow levels</li> <li>○ pro-inflammatory cytokines induce GDF15 expression in macrophages</li> <li>○ in vitro experiments of a hepatocyte system indicate GDF-15 may reduce mRNA expression of hepcidin, and thus contribute to anaemia</li> <li>○ serum concentrations may be affected by kidney function, and iron deficiency described as an “early response molecule to tissue injury” in the setting of cardiovascular disease, and shown to predict decline in glomerular filtration</li> <li>○ currently investigated in a wide range of diseases (neoplasms, cardiovascular, renal)</li> <li>○ prognostic role in AL amyloidosis recently reported</li> </ul>
sTfR [42–44]	serum, urine	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ single polypeptide chain</li> <li>○ reported to parallel total body mass of cellular TfR</li> <li>○ large studies have demonstrated normal distribution, and no relationship with age, nor gender</li> <li>○ changes in iron and immune status may affect sTfR levels</li> <li>○ sTfR are associated with the rate of erythropoiesis when there are adequate iron stores, irrespective of the effectiveness of the process</li> <li>○ in states of iron restriction, sTfR increases; which reflects ineffective erythropoiesis and up-regulation from the deficiency of the element. Conversely, in chronic disease erythropoiesis is not enhanced and sTfR are dependent on iron supply</li> <li>○ serum levels may be useful in differential of true and functional iron deficiency, assessment in inflammatory conditions and chronic disease, as well as monitoring of response to EPO</li> <li>○ different assays have various methodology and reference ranges (although WHO reference reagents have been developed), which underscores a careful cross-study comparison</li> </ul>

**Table 3.** Change in serum levels of hepcidin, GDF15, sTfR and zonulin with respect to renal disease, anaemia and multiple myeloma.

	MM	Anaemia	CKD
hepcidin 25	H	H	H
GDF15	H	H	H
sTfR	N/H	H	H
zonulin	unexamined	N	L

H—High; L—Low; N—Norm.

#### 4. Growth Differentiation Factor 15 (GDF15)

Growth differentiation factor 15 (GDF15) is considered a member of transforming growth factor beta (TGF-beta) superfamily, though it was also discovered to be highly expressed in erythroblasts, and therefore may play a major role in regulation of the erythroid lineage [39]. Multiple roles for inflammatory modulation (i.e., in an inhibitory capacity) and tumorigenesis (both pro- and antitumoral activity) have been proposed for GDF15, though its biological activity has not been elucidated [39]. GDF-15 has been associated with poor treatment response in MM, though survival analyses did not show an effect, possibly due to a small sample size of the investigation [45]. The ability GDF15 to contribute to anaemia's development may follow from its regulation of hepcidin expression. According to Tanno et al. [10], BMSCs produce GDF15 after direct contact with plasma cells. Abnormal secretion of GDF15 is observed from bone marrow stromal cells (BMSCs), and studies have focused on the unique role of the myeloma microenvironment in promoting clonogenic growth and self-renewal via GDF15 [10]. It has been noticed that aside from "overcrowding," there is functional impairment in hematopoietic stem and progenitor cells of myeloma, which is tied to TGF- $\beta$  signalling [16]. Preliminary studies have indicated the clinical potential of measuring GDF15 to predict disease progression and outcomes [10,41], which may also indirectly influence an assessment of anaemia, as reducing bone marrow infiltration by malignant cells should improve haematopoiesis.

Mei et al. [33] showed that the levels of GDF15 were significantly higher in MM patients than among healthy controls. In addition, MM patients with higher stage disease had substantially higher GDF15 levels. Moreover, the concentrations of GDF15 were significantly decreased in MM patients in complete remission, which implies the deleterious role of tumour burden in potentiating the development of end-organ complications. No correlation between the expression of GDF15 mRNA and serum ferritin level was observed, which may suggest that an interplay occurs downstream. It is valuable to consider the complementary findings of Tarkun et al. [45], who observed significantly higher levels of GDF15 in newly diagnosed MM patients ( $n = 35$ ), and negative correlations between GDF15 and haemoglobin. Corre et al. reported similar findings, and the personal research of this author has also indicated that recombinant GDF15 had a slightly-inhibitory in vitro effect on haematopoiesis [39,41]. These results are also consistent with those reported by Westhrin et al. [9], who described elevated serum concentrations of GDF15 in MM patients compared to controls. An increase in serum GDF15 levels by 1 ng/mL was associated with an increased risk of death of 1.187. Moreover, GDF15 was associated with osteolytic bone disease, which may suggest that GDF15 is a close surrogate of end-organ effects of MM [9]. Indeed, Windrichova et al. observed that GDF15 may be a new biomarker used in monitoring bone metastatic disease [46].

Corre et al. [41] reported on 131 MM patients, observing that GDF15 is associated with survival and may be a potential factor of treatment-refractory MM cells; for example, GDF15-induced resistance mainly to melphalan and bortezomib in stroma-dependent and stroma-independent MM cells. There was a lower probability of event-free and overall survival in patients with high levels of plasma GDF15. This data suggests that GDF15 may function as predictor of patient survival in MM.

Lukaszzyk et al. [36] observed that patients with early stages of CKD and functional iron deficiency had higher GDF15 serum levels in comparison to patients without iron deficiency. Zhao et al. [47]



examined 24 pre-treatment patients with MM and observed a positive correlation between serum GDF15 level and serum creatinine. These results are consistent with the findings of Tarkun et al. [45], who reported a strong association between serum GDF15 level and creatinine. Lukaszzyk et al. [48] examined variations of serum GDF15 level in 87 patients with early stages of chronic kidney disease (CKD). According to this study, patients  $\geq 65$  years old and with anaemic status had increased serum concentrations of GDF15, which in itself correlated with haemoglobin and glomerular filtration. Moreover, haemoglobin was described as a potential predictor of GDF15.

According to Mei et al. [33], concentrations of serum hepcidin and GDF15 are similar in patients with MM. This study revealed significantly elevated serum hepcidin and GDF15 levels not only in MM patients as a whole, but also in subgroups depending on disease stage. Both serum hepcidin and GDF15 levels were significantly decreased in MM patients after effective treatment. However, direct association between these two biomarkers was not analysed. These findings lead us to propose that both GDF15 and hepcidin have to be considered with the primary disease in mind; our understanding extrapolated from other diseases, even anaemia of chronic disease, may lack consideration of stimuli originating from a malignant plasma clone.

### 5. Soluble Transferrin Receptor (sTfR)

Iron, despite being an essential element for life, can be also toxic by its influence on oxygen radical production. The body's protective mechanism to prevent iron-associated toxicity is found in transferrin, an iron transport protein in blood, and transferrin receptor (TfR) binding to iron-loaded transferrin and internalizing it by endocytosis. Of two TfR types, TfR1 is more important in anaemia associated with MM. TfR1 has higher affinity for transferrin and is overexpressed on cells with a high rate of proliferation, including malignant hematopoietic neoplasms; conversely, TfR2 is notably restricted to hepatocytes [6]. Nevertheless, Takubo et al. [49] reported that in a study of 82 patients with hematologic malignancies, significantly higher serum sTfR levels were not observed in MM, in contrast to other examined diseases, such as acute non-lymphocytic leukaemia, chronic myeloproliferative disorders, myelodysplastic syndrome and lymphomas.

In theory, sTfR measurement may be the most important biomarker to explain the etiology of anaemia in MM compared to more established biomarkers, such as serum ferritin, transferrin saturation, ferritin index (sTfR/log transferrin saturation), hypochromic reticulocytes and C-reactive protein (CRP). Using sTfR alone in the differential diagnosis of anaemia and the prediction of treatment response is of low predictive value. Using the sTfR/log value in ferritin index may help differentiate functional iron deficiency and ACD [50]. It is accepted that serum ferritin represents the iron storage compartment, and sTfR, the functional iron compartment. Katodritou et al. [11] reinforce this hypothesis in their study of 26 patients with newly diagnosed and anaemic MM patients (haemoglobin  $\leq 10.5$ g/dL): the combination of the ferritin index and hypochromic erythrocytes was predictive. This index may delineate the patients who will benefit from recombinant human EPO and identify functional iron deficiency requiring iron supplementation during diagnosis and early treatment stages. Łukaszzyk et al. [36] proved elevated sTfR serum levels in patients with functional iron deficiency. In that group, sTfR did not correlate with any of the inflammatory parameters. On the other hand, a strong correlation with renal function parameters in absolute iron deficiency was observed. Yin et al. [51] showed that sTfR serum levels can be used as a marker of erythropoiesis in CKD patients treated by high-flux haemodialysis.

Kostova et al. [52] examined 42 patients with MM and observed an inverse correlation between EPO and haemoglobin in patients with MM and preserved renal function, in contrast to those with renal insufficiency. Interestingly, 43% of patients without renal insufficiency (RI) and 85% of patients with renal insufficiency had inadequate EPO responses to anaemia. Inadequate sTfR response to anaemia was found in 76% of all patients. In both groups with and without renal insufficiency, a positive correlation between haemoglobin and sTfR was demonstrated. Alam et al. [53] reported on 140 patients with CKD and 44 healthy controls showing increased sTfR serum levels in line with CKD

stages. Similarly, ferritin and sTfR to ferritin ratio was decreased in advanced stages. This supports the concept that joint assessment of ferritin and sTfR is a valuable index of renal function in CKD.

## 6. Zonulin

Zonulin is a eukaryotic equivalent of the *Vibrio cholerae* zonula occludens toxin, which may reversibly regulate the intestinal permeability through altering intercellular tight junctions' function. Proteomic studies in human sera have shown that zonulin matches to the precursor of haptoglobin-2, while its ability to alter intestinal permeability seems to occur through transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) by its single-chain form [54]. The bodily function of haptoglobin is still not fully elucidated, though it seems to play a role in preventing oxidative injury by binding with haemoglobin [55]. Zonulin, in its cleaved, double-chain form has been characterized as a haemoglobin scavenger [54]. Studies report widespread expression of zonulin in the gastroesophageal mucosa [56]. Zonulin has also been implicated in diseases associated with altered intestinal barrier function, where it may play a role in tolerance and the immune response to antigens [57]. In the study of Kume et al., 80 obese children showed elevated serum zonulin levels [58]. A negative correlation of zonulin with HDL-C, and a positive one with leptin levels, were observed, even after adjustments for age and body mass index. Moreover, Ohlsson et al. studied a population of 363 subjects, demonstrating higher zonulin to be associated with higher waist circumference, diastolic blood pressure, fasting glucose and elevated risk of metabolic disorders [59]. In addition, serum concentrations of zonulin have been tied to inflammatory indices (tumour necrosis factor alpha and interleukin 6) and age, being reportedly higher in older ( $\geq 70$  years old) subjects [60]. Data on the dietary impacts on zonulin levels are inconclusive, to date [59].

Dschietzig et al. observed an association between serum zonulin levels and kidney failure [61]. In their study on 225 patients carrying automatic implantable cardioverters/defibrillators (AICD) for primary or secondary prevention, an inverse association was demonstrated between zonulin and serum creatinine levels. In the same study, examining a group of patients with diastolic or systolic chronic heart failure, no association was observed between zonulin levels and chronic heart failure severity [61]. Malyszko et al. aimed to establish the relationship between zonulin, iron status and anaemia in a study of kidney allograft recipients and healthy controls, observing that zonulin was substantially lower in the former group; was correlated with erythrocyte counts, haemoglobin and the haematocrit; but was not with iron parameters [55]. The authors discussed the potential significance of zonulin as a marker of impaired defensive mechanism, potentially tied to systemic inflammation, or an altered response to immune-suppressing therapy. Studies in early stages of CKD, which is often described as a state of subclinical inflammation, showed no correlations between zonulin and kidney function, though associations with interleukin-6 and hemojuvelin, a protein involved in hepcidin regulation and iron overload, were observed. However, subsequent studies showed that zonulin is not related to anaemic or inflammatory status in CKD, also underscoring the variability of serum zonulin under immune responses, which limits the clinical feasibility of singular blood-drawing assays [62]. To the best of our knowledge, no study on zonulin levels has been conducted in MM, while the physiological importance of this molecule still remains to be elucidated.

## 7. Conclusions

New biomarkers of ferric management, namely, soluble transferrin receptor (sTfR), growth differentiation factor 15 (GDF15) and hepcidin 25, may correlate with characteristics in the etiology and management of MM-associated anaemia. We anticipate that new biomarkers will be incorporated into routine diagnostic and prognostic evaluations and may lead to the development of biomarker-targeted therapeutic interventions. Early intervention may result in improved disease management and an increase quality of life.



**Author Contributions:** M.B., K.K., J.M. (Jolanta Malyszko) and D.H.V. conceived the study, were the major participants in its design and coordination and they prepared draft manuscript. K.M., A.J., M.Z., M.K., J.M. (Jacek Malyszko), K.B. and M.K. participated in study design and coordination. All authors drafted manuscript modifications and approved the final version of the manuscript.

**Funding:** Financial support was provided by a statutory grant K/ZDS/000597 from the Jagiellonian University Medical College to K.K.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.* **2017**, *67*, 7–30. [CrossRef]
2. Jurczynszyn, A.; Skotnicki, A. *Multiple Myeloma. Comprehensive Diagnostics and Therapy*, 1st ed.; Wydawnictwo Medyczne: Wrocław, Poland, 2010; ISBN 978-83-61257-29-5.
3. Kyle, R.A.; Gertz, M.A.; Witzig, T.E.; Lust, J.A.; Lacy, M.Q.; Dispenzieri, A.; Fonseca, R.; Rajkumar, S.V.; Offord, J.R.; Larson, D.R.; et al. Review of 1027 Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Mayo Clin. Proc.* **2003**, *78*, 21–33. [CrossRef]
4. Lenihan, D.J.; Potluri, R.; Bhandari, H.; Ranjan, S.; Chen, C. Evaluation of Cardiovascular Comorbidities Among Patients with Multiple Myeloma in the United States. *Blood* **2016**, *128*, 4794. [CrossRef]
5. National Registry of Malignancies: Multiple Myeloma and malignancies of plasma cells (C90). Available online: <http://onkologia.org.pl/szpiczak-mnogi-nowotwory-komorek-plazmatycznych-c90/> (accessed on 29 September 2019).
6. VanderWall, K.; Daniels-Wells, T.R.; Penichet, M.; Lichtenstein, A. Iron in multiple myeloma. *Crit. Rev. Oncog.* **2013**, *18*, 449–461. [CrossRef] [PubMed]
7. Haynes, R.J.; Read, S.; Collins, G.P.; Darby, S.C.; Winearls, C.G. Presentation and survival of patients with severe acute kidney injury and multiple myeloma: A 20-year experience from a single centre. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2010**, *25*, 419–426. [CrossRef] [PubMed]
8. IbricevicBalic, L.; IcindicNakas, E.; Hasic, S.; Kiseljakovic, E.; Sofohafizovic, A.; Balic, S. Dilemma: Correlation Between Serum Level of Hepcidin and IL-6 in Anemic Myeloma Patients. *Med. Arch.* **2016**, *70*, 429. [CrossRef] [PubMed]
9. Westhrin, M.; Moen, S.H.; Holien, T.; Mylin, A.K.; Heickendorff, L.; Olsen, O.E.; Sundan, A.; Turesson, I.; Gimsing, P.; Waage, A.; et al. Growth differentiation factor 15 (GDF15) promotes osteoclast differentiation and inhibits osteoblast differentiation and high serum GDF15 levels are associated with multiple myeloma bone disease. *Haematologica* **2015**, *100*, e511–e514. [CrossRef] [PubMed]
10. Tanno, T.; Lim, Y.; Wang, Q.; Chesi, M.; Bergsagel, P.L.; Matthews, G.; Johnstone, R.W.; Ghosh, N.; Borrello, I.; Huff, C.A.; et al. Growth differentiating factor 15 enhances the tumor-initiating and self-renewal potential of multiple myeloma cells. *Blood* **2014**, *123*, 725–733. [CrossRef] [PubMed]
11. Katodritou, E.; Speletas, M.; Zervas, K.; Kapetanios, D.; Georgiou, E.; Christoforidou, A.; Pavlitou, A.; Sion, M.; Christakis, J. Evaluation of Hypochromic Erythrocytes in Combination with sTfR-F Index for Predicting Response to r-HuEPO in Anemic Patients with Multiple Myeloma. *Lab. Hematol.* **2006**, *12*, 47–54. [CrossRef]
12. Fasano, A. Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 151–175. [CrossRef]
13. Ludwig, H.; Pohl, G.; Osterborg, A. Anemia in multiple myeloma. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* **2004**, *2*, 233–241. [PubMed]
14. Maes, K.; Nemeth, E.; Roodman, G.D.; Huston, A.; Esteve, F.; Freytes, C.; Callander, N.; Katodritou, E.; Tussing-Humphreys, L.; Rivera, S.; et al. In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2. *Blood* **2010**, *116*, 3635–3644. [CrossRef] [PubMed]
15. Silvestris, F.; Tucci, M.; Quatraro, C.; Dammacco, F. Recent Advances in Understanding the Pathogenesis of Anemia in Multiple Myeloma. *Int. J. Hematol.* **2003**, *78*, 121–125. [CrossRef] [PubMed]
16. Bruns, I.; Cadeddu, R.-P.; Brueckmann, I.; Fröbel, J.; Geyh, S.; Büst, S.; Fischer, J.C.; Roels, F.; Wilk, C.M.; Schildberg, F.A.; et al. Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **2012**, *120*, 2620. [CrossRef]

17. Jurczyszyn, A.; Skotnicki, A. *Multiple Myeloma. Selected Issues*, 1st ed.; Wydawnictwo Medyczne: Wrocław, Poland, 2011; ISBN 978-83-932189-0-5.
18. Birgegård, G.; Gascón, P.; Ludwig, H. Evaluation of anaemia in patients with multiple myeloma and lymphoma: Findings of the European CANCER ANAEMIA SURVEY. *Eur. J. Haematol.* **2006**, *77*, 378–386. [[CrossRef](#)]
19. Bladé, J.; Rosiñol, L. Renal, hematologic and infectious complications in multiple myeloma. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **2005**, *18*, 635–652. [[CrossRef](#)]
20. Terpos, E.; Kleber, M.; Engelhardt, M.; Zweegman, S.; Gay, F.; Kastiris, E.; van de Donk, N.W.C.J.; Bruno, B.; Sezer, O.; Broijl, A.; et al. European Myeloma Network Guidelines for the Management of Multiple Myeloma-related Complications. *Haematologica* **2015**, *100*, 1254–1266. [[CrossRef](#)]
21. Mittelman, M. The implications of anemia in multiple myeloma. *Clin. Lymphoma* **2003**, *4*, S23–S29. [[CrossRef](#)]
22. De Luisi, A.; Binetti, L.; Ria, R.; Ruggieri, S.; Berardi, S.; Catacchio, I.; Racanelli, V.; Pavone, V.; Rossini, B.; Vacca, A.; et al. Erythropoietin is involved in the angiogenic potential of bone marrow macrophages in multiple myeloma. *Angiogenesis* **2013**, *16*, 963–973. [[CrossRef](#)]
23. Fenaux, P.; Platzbecker, U.; Mufti, G.J.; Garcia-Manero, G.; Buckstein, R.; Santini, V.; Diez-Campelo, M.; Finelli, C.; Cazzola, M.; Ihan, O. The Medalist Trial: Results of a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled study of luspatercept to treat anemia in patients with very low-, low-, or intermediate-risk myelodysplastic syndromes (MDS) with ring sideroblasts (RS) who require red. *Blood* **2018**, *132*, 1. [[CrossRef](#)]
24. Jelkmann, W. Activin receptor ligand traps in chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2018**, *27*, 351–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Soleymanian, T.; Soleimani, A.; Musavi, A.; Mojtahedi, K.; Hamid, G. Outcome of patients with multiple myeloma and renal failure on novel regimens. *Saudi J. Kidney Dis. Transplant.* **2016**, *27*, 335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Liu, M.-M.; Xu, H.-Z.; Feng, X.-M.; Zhang, Y.; Liu, Y.-X. Clinical Research about Risk Factors and Reversible Predictors in Renal Impairment due to Multiple Myeloma. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **2015**, *23*, 722–727. [[PubMed](#)]
27. Ganz, T. Hepcidin. *Rinsho Ketsueki* **2016**, *57*, 1913–1917. [[PubMed](#)]
28. Subha Palaneeswari, M.; Ganesh, M.; Karthikeyan, T.; Devi, A.M.; Mythili, S.V. Hepcidin—Minireview. *J. Clin. Diagn. Res.* **2013**, *7*, 1767–1771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Sharma, S.; Nemeth, E.; Chen, Y.-H.; Goodnough, J.; Huston, A.; Roodman, G.D.; Ganz, T.; Lichtenstein, A. Involvement of Hepcidin in the Anemia of Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 3262–3267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Victor, M.; Evgeniy, H.; Gergana, T.; Julia, P.; Vasil, V.; Borislav, M.; Ivo, B.; Zlatina, G.; Kamen, T. Serum Hepcidin Levels in Multiple Myeloma. *Clin. Lab.* **2017**, *63*, 1273–1277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Han, X.; Zhou, D.-B.; Duan, M.-H.; Wang, X.; Zhang, J.-P.; Zhao, Y.-Q.; Shen, T.; Wu, Y.-J. Peripheral blood monocyte hepcidin in patients with multiple myeloma is associated with anemia of chronic disease. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **2013**, *21*, 403–409.
32. Han, X.; Zhou, D.-B.; Duan, M.-H.; Hua, B.-L.; Wang, X.; Zhang, J.-P.; Zhao, Y.-Q.; Shen, T.; Wu, Y.-J. C/EBP $\alpha$  in multiple myeloma patients may lead to increased hepcidin. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **2014**, *22*, 1316–1320.
33. Mei, S.; Wang, H.; Fu, R.; Qu, W.; Xing, L.; Wang, G.; Song, J.; Liu, H.; Li, L.; Wang, X.; et al. Hepcidin and GDF15 in anemia of multiple myeloma. *Int. J. Hematol.* **2014**, *100*, 266–273. [[CrossRef](#)]
34. Katodritou, E.; Ganz, T.; Terpos, E.; Verrou, E.; Olbina, G.; Gastari, V.; Hadjiaggelidou, C.; Varthaliti, M.; Georgiadou, S.; Westerman, M.; et al. Sequential evaluation of serum hepcidin in anemic myeloma patients: Study of correlations with myeloma treatment, disease variables, and anemia response. *Am. J. Hematol.* **2009**, *84*, 524–526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Haraguchi, K.; Uto, H.; Ohnou, N.; Tokunaga, M.; Tokunaga, M.; Utsunomiya, A.; Hanada, S.; Tsubouchi, H. Serum prohepcidin levels are potential prognostic markers in patients with multiple myeloma. *Exp. Ther. Med.* **2012**, *4*, 581–588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Łukaszyk, E.; Łukaszyk, M.; Koc-Żórawska, E.; Tobolczyk, J.; Bodzenta-Łukaszyk, A.; Małyszko, J. Iron Status and Inflammation in Early Stages of Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Press. Res.* **2015**, *40*, 366–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



37. Ganz, T.; Olbina, G.; Girelli, D.; Nemeth, E.; Westerman, M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood* **2008**, *112*, 4292–4297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Nair, V.; Robinson-Cohen, C.; Smith, M.R.; Bellovich, K.A.; Bhat, Z.Y.; Bobadilla, M.; Brosius, F.; de Boer, I.H.; Essioux, L.; Formentini, I.; et al. Growth Differentiation Factor–15 and Risk of CKD Progression. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**, *28*, 2233–2240. [[CrossRef](#)]
39. Corre, J.; Hébraud, B.; Bourin, P. Concise review: Growth differentiation factor 15 in pathology: A clinical role? *Stem Cells Transl. Med.* **2013**, *2*, 946–952. [[CrossRef](#)]
40. Kastritis, E.; Papassotiriou, I.; Merlini, G.; Milani, P.; Terpos, E.; Basset, M.; Akalestos, A.; Russo, F.; Psimenou, E.; Apostolakou, F.; et al. Growth differentiation factor-15 is a new biomarker for survival and renal outcomes in light chain amyloidosis. *Blood* **2018**, *131*, 1568–1575. [[CrossRef](#)]
41. Corre, J.; Labat, E.; Espagnolle, N.; Hébraud, B.; Avet-Loiseau, H.; Roussel, M.; Huynh, A.; Gadelorge, M.; Cordelier, P.; Klein, B.; et al. Bioactivity and Prognostic Significance of Growth Differentiation Factor GDF15 Secreted by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Multiple Myeloma. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 1395–1406. [[CrossRef](#)]
42. Worwood, M. Serum transferrin receptor assays and their application. *Ann. Clin. Biochem.* **2002**, *39*, 221–230. [[CrossRef](#)]
43. Petzer, V.; Theurl, I.; Weiss, G. Established and Emerging Concepts to Treat Imbalances of Iron Homeostasis in Inflammatory Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* **2018**, *11*, 135. [[CrossRef](#)]
44. Speeckaert, M.M.; Speeckaert, R.; Delanghe, J.R. Biological and clinical aspects of soluble transferrin receptor. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2010**, *47*, 213–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Tarkun, P.; Birtas Atesoglu, E.; Mehtap, O.; Musul, M.M.; Hacıhaneftoglu, A. Serum Growth Differentiation Factor 15 Levels in Newly Diagnosed Multiple Myeloma Patients. *Acta Haematol.* **2014**, *131*, 173–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Windrichova, J.; Fuchsova, R.; Kucera, R.; Topolcan, O.; Fiala, O.; Finek, J.; Slipkova, D.; Karlikova, M.; Svobodova, J. Testing of a Novel Cancer Metastatic Multiplex Panel for the Detection of Bone-metastatic Disease—A Pilot Study. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 1973–1978. [[PubMed](#)]
47. Zhao, N.; Yang, J. Expression of serum GDF15 and its clinical significance in multiple myeloma patients. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **2014**, *39*, 270–275. [[PubMed](#)]
48. Lukaszzyk, E.; Lukaszzyk, M.; Koc-Zorawska, E.; Bodzenta-Lukaszzyk, A.; Malyszko, J. GDF-15, iron, and inflammation in early chronic kidney disease among elderly patients. *Int. Urol. Nephrol.* **2016**, *48*, 839–844. [[CrossRef](#)]
49. Takubo, T.; Kumura, T.; Nakao, T.; Nakamae, H.; Aoyama, Y.; Nishiki, S.; Kinoshita, Y.; Koh, K.-R.; Ohta, K.; Yamane, T.; et al. Clinical Usefulness of Combined Measurements of Serum Soluble Transferrin Receptor Levels and Serum Interleukin-18 Levels at Determination of Serum KL-6 Levels in Haematologic Malignancies. *Acta Haematol.* **2000**, *104*, 141–143. [[CrossRef](#)]
50. Müller, T.; Kalea, A.Z.; Marquez, A.; Hsieh, I.; Haque, S.; Ye, M.; Wysocki, J.; Bader, M.; Battle, D. Apelinergic system in the kidney: Implications for diabetic kidney disease. *Physiol. Rep.* **2018**, *6*, e13939. [[CrossRef](#)]
51. Yin, P.; Song, Y.; Li, J. Soluble transferrin receptor as a marker of erythropoiesis in patients undergoing high-flux hemodialysis. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **2017**, *17*, 333–338. [[CrossRef](#)]
52. Kostova, G.; Siljanovski, N. Inadequate erythropoietin production (epo) in patients with multiple myeloma. *Prilozi* **2004**, *25*, 53–66.
53. Alam, F.; Fatima, S.S.; Noor, S.; Bilal, A.; Rehman, R. Stages of chronic kidney disease and soluble Transferrin Receptor (sTfR), Ferritin, ratio. *J. Pak. Med. Assoc.* **2017**, *67*, 848–851.
54. Tripathi, A.; Lammers, K.M.; Goldblum, S.; Shea-Donohue, T.; Netzel-Arnett, S.; Buzzza, M.S.; Antalis, T.M.; Vogel, S.N.; Zhao, A.; Yang, S.; et al. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16799–16804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Malyszko, J.; Koc-Zorawska, E.; Levin-Iaina, N.; Malyszko, J. Zonulin, Iron Status, and Anemia in Kidney Transplant Recipients: Are They Related? *Transplant. Proc.* **2014**, *46*, 2644–2646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Wex, T.; Mönkemüller, K.; Kuester, D.; Fry, L.; Kandulski, A.; Malfertheiner, P. Zonulin is not increased in the cardiac and esophageal mucosa of patients with gastroesophageal reflux disease. *Peptides* **2009**, *30*, 1082–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Fasano, A. Leaky Gut and Autoimmune Diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2012**, *42*, 71–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Küme, T.; Acar, S.; Tuhan, H.; Çatlı, G.; Anık, A.; Gürsoy Çalan, Ö.; Böber, E.; Abacı, A. The Relationship between Serum Zonulin Level and Clinical and Laboratory Parameters of Childhood Obesity. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* **2017**, *9*, 31–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Ohlsson, B.; Orho-Melander, M.; Nilsson, P. Higher Levels of Serum Zonulin May Rather Be Associated with Increased Risk of Obesity and Hyperlipidemia, Than with Gastrointestinal Symptoms or Disease Manifestations. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 582. [[CrossRef](#)]
60. Qi, Y.; Goel, R.; Kim, S.; Richards, E.M.; Carter, C.S.; Pepine, C.J.; Raizada, M.K.; Buford, T.W. Intestinal Permeability Biomarker Zonulin is Elevated in Healthy Aging. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **2017**, *18*, 810. [[CrossRef](#)]
61. Dschietzig, T.; Boschann, F.; Ruppert, J.; Armbruster, F.; Meinitzer, A.; Bankovic, D.; Mitrovic, V.; Melzer, C. Plasma Zonulin and its Association with Kidney Function, Severity of Heart Failure, and Metabolic Inflammation. *Clin. Lab.* **2016**, *62*, 2443–2447. [[CrossRef](#)]
62. Lukaszyc, E.; Lukaszyc, M.; Koc-Zorawska, E.; Bodzenta-Lukaszyc, A.; Malyszko, J. Zonulin, inflammation and iron status in patients with early stages of chronic kidney disease. *Int. Urol. Nephrol.* **2018**, *50*, 121–125. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Research Article

## Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma

Małgorzata Banaszkiewicz,<sup>1</sup> Jolanta Małyško,<sup>2</sup> Krzysztof Batko,<sup>1</sup> Ewa Koc-Żórawska,<sup>3</sup> Marcin Żórawski,<sup>4</sup> Paulina Dumnicka,<sup>5</sup> Artur Jurczyszyn,<sup>6</sup> Karolina Woźniwodzka,<sup>1</sup> Joanna Tisończyk,<sup>5</sup> Marcin Krzanowski,<sup>1</sup> Jacek Małyško,<sup>7</sup> Anna Waszczuk-Gajda,<sup>8</sup> Ryszard Drożdż,<sup>5</sup> Marek Kuźniewski,<sup>1</sup> and Katarzyna Krzanowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chair and Department of Nephrology, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

<sup>2</sup>Department of Nephrology, Dialysis and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>3</sup>Second Department of Nephrology and Hypertension with Dialysis Unit, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

<sup>4</sup>Department of Clinical Medicine, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

<sup>5</sup>Department of Medical Diagnostics, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

<sup>6</sup>Chair and Department of Hematology, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

<sup>7</sup>First Department of Nephrology and Transplantology with Dialysis Unit, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

<sup>8</sup>Department of Hematology, Oncology and Internal Diseases, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

Correspondence should be addressed to Katarzyna Krzanowska; [kasijanda@op.pl](mailto:kasijanda@op.pl)

Received 15 June 2020; Revised 17 August 2020; Accepted 9 October 2020; Published 21 October 2020

Academic Editor: Shin-ichi Yokota

Copyright © 2020 Małgorzata Banaszkiewicz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Growth differentiation factor 15 (GDF-15), a member of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily, participates in processes associated with myeloma development and its end-organ complications. It plays a significant role in both physiological and abnormal erythropoiesis and regulates iron homeostasis through modulation of hepcidin. It is abnormally secreted in marrow stromal cells of patients with multiple myeloma (MM), which may reflect the tumor microenvironment. We analyzed the associations of serum GDF-15 with clinical characteristics of 73 MM patients (including asymptomatic MM) and the laboratory indices of renal function, anemia, and inflammation. Baseline serum GDF-15 was studied as the predictor of two-year survival. We defined five clinically relevant subgroups of patients (symptomatic MM only, patients with and without remission, patients on chemotherapy, and without treatment). Increased GDF-15 concentrations were associated with more advanced MM stage, anemia, renal impairment (lower glomerular filtration and higher markers of tubular injury), and inflammation. Most of the results were confirmed in the subgroup analysis. Serum cystatin C and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin were associated with GDF-15 independently of other variables. In the studied MM patients, GDF-15 did not significantly predict survival ( $p=0.06$ ). Our results suggest that serum GDF-15 reflects myeloma burden and shares a relationship with several markers of prognostic significance, as well as major manifestations.

### 1. Introduction

Multiple myeloma (MM) is a common malignant condition resulting from a clonal proliferation of plasma cells in the bone marrow, which manifests itself with organ involvement, such as bone disease, anemia, and renal failure [1]. Unfortu-

nately, despite several therapeutic advances introduced in recent years, MM remains an incurable condition for the majority of patients ([2, 3]; T. [4]). The disease microenvironment (ME) has become a focus of research, in which cellular interactions, growth factors, and cytokines have emerged as targets of interest [1]. Growth differentiation

factor 15 (GDF-15; also known as macrophage inhibitory cytokine 1) has been recognized among the top interest cancer biomarkers [5]. The potential utility of GDF-15 in malignant neoplastic disease can be drawn from its unique characteristics of being a downstream target of tumor suppressor p53, with its only physiological presence at high levels in the placenta [6]. However, GDF-15 is also considered a divergent member of the transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) family, which is induced in response to factors instigating cellular stress (e.g., hypoxia, tissue injury, and inflammation). These characteristics of GDF-15 suggest its increased concentration may be considered as an integrative, general marker for disease severity and mortality [6, 7].

Studies have attempted to elucidate the complex landscape of the myeloma ME. Schneiderova et al. [8] utilized an array of 92 cancer biomarkers among patients with overt myeloma and its premalignant stage, as well as an assessment following autologous stem cell transplant (auto-SCT). Pro-survival and chemoprotective factors were identified using highly sensitive immunoassays, among which GDF-15 was a prominent molecule, significantly enhanced in MM when comparing to monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). Westhrin et al. studied the potential of GDF-15, through its involvement with osteoclast differentiation, as a serum marker for bone lesions in MM [9]. Subsequent studies by Windrichova et al. utilized multiplex analytic technology to identify novel biomarkers for metastatic bone lesions, discerning GDF-15 as the most prominent biomarker [10]. It has been argued that improved understanding of the relationships between neoplastic plasmacytes and cells and factors constituting a disease-defining ME (interactions between the bone marrow and neoplastic cells, secretion of cytokines, survival, and growth factors) may elucidate myeloma pathophysiology, including mechanisms responsible for treatment failure [8].

Corre et al. (J. [11]) reported that among several established prognostic factors (including staging according to the International Staging System—ISS), in multivariate analysis, GDF-15 remained the only significant predictor of event-free survival, while *in vitro* experiments showed pretreatment with GDF-15 leads to improved survival of both stroma-dependent and independent MM cells when exposed to staple drugs in the MM treatment armamentarium (i.e., melphalan, bortezomib, lenalidomide). Furthermore, Mei et al. previously reported that both plasma GDF-15 concentrations and mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were enhanced in ISS-III when comparing with stages I-II [12]. Taken together, the data presented in the literature support the relationship of GDF-15 with myeloma burden and disease progression.

Considering the attention that GDF-15 has received as a potential prognostic biomarker in neoplastic disease, we examined the serum concentrations of GDF-15 in an ambulatory population within the continuum of MM, ranging from asymptomatic up to overt MM (staged according to ISS). Our aim was to assess the relationships between the serum concentrations of GDF-15 and the disease characteristics defining the clinically relevant subgroups of patients. Moreover, we studied the correlations between GDF-15 and

the acclaimed and emerging biomarkers of important clinical manifestations of MM, i.e., anemia and renal impairment. Finally, we searched for the association between serum GDF-15 and mortality in a heterogeneous group of MM patients.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Study Design and Patients.** Patients were recruited using convenience sampling during ambulatory control visits at the Departments of Hematology and Nephrology of the University Hospital in Kraków, Poland, between August 2016 and October 2017. The inclusion criteria were (1) age  $\geq$  18 years and (2) a diagnosis of SMM or MM according to the International Myeloma Working Group. Patients were excluded if any of the following were present: recent active infection; a history of hepatitis B, C, HIV; and neoplasms other than myeloma. Twenty-one healthy volunteers among physicians and medical staff (11 women, 10 men) aged between 24 and 69 years were recruited into the control sample. Physicians collected detailed history from all patients, which was supplemented by data from the available medical records. The data collected at the initial study visit included the age and sex, the date of initial diagnosis of SMM or MM, the current diagnosis, the results of bone imaging, and the information about past and present treatment including the response to treatment (CR, PR, SD, PD). In November 2018, the follow-up data were collected on mortality.

The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and in compliance with the International Conference on Harmonization/Good Clinical Practice regulations. The study was approved by the Bioethics Committee of the Jagiellonian University, and all patients signed an informed consent for participation in the study.

**2.2. Blood Samples and Laboratory Tests.** Blood samples were obtained from patients at study inclusion. The blood samples of both patients and control subjects were collected in the morning following overnight fasting and rest. Routine laboratory tests were performed on the day of blood collection and included complete blood counts, serum concentrations of creatinine, iron, total protein, albumin,  $\beta$ 2-microglobulin, free light chains, serum activity of lactate dehydrogenase, and urine concentrations of light chains.

In all patients, the aliquots of serum samples and urine samples were frozen and used for nonroutine laboratory tests, including the serum concentrations of GDF-15, IL-6, cystatin C, hepcidin, and N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide and urine concentrations of NGAL monomer and cystatin C.

The Sysmex XE 2100 analyser (Sysmex, Kobe, Japan) was used for complete blood counts. The routine biochemical tests were carried out using automatic biochemical analysers: Hitachi 917 (Hitachi, Japan) and Modular P (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The eGFR was calculated based on serum creatinine using the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) formula: 
$$\text{eGFR} = (186 \times \text{serum creatinine } (\mu\text{mol/l}) \times 0.0113)^{-1.154} \times \text{age}^{-0.203} \times 114 (\times 0.742 \text{ for women}).$$
 The concentration of serum



FLC, urine LC ( $\kappa$  and  $\lambda$  type), and  $\beta$ 2-microglobulin were measured by the immunonephelometric method on a BN II analyser (Siemens GmbH, Germany). The determination of free light chains (FLC K, FLC  $\Lambda$ ) was performed using FreeLite reagents (Binding Site, Birmingham, UK) with reference ranges of 1.7–3.7 g/l and 0.9–2.1 g/l, respectively. The immunophenotype of monoclonal protein was determined by serum immunofixation (IFE) on agarose gel (EasyFix G26, Interlab, Italy).

The nonroutine laboratory tests were performed in series, using commercially available immunoenzymatic test kits. Serum IL-6 was measured using the Quantikine ELISA Human IL-6 Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA), with the minimum detectable dose of 0.70 pg/ml and the intra- and interassay precision of 2.0% and 3.8%, respectively. The reference range for IL-6 was 3.13–12.5 pg/ml. Serum GDF-15 was measured using the Quantikine ELISA Human GDF-15 Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA), with the minimum detectable dose ranging from 0.0 to 4.4 pg/ml and the intra- and interassay precision of 2.8% and 5.6%, respectively. The reference range for GDF-15 was 337–1060 pg/ml. Serum hepcidin 25 levels were measured using the Hepcidin 25 human Cet. No. S-1337 kit (Peninsula Laboratories International, Inc., San Carlos, USA). The reference range for hepcidin 25 is 0.02–25 pg/ml. Urine NGAL monomer was assessed using the Human NGAL monomer-specific ELISA kit (BioPorto Diagnostics A/S, Hellerup, Denmark), with the minimum detectable dose of 10 pg/ml. The detection range for NGAL 10–1000 pg/ml. NT-pBNP concentrations in serum were measured by the Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For NT-ProBNP Human (Cloud-Clone Corporation, Huston, USA), with the minimum detectable dose of 11.7 pg/ml, the quantification range of 30.9–2.500 pg/ml, and the intra- and interassay precision of 10% and 12%, respectively. Cystatin C concentrations in urine and serum were measured using Human Cystatin C ELISA (BioVendor Research and Diagnostic Products, Brno, Czech Republic), with the detection range of 0.25–25 ng/ml and the intra- and interassay precision of 3.5% and 10.4%, respectively.

This study was conducted with the use of the equipment purchased by the Medical University of Białystok as part of the RPOWP 2007–2013 funding, Priority I, Axis 1.1, contract No. UDA-RPPD.01.01.00–20–001/15–00 dated 26.06.2015.

**2.3. Statistical Analysis.** The number of patients and the percentage of the studied group were reported for categories. Mean  $\pm$  standard deviation was reported for normally distributed and median (lower-upper quartile) for nonnormally distributed quantitative variables. Shapiro-Wilk's test was used to assess normality. The GDF-15 concentrations (a non-normally distributed variable) were compared between subgroups using Mann-Whitney's test (two subgroups) or Kruskal-Wallis ANOVA (more than two subgroups). The boxplots illustrating the differences between subgroups show the median (central line), interquartile range (box), nonoutlier range (whiskers), and outliers (points) in each subgroup. The Spearman rank correlation coefficient was used to assess simple correlations of GDF-15. Right-skewed variables were

transformed using normal logarithm (ln) to increase the readability of the scatterplots illustrating the simple correlations. Also, ln-transformed right-skewed variables were used to calculate linear regression models presented in Table 1. Simple and multiple Cox proportional hazard regression was used to study the predictors of overall mortality. In general, the regression models (linear and Cox) were constructed using predictor variables that were significantly associated with the outcome variable in the simple analysis. In case of multiple intercorrelated predictor variables (linear regression), we chose the ones that were most strongly correlated with the dependent variable. The statistical tests were two-tailed, and  $p < 0.05$  indicated statistical significance. Statistica 12.0 (StatSoft, Tulsa, USA) was used for computations.

### 3. Results

**3.1. Demographic and Clinical Characteristics of the Studied Patients with Multiple Myeloma.** The prospective study recruited patients diagnosed with MM, assessed during their control ambulatory visits between August 2016 and October 2017. Seventy-three patients with MM (35 women, 38 men) aged between 29 and 90 years were enrolled in the study (Table 2). Smoldering myeloma (SMM) was diagnosed in six patients and MM in 67 patients. Most patients were in stage I according to the International Staging System (ISS) (Table 2) [13]. Except for 8 patients (including the subjects diagnosed with SMM), all patients underwent at least one line of treatment, and over one-third underwent autologous bone marrow transplantation before entering the study. At the start of the study, roughly 70% of patients were in complete or partial remission (Table 2).

Bone lesions were observed in 60% of patients (Table 2). Six patients experienced acute kidney injury prior to enrollment, and the estimated glomerular filtration rate (eGFR) below 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> was observed in 26 patients (36%) at recruitment (Table 3). Nearly one-fifth of the patients had low hemoglobin concentrations at the start of the study (Table 3).

**3.2. Circulating GDF-15 Is Elevated in Multiple Myeloma and Associated with ISS Stage.** Twenty-one healthy volunteers matched with the patients according to sex (8 women, 13 men;  $p = 0.3$  versus studied group) and age range (39 to 66 years) were recruited to provide blood samples in order to obtain reference values for nonroutine biomarker assays. Aside from GDF-15 and IL-6, the remaining markers (Table 4) were not significantly altered in MM patients when compared to healthy reference subjects. Although the mean age of controls ( $51 \pm 9$  years) was lower compared to the studied group ( $p < 0.001$ ); the differences in GDF-15 ( $p = 0.018$ ) and interleukin 6 ( $p = 0.049$ ) concentrations between MM patients and controls were independent of age.

The serum concentrations of GDF-15 were positively correlated with the ISS stage ( $R = 0.65$ ;  $p < 0.001$ ) and differed significantly between patients across stages of MM (Figure 1(a)). In post hoc comparisons, patients with ISS stage II or III differed significantly from those with smoldering myeloma or stage I MM, and only patients with

TABLE 1: Multiple regression models showing the independent predictors of serum GDF-15 among the studied patients with MM. The right-skewed variables (including GDF-15) were ln-transformed before analysis.

Independent variable	Model 1		Model 2	
	Standardized regression coefficient $\pm$ standard error	<i>P</i> value	Standardized regression coefficient $\pm$ standard error	<i>P</i> value
SMM	-0.06 $\pm$ 0.09	0.5	Not included	-
ISS II	0.42 $\pm$ 0.10	<0.001	0.13 $\pm$ 0.09	0.1
ISS III	0.55 $\pm$ 0.09	<0.001	0.13 $\pm$ 0.09	0.2
SD/PD	-0.06 $\pm$ 0.10	0.5	Not included	-
On CTx treatment	0.25 $\pm$ 0.10	0.012	0.13 $\pm$ 0.07	0.07
Hemoglobin	Not included	-	-0.11 $\pm$ 0.08	0.2
ln (interleukin 6)	Not included	-	0.14 $\pm$ 0.08	0.08
ln (cystatin C)	Not included	-	0.43 $\pm$ 0.11	<0.001
ln (uNGAL)	Not included	-	0.25 $\pm$ 0.08	0.002
Whole model	Adjusted $R^2 = 0.44$	<0.001	Adjusted $R^2 = 0.70$	<0.001

CTx: chemotherapy; ISS: International Staging System for multiple myeloma; PD: progressive disease; SD: stable disease; SMM: smoldering myeloma; uNGAL: urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin.

smoldering MM did not differ significantly from controls. Patients with complete remission (CR) had lower GDF-15 concentrations than the rest of the group: the median (lower; upper quartile) of GDF-15 was 1029 (758; 1402) pg/ml in CR versus 1390 (925; 2466) pg/ml in the remaining patients ( $p = 0.013$ ). However, there were no significant differences regarding the GDF-15 concentrations between MM patients with partial remission (PR), stable disease (SD), or progressive disease (PD): 1545 (1014; 2216) pg/ml in PR; 910 (653; 3018) pg/ml in SD, and 1681 (1168; 2921) in PD ( $p = 0.7$ ). No statistically significant correlations were observed between circulating GDF-15 and age ( $R = 0.22$ ;  $p = 0.065$ ) as well as time from MM diagnosis ( $R = -0.16$ ;  $p = 0.2$ ). The patients who received maintenance chemotherapy treatment at the start of the study had higher circulating GDF-15 levels compared to those without treatment (Figure 1(b)); however, complete remission was more common in untreated patients (44% versus 10% among those receiving treatment;  $p = 0.002$ ). The details regarding treatment regimens (Table S1) and GDF-15 concentrations according to drugs used (Figure S1) are shown in Supplementary File.

In MM patients, serum GDF-15 positively correlated with the concentrations of involved (i.e.,  $\kappa$  in patients with monoclonal protein including  $\kappa$ -type light chains and  $\lambda$  in patients with  $\lambda$ -type monoclonal protein) free light chains in serum ( $R = 0.33$ ;  $p = 0.004$ ; Figure 2(a)) and involved light chains in urine ( $R = 0.35$ ;  $p = 0.002$ ) as well as with total ( $\kappa$  plus  $\lambda$ ) serum free light chains ( $R = 0.35$ ;  $p = 0.002$ ) and urine light chains ( $R = 0.37$ ;  $p = 0.001$ ). Moreover, GDF-15 concentrations were highly positively correlated with  $\beta_2$ -microglobulin ( $R = 0.67$ ;  $p < 0.001$ ; Figure 2(b)) and negatively with serum albumin ( $R = -0.52$ ;  $p < 0.001$ ). We defined five subgroups of patients according to important clinical features as recorded at the start of the study: (1) patients with symptomatic MM (i.e., after excluding those with SMM) ( $n = 67$ ), (2) patients in remission (CR/PR) ( $n = 52$ ) and (3)

those without remission (SD/PD) ( $n = 21$ ), and (4) patients receiving maintenance treatment ( $n = 30$ ) and (5) not receiving chemotherapy ( $n = 43$ ). In all subgroups, we confirmed positive correlations between GDF-15 and  $\beta_2$ -microglobulin, and negative correlations between GDF-15 and albumin. Free light chains in serum and light chains in urine correlated with GDF-15 in patients with symptomatic MM, in remission, and those not receiving chemotherapy (Table S2, Supplementary File).

**3.3. Circulating GDF-15 Is Associated with Anemia in Multiple Myeloma.** Serum GDF-15 concentrations were significantly higher in the studied patients with anemia and inversely correlated with blood hemoglobin and serum iron (Figures 3(a), 3(b), and 3(d)). The association between GDF-15 and blood hemoglobin was significant in all studied subgroups. Moreover, the association between GDF-15 and iron was confirmed in subgroup analyses: after excluding patients with SMM, in patients on chemotherapy and in patients with complete or partial remission. In the study group overall, a weak positive correlation was found between GDF-15 and serum hepcidin-25 (Figure 3(c)). In MM patients without remission (SD/PD), this association was much stronger ( $R = 0.56$ ;  $p = 0.008$ ), while in other subgroups, it was nonsignificant.

**3.4. Circulating GDF-15 Is Associated with Renal Function in Multiple Myeloma.** Higher GDF-15 concentrations were observed in patients with eGFR  $< 60$  ml/min/1.73m<sup>2</sup> as compared to patients with better kidney function ( $p < 0.001$ ; Figure 4(a)). Highly significant positive correlations were observed between serum GDF-15 and markers of glomerular filtration: serum creatinine ( $R = 0.57$ ;  $p < 0.001$ ) and serum cystatin C ( $R = 0.70$ ;  $p < 0.001$ ; Figure 4(b)). Consequently, negative correlations were observed between GDF-15 and eGFR values based on these markers ( $R = -0.54$ ,  $p < 0.001$ ;



TABLE 2: Demographic and clinical characteristics of patients at baseline.

Characteristic	MM patients ( <i>n</i> = 73)
Mean age $\pm$ standard deviation, years	69 $\pm$ 10
Male sex, <i>n</i> (%)	38 (52)
Median time since diagnosis of MM (lower; upper quartile), months	36 (17; 69)
Smoldering myeloma, <i>n</i> (%)	6 (8)
ISS stage I, <i>n</i> (%)	40 (55)
ISS stage II, <i>n</i> (%)	15 (21)
ISS stage III, <i>n</i> (%)	12 (16)
Immunophenotype	
IgG, <i>n</i> (%)	52 (71)
IgA, <i>n</i> (%)	17 (23)
IgM, <i>n</i> (%)	1 (1)
Biclonal, <i>n</i> (%)	2 (3)
Free light chains only, <i>n</i> (%)	1 (1)
Nonsecretory, <i>n</i> (%)	3 (4)
Disease state on the day of study visit	
CR, <i>n</i> (%)	22 (30)
PR, <i>n</i> (%)	30 (41)
SD, <i>n</i> (%)	6 (8)
PD, <i>n</i> (%)	15 (21)
Chemotherapy on the day of study visit	
On (maintenance) treatment, <i>n</i> (%)	30 (41)
No treatment, <i>n</i> (%)	43 (59)
Number of prior treatment schemes	
No treatment, <i>n</i> (%)	8 (11)
1, <i>n</i> (%)	17 (23)
2, <i>n</i> (%)	22 (30)
3 and more, <i>n</i> (%)	26 (36)
History of auto-PBSCT, <i>n</i> (%)	28 (38)
Bone lesions, <i>n</i> (%)	44 (60)
History of acute kidney injury, <i>n</i> (%)	6 (8)

CR: complete remission; Ig: immunoglobulin; ISS: International Staging System for multiple myeloma; MM: multiple myeloma; *n*: number of patients; PBSCT: peripheral blood stem cell transplant; PD: progressive disease; PR: partial remission; SD: stable disease.

and  $R = -0.67$ ,  $p < 0.001$ , respectively). These associations were confirmed in all studied subgroups of patients (after exclusion of SMM, with and without remission, on chemotherapy, and without chemotherapy). Moreover, in the study group overall, GDF-15 concentrations positively correlated with the studied markers of tubular injury: urine NGAL monomer (Figure 4(c)) and urine cystatin C ( $R = 0.24$ ;  $p = 0.040$ ), although the latter correlation was weak. Of note, urinary NGAL ( $R = -0.31$ ;  $p = 0.008$ ) but not urinary cystatin C was significantly correlated with eGFR. The association between GDF-15 and urine NGAL was significant in every subgroup, while the correlation between GDF-15 and urine cystatin C was only significant in patients without remission (SD/PD) ( $R = 0.51$ ;  $p = 0.016$ ).

**3.5. Other Variables Significantly Associated with Circulating GDF-15 in MM and Multiple Regression.** In the studied group, weak positive correlations were observed between

the marker of systemic inflammation, interleukin 6 (IL-6), and GDF-15 ( $R = 0.31$ ;  $p = 0.007$ ). Interestingly, the total white blood cell counts and GDF-15 ( $R = 0.27$ ;  $p = 0.022$ ) were significantly correlated. Both correlations were also significant after excluding subjects with SMM; moreover, GDF-15 was significantly correlated with IL-6 in subjects without remission and those not on chemotherapy.

Circulating GDF-15 was weakly positively correlated with serum NT-proBNP ( $R = 0.28$ ;  $p = 0.016$ ) in the whole studied group and after the exclusion of SMM patients.

Using the data of all the studied patients, we performed multiple regression analysis in order to assess which variables are associated with GDF-15 concentrations independently of each other (Table 1). Firstly, among the clinical characteristics describing MM state which were associated with GDF-15 in simple analysis, the ISS stage together with chemotherapy treatment status was identified as independent predictors of GDF-15 (Table 1, model 1). Secondly, laboratory data were

TABLE 3: Laboratory data of patients at baseline.

Characteristic	MM patients (n = 73)
Serum creatinine, $\mu\text{mol/l}$	89 (76; 104)
eGFR (MDRD), $\text{ml/min/1.73m}^2$	65.4 (49.6; 73.4)
>60 $\text{ml/min/1.73m}^2$ , n (%)	47 (64)
30-60 $\text{ml/min/1.73m}^2$ , n (%)	17 (23)
<30 $\text{ml/min/1.73m}^2$ , n (%)	9 (12)
Hemoglobin, g/dl	12.5 $\pm$ 1.8
Anemia (hemoglobin below lower reference limit), n (%)	14 (19)
Serum iron, $\mu\text{mol/l}$	15.3 $\pm$ 4.9
Serum lactate dehydrogenase, U/l	360 $\pm$ 74
Lactate dehydrogenase above higher reference limit, n (%)	5 (7)
Serum $\beta$ 2-microglobulin, mg/l	2.75 (2.17; 4.20)
Serum albumin, g/l	41.7 $\pm$ 4.5
Serum-free light chains	
$\kappa$ , mg/l	20.1 (13.0; 52.8)
$\lambda$ , mg/l	19.1 (13.5; 34.3)
Involved serum-free light chains, mg/l	38.3 (17.4; 106.0)
Urine light chains	
$\kappa$ , mg/l	ND (ND; 30.6)
$\lambda$ , mg/l	ND (ND; 7.6)
Involved urine light chains, mg/l	7.8 (ND; 39.0)
NT-proBNP, pg/ml	74.8 (31.6; 287.2)

Data are shown as median (lower; upper quartile) or mean  $\pm$  standard deviation unless otherwise specified. eGFR: estimated glomerular filtration rate; MDRD: Modification of Diet in Renal Disease; MM: multiple myeloma; ND: nondetectable; NT-proBNP: N-terminal pro-B-type natriuretic peptide.

TABLE 4: Laboratory results in MM patients as compared to control subjects.

Test	MM patients (n = 73)	Controls (n = 21)	p value
GDF-15, pg/ml	1259 (863; 1934)	584 (516; 762)	<0.001
Interleukin 6, pg/ml	2.97 (1.61; 6.00)	0.58 (0.19; 1.13)	<0.001
Hepcidin 25, ng/ml	28.8 (16.5; 44.6)	27.1 (20.0; 37.3)	0.9
Serum cystatin C, ng/ml	866 (689; 1287)	963 (874; 1038)	0.5
Urine cystatin C, ng/ml	56.0 (16.3; 105.5)	46.7 (26.5; 64.3)	0.5
Urine NGAL monomer, ng/ml	12.9 (5.7; 29.1)	8.7 (4.8; 11.0)	0.08

Data are shown as median (lower; upper quartile). GDF-15: growth differentiation factor 15; MM: multiple myeloma; NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin.

added to these predictors, and the markers of kidney function, i.e., serum cystatin C and urine NGAL monomer, were identified as significant predictors of serum GDF-15, independent of ISS, treatment status, hemoglobin, and interleukin 6 (Table 1, model 2).

**3.6. Association of GDF-15 with Mortality.** In November 2018, the follow-up data on all-cause mortality were collected. The median (lower; upper quartile) observation time in the studied group was 20 (16; 23) months, range from 1 to 25 months. During the observation period, 15 (21%) patients died. Two-year survival (calculated from recruitment into the study until death or the end of follow-up) was 79%. ISS stage (II or III versus I) and positive chemotherapy status on recruitment were identified as significant pre-

dictors of worse survival. GDF-15 (ln-transformed) was not significantly associated with overall survival, neither in simple analysis nor after adjustment for these predictors; however, the association was close to being statistically significant (Table 5). Notably, the direction of this association changed from negative in the simple analysis (HR higher than 1) to positive (HR below 1) after adjustment for the powerful predictors of survival, i.e., ISS and treatment status.

#### 4. Discussion

Renal failure, which is present in approximately 30% of newly diagnosed MM (NDMM) patients, is a major cause of early mortality, and an independent poor prognostic factor of survival. However, renal impairment (RI) is potentially

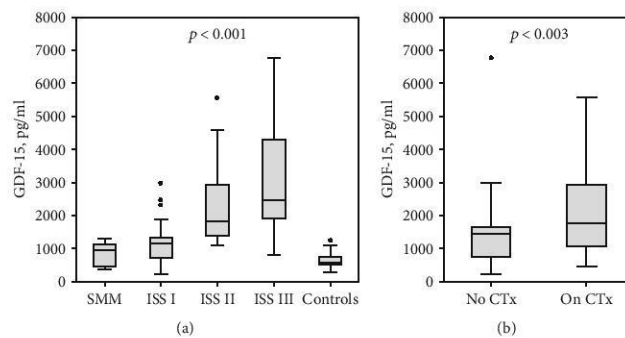


FIGURE 1: Serum GDF-15 concentrations according to incremental MM disease stages with reference controls (a) and among patients receiving no chemotherapy (CTx) treatment versus those on chemotherapy at baseline (b). Data are shown as median (horizontal line), interquartile range (box), nonoutlier range (whiskers), and outliers (points);  $p$  value is shown for overall comparison between groups. The numbers of patients in each group are reported in Table 2. SMM: smoldering myeloma; ISS: International Staging System for multiple myeloma.

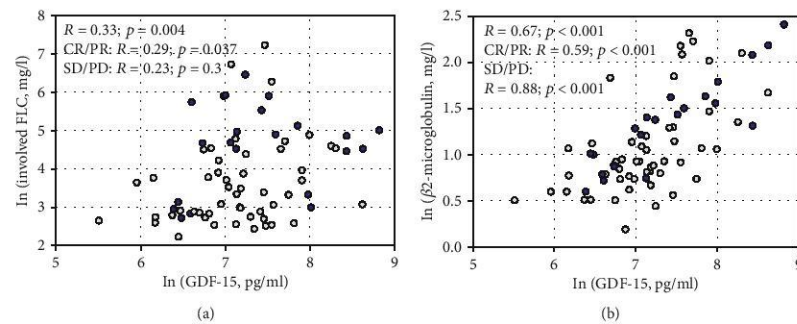


FIGURE 2: Correlations between serum GDF-15 concentrations and involved serum free light chains (FLC) (a) and  $\beta$ 2-microglobulin (b) in studied patients. Light circles represent patients with complete or partial remission (CR/PR), and dark circles represent patients without remission (stable disease or progressive disease, SD/PD). The right-skewed variables were transformed using the natural logarithm ( $\ln$ ) to enhance readability. The Spearman rank-order correlation coefficients ( $R$ ) in the whole studied group and the subgroups are shown with associated  $p$  values.

reversible in up to 50% of patients, which may improve long-term outcomes [14–16]. In the present study, circulating GDF-15 was highly correlated with markers of glomerular filtration (serum creatinine and cystatin C) as well as markers of tubular injury (urinary NGAL and cystatin C). Our salient finding is that serum cystatin C and urinary NGAL were the strongest and independent predictors of serum GDF-15. This could indicate a close link between the mechanisms underlying MM progression and renal complications.

Renal injury occurs from a variety of pathological mechanisms associated with the solubility and nephrotoxic profile of the circulating immunoglobulins and paraproteins, which may precipitate and form casts in distal tubules or induce a proinflammatory and profibrotic milieu when excess light chain endocytosis occurs [17, 18]. Lipocalin 2 (NGAL), an acute-phase molecule with iron-chelating features, characterized with sensitivity to early kidney damage (particularly of

tubular origin), and cystatin C, a freely filtered, proximally absorbed, and catabolized, nonsecreted protein, have both been identified as novel markers of RI in MM [19]. Potential utility in very early detection of RI may translate into prompt treatment and renal outcome improvement, though this has not yet been well studied [20–22]. It is noteworthy to consider the “Forest Fire Theory” of Mori and Nakano, which proposes NGAL as a marker indicative of real-time kidney damage, derived from continuous production by inflamed tubular cells, rather than as a consequence of nephron loss (which would be more accurately reflected in cystatin C concentrations) [23]. Moreover, plasma and urinary sources of NGAL may differ; injury in distal nephron segments leads to secretion into the urine, while plasma concentrations could also be derived from nonrenal sources (e.g., increased in inflammatory states) [24]. A response to kidney insult, rather than inflammation, seems to be the major inducer of

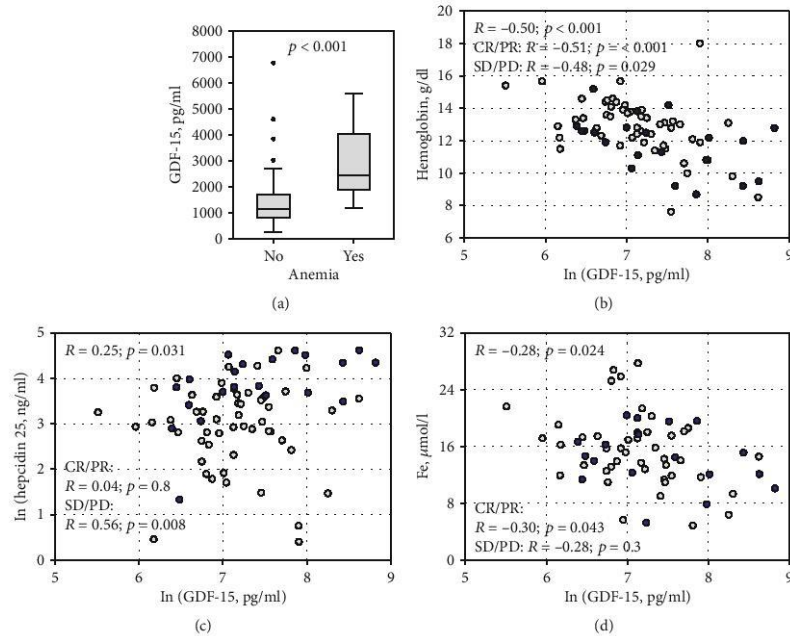


FIGURE 3: Serum GDF-15 concentrations among patients with ( $n=14$ ) and without ( $n=59$ ) anemia (a). Data are shown as median (horizontal line), interquartile range (box), nonoutlier range (whiskers), and outliers (points). Correlations between serum GDF-15 and blood hemoglobin (b), serum hepcidin 25 (c), and iron (d) in the studied patients. Light circles represent patients with complete or partial remission (CR/PR) and dark circles represent patients without remission (stable disease or progressive disease, SD/PD). The right-skewed variables were transformed using natural logarithm ( $\ln$ ) to enhance readability. The Spearman rank-order correlation coefficients ( $R$ ) in the whole studied group and the subgroups are shown with associated  $p$  values.

NGAL in MM, while a rise in both urinary NGAL and serum cystatin C may be indicative of a tubular-glomerular axis impairment, for which these molecules are respective markers [20]. Moreover, serum cystatin C levels have been noticed to be an independent prognostic factor for survival and correlate with advanced ISS stage [22]. Overall, we observed a strong relationship between novel indices of kidney injury and GDF-15. This may suggest that GDF-15 shares a close relationship with ongoing and/or permanent renal damage. In our analysis of patients on maintenance treatment, the trends between GDF-15 and markers of injury to kidney compartments were of strong significance and were less pronounced in the group of nontreated patients, where remission was more common. Whether GDF-15 is a key player in the processes shaping kidney injury or it is intertwined with myeloma progression and resulting end-organ sequelae remains to be established.

GDF-15 has been shown to increase the survival of stroma-dependent MM cells, though it is not produced by the neoplastic cells themselves, but rather by bone marrow (BM) mesenchymal stem cells. These stromal cells have been documented with an abnormal gene expression profile (termed “tumor ME genes”), which seems to support the

malignant clone and promote its proliferation and survival (J [25]; J. [11]). Subsequent studies have shown that BM stromal cells produce GDF-15 after direct contact with tumor cells, while GDF-15 strongly enhances their clonogenic growth and self-renewal (T. [4]). Earlier studies in newly diagnosed myeloma patients have established GDF-15 as a promising molecule of prognostic significance, with the potential to identify patients with poor response to therapy and worse prognosis (J. [11, 26]). Our study examined an ambulatory care sample of patients with MM, demonstrating that serum GDF-15 concentrations are significantly associated with myeloma characteristics, even in a diverse clinical population at various stages of disease (though the majority was in stage I according to ISS). This is supported by the relationships apparent across different patient subgroups (remission, stable, and progressive disease), which suggests that GDF-15 may be useful not only in the treatment-naïve patients but as an additional indicator of tumor burden, which we postulate to reflect the underlying myeloma micro-environment. Patients subjected to the maintenance chemotherapy have higher GDF-15 concentrations, with complete remission less common in these patients (10% vs. 44%), which may be explained by residual disease as a driver of



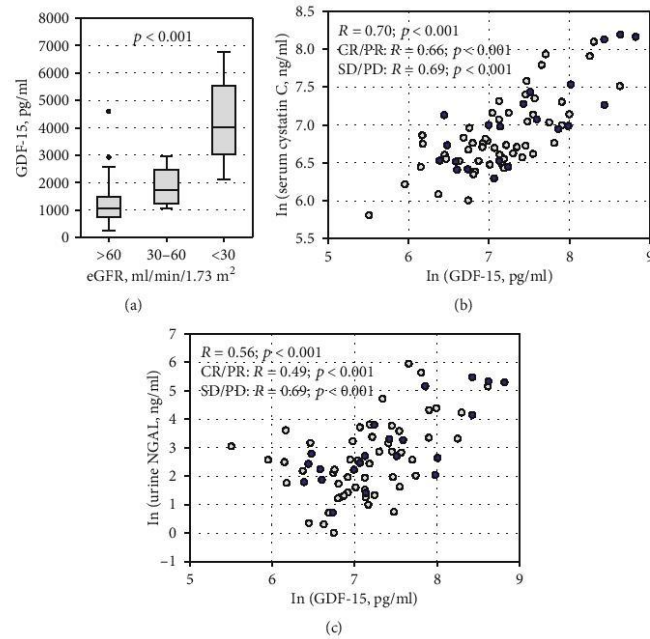


FIGURE 4: Serum GDF-15 concentrations among studied patients according to eGFR values: >60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (n = 47), 30-60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (n = 17), and <30 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (n = 9) (a). Data are shown as median (horizontal line), interquartile range (box), nonoutlier range (whiskers), and outliers (points). Correlations between serum GDF-15 and cystatin C (b) and urine NGAL (c). Light circles represent patients with remission, and dark circles represent patients without remission. The right-skewed variables were transformed using natural logarithm (ln) to enhance readability. Spearman rank-order correlation coefficients (R) in the whole studied group and the subgroups are shown with associated p values.

TABLE 5: Simple and multiple Cox proportional hazard regression models to predict the two-year overall survival of the studied patients with MM.

Independent variable	Simple regression		Multiple regression	
	Hazard ratio (95% confidence interval)	p value	Hazard ratio (95% confidence interval)	p value
ISS II or III	5.53 (1.76-17.39)	0.003	9.12 (2.05-40.72)	0.004
On CTx treatment	13.02 (2.93-57.95)	<0.001	15.02 (3.07-73.65)	<0.001
ln (GDF-15)	1.99 (0.97-4.08)	0.061	0.36 (0.12-1.04)	0.060

CTx: chemotherapy; GDF-15: growth differentiation factor 15; ISS: International Staging System for multiple myeloma.

higher circulating GDF-15 concentrations. Indeed, the differences in GDF-15 concentrations across different study groups were only evident when comparing complete remission with partial remission, stable, and progressive disease (significantly lower only in CR). This may indicate that in cases of partial vs. complete remission, the tumor microenvironment exerts a protective effect on myeloma cells, which is reflected in circulating GDF-15 concentrations similar to stable or progressive disease. GDF-15 may be a valuable molecule to investigate in biomarker-based models accounting for the complexity of myeloma biology. The characterization of myeloma risk and the patient phenotype, i.e., whether they

will benefit from a particular therapeutic strategy, is an important and pragmatic aspect of management [27]. However, cytogenetic and molecular characterization is not readily available or accessible in all centers; therefore, a relevant model of disease-based biomarkers is of relevance for routine practice.

A prior analysis of a group of 15 patients with MM showed that significantly longer progression-free survival was present in patients with decreasing GDF-15 levels (T. [4]). Similarly, other studies support the relationship between GDF-15 and prognostic significance, but the association with survival is controversial. The research by the team of Corre

et al. showed that lower plasma GDF-15 is associated with better event-free and overall survival, though this was not confirmed in subsequent studies (J. [11, 26]). However, in the study by Westhlin et al., lower serum GDF-15 was associated with improved survival, more advanced osteolytic bone disease, and a relationship with serum measures of osteoclast activity. Further in vitro experiments showed promotion of osteoclast differentiation and osteoblast inhibition, which together supports the role of GDF-15 in another cardinal myeloma feature—bone disease [9]. We were not able to confirm a significant association between circulating GDF-15 levels and overall two-year survival in regression models, and remarkably, the direction of the trend was reversed after accounting for disease stage and chemotherapy, which were strong determinants of poor survival. GDF-15 may therefore be a molecule reflecting myeloma burden as a consequence of the progressive disease, and therefore, its assessment throughout the management does not hold more favorable prognostic significance to the staging system itself.

Following the indications from pathogenesis, we evaluated whether GDF-15 shares a relationship with biomarkers involved in the development of its cardinal features (hepcidin as a regulatory molecule of anemia of chronic disease, IL-6 as a major myeloma cytokine, and novel molecules of tubular and glomerular injury). Correlations between markers of functional nephron loss (cystatin C, eGFR formulas) and active tubular injury (urinary NGAL) were much more pronounced in patients necessitating treatment (i.e., maintenance chemotherapy), which may indicate that circulating GDF-15 reflects the symptomatic character of diseases. BM stromal cells have been reported as a major source of interleukin 6, which is a key player of inflammatory pathways in myeloma [28, 29] and inducer of hepcidin [30], which further emphasizes the importance of the abnormal ME. Alongside the concept of BM “crowding out” by tumor cells, it has been demonstrated that hematopoietic stem and progenitor cells (particularly erythroid precursors) may be reduced from the functional impairment, which has been tied to the adverse tumor ME, and particularly TGF $\beta$  signaling [31]. GDF-15 may be a mediator of the tumor ME (J [25]; J. [11]).

The cellular targets and biological functions of GDF-15 are still being explored. The recent discovery of the brainstem-restricted receptor GFRAL [32] supports a primary role of GDF-15 as a signal of somatic distress for the central nervous system (CNS), with a regulatory effect on metabolic and anorectic activity [33]. GDF-15 also plays a part in the inflammatory response, and the work by the group of Luan et al. showed a GFRAL-related central metabolic adaptation via the regulation of sympathetic outflow and triglyceride metabolism [34]. Importantly, it has also been emphasized that the manifold actions ascribed to GDF-15 in prior research are limited by contamination of recombinant GDF-15 with TGF $\beta$  [33, 35, 36]. This indicates that the previous implication of GDF-15 effects on Smad2/3 activity or TGF $\beta$ RII requires caution and reappraisal [36]. On the other hand, it should also be noted that GDF-15 exerts direct effects on immune cells and its immunomodulatory capacity may be independent of centrally regulated mechanisms [36]. Further understanding of whether and if

the central (GFRAL) and peripheral (local, fast-acting) GDF-15-associated mechanisms exist and interact with myeloma biology is warranted.

These studies provide a preliminary rationale for studying GDF-15 as a purported marker of the tumor ME in MM. Our findings revealed a strong relationship between serum GDF-15 concentrations and the disease spectrum (ranging from SMM to ISS stage III MM), as well as correlations between circulating GDF-15 and indices of tumor burden (albumin,  $\beta$ 2-microglobulin), which fall in line with earlier reports ([26]; J. [11]). Patients in complete remission had significantly lower levels of GDF-15 when comparing with stable or progressive disease. However, these differences were marginally significant, which may also reflect an insufficient sample among subgroups.

Recombinant GDF-15 has been reported to inhibit hematopoiesis, which falls in line with negative correlations between hemoglobin and increasing levels of GDF-15 observed at present, as well as in prior works (Toshihiko [37]; Jill Corre, Hébraud, and Bourin 2013; J. [11]). The relationship between GDF-15 and markers of impaired hematopoiesis was confirmed in all studied subgroups, which confirms and extends the results of earlier studies. Moreover, the association of hepcidin with GDF-15, which may act as a regulatory molecule for the latter, is more pronounced in patients with stable or progressive disease, while the trend loses significance in remission. On the other hand, increased GDF-15 concentrations may also reflect more advanced or aggressive disease, which may more often lead to bone marrow impairment, and thus explain an association with lower hemoglobin levels. Whether the purported roles of GDF-15 remain independent of TGF $\beta$  activity (with respect to contamination of recombinant GDF) or are invalidated remains to be confirmed. The ability of GDF-15 to regulate erythropoiesis through the suppression of hepcidin, the main regulator of iron metabolism, has prompted further investigations, which have implied an alternating role of GDF-15 in the context of underlying stimuli (primary disease, inflammatory milieu, and status of iron metabolism) [38]. The liver produces hepcidin in response to inflammatory cytokines, such as interleukin 6, though this process is also influenced by iron availability, hypoxia, and erythropoietin (EPO) [38]. In previously untreated MM patients, or those not in remission, hepcidin and GDF-15 are overexpressed in peripheral blood mononuclear cells, with plasma concentrations of GDF-15, interleukin 6, EPO, and hepcidin noticeably elevated [12]. We observed that our patients had elevated levels of interleukin-6, suggesting an underlying, prevalent state of inflammation, which may have modestly elevated circulating GDF-15 levels. As opposed to the inhibitory effect associated with very high GDF-15 concentrations, moderate elevation may stimulate hepcidin and explain the positive relationship noted at present (Toshihiko [37]).

Induction of hepcidin by GDF-15 may potentially limit the availability of iron for hematopoiesis and provide an alternative explanation for the relationship with anemia. It should be noted that the majority of our patients achieved PR/CR and were subjected to treatment, likely decreasing the levels of hepcidin and GDF-15, which falls in line with

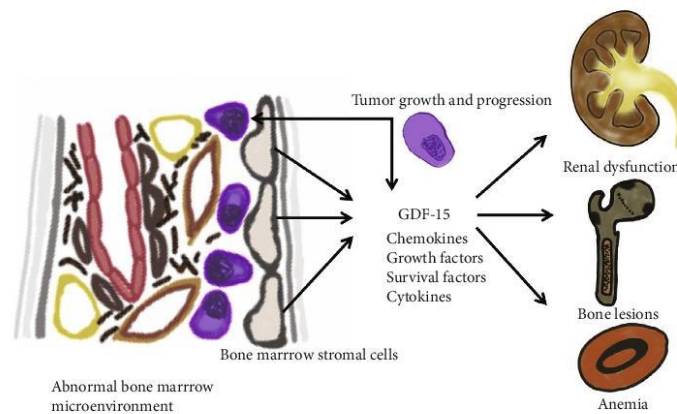


FIGURE 5: The proposed graphical representation of the bone marrow environment in multiple myeloma and end-organ involvement: abnormal bone marrow stromal cells release growth factors, cytokines, and survival factors (including GDF-15) following interactions with malignant plasma cells, which leads to uncontrolled tumor growth and progression. GDF-15 is associated with the development of the cardinal features of myeloma (anemia, renal impairment, and bone lesions), and it may be a mediator of pathways related to the development and progression of these complications.

the observations from earlier studies [12]. Malyszko et al. previously examined the relationship between iron homeostasis and GDF-15 in kidney allograft recipients showing a significant elevation of GDF-15 in patients with anemia, while concentrations of GDF-15 and hepcidin, an independent predictor of GDF-15, were raised overall [39].

In elderly individuals with anemia of unknown etiology, the moderate elevation of GDF-15 was observed, the latter being strongly correlated with kidney function (creatinine), which was surmised to indicate a mutual relationship between anemia and renal insufficiency [40]. Research has revealed that intrarenal expression of GDF-15 in the tubulointerstitial compartment correlates with its circulating levels, for which an increase in the latter may independently reflect renal function deterioration [41]. Large studies of the Framingham community have shown that GDF-15 is associated with new-onset renal disease and the decline in kidney function [42]. In AL amyloidosis, serum GDF-15 was recently revealed as the most significant prognostic measure for dialysis and a valuable addition to renal risk stratification [43]. The underlying mechanism of GDF-15 in both MM- and AL-related renal pathology is unclear, though in AL-amyloidosis, it has been suggested that GDF-15 plays a direct role in pathophysiology, and its production may be induced following a response to free light chain toxicity [43]. Similarly, we show that circulating GDF-15 correlates with the involved monoclonal light chains, and there is a significant relationship with involved paraproteins in urine or serum of patients who are not subject to treatment. GDF-15 seems to be an integral component of the tumor ME, for which it may serve as a surrogate measure, alongside other indices characterizing disease burden. The aforementioned studies suggest that GDF-15 may also be a mediator of processes involved in developing anemia and renal dysfunction, for

which an indirect measure could be attained by assaying circulating forms, potentially holding diagnostic and prognostic significance (graphical presentation in Figure 5). However, it should be emphasized that the increased understanding of the molecular mechanisms of GDF-15 activity, particularly with regard to central GFRAL activity, is necessary to establish future utility.

**4.1. Limitations.** There are several weaknesses of the study that have to be emphasized. Due to this study being a single-center investigation, we recruited a heterogeneous population in favor of study sample size, which prompted post hoc analysis to delineate patient subgroups of clinical interest. Prior studies in homogenous samples (i.e., incident myeloma cases) have already demonstrated that GDF-15 is a candidate marker in myeloma, yet the majority of patients that stand to benefit from biomarker assays throughout the management are not treatment-naïve.

## 5. Conclusions

We postulate that GDF-15 may parallel the underlying mechanisms of myeloma pathology occurring in the abnormal ME, and as such, it shares a relationship with tumor burden and disease complications, most prominently related to anemia and kidney injury. Due to the correlations between GDF-15 and other markers of myeloma burden, which are also indicators of renal injury (e.g.,  $\beta_2$  microglobulin), it is also conceivable that the pronounced concentrations of GDF-15 apparent at more advanced stages of disease relate to impaired glomerular filtration. However, the relationship with urinary NGAL in all clinical subgroups, which is reflective of active inflammation in the tubular compartment, may suggest that a generalized insult (e.g., cytokine byproducts of

tumor progression) is more mechanistically related to the circulating levels of GDF-15, rather than functional nephron loss.

### Data Availability

The data used to support the findings of this study are included within the article.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### Authors' Contributions

All authors have contributed substantially to the work reported. All authors critically revised the paper. M.B., J.M., K.B., K.K., M.K., JAM., A.J., and K.W. contributed to the conceptualization. M.B., J.M., K.B., K.K., M.K., J.M., A.J., K.W., E.K.Ż., P.D., J.T., A.W.G., and R.D. performed the data curation. M.B., J.M., K.B., K.K., M.K., J.M., A.J., K.W., E.K.Ż., P.D., J.T., and R.D. helped in the formal analysis. K.K. acquired funding. M.B., J.M., K.B., K.K., M.K., JAM., A.J., K.W. contributed to the investigation. M.B., J.M., K.K., M.K., M.Ż., JAM., A.J., and K.W. contributed to the methodology. K.B. is responsible for the software. A.J., J.M., JAM., MAK, and R.D. contributed to the supervision. M.B., J.M., K.B., K.K., M.K., J.M., A.J., and K.W. contributed to the validation. M.B., J.M., K.B., K.K., M.K., J.M., A.J., and K.W. contributed to the visualization. M.B., J.M., K.B., K.K., M.K., JAM., A.J., and K.W. wrote the original draft. M.B., J.M., K.B., K.K., M.K., JAM., A.J., K.W., E.K.Ż., P.D., R.D., and MAK. contributed to the writing, review, and editing of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### Acknowledgments

This study was conducted with the use of equipment purchased by the Medical University of Białystok as part of the RPOWP 2007-2013 funding, Priority I, Axis 1.1, contract No. UDA-RPPD.01.01.00-20-001/15-00 dated 26.06.2015. This study was supported by a statutory grant from the Jagiellonian University Medical College (N41/DBS/000193; to K.K.).

### Supplementary Materials

Table S1 details treatment among the studied sample of MM patients. Figure S1 is a graphical representation on the relationship between GDF-15 concentrations and different drug choice. Table S2 provides analyses for several studied biomarkers (variables) compared based on treatment status in MM patients. (*Supplementary Materials*)

### References

- [1] C. Röhlig, S. Knop, and M. Bornhäuser, "Multiple myeloma," *Lancet (London, England)*, vol. 385, no. 9983, pp. 2197–2208, 2015.







- [2] H. Abramson, "Monoclonal antibodies for the treatment of multiple myeloma: an update," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 12, p. 3924, 2018.
- [3] M. Castella, C. F. de Larrea, and B. Martín-Antonio, "Immunotherapy: a novel era of promising treatments for multiple myeloma," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 11, article 3613, 2018.
- [4] T. Tanno, Y. Lim, Q. Wang et al., "Growth differentiating factor 15 enhances the tumor-initiating and self-renewal potential of multiple myeloma cells," *Blood*, vol. 123, no. 5, pp. 725–733, 2014.
- [5] C. F. Basil, Y. Zhao, K. Zavaglia et al., "Common cancer biomarkers," *Cancer Research*, vol. 66, no. 6, pp. 2953–2961, 2006.
- [6] J. Corre, B. Hébraud, and P. Bourin, "Concise review: growth differentiation factor 15 in pathology: a clinical role?," *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 2, no. 12, pp. 946–952, 2013.
- [7] T. Nakajima, I. Shibasaki, T. Sawaguchi et al., "Growth differentiation factor-15 (GDF-15) is a biomarker of muscle wasting and renal dysfunction in preoperative cardiovascular surgery patients," *Journal of Clinical Medicine*, vol. 8, no. 10, p. 1576, 2019.
- [8] P. Schneiderova, T. Pika, P. Gajdos et al., "Serum protein fingerprinting by PEA immunoassay coupled with a pattern-recognition algorithms distinguishes MGUS and multiple myeloma," *Oncotarget*, vol. 8, no. 41, pp. 69408–69421, 2017.
- [9] M. Westhrin, S. H. Moen, T. Holien et al., "Growth differentiation factor 15 (GDF15) promotes osteoclast differentiation and inhibits osteoblast differentiation and high serum GDF15 levels are associated with multiple myeloma bone disease," *Haematologica*, vol. 100, no. 12, pp. e511–e514, 2015.
- [10] J. Windrichova, R. Fuchsova, R. Kucera et al., "Testing of a novel cancer metastatic multiplex panel for the detection of bone-metastatic disease - a pilot study," *Anticancer Research*, vol. 36, no. 4, pp. 1973–1978, 2016.
- [11] J. Corre, E. Labat, N. Espagnolle et al., "Bioactivity and prognostic significance of growth differentiation factor GDF15 secreted by bone marrow mesenchymal stem cells in multiple myeloma," *Cancer Research*, vol. 72, no. 6, pp. 1395–1406, 2012.
- [12] S. Mei, H. Wang, R. Fu et al., "Hepcidin and GDF15 in anemia of multiple myeloma," *International Journal of Hematology*, vol. 100, no. 3, pp. 266–273, 2014.
- [13] P. R. Greipp, J. S. Miguel, B. G. M. Durie et al., "International staging system for multiple myeloma," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 15, pp. 3412–3420, 2005.
- [14] B. M. Augustson, G. Begum, J. A. Dunn et al., "Early mortality after diagnosis of multiple myeloma: analysis of patients entered onto the United Kingdom Medical Research Council Trials between 1980 and 2002—Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 36, pp. 9219–9226, 2005.
- [15] L. M. Knudsen, E. Hippe, M. Hjorth, E. Holmberg, and J. Westin, "Renal function in newly diagnosed multiple myeloma — a demographic study of 1353 patients," *European Journal of Haematology*, vol. 53, no. 4, pp. 207–212, 1994.
- [16] L. M. Knudsen, M. Hjorth, and E. Hippe, "Renal failure in multiple myeloma: reversibility and impact on the prognosis," *European Journal of Haematology*, vol. 65, no. 3, pp. 175–181, 2000.
- [17] E. C. Heher, H. G. Rennke, J. P. Laubach, and P. G. Richardson, "Kidney disease and multiple myeloma," *Clinical Journal*



- of the American Society of Nephrology, vol. 8, no. 11, pp. 2007–2017, 2013.
- [18] B. Sprangers, “Aetiology and management of acute kidney injury in multiple myeloma,” *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 33, no. 5, pp. 722–724, 2018.
- [19] M. Banaszekiewicz, J. Małyszko, D. H. Vesole et al., “New biomarkers of ferric management in multiple myeloma and kidney disease-associated anemia,” *Journal of Clinical Medicine*, vol. 8, no. 11, p. 1828, 2019.
- [20] G. P. Papassotiropoulos, E. Kastritis, M. Gkotsamanidou et al., “Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cystatin C are sensitive markers of renal injury in patients with multiple myeloma,” *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, vol. 16, no. 1, pp. 29–35, 2016.
- [21] W. Du, T. Shen, H. Li et al., “Urinary NGAL for the diagnosis of the renal injury from multiple myeloma,” *Cancer Biomarkers*, vol. 18, no. 1, pp. 41–46, 2017.
- [22] E. Terpos, E. Katodritou, E. Tsiftsakis et al., “Cystatin-C is an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma and is reduced by bortezomib administration,” *Haematologica*, vol. 94, no. 3, pp. 372–379, 2009.
- [23] K. Mori and K. Nakao, “Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage,” *Kidney International*, vol. 71, no. 10, pp. 967–970, 2007.
- [24] H. Chae, H. Ryu, K. Cha, M. Kim, Y. Kim, and C. K. Min, “Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of renal impairment in patients with multiple myeloma,” *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, vol. 15, no. 1, pp. 35–40, 2015.
- [25] J. Corre, K. Mahtouk, M. Attal et al., “Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma,” *Leukemia*, vol. 21, no. 5, pp. 1079–1088, 2007.
- [26] P. Tarkun, E. B. Atesoglu, O. Mehtap, M. M. Musul, and A. Hacıhanefioglu, “Serum growth differentiation factor 15 levels in newly diagnosed multiple myeloma patients,” *Acta Haematologica*, vol. 131, no. 3, pp. 173–178, 2014.
- [27] A. G. Solimando, M. C. da Viá, S. Cicco et al., “High-risk multiple myeloma: integrated clinical and omics approach dissects the neoplastic clone and the tumor microenvironment,” *Journal of Clinical Medicine*, vol. 8, no. 7, p. 997, 2019.
- [28] A. Allegra, V. Innao, A. G. Allegra et al., “Lymphocyte subsets and inflammatory cytokines of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 11, p. 2822, 2019.
- [29] V. M. Lauta, “A review of the cytokine network in multiple myeloma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications,” *Cancer*, vol. 97, no. 10, pp. 2440–2452, 2003.
- [30] E. Nemeth, S. Rivera, V. Gabayan et al., “IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 113, no. 9, pp. 1271–1276, 2004.
- [31] I. Bruns, R.-P. Cadeddu, I. Brueckmann et al., “Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells,” *Blood*, vol. 120, no. 13, pp. 2620–2630, 2012.
- [32] S. E. Mullican, X. Lin-Schmidt, C. N. Chin et al., “GFRAL is the receptor for GDF15 and the ligand promotes weight loss in mice and nonhuman primates,” *Nature Medicine*, vol. 23, no. 10, pp. 1150–1157, 2017.
- [33] S. M. Lockhart, V. Saudek, and S. O’Rahilly, “GDF15: a hormone conveying somatic distress to the brain,” *Endocrine Reviews*, vol. 41, no. 4, pp. 610–642, 2020.
- [34] H. H. Luan, A. Wang, B. K. Hilliard et al., “GDF15 is an inflammation-induced central mediator of tissue tolerance,” *Cell*, vol. 178, no. 5, pp. 1231–1244.e11, 2019.
- [35] O. E. Olsen, A. Skjærvi, B. F. Størdal, A. Sundan, and T. Holien, “TGF- $\beta$  contamination of purified recombinant GDF15,” *PLoS One*, vol. 12, no. 11, p. e0187349, 2017.
- [36] J. Wischhusen, I. Melero, and W. H. Fridman, “Growth/differentiation factor-15 (GDF-15): from biomarker to novel targetable immune checkpoint,” *Frontiers in Immunology*, vol. 11, 2020.
- [37] T. Tanno, N. V. Bhanu, P. A. Oneal et al., “High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin,” *Nature Medicine*, vol. 13, no. 9, pp. 1096–1101, 2007.
- [38] I. Theurl, A. Finkenstedt, A. Schroll et al., “Growth differentiation factor 15 in anaemia of chronic disease, iron deficiency anaemia and mixed type anaemia,” *British Journal of Haematology*, vol. 148, no. 3, pp. 449–455, 2010.
- [39] J. Małyszko, E. Koc-Zorawska, J. S. Małyszko, I. Glowinska, M. Mysliwiec, and I. C. Macdougall, “GDF15 is related to anaemia and hepcidin in kidney allograft recipients,” *Nephron - Clinical Practice*, vol. 123, no. 1–2, pp. 112–117, 2013.
- [40] J. Waalen, K. von Löhneysen, P. Lee, X. Xu, and J. S. Friedman, “Erythropoietin, GDF15, IL6, hepcidin and testosterone levels in a large cohort of elderly individuals with anaemia of known and unknown cause,” *European Journal of Haematology*, vol. 87, no. 2, pp. 107–116, 2011.
- [41] V. Nair, C. Robinson-Cohen, M. R. Smith et al., “Growth differentiation factor-15 and risk of CKD progression,” *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 28, no. 7, pp. 2233–2240, 2017.
- [42] J. E. Ho, S.-J. Hwang, K. C. Wollert et al., “Biomarkers of cardiovascular stress and incident chronic kidney disease,” *Clinical Chemistry*, vol. 59, no. 11, pp. 1613–1620, 2013.
- [43] E. Kastritis, I. Papassotiropoulos, G. Merlini et al., “Growth differentiation factor-15 is a new biomarker for survival and renal outcomes in light chain amyloidosis,” *Blood*, vol. 131, no. 14, pp. 1568–1575, 2018.

Article

# The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment

Małgorzata Banaszekiewicz <sup>1</sup>, Jolanta Małyszko <sup>2</sup>, Krzysztof Batko <sup>1</sup>, Ewa Koc-Żórawska <sup>3</sup>, Marcin Żórawski <sup>4</sup>, Paulina Dumnicka <sup>5</sup>, Artur Jurczyszyn <sup>6</sup>, Karolina Woziwodzka <sup>1</sup>, Aleksandra Maleszka <sup>7</sup>, Marcin Krzanowski <sup>1</sup>, Andrzej Kraśniak <sup>1</sup>, Ryszard Drożdż <sup>5</sup> and Katarzyna Krzanowska <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Nephrology and Transplantology, Jagiellonian University Medical College, 30-688 Kraków, Poland; mbanaszekiewicz92@gmail.com (M.B.); batko.krzysztof@gmail.com (K.B.); woziwodzka.karolina@gmail.com (K.W.); mkrzanowski@op.pl (M.K.); akrasnia@cm-uj.krakow.pl (A.K.)
- <sup>2</sup> Department of Nephrology, Dialysis and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, 02-091 Warsaw, Poland; jolmal@poczta.onet.pl
- <sup>3</sup> Second Department of Nephrology and Hypertension with Dialysis Unit, Medical University of Białystok, 15-276 Białystok, Poland; ewakoczorawska@wp.pl
- <sup>4</sup> Department of Clinical Medicine, Medical University of Białystok, 15-254 Białystok, Poland; mzorawski@wp.pl
- <sup>5</sup> Department of Medical Diagnostics, Jagiellonian University Medical College, 30-688 Kraków, Poland; paulina.dumnicka@uj.edu.pl (P.D.); ryszard.drozd@uj.edu.pl (R.D.)
- <sup>6</sup> Department of Hematology, Jagiellonian University Medical College, 31-501 Kraków, Poland; mmjurczy@cyf-kr.edu.pl
- <sup>7</sup> Department of Diagnostics, University Hospital in Kraków, 30-688 Kraków, Poland; amaleszka@su.krakow.pl
- \* Correspondence: kasajanda@op.pl; Tel.: +48-124-002-850



Citation: Banaszekiewicz, M.;

Małyszko, J.; Batko, K.;

Koc-Żórawska, E.; Żórawski, M.;

Dumnicka, P.; Jurczyszyn, A.;

Woziwodzka, K.; Maleszka, A.;

Krzanowski, M.; et al. The Key Role

of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple

Myeloma Patients with Renal

Impairment. *Medicina* **2022**, *58*, 417.[https://doi.org/10.3390/](https://doi.org/10.3390/medicina58030417)[medicina58030417](https://doi.org/10.3390/medicina58030417)

Academic Editor: Charat

Thongprayoon

Received: 14 February 2022

Accepted: 10 March 2022

Published: 11 March 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** *Background and objectives:* Anemia is common in multiple myeloma (MM) and is caused by a complex pathomechanism, including impaired iron homeostasis. Our aim is to evaluate the biomarkers of iron turnover: serum soluble transferrin receptor (sTfR) and hepcidin-25 in patients at various stages of MM in relation with markers of anemia, iron status, inflammation, renal impairment and burden of the disease and as predictors of mortality. *Materials and methods:* Seventy-three MM patients (six with smoldering and 67 with symptomatic disease) were recruited and observed for up to 27 months. Control group included 21 healthy individuals. Serum sTfR and hepcidin were measured with immunoenzymatic assays. *Results:* MM patients with and without anemia had higher sTfR compared to controls, while only anemic patients had higher hepcidin-25. Both hepcidin-25 and sTfR were higher in anemic than non-anemic patients. Higher hepcidin-25 (but not sTfR) was associated with increasing MM advancement (from smoldering to International Staging System stage III disease) and with poor response to MM treatment, which was accompanied by lower blood hemoglobin and increased anisocytosis. Neither serum hepcidin-25 nor sTfR were correlated with markers of renal impairment. Hepcidin-25 predicted blood hemoglobin in MM patients independently of other predictors, including markers of renal impairment, inflammation and MM burden. Moreover, both blood hemoglobin and serum hepcidin-25 were independently associated with patients' 2-year survival. *Conclusions:* Our results suggest that hepcidin-25 is involved in anemia in MM and its concentrations are not affected by kidney impairment. Moreover, serum hepcidin-25 may be an early predictor of survival in this disease, independent of hemoglobin concentration. It should be further evaluated whether including hepcidin improves the early diagnosis of anemia in MM.

**Keywords:** multiple myeloma; soluble transferrin receptor; anemia; hepcidin 25; renal impairment; tumor microenvironment; biomarker

## 1. Introduction

Multiple myeloma (MM) is a plasma cell disorder that accounts for approximately 10% of hematological malignancies. It is a more common disease in the elderly population

and often develops following an asymptomatic stage. The diagnostic process involves the search for a myeloma-defining event, including anemia and renal impairment. However, recent guidelines [1] allow for earlier diagnosis of MM preceding the development of organ damage in patients with high ( $\geq 60\%$ ) clonal plasma cell involvement of bone marrow, involved to uninvolved serum free light chains (FLCs) ratio  $\geq 100$  and serum FLCs  $\geq 100$  mg/L, or more than one focal lesion in magnetic resonance imaging. Median overall survival of patients with newly diagnosed disease reaches 6 to 8 years, which is a striking improvement attributed to modern therapy [2]. The focus on timely diagnosis and prevention of organ damage drives the interest in diagnostic and prognostic biomarkers. In theory, a validated biomarker can act as a surrogate of underlying disease pathways and inform the physician on the alterations in organ-specific processes; for example, our previous studies demonstrated that urinary insulin growth factor binding protein 7 (IGFBP-7), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) monomer, and transgelin-2 may be markers of renal impairment in patients with MM [3,4]. The use of appropriate biomarkers may be crucial for adequate tailoring of the treatment plan. However, in order to be widely adopted into practice, novel biomarkers need to offer a significant improvement as compared to the current ones.

Anemia is commonly observed in MM (in about 70% of patients), and is even more prevalent in those patients who develop renal impairment (almost 90% of such cases). Anemia may be caused by complex pathomechanisms. Cytokines produced by plasmacytes lead to anemia of chronic disease (ACD), by erythropoiesis inhibition and impaired iron homeostasis [5]. The most common laboratory findings in MM-related anemia and ACD are: (1) normocytic and normochromic anemia, (2) normal to mildly low serum iron levels, (3) high serum ferritin, and (4) hemosiderin in bone marrow macrophages [6]. It seems that inadequate excretion of erythropoietin (EPO) compared to the degree of anemia, reduction of erythrocytes' survival time ( $<10\%$ ), inadequacy of ferric management, and direct suppression of erythropoiesis by neoplastic cells are mainly responsible for the development of ACD [7]. Other MM-related factors leading to anemia include: displacement of erythroid system by neoplastic plasmacytes, proinflammatory activity of cytokines, and disabled apoptosis of the erythroid system. However, renal failure should also be taken into consideration as an important factor contributing to anemia. Among MM patients with renal impairment, lower serum EPO levels appear more frequently (up to 60%) than in patients with normal renal function [8]. The molecules engaged in iron metabolism, namely hepcidin and soluble transferrin receptor (sTfR), have been previously suggested as potential biomarkers in MM, enabling to better characterize the underlying etiology of anemia [9].

Hepcidin, as a one of acute phase proteins, is regulated by interleukin-6 (IL-6), a cytokine inducing MM development (a potential growth factor for myeloma cells). Hepcidin-25 (an active hormone consisting of 25 aminoacids) controls iron delivery from intestinal cells to blood and regulates iron transport and its release from macrophages. There is a potential association between novel drugs in MM and this marker [9]. Moreover, hepcidin expression is regulated by growth differentiation factor 15 (GDF-15), secreted by tumor microenvironment cells. In our previous study, increased GDF-15 was associated with end-organ damage and adverse prognosis in MM patients [7].

sTfR prevents the organism from iron-associated toxicity. TfR1 form has higher affinity for transferrin and is overexpressed on cells with a high rate of proliferation, including malignant hematopoietic cells. Interestingly, sTfR to ferritin ratio was decreased in advanced stages of hematopoietic malignancies [10,11]. Studies have demonstrated increased sTfR serum levels, decreased ferritin and increased sTfR to ferritin ratio in correlation with increasing stages of chronic kidney disease (CKD) [12].

The primary aim of this study was to evaluate biomarkers of iron turnover, sTfR, and hepcidin-25 in patients at various stages of MM progression, and examine their relationship with indicators of anemia and iron status (hemoglobin, red blood cell indices, ferritin, and serum iron concentration) and renal impairment (serum creatinine, estimated glomerular



filtration rate–eGFR, and urinary NGAL). Moreover, we examined the relationships of these two markers with indicators of inflammation (IL-6) and burden of this disease (FLCs,  $\beta$ 2-microglobulin, and GDF-15). Finally, serum concentrations of sTfR and hepcidin-25 were assessed to verify them as predictors of mortality in multiple myeloma.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design and Patients

The recruitment process and laboratory methodology follow our earlier work [5].

Briefly, in this prospective observational study, patients were recruited during ambulatory control visits at the Departments of Hematology of the University Hospital in Kraków. We included adult patients with smoldering MM (SMM) or MM diagnosis consistent with the International Myeloma Working Group criteria [1]. We excluded patients reporting recent active infection, chronic infection with hepatitis B, C or human immunodeficiency viruses, or diagnosis of active malignancy other than MM and patients on dialysis.

At the start of the study, physicians who conducted ambulatory control visits collected clinical data regarding demographics (patient's age and sex), history of hematological disease including the date of initial diagnosis of SMM or MM, the current diagnosis, the presence of bone lesions on X-ray, and the information about past and present treatment including the response to the treatment: complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD), or progressive disease (PD), and relevant co-morbidities. Follow-up data on mortality was collected in February 2020, 27 months after the start of the study.

We also recruited a control group consisting of 21 healthy individuals (13 women, 8 men, aged 39–66 years) who provided blood samples used to obtain control results of non-standard laboratory tests.

### 2.2. Ethics Statement

The study was compliant with the Declaration of Helsinki and the International Conference on Harmonization/Good Clinical Practice regulations. Approval by the Bioethics Committee of the Jagiellonian University was granted (approval number 1072.6120.248.2017). Written informed consent was obtained from all participants. All the patients with MM were treated at the Department of Hematology, University Hospital in Kraków, Poland.

### 2.3. Blood Samples and Laboratory Tests

Blood and urine samples were obtained from MM patients at study enrolment, in morning hours, after overnight fast. Blood samples were collected by trained nurses into appropriate closed-system tubes. Urine was self-collected by patients using clean-catch method and dedicated containers.

Routine laboratory tests were performed on the day of blood and urine collection and included complete blood count, serum concentrations of creatinine, iron, total protein, albumin,  $\beta$ 2-microglobulin, free light chains, ferritin, serum activity of lactate dehydrogenase, and urine concentrations of light chains.

Sysmex XE 2100 analyzer (Sysmex, Kobe, Japan) was used for complete blood counts. The routine biochemical tests were carried out using automatic biochemical analyzers: Hitachi 917 (Hitachi, Japan) and Modular P (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The eGFR was calculated based on serum creatinine using the Chronic Kidney Disease–Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) 2009 formula. Concentrations of serum FLC, urine LC ( $\kappa$  and  $\lambda$  type) and  $\beta$ 2-microglobulin were measured by immunonephelometric method on a BN II analyzer (Siemens GmbH, Erlangen, Germany). Freelite reagents (Binding Site, Birmingham, UK) were used to assess FLCs  $\kappa$  and  $\lambda$  (reference ranges were 1.7–3.7 g/L and 0.9–2.1 g/L, respectively). The immunophenotype of the monoclonal protein was determined by serum immunofixation on agarose gel (EasyFix G26, Interlab, Rome, Italy).

Additional samples for non-routine laboratory tests were obtained along with routine samples' collection from patients with MM, and were collected using the same methodology

from the control subjects. Serum and urine samples for non-routine laboratory tests were aliquoted, frozen, and stored in  $-70^{\circ}\text{C}$  until analysis. Hemolyzed or lipemic serum samples were not used. The non-routine tests were performed in series, with commercially available immunoassays (ELISA), and included serum concentrations of sTfR, hepcidin 25, GDF-15, IL-6, and N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide (NT-proBNP), and urine concentrations of NGAL monomer.

Serum sTfR was measured using Quantikine IVD ELISA Human sTfR Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA), with the minimum detection range of 0.5 nmol/L. Serum hepcidin-25 was measured using Hepcidin 25 human Cet. No. S-1337 kit (Peninsula Laboratories International, Inc., San Carlos, CA, USA). The detection range for hepcidin 25 was 0.02–25 ng/mL. Serum GDF-15 was measured using Quantikine ELISA Human GDF-15 Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA), with minimum detection dose  $\leq 4.4$  pg/mL. Serum IL-6 was measured using Quantikine ELISA Human IL-6 Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA with the minimum detection dose of 0.70 pg/mL. Serum NT-pBNP concentrations were measured by Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For NT-ProBNP Human (Cloud-Clone Corporation, Houston, TX, USA), with the minimum detection dose of 11.7 pg/mL. Urine NGAL monomer was assessed using Human NGAL monomer-specific ELISA Kit (BioPorto Diagnostics A/S, Hellerup, Denmark), with the minimum detection dose of 10 pg/mL.

#### 2.4. Statistical Methods

For categorical data, we reported numbers and percentages of patients. Mean  $\pm$  standard deviation or median (lower-upper quartile) were reported for normally and non-normally distributed quantitative variables, respectively. The Shapiro–Wilk test was used to assess normality. The differences between groups were assessed with the *t*-test or Mann–Whitney test, according to distribution. Spearman rank correlation coefficient was used to analyze associations between studied quantitative variables and the ordered variable describing MM stage ranging from SMM to ISS stage III. Simple correlations between two quantitative variables were assessed using the Pearson coefficient. We used multiple linear regression to search for independent predictors of blood hemoglobin, including the independent variables that correlated significantly with hemoglobin in the simple analysis. Right-skewed variables were log-transformed using normal logarithm before the correlation and linear regression analyses. Survival times were calculated from the date of the study enrolment until the date of death from any cause or the date of the last follow-up and were estimated with use of the Kaplan–Meier method. Simple and multiple Cox proportional hazard regression were used to study the predictors of overall mortality. The statistical tests were two-tailed and  $p < 0.05$  indicated statistical significance. Statistica 12.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) software was used for computations.

### 3. Results

#### 3.1. Baseline Characteristics of the Patients with MM and Differences between Patients with or without Anemia

Seventy-three patients (35 females), aged between 29 and 90 years old, were recruited (Figure 1). Six patients (8%) were diagnosed with smoldering myeloma (SMM) and 67 patients (92%) with symptomatic MM. Forty patients (55% of the studied group) were classified to have stage I disease according to International Staging System for multiple myeloma (ISS) [13]. Eight patients (11%, including the subjects diagnosed with SMM) were treatment naïve upon presentation. Most patients ( $n = 65$ ; 89%) had received at least one line of treatment and 23 (32%) had a history of prior autologous peripheral blood stem cell transplantation. Fifty-two patients (71%) were in complete or partial remission. Fourteen patients (19%) had anemia defined as blood hemoglobin below sex-related lower reference limit (i.e.,  $<11$  g/dL in women and  $<12$  g/dL in men). Patients with anemia more commonly received maintenance treatment and demonstrated a worse response to the treatment, as

compared to subjects with normal blood hemoglobin (Table 1), while other baseline clinical characteristics were similar across the groups.

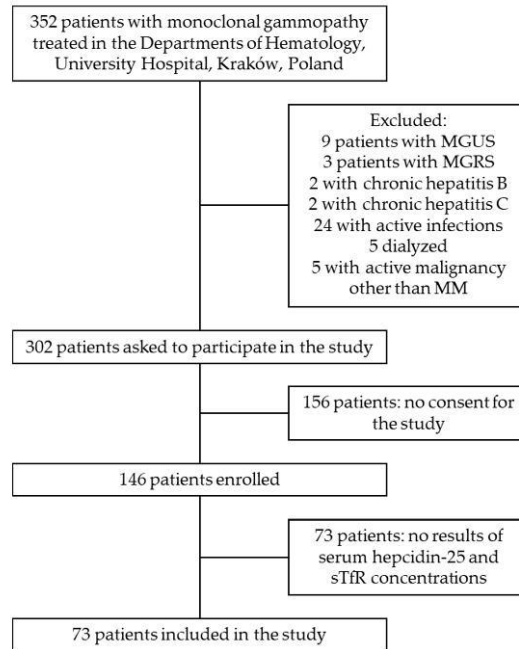


Figure 1. Flow diagram of study patient selection.

Table 1. Baseline demographic and clinical characteristics of studied patients with multiple myeloma (MM) with and without anemia.

Characteristic	MM Patients with Anemia (n = 14)	MM Patients without Anemia (n = 59)	p-Value
Mean age ± standard deviation, years	67.8 ± 10.5	69.0 ± 10.2	0.7
Male sex, n (%)	10 (71)	28 (47)	0.1
Median time since diagnosis of MM (lower; upper quartile), months	30 (16; 88)	38 (17; 65)	0.9
Smoldering myeloma, n (%)	0	6 (10)	0.07
ISS stage I, n (%)	5 (36)	35 (59)	
ISS stage II, n (%)	4 (29)	11 (19)	
ISS stage III, n (%)	5 (36)	7 (12)	
Immunophenotype:			
IgG, n (%)	10 (71)	42 (71)	0.9
IgA, n (%)	5 (36)	12 (20)	0.2
IgM, n (%)	0	1 (2)	0.9
biclonal, n (%)	2 (14)	0	0.9
Free light chains only, n (%)	0	1 (2)	0.9
Non-secretory, n (%)	0	3 (5)	0.9
Disease state on the day of study visit:			
CR, n (%)	0	22 (37)	0.041
PR, n (%)	8 (57)	22 (37)	
SD, n (%)	1 (7)	5 (8)	
PD, n (%)	5 (36)	10 (17)	



Table 1. Cont.

Characteristic	MM Patients with Anemia (n = 14)	MM Patients without Anemia (n = 59)	p-Value
Chemotherapy on the day of study visit:			
On maintenance treatment, n (%)	10 (71)	20 (34)	0.010
No treatment, n (%)	4 (29)	39 (66)	
Treatment with:			
Bortezomib, n (%)	3 (21)	7 (12)	0.3
Lenalidomide, n (%)	6 (43)	7 (12)	0.006
Thalidomide, n (%)	1 (7)	4 (7)	0.9
Cyclophosphamide, n (%)	1 (7)	3 (5)	0.8
Melfalan, n (%)	0	1 (2)	1.0
Steroid, n (%)	10 (71)	19 (32)	0.007
Number of prior treatment schemes:			
No treatment, n (%)	0	8 (14)	0.4
1, n (%)	3 (21)	14 (24)	
2, n (%)	6 (43)	16 (27)	
3 and more, n (%)	5 (36)	21 (36)	
History of auto-PBSCT, n (%)	6 (43)	17 (29)	0.3
Chronic kidney impairment (eGFR <60 mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	6 (43)	17 (29)	0.3

Abbreviations: CR, complete response; eGFR, estimated glomerular filtration rate; Ig, immunoglobulin; ISS, International Staging System for multiple myeloma; n, number of patients; PBSCT, peripheral blood stem cell transplant; PD, progressive disease; PR, partial response; SD, stable disease.

Anemia was associated with a higher average mean red blood cell volume (MCV) and anisocytosis (higher red cell distribution width, RDW-CV) (Table 2). Moreover, anemic patients had lower serum albumin, higher  $\beta$ 2-microglobulin, and higher FLCs (Table 2). Although serum creatinine and urinary NGAL were elevated in anemic subjects, average eGFR values were similar. Both serum ferritin and soluble sTfR concentrations were higher in MM patients with anemia, resulting in no difference in sTfR/log(ferritin) ratios between anemic and non-anemic subjects (Table 2). There was no difference between the groups in serum iron levels, either. Average serum hepcidin-25 level was more than twice higher in patients with anemia than in those without anemia; similar differences were observed between the groups in serum concentrations of IL-6 and GDF-15 (Table 2).

In the studied 73 patients with MM, serum sTfR was higher than in 21 healthy controls (median (lower; upper quartile)): 25.0 (20.4; 28.4) versus 19.4 (17.3; 23.7) nmol/L, respectively;  $p = 0.002$ ). Both patients with (27.7 (24.6; 33.1);  $p < 0.001$ ) and without anemia (24.0 (19.9; 27.9);  $p = 0.007$ ) had higher sTfR as compared to controls. Serum concentrations of hepcidin-25 did not differ between MM patients and control subjects: 28.8 (16.5; 44.6) versus 27.1 (20.0; 37.3) ng/mL;  $p = 0.9$ ); however, anemic MM patients (54.2 (30.9; 90.2)) had significantly higher hepcidin-25 than controls ( $p = 0.006$ ).

### 3.2. Associations between the Studied Markers of Iron Metabolism and Baseline Clinical Characteristics of Patients with MM

In the studied patients, no significant association was observed between the ordered variable describing the advancement of MM (from SMM to ISS III) and sTfR concentrations (Figure 2A), while a weak positive association was observed for serum hepcidin-25 (Figure 2B). Increasing severity from SMM to ISS stage III MM was associated with decreasing blood hemoglobin (Figure 2C) and increasing red blood cell anisocytosis (i.e., increasing RDW-CV values; Figure 2D). A weak negative association was observed between serum iron concentrations and the MM stage ( $R = -0.31$ ;  $p = 0.013$ ). However, there were no associations between the MM stage and other erythrocyte indices (MCV or mean cell hemoglobin, MCH). In addition, we observed no significant associations between MM stage and serum ferritin ( $R = 0.23$ ;  $p = 0.1$ ) or sTfR/log(ferritin) ratio ( $R = -0.04$ ;  $p = 0.8$ ).

**Table 2.** Baseline results of laboratory tests among studied MM patients with and without anemia. Data are shown as median (lower; upper quartile) or mean  $\pm$  standard deviation.

Characteristic	MM Patients with Anemia (n = 14)	MM Patients without Anemia (n = 59)	p-Value
White blood cell count, $\times 10^3/\mu\text{L}$	5.64 (4.35; 6.49)	6.12 (4.94; 7.12)	0.3
Red blood cell count, $\times 10^6/\mu\text{L}$	3.10 $\pm$ 0.38	4.27 $\pm$ 0.47	<0.001
Hemoglobin, g/dL	9.90 $\pm$ 1.22	13.20 $\pm$ 1.27	<0.001
Hematocrit, %	29.3 $\pm$ 3.63	38.4 $\pm$ 3.53	<0.001
MCV, fL	94.8 $\pm$ 5.0	90.2 $\pm$ 4.8	0.002
MCH, pg	32.0 $\pm$ 1.9	31.1 $\pm$ 2.0	0.1
MCHC, g/dL	33.8 $\pm$ 0.9	34.3 $\pm$ 1.1	0.1
RDW-CV, %	15.5 (14.7; 17.3)	14.2 (13.5; 15.0)	0.001
Platelet count, $\times 10^3/\mu\text{L}$	162 $\pm$ 73	180 $\pm$ 60	0.3
Lactate dehydrogenase, U/L	342 (308; 389)	356 (306; 403)	0.7
Albumin, g/L	38.4 (35.7; 41.0)	43.7 (40.6; 45.5)	<0.001
Involved serum free light chains, mg/L	92.7 (27.9; 133.0)	29.9 (16.3; 94.3)	0.047
Involved urine light chains, mg/L	10.09 (6.80; 27.60)	7.83 (6.34; 48.20)	0.9
$\beta 2$ -microglobulin, mg/L	4.93 (2.88; 8.14)	2.53 (2.10; 3.66)	0.006
Serum creatinine, $\mu\text{mol/L}$	100 (84; 218)	85 (74; 98)	0.025
eGFR (CKD-EPI <sub>Cr</sub> ), mL/min/1.73 m <sup>2</sup>	66 (25; 78)	67 (53; 78)	0.3
Urine NGAL, ng/mL	27.7 (11.6; 80.4)	11.2 (4.55; 26.8)	0.019
Iron, $\mu\text{mol/L}$ *	14.4 $\pm$ 3.7	15.6 $\pm$ 5.2	0.4
Ferritin, $\mu\text{g/L}$ *	380 (284; 568)	136 (55; 350)	0.009
sTfR, nmol/L	27.7 (24.6; 33.1)	24.0 (19.9; 27.9)	0.041
sTfR/log(ferritin) *	4.98 (4.66; 5.22)	4.72 (3.97; 6.98)	0.6
Hepcidin-25, ng/mL	54.2 (30.9; 90.2)	21.9 (13.7; 40.4)	0.002
GDF-15, pg/mL	2450 (1896; 4028)	1141 (802; 1681)	<0.001
Interleukin 6, pg/mL	5.11 (3.28; 7.45)	2.43 (1.53; 4.78)	0.027
NT-proBNP, pg/mL	293.6 (31.2; 460.1)	69.7 (31.6; 199.2)	0.08

\* Iron concentrations were available in 63 patients, including 12 with anemia and 51 without anemia. Ferritin concentrations were available in 51 patients, including 9 with anemia and 42 without anemia. Abbreviations: CKD-EPI<sub>Cr</sub>, Chronic Kidney Disease–Epidemiology Collaboration equation based on serum creatinine; eGFR, estimated glomerular filtration rate; GDF-15, growth differentiation factor 15; MCH, mean cell hemoglobin; MCHC, mean cell hemoglobin concentration; MCV, mean cell volume; MM, multiple myeloma; NGAL, neutrophil–gelatinase-associated lipocalin; NT-proBNP, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; RDW-CV, red cell distribution width–coefficient of variation.

Serum hepcidin-25 and ferritin concentrations were significantly higher in patients who received maintenance treatment at the start of the study, while the difference was not significant in case of sTfR (Figure 3A–C). Treatment with bortezomib ( $p = 0.019$ ), lenalidomide ( $p = 0.012$ ), and steroid ( $p = 0.008$ ) was associated with significantly higher serum hepcidin-25; treatment with lenalidomide ( $p = 0.004$ ) and steroid ( $p = 0.010$ ) was associated with higher ferritin. This was paralleled by lower hemoglobin ( $11.71 \pm 1.78$  versus  $13.13 \pm 1.61$  g/dL;  $p = 0.001$ ) and higher RDW-CV ( $15.1$  (14.3; 17.2) versus  $13.9$  (13.5; 14.6) %;  $p < 0.001$ ) in treated versus untreated patients. Both serum sTfR and hepcidin-25 concentrations were associated with the response to treatment (Figure 3D,E), whereas other studied markers of iron status did not differ between patients with CR, PR, SD, or PD. Again, patients with CR had the highest blood hemoglobin ( $p = 0.004$ ) and lowest RDW-CV ( $p < 0.001$ ).

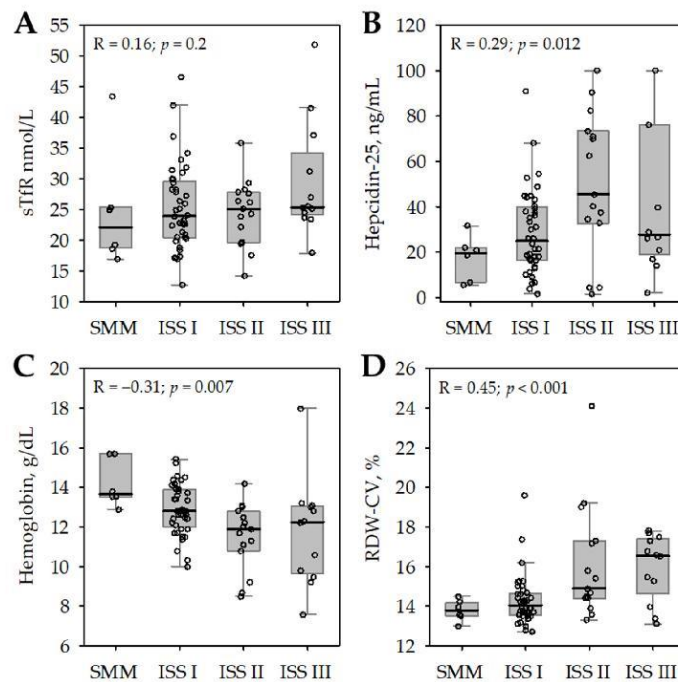
Neither of the studied markers of iron metabolism (sTfR, hepcidin-25, ferritin, sTfR/log(ferritin), iron) was associated with sex ( $p > 0.3$  in all comparisons) or age ( $p > 0.3$  in all cases).

### 3.3. Association between Studied Markers and Blood Hemoglobin in Patients with Multiple Myeloma

In the 73 studied MM patients, blood hemoglobin concentrations were positively associated with serum albumin and eGFR, and negatively associated with  $\beta 2$ -microglobulin, serum creatinine, urine NGAL, serum hepcidin-25, GDF-15, and interleukin 6 (Table 3). Neither sTfR ( $R = -0.14$ ;  $p = 0.2$ ), nor ferritin ( $R = -0.23$ ;  $p = 0.1$ ), or sTfR/log(ferritin)



( $R = 0.04$ ;  $p = 0.8$ ) significantly predicted hemoglobin concentrations in the studied group. In a multiple analysis adjusted for sex, response to treatment (CR, PR, SD, or PD) and treatment status (maintenance treatment or no treatment at the start of the study), serum albumin and hepcidin-25 were identified as independent predictors of hemoglobin level (Table 3).

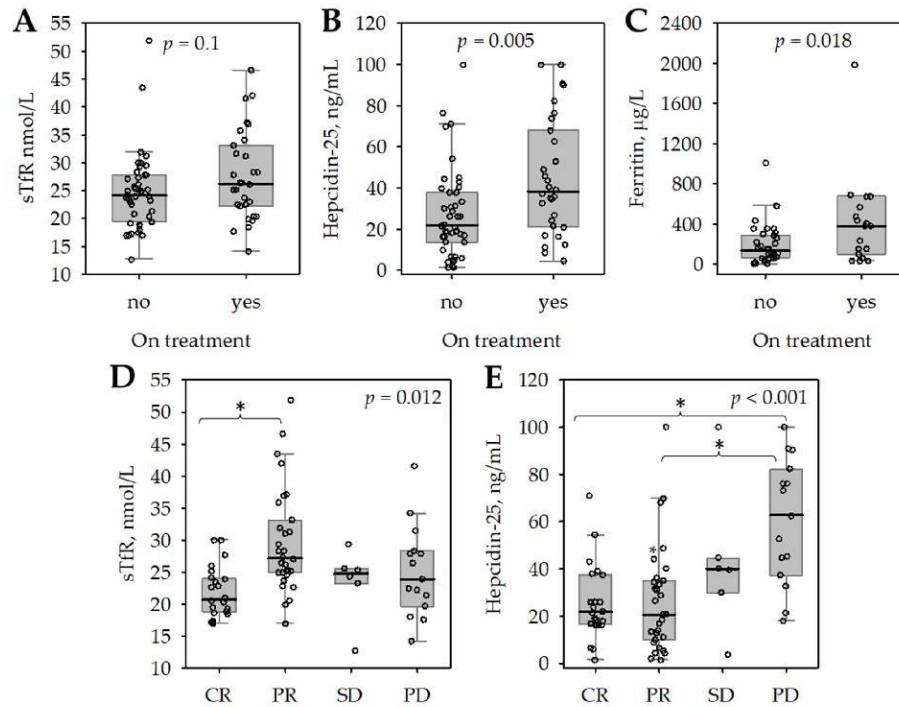


**Figure 2.** Soluble transferrin receptor (sTfR, **A**), hepcidin-25 (**B**), blood hemoglobin (**C**), and red cell distribution width–coefficient of variation (RDW-CV, **D**), among 73 studied patients with multiple myeloma (MM) according to increasing stage of the disease: from smoldering multiple myeloma (SMM) to International Staging System for MM (ISS) stage III. The data are shown as median (central line), interquartile range (box), non-outlier range (whiskers), and outliers (points). Spearman correlation coefficients ( $R$ ) and  $p$ -values describe the correlations of the studied variables (shown on the Y-axis) with ordered scale of increasing severity of MM (from SMM to ISS stage III MM, as shown on the X-axis).

Hepcidin-25 (log-transformed) demonstrated a significant correlation with red blood cell indices: MCV ( $R = 0.23$ ;  $p = 0.048$ ), MCH ( $R = 0.24$ ;  $p = 0.040$ ), and RDW-CV ( $R = 0.33$ ;  $p = 0.004$ ). Moreover, RDW-CV correlated positively with log(ferritin) ( $R = 0.36$ ;  $p = 0.010$ ), log(interleukin 6) ( $R = 0.34$ ;  $p = 0.003$ ) and log(GDF-15) ( $R = 0.42$ ;  $p < 0.001$ ). Iron concentrations ( $R = 0.31$ ;  $p = 0.012$ ) and log(sTfR) ( $R = -0.24$ ;  $p = 0.039$ ) were correlated with MCHC.

#### 3.4. Relationship between the Studied Markers of Iron Metabolism and their Associations with the Markers of MM Burden, Inflammation and Renal Impairment

Serum hepcidin-25 correlated positively with ferritin ( $R = 0.61$ ;  $p < 0.001$  for log-transformed variables) and, consequently, with sTfR/log(ferritin) ratio ( $R = -0.38$ ;  $p = 0.006$ ). Otherwise, the studied markers of iron metabolism were not interrelated: serum sTfR did not correlate with ferritin, hepcidin-25, or iron concentrations.



**Figure 3.** Soluble transferrin receptor (sTfR, (A)), hepcidin-25 (B), and ferritin (C) in serum of studied patients with MM according to treatment status; serum sTfR (D) and hepcidin-25 (E) in patients with MM according to the response to treatment. The data are shown as median (central line), interquartile range (box), non-outlier range (whiskers), and outliers (points); p-values in Mann-Whitney (A–C) or Kruskal–Wallis (D,E) test are shown, asterisk depicts significant differences in post-hoc comparisons.

**Table 3.** Significant predictors of blood hemoglobin concentrations among studied patients in MM in simple analysis and the results of multiple regression. Multiple regression model was adjusted for sex, treatment status, and the response to treatment.

Independent Variable	Simple Correlation		Multiple Linear Regression	
	R	p-Value	$\beta \pm SE$	p-Value
Albumin	0.57	<0.001	0.36 ± 0.12	0.004
$\beta$ 2-microglobulin	−0.38	<0.001	0.03 ± 0.16	0.8
Creatinine	−0.31	0.008	not included	
eGFR	0.33	0.005	−0.02 ± 0.17	0.9
log(NGAL)	−0.30	0.010	−0.02 ± 0.1	0.9
log(hepcidin-25)	−0.39	0.001	−0.27 ± 0.11	0.016
log(GDF-15)	−0.50	<0.001	−0.23 ± 0.17	0.2
log(interleukin 6)	−0.29	0.013	0.02 ± 0.11	0.8
The regression model	Not applicable		R <sup>2</sup> = 0.49	<0.001

Abbreviations: R, Pearson’s correlation coefficient;  $\beta$ , standardized regression coefficient; SE, standard error; R<sup>2</sup>, coefficient of determination, estimated glomerular filtration rate; GDF-15, growth differentiation factor 15; NGAL, neutrophil-gelatinase associated lipocalin.

While serum iron concentrations were correlated with renal function (serum creatinine, eGFR, and urine NGAL), we observed no such correlations in the case of serum ferritin, sTfR, and hepcidin (Table 4). Only sTfR and iron concentration significantly correlated with

GDF-15 (Table 4). Moreover, serum sTfR negatively correlated with albumin and serum iron positively correlated with  $\beta$ 2-microglobulin. No correlations were observed between the studied markers of iron metabolism and IL-6, serum FLC, or urinary light chains. The ratio of sTfR/log(ferritin) did not correlate with any of the studied variables.

**Table 4.** Simple correlations of studied laboratory markers of iron metabolism with markers of renal impairment and tumor burden.

Variable	Log(sTfR)	Log(Hepcidin-25)	Log(Ferritin)	Iron
Creatinine	R = 0.13; p = 0.3	R = 0.17; p = 0.1	R = 0.16; p = 0.3	R = -0.26; p = 0.042
eGFR	R = -0.17; p = 0.1	R = 0.01; p = 0.9	R = 0.05; p = 0.7	R = 0.32; p = 0.008
log(NGAL)	R = 0.06; p = 0.6	R = 0.12; p = 0.3	R = 0.06; p = 0.7	R = -0.33; p = 0.009
Albumin	R = -0.25; p = 0.031	R = -0.14; p = 0.2	R = -0.16; p = 0.2	R = 0.04; p = 0.8
$\beta$ 2-microglobulin	R = 0.17; p = 0.2	R = 0.18; p = 0.1	R = 0.19; p = 0.2	R = -0.29; p = 0.022
log(GDF-15)	R = 0.27; p = 0.019	R = 0.20; p = 0.09	R = 0.20; p = 0.2	R = -0.32; p = 0.010

Abbreviations: eGFR, estimated glomerular filtration rate; GDF-15, growth differentiation factor 15; NGAL, neutrophil–gelatinase-associated lipocalin.

### 3.5. Predictors of Mortality in Multiple Myeloma

After 27 months from the start of the study, we collected the data on all-cause mortality. The median observation time in the studied group was 20 months (range: 1 to 25 months; lower; upper quartile: 16; 23 months). Fifteen (21%) patients died during the observation period for the following causes: MM in six, infection in five, other neoplasm in three, and unknown cause in one. The estimated two-year survival rate (Kaplan–Meier method) was 79%. Blood hemoglobin was significantly associated with survival (hazard ratio: 0.67; 95% confidence interval: 0.52–0.87; p = 0.003). Baseline serum hepcidin significantly predicted survival in simple analysis (hazard ratio: 1.02; 95% confidence interval: 1.0002–1.04; p = 0.047), although the association was weak. Moreover, baseline serum hepcidin-25 appeared to be a negative predictor of survival, independent of hemoglobin concentration (Table 5). No association with survival was observed for serum sTfR (p = 0.8).

**Table 5.** Simple and multiple Cox proportional hazard regression model to predict two-year overall survival of studied patients with MM.

Independent Variable	Simple Regression		Multiple Regression	
	HR (95% CI)	p-Value	HR (95% CI)	p-Value
Hemoglobin	0.67 (0.52–0.87)	0.003	0.74 (0.55–0.99)	0.044
Hepcidin-25	1.03 (1.01–1.04)	0.002	1.02 (1.001–1.04)	0.041

Abbreviations: HR, hazard ratio, CI, confidence interval.

## 4. Discussion

In this study, we evaluated the relationships between the advancement of MM and biomarkers of anemia and iron turnover. Anemia is a common manifestation of MM. In a retrospective analysis of over one thousand MM patients published by Kyle et al., 73% of patients presented with anemia at diagnosis [14]. Data collected at cancer care centers indicate that the vast majority (85%) of patients experience anemia at some point in time, while its presence is associated with a worse quality of life. In MM patients, hemoglobin levels are usually lower than in other hematological conditions [15]. Developing reliable biomarkers for anemia and clarifying the underlying pathomechanisms represent areas of high interest. Furthermore, differentiating iron deficiency from ACD is useful for adequate treatment tailoring (e.g., potential benefits from iron supplementation and use of erythropoiesis-stimulating agents). Hematopoietic scores based on a composite of platelets  $<150 \times 10^9/L$ , hemoglobin  $<10 \text{ g/dL}$ , and high MCV (MCV  $> 96$ ) represent a simple tool to reliably predict survival in incident cases of MM [16].

In our study, we observed that iron-regulating cytokines and hormones (hepcidin-25, IL-6, and GDF-15) were significantly elevated in anemic subjects with MM. More advanced



disease was negatively associated with iron levels and positively with serum hepcidin, while no significant associations were noted with ferritin, sTfR, or sTfR/log(ferritin). Although previously postulated as a useful measure, sTfR/log(ferritin) was of no benefit in our MM patients, as both ferritin and sTfR values were elevated. Iron transport in plasma occurs when transferrin interacts with its membrane receptors, which are prevalent in bone marrow tissue (80%) and are stimulated by iron deprivation. The concentration of the soluble form of the receptor (sTfR) in plasma is proportional to cellular mass and remains stable over time in healthy subjects. No age- or sex-related variations are observed. sTfR can be described as a marker of erythropoiesis when iron stores are adequate and available, whereas in iron deficiency it is a measure of iron status [17]. Hypoferremia with lower availability of iron for erythrocyte progenitors is a potential mechanism underlying anemia in MM [18]. The inflammatory component of malignancy involves cytokine signaling, which, in turn, promotes hepcidin secretion by hepatocytes, ferroportin binding and prevention of iron efflux from enterocytes and reticuloendothelial cells. This process shapes iron restriction in inflammation [9,10,17–20]. Our findings are consistent with these hypotheses.

The etiology of MM-related anemia is multifactorial. Rapid proliferation of MM cells, tumor microenvironment, and expansion of myeloma in bone marrow are other factors that may contribute to the “iron block” (e.g., by increasing iron demand and limiting the functional erythropoietic compartment) [10,16]. Myeloma cells can promote erythroblast apoptosis [21,22], while cytokines, such as IL-6, impair erythroid maturation and hemoglobin production outside of “iron restriction” pathways [23]. Recent data analyses support the model hypothesis of erythroid apoptosis induction by myeloma cytokines and erythroblastic island destruction by myeloma cells [24].

Progression of anemia in MM has been associated with worsening erythroid hypoplasia, indirectly marked by transferrin receptor levels. Blunted erythropoietin release has also been observed in more severe anemia, and kidney function appears to be an important factor here [25,26]. However, deficient erythropoietin production may occur without kidney impairment. The proposed mechanisms resemble the pathways of anemia of inflammation and CKD [25]. In the present study, in the majority of patients, anemia can be categorized as normocytic with iron replete status and notable anisocytosis. The concurrent elevation of IL-6 and hepcidin-25 levels suggests that elevated sTfR reflects an increased iron demand, which is restricted to the erythroid progenitors through enhanced activity of the IL-6-hepcidin axis [27]. This falls in line with the current model of the anemia of inflammation in MM.

Moreover, one of the most landmark drugs in MM treatment is the proteasome inhibitor, bortezomib, due to its various anti-myeloma effects, such as the induction of apoptosis, alteration of the bone marrow microenvironment, and inhibition of nuclear factor kappa B (NFκB). It seems that it also affects additional cell survival pathways and exerts inhibitory effects on cytokines, such as IL-6 or tumor necrosis factor α (TNFα) [28]. Hepcidin up-regulation has been linked to IL-6 signaling in MM (although IL-6 independent mechanisms are also recognized) and its levels are elevated in both serum and urine samples [20,29]. IL-6 is a crucial player in the inflammatory microenvironment of MM. It is also itself a biomarker of prognostic significance [30,31]. Hepcidin mRNA in monocytes of MM patients is elevated and in untreated cases it correlates negatively with hemoglobin, and positively with ferritin and IL-6 levels [32]. Data from murine models suggest that competition for iron within the bone marrow microenvironment occurs in the initial stages of MM-related anemia, which would make hepcidin- or cytokine-targeted therapy less effective in newly diagnosed patients [33]. This may also influence conclusions from studies based only on incident MM cases. This association could aid in choosing appropriate treatment in the future, especially in relapsing MM, including antibodies targeting myeloma cells' antigens, nuclear export inhibitors, or histone deacetylase inhibitors [34].

In our study, hepcidin and albumin were independent predictors of hemoglobin levels in multiple analysis adjusted for other variables correlated with hemoglobin, treatment characteristics, and sex. While hypoalbuminemia is a well-established prognostic indicator

in myeloma that is associated with disease severity [35], the potential of hepcidin-25 as a predictor of hemoglobin independent of treatment status is a novel finding. Moreover, we observed a significant relationship between hemoglobin and overall survival, with serum hepcidin-25 being the only independent negative predictor of survival among the studied indices of iron status. However, it is necessary to highlight that the observed association between serum hepcidin concentrations and survival must be considered preliminary due to the limitations of our study, and should be verified in larger studies. Hepcidin levels are increased in many malignancies, including MM, which provides an essential source of iron for the survival of neoplastic cells. Malignant cells require increasing cellular iron import by actions of hepcidin on ferroportin downregulation. In MM, hepcidin expression is related to bone morphogenetic protein 2 (BMP2) and IL-6. However, BMP2 is a stronger inducer of hepcidin than IL-6 [36]. Moreover, local levels of hepcidin are lower than serum levels. All of that suggest that most hepcidin in MM derives from the liver [20] It explains our observation of no correlation between hepcidin and IL-6.

High concentrations of hepcidin are observed in both CKD and in MM [29,37]. In CKD, patients with functional iron deficiency have higher hepcidin levels, which are predicted by the degree of inflammation (e.g., levels of ferritin, fibrinogen, IL-6) [37]. However, although in our study serum iron concentrations were correlated with renal function (serum creatinine, eGFR, and urine NGAL), we observed no such correlations in the case of serum ferritin, sTfR, and hepcidin. It is well known that renal impairment in MM reflects poor prognosis and determines the response to chemotherapy [3]. The lack of hepcidin correlation with renal function supports the role of hepcidin as a marker of poor prognosis in MM that is independent of renal injury.

GDF-15 is another potential mediator that plays a role within the myeloma microenvironment. It is secreted by abnormal bone marrow stromal cells [38,39]. The prognostic value of this biomarker has been previously described. GDF-15 concentrations are elevated in advanced MM and decline (alongside with hepcidin levels) following treatment [9,38–40]. In the present study, serum hepcidin-25 was associated with red blood cell parameters. We demonstrated that hemoglobin levels correlate not only with hepcidin-25, GDF-15, and IL-6, but also with kidney glomerular (i.e., creatinine as a surrogate) and tubular (i.e., NGAL as a surrogate) function. NGAL is a sensitive marker of kidney function in MM. It is often described as a “real-time indicator of renal injury”. It also shows a relationship with inflammation and tumor burden [3,41–44].

In the present study, several markers of myeloma burden, kidney injury, inflammation, and iron regulation have been tied to alterations in hemoglobin levels. These observations may reflect a complex network of pathological processes underlying MM. However, dedicated mechanistic study is necessary to evaluate whether these correlations reflect the interaction between molecular pathways or only parallel the progression of disease (and are therefore interrelated). Other limitations are also present and relate to the interpretation of findings. This investigation examined a heterogeneous patient sample at different stages of the disease, with varying degrees of organ involvement and treated with different modalities. These factors may confound our observations. Our conclusions are also based on biomarker assays performed at a single moment in time. The lack of prospective evaluation is a natural limitation of a cross-sectional design, though it is particularly relevant for concentrations of circulating proteins and small molecules, which physiologically fluctuate and can be transiently elevated.

## 5. Conclusions

Multiple myeloma is a progressive hematological malignancy with a poor prognosis and frequent organ impairment. Our results suggest that hepcidin-25 is involved in anemia in MM and its concentrations are not affected by kidney impairment. We postulate that in future, hepcidin-25 may be helpful to early diagnose anemia in MM patients independently of kidney impairment, which in consequence may support early treatment, improving disease management and increasing the quality of life. Moreover, serum hepcidin-25



may be an early predictor of survival in MM, independent of hemoglobin concentration; however, this result must be considered preliminary and needs confirmation in larger studies. In our study, neither sTfR, ferritin, nor sTfR/log(ferritin) were good predictors of hemoglobin concentration in patients with MM. However, MM progression is also driven by other factors, which indicates that a reliable model for disease assessment will require a panel of validated markers.

**Author Contributions:** All authors have contributed substantially to the work reported. All authors critically revised the paper. Conceptualization, K.W., J.M., K.B., K.K. and M.K.; data curation, M.B., K.W., K.B., K.K., M.K., J.M., M.Ż., P.D., A.J., A.M. and R.D.; formal analysis, M.B., K.W., J.M., K.B., E.K.-Ż., K.K., M.K., A.J., P.D. and R.D.; funding acquisition, K.K.; investigation and methodology, M.B., K.W., J.M., E.K.-Ż., K.K., M.K., M.Ż., A.M. and A.J.; software, P.D.; supervision, A.J., J.M., R.D. and K.K.; validation, K.W., J.M., K.B., K.K. and M.K.; visualization, K.W., J.M., K.B., K.K., M.K., and A.J.; writing—original draft, M.B., K.W., J.M., K.B., K.K. and M.K.; writing—review and editing, J.M., K.B., K.K., M.K., A.K., A.J., M.Ż., P.D. and R.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by a statutory grant from the Jagiellonian University Medical College (N41/DBS/000193; to K.K.).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethics Committee: Bioethics Committee of the Jagiellonian University (protocol code 1072.6120.248.2017).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data is available from the corresponding author upon reasonable request.

**Acknowledgments:** This study was conducted with the use of equipment purchased by Medical University of Białystok as part of the RPOWP 2007–2013 funding, Priority I, Axis 1.1, contract No. UDA-RPPD.01.01.00-20-001/15-00 dated 26 June 2015.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

## References

1. Rajkumar, S.V.; Dimopoulos, M.A.; Palumbo, A.; Blade, J.; Merlini, G.; Mateos, M.V.; Kumar, S.; Hillengass, J.; Kastritis, E.; Richardson, P.; et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, e538–e548. [\[CrossRef\]](#)
2. Rajkumar, S.V. Multiple Myeloma: 2020 Update on Diagnosis, Risk-Stratification and Management. *Am. J. Hematol.* **2020**, *95*, 548–567. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Woźniowicz, K.; Małyszko, J.; Koc-Żórawska, E.; Żórawski, M.; Dumnicka, P.; Jurczyszyn, A.; Batko, K.; Mazur, P.; Banaszkiwicz, M.; Krzanowski, M.; et al. Renal Impairment Detectors: IGFBP-7 and NGAL as Tubular Injury Markers in Multiple Myeloma Patients. *Medicina* **2021**, *57*, 1348. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Woźniowicz, K.; Małyszko, J.; Koc-Żórawska, E.; Żórawski, M.; Dumnicka, P.; Jurczyszyn, A.; Batko, K.; Mazur, P.; Banaszkiwicz, M.; Krzanowski, M.; et al. Transgelin-2 in Multiple Myeloma: A New Marker of Renal Impairment? *Molecules* **2022**, *27*, 79. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Ludwig, H.; Pohl, G.; Osterborg, A. Anemia in multiple myeloma. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* **2004**, *2*, 233–241.
6. Maes, K.; Nemeth, E.; Roodman, G.D.; Huston, A.; Esteve, F.; Freytes, C.; Callander, N.; Katodritou, E.; Tussing-Humphreys, L.; Rivera, S.; et al. In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2. *Blood* **2010**, *116*, 3635–3644. [\[CrossRef\]](#)
7. Banaszkiwicz, M.; Małyszko, J.; Batko, K.; Koc-Żórawska, E.; Żórawski, M.; Dumnicka, P.; Jurczyszyn, A.; Woźniowicz, K.; Tisończyk, J.; Krzanowski, M.; et al. Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma. *Mediat. Inflamm.* **2020**, *2020*, 5657864. [\[CrossRef\]](#)
8. Mittelman, M. The implications of anemia in multiple myeloma. *Clin. Lymphoma* **2003**, *4*, S23–S29. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Banaszkiwicz, M.; Małyszko, J.; Vesole, D.H.; Woźniowicz, K.; Jurczyszyn, A.; Żórawski, M.; Krzanowski, M.; Małyszko, J.; Batko, K.; Kuźniowski, M.; et al. New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1828. [\[CrossRef\]](#)
10. VanderWall, K.; Daniels-Wells, T.R.; Penichet, M.; Lichtenstein, A. Iron in Multiple Myeloma. *Crit. Rev. Oncog.* **2013**, *18*, 449–461. [\[CrossRef\]](#)

11. Takubo, T.; Kumura, T.; Nakao, T.; Nakamae, H.; Aoyama, Y.; Nishiki, S.; Kinoshita, Y.; Koh, K.R.; Ohta, K.; Yamane, T.; et al. Clinical usefulness of combined measurements of serum soluble transferrin receptor levels and serum interleukin-18 levels at determination of serum KL-6 levels in haematologic malignancies. *Acta Haematol.* **2000**, *104*, 141–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Alam, F.; Fatima, S.S.; Noor, S.; Bilal, A.; Rehman, R. Stages of chronic kidney disease and soluble Transferrin Receptor (sTfR), Ferritin ratio. *J. Pak. Med. Assoc.* **2017**, *67*, 848–851. [[PubMed](#)]
13. Greipp, P.R.; San Miguel, J.; Durie, B.G.; Crowley, J.J.; Barlogie, B.; Bladé, J.; Boccadoro, M.; Child, J.A.; Avet-Loiseau, H.; Kyle, R.A.; et al. International staging system for multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 3412–3420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kyle, R.A.; Gertz, M.A.; Witzig, T.E.; Lust, J.A.; Lacy, M.Q.; Dispenzieri, A.; Fonseca, R.; Rajkumar, S.V.; Offord, J.R.; Larson, D.R.; et al. Review of 1027 Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Mayo Clin. Proc.* **2003**, *78*, 21–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Birgegård, G.; Gascón, P.; Ludwig, H. Evaluation of Anaemia in Patients with Multiple Myeloma and Lymphoma: Findings of the European CANCER ANAEMIA SURVEY. *Eur. J. Haematol.* **2006**, *77*, 378–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Al Saleh, A.S.; Sidiqi, M.H.; Dispenzieri, A.; Kapoor, P.; Muchtar, E.; Buadi, F.K.; Warsame, R.; Lacy, M.Q.; Dingli, D.; Leung, N.; et al. Hematopoietic Score Predicts Outcomes in Newly Diagnosed Multiple Myeloma Patients. *Am. J. Hematol.* **2020**, *95*, 4–9. [[CrossRef](#)]
17. Beguin, Y. Soluble Transferrin Receptor for the Evaluation of Erythropoiesis and Iron Status. *Clin. Chim. Acta* **2003**, *329*, 9–22. [[CrossRef](#)]
18. Riedl, J.; Posch, F.; Königsbrügge, O.; Lötsch, F.; Reitter, E.M.; Eigenbauer, E.; Marosi, C.; Schwarzinger, I.; Zielinski, C.; Pabinger, I.; et al. Red cell distribution width and other red blood cell parameters in patients with cancer: Association with risk of venous thromboembolism and mortality. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e111440. [[CrossRef](#)]
19. Nemeth, E.; Rivera, S.; Gabayan, V.; Keller, C.; Taudorf, S.; Pedersen, B.K.; Ganz, T. IL-6 Mediates Hypoferremia of Inflammation by Inducing the Synthesis of the Iron Regulatory Hormone Hepcidin. *J. Clin. Investig.* **2004**, *113*, 1271–1276. [[CrossRef](#)]
20. Sharma, S.; Nemeth, E.; Chen, Y.-H.; Goodnough, J.; Huston, A.; Roodman, G.D.; Ganz, T.; Lichtenstein, A. Involvement of Hepcidin in the Anemia of Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 3262–3267. [[CrossRef](#)]
21. Silvestris, F.; Tucci, M.; Cafforio, P.; Dammacco, F. Fas-L up-Regulation by Highly Malignant Myeloma Plasma Cells: Role in the Pathogenesis of Anemia and Disease Progression. *Blood* **2001**, *97*, 1155–1164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Silvestris, F.; Cafforio, P.; Tucci, M.; Dammacco, F. Negative Regulation of Erythroblast Maturation by Fas-L(+)/TRAIL(+) Highly Malignant Plasma Cells: A Major Pathogenetic Mechanism of Anemia in Multiple Myeloma. *Blood* **2002**, *99*, 1305–1313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. McCranor, B.J.; Kim, M.J.; Cruz, N.M.; Xue, Q.-L.; Berger, A.E.; Walston, J.D.; Civin, C.I.; Roy, C.N. Interleukin-6 Directly Impairs the Erythroid Development of Human TF-1 Erythroleukemic Cells. *Blood Cells Mol. Dis.* **2014**, *52*, 126–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bouchnita, A.; Eymard, N.; Moyo, T.K.; Koury, M.J.; Volpert, V. Bone Marrow Infiltration by Multiple Myeloma Causes Anemia by Reversible Disruption of Erythropoiesis. *Am. J. Hematol.* **2016**, *91*, 371–378. [[CrossRef](#)]
25. Beguin, Y.; Yerna, M.; Loo, M.; Weber, M.; Fillet, G. Erythropoiesis in Multiple Myeloma: Defective Red Cell Production Due to Inappropriate Erythropoietin Production. *Br. J. Haematol.* **1992**, *82*, 648–653. [[CrossRef](#)]
26. Rokicka-Piotrowicz, M.; Paszkowska, M.; Król, M.; Kuratowska, Z. Analysis of causes for anemia in patients with multiple myeloma. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **2000**, *104*, 843–851.
27. Wrighting, D.M.; Andrews, N.C. Interleukin-6 Induces Hepcidin Expression through STAT3. *Blood* **2006**, *108*, 3204–3209. [[CrossRef](#)]
28. Mohty, M.; Brissot, E.; Savani, B.N.; Gaugler, B. Effects of bortezomib on the immune system: A focus on immune regulation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2013**, *19*, 1416–1420. [[CrossRef](#)]
29. Ganz, T.; Olbina, G.; Girelli, D.; Nemeth, E.; Westerman, M. Immunoassay for Human Serum Hepcidin. *Blood* **2008**, *112*, 4292–4297. [[CrossRef](#)]
30. Harmer, D.; Falank, C.; Reagan, M.R. Interleukin-6 Interweaves the Bone Marrow Microenvironment, Bone Loss, and Multiple Myeloma. *Front. Endocrinol.* **2019**, *9*, 788. [[CrossRef](#)]
31. Pelliniemi, T.T.; Irjala, K.; Mattila, K.; Pulkki, K.; Rajamäki, A.; Tienhaara, A.; Laakso, M.; Lahtinen, R. Immunoreactive Interleukin-6 and Acute Phase Proteins as Prognostic Factors in Multiple Myeloma. Finnish Leukemia Group. *Blood* **1995**, *85*, 765–771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Han, X.; Zhou, D.-B.; Duan, M.-H.; Wang, X.; Zhang, J.-P.; Zhao, Y.-Q.; Shen, T.; Wu, Y.-J. Peripheral blood monocyte hepcidin in patients with multiple myeloma is associated with anemia of chronic disease. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **2013**, *21*, 403–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bordini, J.; Bertilaccio, M.T.S.; Ponzoni, M.; Fermo, I.; Chesi, M.; Bergsagel, P.L.; Camaschella, C.; Campanella, A. Erythroblast Apoptosis and Microenvironmental Iron Restriction Trigger Anemia in the VK\*MYC Model of Multiple Myeloma. *Haematologica* **2015**, *100*, 534–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Field-Smith, A.; Morgan, G.J.; Davies, F.E. Bortezomib (Velcade/trade mark) in the Treatment of Multiple Myeloma. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2006**, *2*, 271–279. [[CrossRef](#)]
35. Kim, J.E.; Yoo, C.; Lee, D.H.; Kim, S.-W.; Lee, J.-S.; Suh, C. Serum Albumin Level Is a Significant Prognostic Factor Reflecting Disease Severity in Symptomatic Multiple Myeloma. *Ann. Hematol.* **2010**, *89*, 391–397. [[CrossRef](#)]
36. Vela, D.; Vela-Gaxha, Z. Differential regulation of hepcidin in cancer and non-cancer tissues and its clinical implications. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, e436. [[CrossRef](#)]



37. Łukaszyk, E.; Łukaszyk, M.; Koc-Żórawska, E.; Tobolczyk, J.; Bodzenta-Łukaszyk, A.; Małyszko, J. Iron Status and Inflammation in Early Stages of Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Press. Res.* **2015**, *40*, 366–373. [[CrossRef](#)]
38. Tanno, T.; Lim, Y.; Wang, Q.; Chesi, M.; Bergsagel, P.L.; Matthews, G.; Johnstone, R.W.; Ghosh, N.; Borrello, I.; Huff, C.A.; et al. Growth Differentiating Factor 15 Enhances the Tumor-Initiating and Self-Renewal Potential of Multiple Myeloma Cells. *Blood* **2014**, *123*, 725–733. [[CrossRef](#)]
39. Corre, J.; Labat, E.; Espagnolle, N.; Hébraud, B.; Avet-Loiseau, H.; Roussel, M.; Huynh, A.; Gadelorge, M.; Cordelier, P.; Klein, B.; et al. Bioactivity and Prognostic Significance of Growth Differentiation Factor GDF15 Secreted by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Multiple Myeloma. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 1395–1406. [[CrossRef](#)]
40. Mei, S.; Wang, H.; Fu, R.; Qu, W.; Xing, L.; Wang, G.; Song, J.; Liu, H.; Li, L.; Wang, X.; et al. Hepcidin and GDF15 in Anemia of Multiple Myeloma. *Int. J. Hematol.* **2014**, *100*, 266–273. [[CrossRef](#)]
41. Mori, K.; Nakao, K. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as the Real-Time Indicator of Active Kidney Damage. *Kidney Int.* **2007**, *71*, 967–970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Papassotiriou, G.-P.; Kastiris, E.; Gkatzamanidou, M.; Christoulas, D.; Eleutherakis-Papaiakovou, E.; Migkou, M.; Gavriatopoulou, M.; Roussou, M.; Margeli, A.; Papassotiriou, I.; et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and Cystatin C Are Sensitive Markers of Renal Injury in Patients With Multiple Myeloma. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2016**, *16*, 29–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Chae, H.; Ryu, H.; Cha, K.; Kim, M.; Kim, Y.; Min, C.-K. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Biomarker of Renal Impairment in Patients with Multiple Myeloma. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2015**, *15*, 35–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wozniowicz, K.; Vesole, D.H.; Małyszko, J.; Batko, K.; Jurczyszyn, A.; Koc-Żórawska, E.; Krzanowski, M.; Małyszko, J.; Żórawski, M.; Waszczuk-Gajda, A.; et al. New Markers of Renal Failure in Multiple Myeloma and Monoclonal Gammopathies. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## **Rozdział 8.**

### **Streszczenia artykułów**

#### **8.1. New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia opublikowany w Journal of Clinical Medicine.**

**Rok publikacji 2019; IF - 3,303; MNiSW/MEiN - 140**

Szpiczak mnogi, będący nowotworem złośliwym klonalnych komórek plazmatycznych, stanowi około 10% wszystkich nowotworów hematologicznych. Zapadalność jest wyższa u osób starszych, a także wśród Afroamerykanów. Jednymi z najczęstszych objawów obok osteolizy kości są niedokrwistość oraz uszkodzenie nerek. Anemia rozwija się w wyniku podobnych zależności jak w przypadku ACD – na drodze supresji erytropoezy przez cytokiny (względny niedobór EPO), a także w wyniku zaburzeń czynności nerek (rzeczywisty niedobór EPO) oraz poprzez mielosupresyjne działania uboczne chemioterapii. Zwiększone wykorzystanie żelaza w komórkach nowotworowych może być odpowiedzialne za rozwój niedokrwistości u pacjentów z MM nawet bez współistniejącej niewydolności nerek. Powikłaniami niedokrwistości mogą być: trwała dysfunkcja narządów, nasilające się niedokrwienie a w konsekwencji zmiany w metabolizmie nowotworów i oporność na chemio- oraz radioterapię. Coraz częściej nowe biomarkery gospodarki żelazem jak: GDF15, sTfR i hepcydyna 25 są badane w przypadku chorób takich jak anemia, przewlekła choroba nerek, choroby nowotworowe czy choroby serca. Rzadko jednak łączy się w badaniach zależność tych markerów z więcej niż dwoma chorobami jednocześnie. Nowe biomarkery badane są nie tylko jako molekuły wskazujące na rozwój anemii, ale również wydają się pomocne w diagnostyce jej przyczyn, co umożliwi skuteczniejszy dobór leczenia. Nadal ilość prac nad nowymi markerami gospodarki żelazowej jest niewystarczająca do stworzenia panelu badań wystandaryzowanego dla MM. Wydaje się więc zasadne kontynuowanie prac nad tymi markerami, co w przyszłości może skutkować włączeniem ich do rutynowej oceny diagnostycznej i prognostycznej w przypadku chorych z MM i niewydolnością nerek, a także będzie prowadzić do opracowania interwencji terapeutycznych.

## **8.2. Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma opublikowany w Mediators of Inflammation.**

**Rok publikacji 2020; IF – 4,711; MNiSW/MEiN - 100**

GDF15 jako członek rodziny TGF-beta uczestniczy w procesach związanych z rozwojem szpiczaka mnogiego, a także powstaniem z powikłań narządowych. Odgrywa znaczącą rolę zarówno w fizjologicznej jak i patologicznej erytropoezie regulując gospodarkę żelazową poprzez wpływ na ekspresję hepcydyny. Może również odzwierciedlać mikrośrodowisko nowotworu, ponieważ w przypadku MM jest nieprawidłowo wydzielany przez komórki zrębu szpiku kostnego. Celem badania była ocena zależności stężeń GDF15 z anemią oraz uszkodzeniem nerek w grupie chorych z MM. W grupie 73 pacjentów z MM oraz SMM analizowano zależności stężenia GDF15 w surowicy m. in. z dotychczas stosowanymi markerami anemii (HGB oraz stężeniem żelaza), parametrami nerkowymi, zaawansowaniem choroby podstawowej, odpowiedzią na leczenie i śmiertelnością. Dodatkowo oceniono zależność GDF15 z innymi nowymi markerami gospodarki żelazowej. W grupie kontrolnej znajdowało się 21 zdrowych osób.

### **Wyniki:**

Stężenie GDF15 w surowicy było dodatnio związane ze stopniem ISS ( $R = 0,65$ ;  $p < 0,001$ ) i wykazywało istotne różnice między pacjentami w różnych stadiach MM. Wartości GDF15 były różne w zależności od odpowiedzi na leczenie: pacjenci z całkowitą remisją (ang. complete remission – CR) mieli niższe stężenie GDF15 niż reszta grupy (chorzy z częściową remisją (ang. partial remission – PR), stabilną chorobą (ang. stable disease – SD) lub postępującą chorobą (ang. progressive disease – PD)) (mediana 1029 pg/ml versus 1390 pg/ml;  $p = 0,013$ ). Chorzy, którzy otrzymywali chemioterapię podtrzymującą na początku badania mieli wyższe wartości GDF15. Stężenie GDF15 w surowicy korelowało ze stężeniem prognostycznych markerów zaawansowania choroby nowotworowej: pozytywnie z całkowitym ( $\kappa$  i  $\lambda$ ) stężeniem FLC w surowicy ( $R = 0,35$ ;  $p = 0,002$ ), całkowitym stężeniem LC w moczu ( $R = 0,37$ ;  $p = 0,001$ ) i stężeniem  $\beta 2$ -mikroglobuliny w surowicy ( $R = 0,67$ ;  $p < 0,001$ ) oraz negatywnie ze stężeniem albuminy ( $R = -0,52$ ;  $p < 0,001$ ). Ponadto, stężenie GDF15 w surowicy było istotnie wyższe u badanych pacjentów z niedokrwistością ( $p < 0,001$ )

oraz wykazano odwrotną zależność z wartością hemoglobiny ( $R = 0,50$ ;  $p < 0,001$ ) i żelaza w surowicy ( $R = 0,28$ ;  $p = 0,024$ ). Ujemną zależność wykazano także pomiędzy GDF15 a wartościami eGFR wyliczonymi na podstawie stężenia kreatyniny i cystatyny C (odpowiednio  $R = -0,54$ ;  $p < 0,001$  oraz  $R = -0,67$ ;  $p < 0,001$ ). Natomiast dodatnią zależność odnotowano pomiędzy GDF15 i hepcydyną 25 w surowicy ( $R = 0,25$ ;  $p = 0,031$ ), a także pomiędzy GDF15 a markerami filtracji kłębuszkowej: stężeniem kreatyniny w surowicy ( $R = 0,57$ ;  $p < 0,001$ ) oraz cystatyny C w surowicy ( $R = 0,70$ ;  $p < 0,001$ ) oraz pomiędzy GDF15 w surowicy a markerami uszkodzenia cewek nerkowych: stężeniem NGAL w moczu ( $R = 0,56$ ;  $p < 0,001$ ) oraz słabszą ze stężeniem cystatyny C w moczu ( $R = 0,24$ ;  $p = 0,040$ ). GDF15 nie był istotnie związany z całkowitym przeżyciem ani w prostej analizie, ani po dołączeniu predyktorów śmiertelności takich jak stopień ISS czy odpowiedź na chemioterapię.

Wnioski z przeprowadzonych badań:

GDF15 jako element nieprawidłowego mikrośrodowiska szpiczaka może stanowić jedną z przyczyn patologicznych mechanizmów w MM oraz mieć związek z zaawansowaniem choroby (korelacje z ISS oraz z markerami zaawansowania choroby nowotworowej) i powikłaniami wynikającymi z choroby podstawowej, np.: niedokrwistością (powiązania z HGB oraz stężeniem żelaza) czy uszkodzeniem nerek. Z uwagi na zależności pomiędzy GDF15 a niektórymi markerami obciążenia MM, będącymi również wskaźnikami uszkodzenia nerek, jak np.:  $\beta$ 2-mikroglobulina oraz na korelacje z podstawowymi markerami filtracji kłębuszkowej (kreatyniną i cystatyną C) wydaje się zasadne powiązanie wyższych stężeń GDF15 również z upośledzeniem filtracji kłębuszkowej w przebiegu MM. Jednak związek GDF15 ze stężeniem NGAL w moczu we wszystkich podgrupach klinicznych, może sugerować lepsze odzwierciedlenie przez stężenia GDF15 uszkodzenia cewek nerkowych niż kłębuszka. W przyszłości zasadnym może być dobór diagnostyki i leczenia w oparciu o ten marker, czego efektem stanie się nie tylko skuteczniejsze leczenie niedokrwistości, ale również zmniejszenie uszkodzenia nerek w przebiegu MM, a także zmniejszenie ilości hospitalizacji wynikającej z tych powikłań i poprawa jakości życia chorych.

### **8.3. The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment opublikowany w Medicina.**

**Rok publikacji 2022; IF – 2,430; MEiN - 40**

Anemia, będąca częstym powikłaniem szpiczaka mnogiego, jest spowodowana złożonymi patomechanizmami w tym nieprawidłową gospodarką żelaza w organizmie. Jednym z elementów wpływających na jej funkcjonowanie jest hepcydyna, która kontroluje wchłanianie żelaza z jelit, a także jego transport w organizmie oraz uwalnianie z makrofagów. Kolejną cząsteczką jest sTfR chroniący komórki przed toksycznością związaną z żelazem. Celem przedstawionej pracy była ocena zależności stężeń sTfR i hepcydyny 25 z anemią oraz uszkodzeniem nerek w grupie chorych z MM. Do badania włączono 73 pacjentów z MM (6 z SMM oraz 67 z objawową postacią), follow up wyniósł średnio 27 miesięcy, natomiast grupę kontrolną stanowiło 21 zdrowych ochotników. Oceniano zależności pomiędzy sTfR i hepcydyną 25 w surowicy m. in. z klasycznymi markerami anemii (w tym HGB, stężeniem żelaza), markerami uszkodzenia nerek, zaawansowaniem choroby podstawowej, odpowiedzią na leczenie i śmiertelnością. Dodatkowo oceniono zależności badanych biomarkerów między sobą oraz z GDF15.

#### **Wyniki:**

Pacjenci z MM mieli wyższe stężenie sTfR w surowicy w porównaniu do osób z grupy kontrolnej (mediana 25,0 nmol/l versus 19,4 nmol/l;  $p = 0,002$ ), natomiast w przypadku hepcydyny 25 stężenia nie różniły się znacząco w obu grupach. U badanych pacjentów nie zaobserwowano zależności pomiędzy zaawansowaniem choroby w postaci stopnia ISS a stężeniem sTfR w surowicy, podczas gdy hepcydyna 25 wykazała dodatnią zależność z tym wskaźnikiem ( $R = 0,29$ ,  $p = 0,012$ ). Stężenie sTfR w surowicy ujemnie korelowało ze stężeniem albumin ( $R = -0,25$ ;  $p = 0,031$ ), nie zaobserwowano natomiast żadnego związku z pozostałymi markerami zaawansowania MM (stężeniami FLC w surowicy, LC w moczu oraz  $\beta$ 2-mikroglobuliny w surowicy). W przypadku hepcydyny 25 nie odnotowano zależności z markerami stopnia zaawansowania MM. Natomiast stężenie hepcydyny 25 było istotnie wyższe u pacjentów, którzy otrzymywali leczenie podtrzymujące na początku badania ( $p = 0,005$ ), ale w przypadku sTfR ta różnica była statystycznie nieistotna. Leczenie

bortezomibem, ( $p = 0,019$ ), lenalidomidem ( $p = 0,008$ ) oraz sterydami ( $p = 0,008$ ) było związane ze znaczenie wyższym stężeniem hepcydyny 25 w surowicy. Zarówno stężenia sTfR ( $p = 0,012$ ) jak i hepcydyny 25 ( $p < 0,001$ ) były związane z odpowiedzią na leczenie. Stężenie sTfR jak i hepcydyny 25 w surowicy było wyższe w grupie pacjentów z anemią w porównaniu do pacjentów bez niedokrwistości (odpowiednio: mediana 27,7 nmol/l versus 24,0 nmol/l;  $p = 0,041$  oraz mediana 54,2 ng/ml versus 21,9 ng/ml;  $p = 0,002$ ). Wykazano ujemną zależność pomiędzy stężeniem hepcydyny 25 w surowicy a stężeniem HGB ( $R = -0,39$ ;  $p < 0,001$ ). Stężenie sTfR nie było związane ze stężeniem HGB w badanej grupie. W analizie wieloskładnikowej dostosowanej do płci, odpowiedzi na leczenie (CR, PR, SD lub PD), stanu leczenia w momencie włączenia do badania (podtrzymujące lub brak) hepcydyna 25 okazała się niezależnym predyktorem stężenia HGB ( $R = -0,27$ ;  $p = 0,016$ ). Hepcydyna 25 wykazała istotną zależność z MCV ( $R = 0,23$ ,  $p = 0,048$ ), MCH ( $R = 0,24$ ;  $p = 0,040$ ) i RDW-CV ( $R = 0,33$ ;  $p = 0,004$ ).  $\log(\text{sTfR})$  był negatywnie związany z MCHC ( $R = -0,24$ ;  $p = 0,039$ ). Nie zaobserwowano związku zarówno z hepcydyną 25 jak i sTfR z markerami nerkowymi (stężeniem kreatyniny w surowicy, eGfR, stężeniem NGAL w moczu). Hepcydyna 25 i sTfR nie wykazywały korelacji między sobą, natomiast stężenie sTfR wykazywało dodatnią zależność ze stężeniem GDF15 w surowicy ( $R = 0,27$ ;  $p = 0,019$ ), natomiast w przypadku hepcydyny 25 nie zaobserwowano podobnego związku. Średnio po 27 miesiącach od rozpoczęcia badania zebrano dane dotyczące śmiertelności. Po podsumowaniu wyników wyjściowe stężenie hepcydyny 25 w surowicy w sposób istotny przewidywało przeżycie w analizie prostej [współczynnik ryzyka (ang. hazard ratio – HR) = 1,03;  $p = 0,002$ ], okazało się predyktorem przeżycia niezależnym od stężenia HGB (HR = 1,02;  $p = 0,041$ )]. Nie zaobserwowano związku pomiędzy wyjściowym stężeniem sTfR w surowicy a przeżyciem.

Wnioski z przeprowadzonych badań:

Hepcydyna 25 może okazać się pomocna we wczesnym diagnozowaniu anemii u pacjentów z MM niezależnie od stopnia uszkodzenia nerek, co w konsekwencji przyczyni się do włączenia skutecznego leczenia na wcześniejszym etapie oraz podniesie jakość życia chorych. Ponadto oznaczenie stężenia hepcydyny 25 w surowicy może być wczesnym predyktorem przeżycia w MM niezależnie od stężenia HGB,



jednakże to założenie należy uznać za wstępne i wymagające dalszego potwierdzenia w kolejnych badaniach. Oznaczenie stężenia sTfR w surowicy nie wiąże się z przewidywaniem rozwoju niedokrwistości ani określaniem ryzyka śmiertelności wśród pacjentów z MM. Jednak progresja MM jest napędzana przez różne czynniki, co sugeruje, że wiarygodny model oceny choroby będzie wymagał panelu zwalidowanych markerów.

## **Rozdział 9.**

### **Wnioski**

1. Stężenie GDF15 i hepcydyny 25 w surowicy jest powiązane z zaawansowaniem MM oraz odpowiedzią na leczenie, natomiast stężenie sTfR w surowicy wykazuje korelacje jedynie z odpowiedzią na leczenie. Dodatkowo na stężenie hepcydyny 25 ma wpływ z rodzaj stosowanego leczenia.
2. Oznaczenia stężenie GDF15 w surowicy jest przydatnym markerem niedokrwistości i zapasów żelaza w MM niezależnym od stadium zaawansowania choroby, stosowanego leczenia czy odpowiedzi na to leczenie. Również hepcydyna 25 jest wskaźnikiem niedokrwistości w MM.
3. Stężenie GDF15 w surowicy jest skorelowane zarówno z markerami upośledzenia filtracji kłębuszkowej, jak i uszkodzenia cewek nerkowych, jednakże związek ze stężeniem NGAL w moczu wydaje się być silniejszy.
4. Stężenie hepcydyny 25 w surowicy jest wskaźnikiem śmiertelności w grupie chorych z MM niezależnym od czynności nerek oraz niepowiązanym ze stężeniem HGB.
5. Stężenie GDF15 w surowicy wykazało zależność zarówno z hepcydyną 25 jak i sTfR, natomiast hepcydyna 25 i sTfR nie wykazały zależności między sobą.

## Rozdział 10.

### Streszczenie

Szpiczak mnogi, stanowiący 10% nowotworów hematologicznych, najczęściej dotyka osób starszych, jednakże w ostatnich latach granica wieku rozpoznawania MM przesuwana się stopniowo w kierunku młodszych pacjentów. Spośród manifestacji szpiczaka dominująca jest niedokrwistość, a w dalszej kolejności zmiany kostne i uszkodzenie nerek.

Anemia, będąca wczesnym powikłaniem MM, ma złożoną patogenezę. Do jej przyczyn możemy zaliczyć, m. in. wzmożoną ekspresję szlaku cytokin przyczyniającą się do rozwoju ACD, wypieranie prawidłowych komórek szpiku kostnego przez komórki szpiczaka, zaburzenie prawidłowej gospodarki żelazowej, czy zmniejszone wydzielanie EPO spowodowane niewydolnością nerek. Niedokrwistość koreluje z gorszym rokowaniem w tej grupie pacjentów. W leczeniu anemii stosowane są klasyczne metody leczenia jak: suplementacja żelaza, transfuzje składników krwi (wymagające częstszych hospitalizacji) oraz stosowanie EPO (związane ze zwiększonym ryzykiem zakrzepowo-zatorowym w powiązaniu ze stosowaniem chemioterapii). Aktualnie trwają prace nad nową formą leczenia w postaci rekombinowanych białek fuzyjnych rozpuszczalnego receptora aktiwiny typu II oraz IgG-Fc. Do oceny stopnia i zaawansowania niedokrwistości służą stężenia: HGB, hematokrytu, RBC, MCH, MCHC, MCV, RDW-CV i żelaza. Istnieją jednak nowe biomarkery gospodarki żelazowej takie jak: GDF15, sTfR czy hepcydyna 25, które mogą poprawić diagnostykę i rozpoznanie anemii.

Praca doktorska oparta jest na cyklu 3 prac, które wskazują na możliwość zastosowania nowych biomarkerów gospodarki żelazowej: GDF15, sTfR i hepcydyny 25 u chorych ze szpiczakiem mnogim oraz przewlekłą chorobą nerek. Badano związek między markerami a zaawansowaniem nowotworu, anemią, uszkodzeniem nerek, śmiertelnością, jak również powiązania markerów pomiędzy sobą.

Do badania zakwalifikowano łącznie 73 chorych z MM lub SMM. Od każdego pacjenta pobrano próbki krwi oraz moczu, z których oznaczono biomarkery gospodarki żelazowej (GDF15, sTfR, hepcydynę 25), a także standardowe wskaźniki anemii i niedoboru żelaza, markery zaawansowania MM, uszkodzenia nerek oraz stanu zapalnego. Po okresie średnio 27 miesięcy od rozpoczęcia badania oceniono markery niedokrwistości, i uzupełniono dane dotyczące zgonu (jeśli wystąpił).

Spośród badanych markerów stężenie GDF15 w surowicy najlepiej związane jest ze stadium zaawansowania MM (zarówno ze stadium ISS jak i stężeniem FLC w surowicy, LC w moczu,  $\beta$ 2-mikroglobuliny w surowicy oraz albuminy w surowicy) oraz odpowiedzią na leczenie, natomiast wartości hepcydyny 25 oznaczane w surowicy są dodatkowo powiązane z rodzajem stosowanego leczenia. Stężenia wszystkich markerów były wyższe u chorych z niedokrwistością, jednakże zależności ze stężeniem HGB wykazały jedynie GDF15 i hepcydyna 25. Zaobserwowano powiązanie stężenia GDF15 w surowicy z markerami upośledzenia filtracji kłębuszkowej jak i uszkodzenia cewek nerkowych. Nie wykazano korelacji pomiędzy wszystkimi biomarkerami – najwięcej zależności prezentował GDF15. Wykazano, że stężenie hepcydyny 25 w surowicy może być predyktorem śmiertelności wśród chorych z MM niezależnym od uszkodzenia nerek jak i od stężenia HGB.

Biorąc pod uwagę powyższe wyniki wydaje się zasadne oznaczanie markerów gospodarki żelazowej u chorych za szpiczakiem mnogim celem przewidywania rozwoju anemii, a także oceny rokowania pacjentów niezależnie od współistniejących powikłań MM. Dzięki temu możliwe będzie wcześniejsze interweniowanie, wdrażanie profilaktyki oraz farmakoterapii w oparciu o te markery, co może zapobiec rozwojowi takich konsekwencji jak powikłania sercowo-naczyniowe, pogorszenie funkcji poznawczych czy częste hospitalizacje związane z przetaczaniem preparatów krwi, a tym samym podniesie jakość życia chorych. Konieczne jest jednak kontynuowanie badań nad tymi markerami celem wykluczenia wpływu innych czynników oraz precyzyjnej oceny faktycznej możliwości ich zastosowania w grupie pacjentów z MM.

## **Rozdział 11.**

### **Summary**

Multiple myeloma, which represents 10% of haematological neoplasms, mainly affects the elderly. In recent years the age limit for MM diagnosis has been gradually edging towards the younger population. The most common manifestations of MM are: predominantly anaemia and consequent symptoms due to bone and kidney failure.

Anaemia, which is an early complication of MM, has multifactorial pathogenesis. The predominant causes are due to: overexpression of cytokines pathway which contribute to development of ACD, displacement of normal bone marrow cells by myeloma cells, disturbance of normal ferritic management and reduced EPO secretion due to renal failure. Anaemia correlates with worse prognosis; moreover it may be an independent predictor of development of impaired kidney function in multiple myeloma. In treatment of anaemia, classic methods are used such as iron supplementation, blood transfusions (which require frequent hospitalizations) and the use of EPO (associated with increased risk of thromboembolism). Currently new forms of anaemia pharmacotherapy are being studied (recombinant, soluble activin type-II receptor–IgG-Fc fusion proteins).

Concentrations of HGB, haematocrit, RBC, MCH, MCHC, MCV, RDW-CV and iron are used for classical assessment of anaemia. Presently there are new biomarkers of ferritic management (GDF15, sTfR or hepcidin 25) which can improve the recognition of anaemia.

This doctoral dissertation is based on the cycle of 3 publications that evaluate the use of new biomarkers of ferritic management (GDF15, sTfR and hepcidin 25) in patients with multiple myeloma and renal failure. The relationship between markers and neoplasm advancement, anaemia, kidney failure, mortality, as well as the associations between indicators were compared and studied.

73 patients were included into the study with MM or SMM. Blood and urine samples were drawn from each patient. Biomarkers of ferritic management (GDF15, sTfR, hepcidin 25), as well as standard indicators of anaemia and iron deficiency, markers of MM advancement, renal failure and inflammation were assayed. After an interval of 27 months from the start of the study, laboratory test results from the last visit (mainly markers of anaemia) were evaluated and mortality data were completed.

After evaluation of the studied markers, Serum GDF15 concentrations had the best correlations with advancement of MM (ISS stage, as well as serum levels of FLC, urine LC, serum  $\beta$ 2-microglobulin and serum albumin) and treatment response. Meanwhile, serum hepcidin 25 concentrations were additionally associated with the type of treatment prescription. Serum levels of all markers were higher in patients with anaemia; while only GDF15 and hepcidin 25 showed correlation with HGB concentrations. Associations between serum GDF15 concentrations and markers of glomerular filtration impairment and renal tubular damage were observed. GDF15 presented most frequent associations with other biomarkers. Serum levels of hepcidin 25 have been predictors of mortality in MM patients independently of kidney injury and HGB concentrations.

Taking into consideration the above results, it seems reasonable to assay biomarkers of ferritic management in the MM population to predict development of anaemia, as well as to assess patients prognosis independently of concomitant complications of multiple myeloma. These markers may serve to be helping tools in earlier intervention, prevention implementation and pharmacotherapy. In turn they may prevent the development of such consequences as: cardiovascular complications, cognitive deterioration or frequent hospitalizations associated with blood transfusions; and very importantly increase patients quality of life. One must emphasize the necessity to continue studies concerning these markers in order to exclude the influence of other factors and to precisely assess the effectiveness in their use in MM.



## Rozdział 12.

### Spis piśmiennictwa

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.* 2017, 67, 7–30.
2. Dmoszyńska, A. Postępy w diagnostyce i leczeniu szpiczaka plazmocytowego. *Onkol Prakt Klin*, 2007, 3, 69-76.
3. Rajkumar, S.V. Multiple Myeloma: 2020 Update on Diagnosis, Risk-Stratification and Management. *Am. J. Hematol.* 2020, 95, 548–567.
4. Kyle, R.A.; Gertz, M.A.; Witzig, T.E.; Lust, J.A.; Lacy, M.Q.; Dispenzieri, A.; Fonseca, R.; Rajkumar, S.V.; O'ord, J.R.; Larson, D.R. et al. Review of 1027 Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Mayo Clin. Proc.* 2003, 78, 21–33.
5. Ludwig, H.; Pohl, G.; Osterborg, A. Anemia in multiple myeloma. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 2004, 2, 233–241.
6. Birgegård, G.; Gascón, P.; Ludwig, H. Evaluation of anaemia in patients with multiple myeloma and lymphoma: Findings of the European CANCER ANAEMIA SURVEY. *Eur. J. Haematol.* 2006, 77, 378–386.
7. Maes, K.; Nemeth, E.; Roodman, G.D.; Huston, A.; Esteve, F.; Freytes, C.; Callander, N.; Katodritou, E.; Tussing-Humphreys, L.; Rivera, S. et al. In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2. *Blood* 2010, 116, 3635–3644.
8. VanderWall, K.; Daniels-Wells, T.R.; Penichet, M.; Lichtenstein, A. Iron in multiple myeloma. *Crit. Rev. Oncog.* 2013, 18, 449–461.
9. Jurczyszyn, A.; Skotnicki, A. Szpiczak Mnogi – Wybrane Zagadnienia, 1sza edycja.; Wydawnictwo Medyczne: Wrocław, Poland, 2011; ISBN 978-83-932189-0-5.
10. Mittelman, M. The implications of anemia in multiple myeloma. *Clin. Lymphoma* 2003, 4, S23–S29.
11. Liu, M.-M.; Xu, H.-Z.; Feng, X.-M.; Zhang, Y.; Liu, Y.-X. Clinical Research about Risk Factors and Reversible Predictors in Renal Impairment due to Multiple Myeloma. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2015, 23, 722–727.
12. Fenaux, P.; Platzbecker, U.; Mufti, G.J.; Garcia-Manero, G.; Buckstein, R.; Santini, V.; Diez-Campelo, M.; Finelli, C.; Cazzola, M.; Ihan, O. The Medalist

- Trial: Results of a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled study of luspaterecept to treat anemia in patients with very low-, low-, or intermediate-risk myelodysplastic syndromes (MDS) with ring sideroblasts (RS) who require red. Blood 2018, 132, 1.
13. Jelkmann, W. Activin receptor ligand traps in chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2018, 27, 351–357.
  14. Corre, J.; Hébraud, B.; Bourin, P. Concise review: Growth differentiation factor 15 in pathology: A clinical role? *Stem Cells Transl. Med.* 2013, 2, 946–952.
  15. Corre, J.; Labat, E.; Espagnol, N.; Hébraud, B.; Avet-Loiseau, H.; Roussel, M.; Huynh, A.; Gadelorge, M.; Cordelier, P.; Klein, B. et al. Bioactivity and Prognostic Significance of Growth Differentiation Factor GDF15 Secreted by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Multiple Myeloma. *Cancer Res.* 2012, 72, 1395–1406.
  16. Nair, V.; Robinson-Cohen, C.; Smith, M.R.; Bellovich, K.A.; Bhat, Z.Y.; Bobadilla, M.; Brosius, F.; de Boer, I.H. Essioux, L.; Formentini, I. et al. Growth Differentiation Factor-15 and Risk of CKD Progression. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2017, 28, 2233–2240.
  17. Kastiris, E.; Papassotiropoulos, I.; Merlini, G.; Milani, P.; Terpos, E.; Basset, M.; Akalestos, A.; Russo, F.; Psimenou, E.; Apostolakou, F. et al. Growth differentiation factor-15 is a new biomarker for survival and renal outcomes in light chain amyloidosis. *Blood* 2018, 131, 1568–1575.
  18. Tarkun, P.; Birtas Atesoglu, E.; Mehtap, O.; Musul, M.M.; Hacıhanefioglu, A. Serum Growth Differentiation Factor 15 Levels in Newly Diagnosed Multiple Myeloma Patients. *Acta Haematol.* 2014, 131, 173–178.
  19. Katodritou, E.; Speletas, M.; Zervas, K.; Kapetanios, D.; Georgiou, E.; Christoforidou, A.; Pavlitou, A.; Sion, M.; Christakis, J. Evaluation of Hypochromic Erythrocytes in Combination with sTfR-F Index for Predicting Response to r-HuEPO in Anemic Patients with Multiple Myeloma. *Lab. Hematol.* 2006, 12, 47–54.
  20. Speckaert, M.M.; Speckaert, R.; Delanghe, J.R. Biological and clinical aspects of soluble transferrin receptor. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2010, 47, 213–228.
  21. Worwood, M. Serum transferrin receptor assays and their application. *Ann. Clin. Biochem.* 2002, 39, 221–230.

22. Petzer, V.; Theurl, I.; Weiss, G. Established and Emerging Concepts to Treat Imbalances of Iron Homeostasis in Inflammatory Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* 2018, 11, 135.
23. Subha Palaneeswari, M.; Ganesh, M.; Karthikeyan, T.; Devi, A.M.; Mythili, S.V. Hepcidin–Minireview. *J. Clin. Diagn. Res.* 2013, 7, 1767–1771.
24. Alam, F.; Fatima, S.S.; Noor, S.; Bilal, A.; Rehman, R. Stages of chronic kidney disease and soluble Transferrin Receptor (sTfR), Ferritin ratio. *J. Pak. Med. Assoc.* 2017, 67, 848–851.
25. Theurl, I.; Finkenstedt, A.; Schroll, A.; Nairz, M.; Sonnweber, T.; Bellmann-Weiler, R.; Theurl, M.; Seifert, M.; Wroblewski, V. J.; Murphy, A. T. et al. Growth differentiation factor 15 in anaemia of chronic disease, iron deficiency anaemia and mixed type anaemia. *Br J Haematol.* 2010, 148, 449-455.
26. KDIGO CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2013, 3, 1–150.

## Rozdział 13.

### Oświadczenia współautorów

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu.

„New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia.” Autorzy: Małgorzata Banaszekiewicz, Jolanta Małyszko, David H. Vesole, Karolina Wozniowiczka, Artur Jurczyszyn, Marcin Żórawski, Marcin Krzanowski, Jacek Małyszko, Krzysztof Batko, Marek Kuźniewski, Katarzyna Krzanowska *Journal of Clinical Medicine*, 2019, 8, 1828.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
lek. Małgorzata Banaszekiewicz	opracowanie koncepcji manuskryptu, przygotowanie i korekta manuskryptu, analiza i interpretacja prac źródłowych, ostateczne opracowanie manuskryptu	33,0%
prof. dr hab. n. med. Jolanta Małyszko	opracowanie koncepcji manuskryptu, przygotowanie i korekta manuskryptu, nadzór nad ostateczną formą manuskryptu	9,0%
dr hab. n. med. David H. Vesole	stworzenie idei i hipotezy badawczej, przygotowanie i nadzór nad manuskrytem	9,2%
lek. Karolina Wozniowiczka	opracowanie koncepcji manuskryptu, przygotowanie i korekta manuskryptu, analiza i interpretacja prac	5,5%
prof. dr hab. n. med. Artur Jurczyszyn	opracowanie koncepcji manuskryptu, ostateczne opracowanie manuskryptu	6,8%
dr hab. n. med. Marcin Żórawski	korekta i ostateczne przygotowanie manuskryptu	5,0%
dr hab. n. med. Marcin Krzanowski	opracowanie koncepcji manuskryptu, przygotowanie i korekta manuskryptu	5,2%
prof. dr hab. n. med. Jacek A. Małyszko	przygotowanie i korekta manuskryptu	5,0%

lek. Krzysztof Batko	opracowanie koncepcji manuskryptu, przygotowanie i korekta manuskryptu, analiza i interpretacja prac	5,6%
prof. dr. hab. n. med. Marek Kuźniewski	ostateczne opracowanie manuskryptu	4,4%
prof. UJ, dr hab. n. med. Katarzyna Krzanowska	opracowanie koncepcji manuskryptu, przygotowanie i korekta manuskryptu, nadzór nad ostateczną formą manuskryptu	11,3%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Małgorzaty Banaszkiewicz.



Marek Kuźniewski



Kraków, dnia 17.01.2022

Lek. Małgorzata Banaszkiewicz  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: „New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia” opublikowanej w Journal of clinical medicine, vol. 8, 2019, str 1828 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Procentowy udział w jego powstanie określam na ok 33%

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Małgorzata Banaszkiewicz  
lekarz  
3482513  


Warszawa, dnia 17.01.2022

Prof. dr hab. n. med. Jolanta Małyszko  
Klinika Nefrologii, Dializoterapii i Chorób Wewnętrznych  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: „New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia” opublikowanej w Journal of clinical medicine, vol. 8, 2019, str 1828 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 9,0 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- przygotowaniu i korekcie manuskryptu
- nadzorze nad ostateczną formą manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- przygotowaniu i korekcie manuskryptu
- analizie i interpretacji prac źródłowych
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

KIEROWCA  
Klinika Nefrologii, Dializoterapii  
i Chorób Wewnętrznych  
Centralny Szpital Kliniczny PCK WUM  
Jolanta Małyszko  
(podpis współautora)  
Prof. dr hab. n. med. Jolanta Małyszko

MD, PhD David H. Vesole  
John Theurer Cancer Center,  
Hackensack University Medical Center,

### **Co-atorship statement**

As a co-author of the publication: „New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia” published in Journal of clinical medicine, vol. 8, 2019, pp. 1828, I declare that my own substantial contribution to this publication is 9,2% and consists of:

- development a research idea and creation of research hypothesis, conceptualization of the manuscript;
- preparation of the manuscript;
- supervision of the manuscript.

Hereby, I agree to submit the above-mentioned publication by MD Małgorzata Banaszkiwicz as part of a doctoral dissertation in the form of a thematically coherent collection of articles published in scientific journals.

I declare that an independent and identifiable part of the abovementioned publication shows individual contribution of MD Małgorzata Banaszkiwicz consisting of:

- conceptualization of the manuscript;
- analysis and interpretation of references;
- preparation of manuscript;
- final manuscript editing.



.....  
(co-author's signature)

Kraków, dnia 17.01.2022

Lek. Karolina Woziwodzka  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

## OŚWIADCZENIE

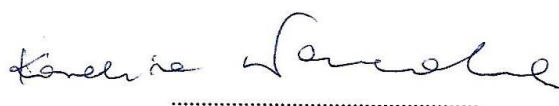
Jako współautor pracy: „New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia” opublikowanej w Journal of clinical medicine, vol. 8, 2019, str 1828 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5,5 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- przygotowaniu i korekcie manuskryptu
- analizie i interpretacji prac.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- przygotowaniu i korekcie manuskryptu
- analizie i interpretacji prac źródłowych
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 17.01.2022

Prof. dr hab. n. med. Artur Jurczyszyn  
Klinika i Katedra Hematologii  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: „New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia” opublikowanej w Journal of clinical medicine, vol. 8, 2019, str 1828 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 6,8 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- przygotowaniu i korekcie manuskryptu
- analizie i interpretacji prac źródłowych
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

prof. dr. hab. n. med. ARTUR JURCZYSZYN  
specjalista chorób wewnętrznych  
specjalista hematolog  
...980613909.....821825  
(podpis współautora)

Białystok, dnia 17.01.2022

Dr hab. n. med. Marcin Żórawski  
Zakład Medycyny Klinicznej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

## OŚWIADCZENIE

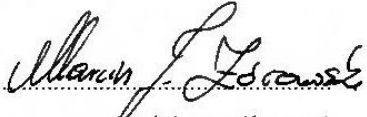
Jako współautor pracy: „New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia” opublikowanej w Journal of clinical medicine, vol. 8, 2019, str 1828 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5,0 % i polegał na:

- korekcie i ostatecznym przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- przygotowaniu i korekcie manuskryptu
- analizie i interpretacji prac źródłowych
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

  
(podpis współautora)



Kraków, dnia 17.01.2022

Dr hab. n. med. Marcin Krzanowski  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: „New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia” opublikowanej w Journal of clinical medicine, vol. 8, 2019, str 1828 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5,2 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- przygotowaniu i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiwicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiwicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- przygotowaniu i korekcie manuskryptu
- analizie i interpretacji prac źródłowych
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Dr hab. n. med. Marcin Krzanowski  
specjalista chorób wewnętrznych  
NEFROLOG  
REUMATOLOG  
1488013

.....  
(podpis współautora)

Białystok, dnia 17.01.2022

Prof. dr hab. n. med. Jacek A. Małyшко  
I Klinika Nefrologii i Transplantologii z Ośrodkiem Dializ  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: „New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia” opublikowanej w Journal of clinical medicine, vol. 8, 2019, str 1828 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5,0 % i polegał na:

- przygotowaniu i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiwicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiwicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- przygotowaniu i korekcie manuskryptu
- analizie i interpretacji prac źródłowych
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

70419694 Prof. dr hab. Jacek Małyшко  
specjalista nefrolog, hipertencjologia  
transplantolog kliniczny  
choroby wewnętrzne

(podpis współautora)

Kraków, dnia 17.01.2022

Lek. Krzysztof Batko  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

## OŚWIADCZENIE

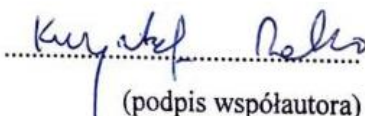
Jako współautor pracy: „New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia” opublikowanej w Journal of clinical medicine, vol. 8, 2019, str 1828 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5,6 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- przygotowaniu i korekcie manuskryptu
- analizie i interpretacji prac.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiwicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiwicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- przygotowaniu i korekcie manuskryptu
- analizie i interpretacji prac źródłowych
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 17.01.2022 r.

Prof. dr. hab. n. med. Marek Kuźniewski  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

### OŚWIADCZENIE


Jako współautor pracy pt. „New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia” opublikowanej w Journal of clinical medicine, vol. 8, 2019, str 1828 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 4,4 % i polegał na:

- ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiwicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiwicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- przygotowaniu i korekcie manuskryptu
- analizie i interpretacji prac źródłowych
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

  
Katedra i Klinika Nefrologii  
i Transplantologii UJ CM  
prof. dr hab. med. Marek Kuźniewski  
p.o. kierownik Katedry

.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 17.01.2022

Prof. UJ, dr hab. n. med. Katarzyna Krzanowska  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

## OŚWIADCZENIE


Jako współautor pracy: „New Biomarkers of Ferric Management in Multiple Myeloma and Kidney Disease-Associated Anemia” opublikowanej w Journal of clinical medicine, vol. 8, 2019, str 1828 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 11,3 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- przygotowaniu i korekcie manuskryptu
- nadzorze nad ostateczną formą manuskryptu
- pozyskaniu finansowania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiwicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiwicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji manuskryptu
- przygotowaniu i korekcie manuskryptu
- analizie i interpretacji prac źródłowych
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)

“Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma.” Autorzy: Małgorzata Banaszekiewicz, Jolanta Małyszko, Krzysztof Batko, Ewa Koc-Żórawska, Marcin Żórawski, Paulina Dumnicka, Artur Jurczyszyn, Karolina Woziwodzka, Joanna Tisończyk, Marcin Krzanowski, Jacek Małyszko, Anna Waszczuk-Gajda, Ryszard Drożdż, Marek Kuźniewski, Katarzyna Krzanowska. *Mediators of Inflammation*, 2020, 2020, 5657864.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
lek. Małgorzata Banaszekiewicz	opracowanie koncepcji badań oraz stworzenie hipotezy badawczej, wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja wyników pracy, analiza piśmiennictwa, opracowania badań i metodologii, przygotowanie manuskryptu pracy, wizualizacja i ostateczne opracowanie manuskryptu	33,0%
prof. dr hab. n. med. Jolanta Małyszko	opracowanie koncepcji badań oraz stworzenie hipotezy badawczej, wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza, interpretacja i weryfikacja wyników pracy, analiza piśmiennictwa, opracowanie badań i metodologii, przygotowanie manuskryptu pracy, wizualizacja, korekta i ostateczne opracowanie manuskryptu, nadzór nad ostateczną formą manuskryptu	7,0%
lek. Krzysztof Batko	opracowanie koncepcji badania oraz stworzenie hipotezy badawczej, wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja wyników pracy, analiza piśmiennictwa, weryfikacja wyników, przygotowanie oprogramowania, wizualizacja i ostateczne opracowanie manuskryptu	4,0%
dr hab. n. med. Ewa	wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, wykonanie	4,0%



Koc-Żórawska	bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja wyników pracy, ostateczne opracowanie manuskryptu	
dr hab. n. med Marcin Żórawski	wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, opracowanie badań i metodologii, korekta manuskryptu	4,0%
dr n. med. Paulina Dumnicka	wykonanie analizy statystycznej i interpretacji wyników pracy, opracowanie danych, opracowanie badania i metodologii, ostateczne opracowanie manuskryptu	5,0%
prof. dr hab. n. med. Artur Jurczyszyn	opracowanie koncepcji badania oraz stworzenie hipotezy badawczej, wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja wyników pracy, analiza piśmiennictwa, opracowanie badań i metodologii, weryfikacja wyników, wizualizacja i ostateczne opracowanie manuskryptu, nadzór nad ostateczną formą manuskryptu	4,0%
lek. Karolina Wozniowiczka	wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, opracowanie koncepcji badania oraz stworzenie hipotezy badawczej, analiza i interpretacja wyników pracy, weryfikacja wyników, analiza piśmiennictwa, opracowanie badań i metodologii, wizualizacja i ostateczne opracowanie manuskryptu	4,0%
mgr Joanna Tisończyk	wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja wyników pracy, analiza piśmiennictwa, opracowanie badań i metodologii	3,0%
dr hab. n. med. Marcin Krzanowski	opracowanie koncepcji badań oraz stworzenie hipotezy badawczej, wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja wyników tej pracy, analiza	4,0%

	piśmiennictwa, opracowania badań i metodologii, weryfikacja wyników, przygotowanie manuskryptu pracy, wizualizacja i ostateczne opracowanie manuskryptu	
prof. dr hab. n. med. Jacek A. Małyszko	opracowanie koncepcji badania oraz stworzenie hipotezy badawczej, analiza piśmiennictwa, opracowanie metodologii, przygotowanie manuskryptu pracy, korekta i ostateczne opracowanie manuskryptu, nadzór nad ostateczną formą manuskryptu	7,0%
dr hab. n. med. Anna Waszczuk-Gajda	wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie	3,0%
prof. dr hab. n. med. Ryszard Drożdż	wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja wyników pracy, ostateczne opracowanie manuskryptu, nadzór nad ostateczną formą manuskryptu	4,0%
prof. dr. hab. n. med. Marek Kuźniewski	ostateczne opracowanie manuskryptu, nadzór nad ostateczną formą manuskryptu	4,0%
prof. UJ, dr hab. n. med. Katarzyna Krzanowska	opracowanie koncepcji badania oraz stworzenie hipotezy badawczej, wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja wyników pracy, analiza piśmiennictwa, opracowanie badań i metodologii, przygotowanie manuskryptu pracy, weryfikacja wyników, wizualizacja i ostateczne opracowanie manuskryptu, nadzór nad ostateczną formą manuskryptu	10,0%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Małgorzaty Banaszkiewicz.

*M. Banaszkiewicz*

Kraków, dnia 17.01.2022

Lek. Małgorzata Banaszkiewicz  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w Mediator of Inflammation, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Procentowy udział w jego powstanie określam na ok 33%

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Małgorzata Banaszkiewicz  
lekarz  
3482513



Warszawa, dnia 17.01.2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Jolanta Małyszko  
Klinika Nefrologii, Dializoterapii i Chorób Wewnętrznych  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w Mediator of Inflammation, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 7,0 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie, interpretacji i weryfikacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji, korekcie i ostatecznym opracowaniu manuskryptu;
- nadzorze nad ostateczną formą manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

KLINIKUM  
Klinika Nefrologii, Dializoterapii  
i Chorób Wewnętrznych  
Centrum Diagnostyki Laboratoryjnej  
Laboratorium Chemii Klinicznej UCJ  
UM  
dr hab. n. med. Jolanta Małyszko  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 17.01.2022 r.

Lek. Krzysztof Batko  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE


Jako współautor pracy pt. „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w Mediator of Inflammation, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 4,0 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa;
- weryfikacji wyników;
- przygotowaniu oprogramowania;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiwicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiwicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)

Białystok, dnia 17.01.2022 r.

Dr hab. n. med. Ewa Koc-Żórawska  
II Klinika Nefrologii z Oddziałem Leczenia  
Nadciśnienia Tętniczego i Pododdziałem Dializoterapii  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

### OŚWIADCZENIE

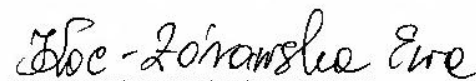
Jako współautor pracy pt. „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w Mediator of Inflammation, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 4,0 % i polegał na:

- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.



(podpis współautora)



Białystok, dnia 17.01.2022 r.

Dr hab. n. med. Marcin Żórawski  
Zakład Medycyny Klinicznej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

## OŚWIADCZENIE

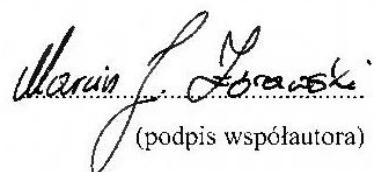
Jako współautor pracy pt. „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w Mediator of Inflammation, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 4,0 % i polegał na:

- opracowaniu badań i metodologii;
- korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 17.01.2022 r.

Dr n. med. Paulina Dumnicka  
Zakład Diagnostyki Medycznej  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w Mediator of Inflammation, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5,0 % i polegał na:

- wykonaniu analizy statystycznej i interpretacji wyników tej pracy;
- opracowaniu danych;
- opracowaniu badań i metodologii;
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 17.01.2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Artur Jurczyszyn  
Klinika i Katedra Hematologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. . „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w Mediator of Inflammation, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 4,0 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa;
- opracowaniu badań i metodologii;
- weryfikacji wyników;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu;
- nadzorze nad ostateczną formą manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiwicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiwicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu

prof. dr. hab. n. med. ARTUR JURCZYSZYN  
specjalista chorób wewnętrznych  
.....specjalista hematologii.....  
980613909 8421825  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 17.01.2022 r.

Lek. Karolina Woziwodzka  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w Mediator of Inflammation, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 4,0 % i polegał na:

- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- weryfikacji wyników
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszekiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszekiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.



.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 17.01.2022 r.

Mgr Joanna Tisończyk  
Zakład Diagnostyki Medycznej  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE

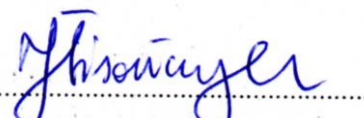
Jako współautor pracy pt. „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w Mediator of Inflammation, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 3,0 % i polegał na:

- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiwicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiwicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 17.01.2022 r.

Dr hab. n. med. Marcin Krzanowski  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w Mediator of Inflammation, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 4,0 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- weryfikacji wyników;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiwicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiwicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Dr hab. n. med. Marcin Krzanowski  
specjalista chorób wewnętrznych  
NEFROLOG  
REUMATOLOG  
1498013

.....  
(podpis współautora)



Białystok, dnia 17.01.2022

Prof. dr hab. n. med. Jacek A. Małyшко  
I Klinika Nefrologii i Transplantologii z Ośrodkiem Dializ  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w Mediator of Inflammation, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 7,0 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- korekcie i ostatecznym opracowaniu manuskryptu;
- nadzorze nad ostateczną formą manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

7049694\* Prof. dr hab. Jacek Małyшко  
specjalista nefrolog, hipertencjolog,  
transplantolog kliniczny,  
choroby wewnętrzne



.....  
(podpis współautora)

Warszawa, dnia 17.01.2022 r.

Dr. hab. n. med. Anna Waszczuk-Gajda  
Klinika Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. . „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w Mediator of Inflammation, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 3,0 % i polegał na:

- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

*Anna Waszczuk-Gajda*

.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 17.01.2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Ryszard Drożdż  
Zakład Diagnostyki Medycznej  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE

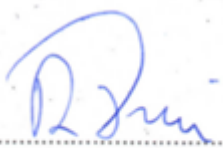
Jako współautor pracy pt. „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w Mediator of Inflammation, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 4,0 % i polegał na:

- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu;
- nadzorze nad ostateczną formą manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.



.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 17.01.2022 r.

Prof. dr. hab. n. med. Marek Kuźniewski  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE


Jako współautor pracy pt. „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w Mediator of Inflammation, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 4,0 % i polegał na:

- ostatecznym opracowaniu manuskryptu;
- nadzorze nad ostateczną formą manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

  
Katedra i Klinika Nefrologii  
i Transplantologii UI CM  
prof. dr hab. med. Marek Kuźniewski  
p.o. kierownik Katedry

(podpis współautora)

Kraków, dnia 17.01.2022 r.

Prof. UJ, dr hab. n. med. Katarzyna Krzanowska  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE

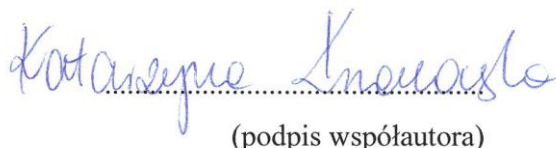
Jako współautor pracy pt. „Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma” opublikowanej w *Mediator of Inflammation*, vol. 2020, 2020, str 5657864 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 10,0 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- pozyskaniu finansowania;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- weryfikacji wyników;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu;
- nadzorze nad ostateczną formą manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.



(podpis współautora)

“The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment.” Autorzy: Małgorzata Banaszekiewicz, Jolanta Małyszko, Krzysztof Batko, Ewa Koc-Żórawska, Marcin Żórawski, Paulina Dumnicka, Artur Jurczyszyn, Karolina Woziwodzka, Aleksandra Maleszka, Marcin Krzanowski, Andrzej Kraśniak, Ryszard Drożdż, Katarzyna Krzanowska. *Medicina*, 2022, 58, 417.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
lek. Małgorzata Banaszekiewicz	opracowanie koncepcji badania oraz stworzenie hipotezy badawczej, wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja wyników pracy, analiza piśmiennictwa, opracowania badań i metodologii, przygotowanie manuskryptu pracy, wizualizacja i ostateczne opracowanie manuskryptu	33,0%
prof. dr hab. n. med. Jolanta Małyszko	opracowanie koncepcji badań oraz stworzenie hipotezy badawczej, wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza, interpretacja i weryfikacja wyników pracy, analiza piśmiennictwa, opracowanie badania i metodologii, przygotowanie manuskryptu pracy, wizualizacja, korekta i ostateczne opracowanie manuskryptu, nadzór nad ostateczną formą manuskryptu	7,5%
lek. Krzysztof Batko	opracowanie koncepcji badania oraz stworzenie hipotezy badawczej, wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja wyników pracy, analiza piśmiennictwa, weryfikacja wyników, przygotowanie oprogramowania, wizualizacja i ostateczne opracowanie manuskryptu	5,5%
dr hab. n. med. Ewa Koc-Żórawska	wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja	4,5%



	wyników tej pracy, ostateczne opracowanie manuskryptu	
dr hab. n. med Marcin Żórawski	wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, opracowanie badań i metodologii, korekta manuskryptu	4,5%
dr n. med. Paulina Dumnicka	wykonanie analizy statystycznej i interpretacji wyników pracy, opracowanie danych, opracowanie metodologii, ostateczne opracowanie manuskryptu	6,0%
prof. dr hab. n. med. Artur Jurczyszyn	opracowanie koncepcji badania oraz stworzenie hipotezy badawczej, wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja wyników pracy, analiza piśmiennictwa, opracowanie badań i metodologii, weryfikacja wyników, wizualizacja i ostateczne opracowanie manuskryptu, nadzór nad ostateczną formą manuskryptu	5,0%
lek. Karolina Wozniowiczka	wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, opracowanie koncepcji badania oraz stworzenie hipotezy badawczej, analiza i interpretacja wyników pracy, weryfikacja wyników, analiza piśmiennictwa, opracowanie badań i metodologii, wizualizacja i ostateczne opracowanie manuskryptu	5,5%
mgr Aleksandra Maleszka	wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie	3,5%
dr hab. n. med. Marcin Krzanowski	opracowanie koncepcji badania oraz stworzenie hipotezy badawczej, wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja wyników pracy, analiza piśmiennictwa, opracowania metodologii, weryfikacja wyników, przygotowanie manuskryptu pracy, wizualizacja i ostateczne	5,0%

	opracowanie manuskryptu	
dr hab. n. med. Andrzej Kraśniak	ostateczne opracowanie manuskryptu, nadzór nad ostateczną formą manuskryptu	4,5%
prof. dr hab. n. med. Ryszard Drożdż	wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja wyników pracy, ostateczne opracowanie manuskryptu, nadzór nad ostateczną formą manuskryptu	4,5%
prof. UJ, dr hab. n. med. Katarzyna Krzanowska	opracowanie koncepcji badań oraz stworzenie hipotezy badawczej, wykonanie bazy danych, zbieranie danych i ich opracowanie, analiza i interpretacja wyników pracy, analiza piśmiennictwa, opracowanie metodologii, przygotowanie manuskryptu pracy, weryfikacja wyników, wizualizacja i ostateczne opracowanie manuskryptu, nadzór nad ostateczną formą manuskryptu	11,0%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Małgorzaty Banaszkiewicz

*M. Banaszkiewicz*

Kraków, dnia 16.03.2022

Lek. Małgorzata Banaszkiewicz  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Key Role of Heparin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment” opublikowanej w *Medicina*, vol. 58, 2022, str 417 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Procentowy udział w jego powstanie określam na ok 33%

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

*Małgorzata Banaszkiewicz*  
lekarz  
3482513

*M. Banaszkiewicz*

Warszawa, dnia 16.03.2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Jolanta Małyszko  
Klinika Nefrologii, Dializoterapii i Chorób Wewnętrznych  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment” opublikowanej w *Medicina*, vol. 58, 2022, str 417 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 7,5 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie, interpretacji i weryfikacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji, korekcie i ostatecznym opracowaniu manuskryptu;
- nadzorze nad ostateczną formą manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

KIEROWNIK  
Klinika Nefrologii, Dializoterapii  
i Chorób Wewnętrznych  
Centrum Kliniczne UCK WUM  
.....  
prof. dr hab. n. med. Jolanta Małyszko  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 16.03.2022 r.

Lek. Krzysztof Batko  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

### OŚWIADCZENIE


Jako współautor pracy pt. „The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment” opublikowanej w *Medicina*, vol. 58, 2022, str 417 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5,5 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa;
- weryfikacji wyników;
- przygotowaniu oprogramowania;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)

Białystok, dnia 16.03.2022 r.

Dr hab. n. med. Ewa Koc-Żórawska  
II Klinika Nefrologii z Oddziałem Leczenia  
Nadciśnienia Tętniczego i Pododdziałem Dializoterapii  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment” opublikowanej w *Medicina*, vol. 58, 2022, str 417 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 4,5 % i polegał na:

- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiwicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiwicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.



(podpis współautora)



Białystok, dnia 16.03.2022 r.

Dr hab. n. med. Marcin Żórawski  
Zakład Medycyny Klinicznej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

## OŚWIADCZENIE

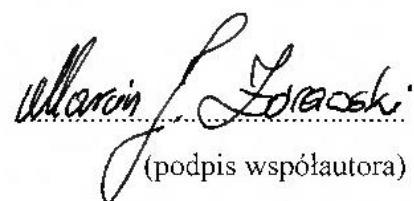
Jako współautor pracy pt. „The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment” opublikowanej w *Medicina*, vol. 58, 2022, str 417 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 4,5 % i polegał na:

- opracowaniu badań i metodologii;
- korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 16.03.2022 r.

Dr n. med. Paulina Dumnicka  
Zakład Diagnostyki Medycznej  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment” opublikowanej w *Medicina*, vol. 58, 2022, str 417 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 6,0 % i polegał na:

- wykonaniu analizy statystycznej i interpretacji wyników tej pracy;
- opracowaniu danych;
- opracowaniu badań i metodologii;
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiwicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiwicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 16.03.2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Artur Jurczyszyn  
Klinika i Katedra Hematologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment” opublikowanej w *Medicina*, vol. 58, 2022, str 417 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5,0 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa;
- opracowaniu badań i metodologii;
- weryfikacji wyników;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu;
- nadzorze nad ostateczną formą manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

prof. dr. hab. n. med. ARTUR JURCZYSZYN  
specjalista chorób wewnętrznych  
specjalista hematologii  
980613909 821825

(podpis współautora)

Kraków, dnia 16.03.2022 r.

Lek. Karolina Woziwodzka  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment” opublikowanej w *Medicina*, vol. 58, 2022, str 417 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5,5 % i polegał na:

- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- weryfikacji wyników
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiwicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiwicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.



.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 16.03.2022 r.

Mgr Aleksandra Maleszka  
Zakład Diagnostyki Medycznej  
Szpital Uniwersytecki w Krakowie

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment” opublikowanej w *Medicina*, vol. 58, 2022, str 417 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 3,5 % i polegał na:

- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.



(podpis współautora)

Kraków, dnia 16.03.2022 r.

Dr hab. n. med. Marcin Krzanowski  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment” opublikowanej w *Medicina*, vol. 58, 2022, str 417 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 5,0 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- weryfikacji wyników;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiwicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiwicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

Dr hab. n. med. Marcin Krzanowski  
specjalista chorób wewnętrznych  
NEFROLOG  
REUMATOLOG

.....1488013.....

(podpis współautora)

Kraków, 16.03.2022 r.

Dr hab. n. med. Andrzej Kraśniak  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

### OŚWIADCZENIE

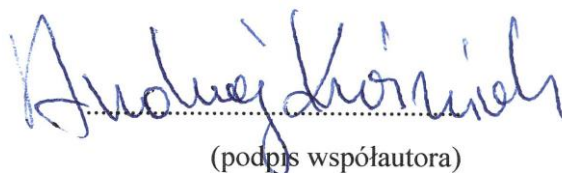
Jako współautor pracy pt. „The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment” opublikowanej w *Medicina*, vol. 58, 2022, str 417 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 4,5 % i polegał na:

- ostatecznym opracowaniu manuskryptu;
- nadzorze nad ostateczną formą manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.



(podpis współautora)



Kraków, dnia 16.03.2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Ryszard Drożdż  
Zakład Diagnostyki Medycznej  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE

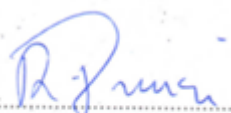
Jako współautor pracy pt. „The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment” opublikowanej w *Medicina*, vol. 58, 2022, str 417 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 4,5 % i polegał na:

- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- ostatecznym opracowaniu manuskryptu;
- nadzorze nad ostateczną formą manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 16.03.2022 r.

Prof. UJ, dr hab. n. med. Katarzyna Krzanowska  
Katedra Nefrologii, Dializoterapii i Transplantologii  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński

## OŚWIADCZENIE


Jako współautor pracy pt. „The Key Role of Hepcidin-25 in Anemia in Multiple Myeloma Patients with Renal Impairment” opublikowanej w *Medicina*, vol. 58, 2022, str 417 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wynosi 11,0 % i polegał na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- pozyskaniu finansowania;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- weryfikacji wyników;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu;
- nadzorze nad ostateczną formą manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Małgorzatę Banaszkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Małgorzaty Banaszkiewicz polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań oraz stworzeniu hipotezy badawczej;
- wykonaniu bazy danych, zbieraniu danych i ich opracowaniu;
- analizie i interpretacji wyników tej pracy;
- analizie piśmiennictwa, opracowaniu badań i metodologii;
- przygotowaniu manuskryptu pracy;
- wizualizacji i ostatecznym opracowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)

## Rozdział 14.

### Zgoda Komisji Bioetycznej, opinia i akceptacja poprawek

#### OPINIA

**nr 1072.6120.248.2017 z dnia 30 listopada 2017 roku**

Na zebraniu w dniu 30 listopada 2017 r. Komisja zapoznała się z wnioskiem z dnia 16 listopada 2017 r. złożonym:

przez kierownika tematu: **dr hab. n. med. Katarzyna Krzanowska**  
zatrudnionego  
**Katedra i Klinika Nefrologii UJCM**  
**31 – 501 Kraków, ul. Kopernika 15c**

oraz jego merytorycznym uzasadnieniem dotyczącym przeprowadzenia eksperymentu medycznego pt. „Nowe markery uszkodzenia nerek, występowania ryzyka chorób sercowo – naczyniowych oraz zaburzeń gospodarki żelazowej pacjentów z rozpoznany m szpiczakiem mnogim”.

#### Do wniosku dołączono:

1. Protokół badania, wersja 1 z dnia 16.11.2017 r.
2. Informacja dla uczestnika badania, wersja 1 z dnia 16.11.2017 r.
3. Formularz świadomej zgody uczestnika badania, wersja 1 z dnia 16.11.2017 r.
4. Zgoda na przetwarzanie danych osobowych i wgląd do dokumentacji medycznej uczestnika badania, wersja 1 z dnia 16.11.2017 r.
5. Lista piśmiennictwa.
6. Zgoda Kierownika Katedry i Kliniki Nefrologii UJCM na realizację badania.
7. Zyciorys naukowy Wnioskodawcy.
8. Oświadczenie o realizacji projektu w ramach prac badawczych UJ/UJCM wersja 1 z dnia 16.11.2017 r.

Komisja wyraża pozytywną opinię w sprawie przeprowadzenia wnioskowanego badania - na warunkach określonych we wniosku oraz dodatkowo zastrzegając:

- 1/ obowiązek uzyskania pisemnej zgody każdej osoby wyrażającej wolę (gotowość) udziału w danym eksperymencie, zgodnie z obowiązującym przepisami,
- 2/ obowiązek przedstawienia Komisji:
  - wszystkich zmian w protokole mających wpływ na przebieg oraz ocenę badania,
  - zawiadomienia o przyczynach przedwczesnego zakończenia badania,
  - sprawozdania w toku przeprowadzanych badań - co sześć miesięcy,
  - raportu końcowego,
- 3/ warunek uwzględnienia w kryteriach wyłączenia zespołu kruchości.

**Badanie może być prowadzone do dnia 30 listopada 2018 roku.**

**Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi.**  
**Lista członków Komisji biorących udział w posiedzeniu stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.**

Kraków, dnia 30 listopada 2017 r.

Przewodniczącą  
Komisji Bioetycznej UJCM  
  
prof. dr hab. n. med. Piotr Błażewski

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ  
DO WYŁĄCZNEGO WYKORZYSTANIA  
DLA CEŁÓW STATYSTYCZNYCH  
UNIWERSYTETU JAGIELLOŃSKIEGO



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Komisja Bioetyczna  
Uniwersytetu  
Jagiellońskiego

ul. Podwale 3/5  
PL 31-118 Kraków  
tel. +48 (12) 37 04 386  
kbet@cm-uj.krakow.pl  
www.kbet.cm-uj.krakow.pl

Lista członków KOMISJI BIOETYCZNEJ UJ biorących udział w podjęciu uchwały dotyczącej opinii nr 1072.6120.248.2017:

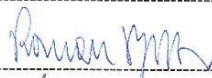
1. Przewodniczący: prof. dr hab. med. Piotr Thor – lekarz – chirurg ogólny/urolog



2. Z-ca Przewodniczącego: mgr Alicja Wiedera – psycholog kliniczny



3. prof. dr hab. med. Roman Pfitzner – lekarz – chirurg ogólny/kardiochirurg

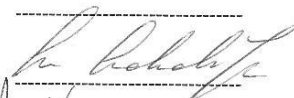


4. dr hab. med. Ewa Konduracka, prof. UJ – lekarz – internista/kardiolog

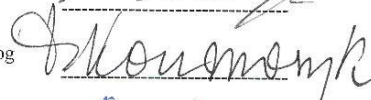


5. dr hab. med. Klaudia Stangel-Wójcikiewicz – lekarz – ginekolog-polożnik

6. dr hab. med. Ewa Cichocka-Jarosz – lekarz – pediatra/alergolog



7. dr hab. n. med. Tomasz Kaczmarzyk – lekarz stomatolog – chirurg stomatolog



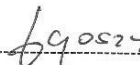
8. dr hab. med. Piotr Major – lekarz – chirurg ogólny



9. dr hab. Jerzy Brusiło OFMConv. – duchowny



10. dr med. Aleksandra Goszcz – lekarz – internista/farmakolog kliniczny

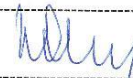


11. dr med. Stefan Bednarz – lekarz – internista

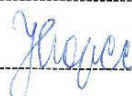


12. dr med. Bartosz Grabski – lekarz – psychiatra/seksuolog

13. mgr Leszek Kądziera – radca prawny



14. Jolanta Kopceć – położna



## AKCEPTACJA

dot. opinii nr: 1072.6120.248.2017 z dnia 30 listopada 2017 roku

### TYTUŁ BADANIA:

„Nowe markery uszkodzenia nerek, występowania ryzyka chorób sercowo-naczyniowych oraz zaburzeń gospodarki żelazowej pacjentów z rozpoznaniem szpiczakiem mnogim”

### WNIOSKODAWCA:

dr hab. n. med. Katarzyna Krzanowska  
Katedra i Klinika Nefrologii UJ CM  
31-501 Kraków, ul. Kopernika 15c

### PRZEDSTAWIONE DOKUMENTY:

- 1) Zgłoszenie poprawki z dnia 06.09.2018 r.;
- 2) Protokół badania – wersja 2 z dnia 03.09.2018 r.;
- 3) Zgoda na przetwarzanie danych osobowych i wgląd do dokumentacji medycznej uczestnika badania – wersja 2 z dnia 03.09.2018 r.

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Jagiellońskiego na posiedzeniu w dniu 20 września 2018 r., po zapoznaniu się z wyżej wymienionymi dokumentami, pozytywnie zaopiniowała zgłoszoną poprawkę.

### Lista członków Komisji Bioetycznej biorących udział w posiedzeniu:

Przewodniczący: prof. dr hab. med. Piotr Thor – lekarz – chirurg ogólny/urolog  
Zastępca przewodniczącego: mgr Alicja Widera – psycholog kliniczny

#### Członkowie:

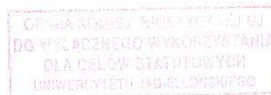
prof. dr hab. med. Roman Pfitzner – lekarz – chirurg ogólny/kardiochirurg  
dr hab. med. Klaudia Stangel-Wójcikiewicz – lekarz – ginekolog-położnik  
dr hab. med. Ewa Cichońska-Jarosz – lekarz – pediatra/alergeolog  
dr med. Aleksandra Goszcz – lekarz – internista/farmakolog kliniczny  
dr med. Stefan Bednarz – lekarz – internista – przedstawiciel Okręgowej Rady Lekarskiej w Krakowie  
mgr Leszek Kądziała – radca prawny  
Jolanta Kopeć – położna

### Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi

Kraków, 20 września 2018 r.

Przewodniczący  
Komisji Bioetycznej UJ

prof. dr hab. n. med. Piotr Thor



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Komisja Bioetyczna

Uniwersytetu

Jagiellońskiego

ul. Grzegorzeczka 20

PL 31-531 Kraków

tel. + 48 (12) 433 27 39

+ 48 (12) 433 27 43

kbet@cm-uj.krakow.pl

www.kbet.cm-uj.krakow.pl

## AKCEPTACJA

dot. opinii nr: 1072.6120.248.2017 z dnia 30 listopada 2017 roku

### TYTUŁ BADANIA:

„Nowe markery uszkodzenia nerek, występowania ryzyka chorób sercowo-naczyniowych oraz zaburzeń gospodarki żelazowej pacjentów z rozpoznanym szpiczakiem mnogim”

### WNIOSKODAWCA:

dr hab. n. med. Katarzyna Krzanowska  
Katedra i klinika Nefrologii UJ CM  
31-501 Kraków, ul. Kopernika 15c

### PRZEDSTAWIONE DOKUMENTY:

Zgłoszenie poprawki z dnia 11 października 2018 r. dotyczącej wyrażenia zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego na przedłużenie badania do 31 grudnia 2020 roku.

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Jagiellońskiego na posiedzeniu w dniu 25 października 2018 r., po zapoznaniu się z wyżej wymienionym dokumentem pozytywnie zaopiniowała zgłoszoną poprawkę.

Lista członków Komisji Bioetycznej biorących udział w posiedzeniu:

Przewodniczący: prof. dr hab. med. Piotr Thor – lekarz – chirurg ogólny/urolog  
Zastępca przewodniczącego: mgr Alicja Widra – psycholog kliniczny

#### Członkowie:

prof. dr hab. med. Roman Pfitzner – lekarz – chirurg ogólny/kardiochirurg  
dr hab. med. Ewa Konduracka, prof. UJ – lekarz – internista/kardiolog  
dr hab. med. Ewa Cichocka-Jarosz – lekarz – pediatra/alerгоlog  
dr hab. n. med. Tomasz Kaczmarzyk, prof. UJ – lekarz stomatolog – chirurg stomatolog  
dr hab. Jerzy Brusilo FMConv. – duchowny  
dr med. Aleksandra Górcz – lekarz – internista/farmakolog kliniczny  
dr med. Stefan Bodnarz – lekarz – internista – przedstawiciel Okręgowej Rady Lekarskiej w Krakowie  
mgr Leszek Kądziela – radca prawny  
Jolanta Kopeć – położna

Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi

Kraków, 25 października 2018 r.

Prof. dr hab. med. Piotr Thor  
Komisja Bioetyczna UJ CM

prof. dr hab. n. med. Piotr Thor



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Komisja Bioetyczna

Uniwersytetu

Jagiellońskiego

ul. Grzegorzewska 20

PL 31-531 Kraków

tel. + 48 (12) 433 27 39

+ 48 (12) 433 27 43

kbet@cm-uj.krakow.pl

www.kbet.cm-uj.krakow.pl