

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΟΜΩΝΥΜΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΕΛΕΤΙΟΣ-ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΑΠΟ
ΜΑΚΡΟΣΦΑΙΡΙΝΑΙΜΙΑ WALDENSTROM

ΙΩΑΝΝΗΣ Χ. ΝΤΑΝΑΣΗΣ-ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ, 27 ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΥ 2020

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΟΜΩΝΥΜΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΕΛΕΤΙΟΣ-ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΑΠΟ
ΜΑΚΡΟΣΦΑΙΡΙΝΑΙΜΙΑ WALDENSTROM

ΙΩΑΝΝΗΣ Χ. ΝΤΑΝΑΣΗΣ-ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ, 27 ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΥ 2020

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΕΩΣ ΤΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ: 28/12/2016

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 25/01/2017**

ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

1. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΕΛΕΤΙΟΣ-ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)
2. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΤΕΡΠΙΟΣ
3. ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΜΑΡΙΑ-ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΚΥΡΤΣΩΝΗ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 08/05/2017

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΕΩΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:
27/01/2020**

ΟΝΟΜΑ ΤΟΥ ΠΡΟΕΔΡΟΥ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ:

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΕΤΡΟΣ ΣΦΗΚΑΚΗΣ

**ΟΝΟΜΑΤΑ ΤΩΝ ΜΕΛΩΝ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ
ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:**

1. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΕΛΕΤΙΟΣ-ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ
2. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΤΕΡΠΙΟΣ
3. ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΜΑΡΙΑ-ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΚΥΡΤΣΩΝΗ
4. ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ ΚΑΣΤΡΙΤΗΣ
5. ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΜΑΡΙΑΝΝΑ ΠΟΛΙΤΟΥ
6. ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΦΛΩΡΑ ΖΑΓΟΥΡΗ
7. ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΜΑΡΙΑ ΓΑΒΡΙΑΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΒΑΘΜΟΣ: ΑΡΙΣΤΑ

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ζυγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωύτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ζυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ζυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω.

Ἀγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαίων καὶ ἀνδρώων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρήτα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιεόντι, καὶ μὴ ζυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Στην οικογένειά μου

Στη νοιά μου

Στη γιαγιά μου

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε υπό την αιγίδα της Θεραπευτικής Κλινικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω πρωτίστως τον Επιβλέποντα και Δάσκαλό μου Καθηγητή κ. Μελέτιο-Αθανάσιο Δημόπουλο για τη συνεχή του καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη. Αποτελεί για μένα πρότυπο ιατρού-επιστήμονα και με έχει διδάξει ότι η ιατρική έρευνα απαιτεί συνεχή επαγρύπνηση και επιμονή.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Ευάγγελο Τέρπο και την Επ. Καθηγήτρια κα Μαρία Γαβριατοπούλου για την αμέριστη συμπαράσταση και τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά την πραγματοποίηση της διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Αν. Καθηγητή κ. Ευστάθιο Καστρίτη για την καθοριστική υποστήριξη στην εκπόνηση της διατριβής με τις καίριες υποδείξεις του για τη βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας.

Ευχαριστώ ολόψυχα όλη την ομάδα της Θεραπευτικής Κλινικής - ιατρούς, νοσηλεύτριες, βιολόγους - για την αρμονική συνεργασία στη συλλογή, επεξεργασία και ανάλυση των δειγμάτων.

Ευχαριστώ θερμά την Αν. Καθηγήτρια κα Θεοδώρα Ψαλτοπούλου και τον κ. Θεόδωρο Σεργεντάνη για τις ευκαιρίες που μου πρόσφεραν, καθώς και για τη μαθητεία δίπλα τους που με εφοδίασε με κριτική ικανότητα στην ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ τον Αν. Καθηγητή κ. Αναστάσιο Φιλίππου για τη στήριξη και την καθοδήγησή του στα πρώτα μου βήματα στον τομέα της ιατρικής έρευνας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
I. ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	9
II. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	13
III. ABSTRACT	15
IV. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	16
1. <u>IgM μονοκλωνικές γαμμαπάθειες και Μακροσφαιριναιμία Waldenström</u>	16
Εισαγωγή	16
IgM MGUS	18
Ασυμπτωματική μακροσφαιριναιμία Waldenström	19
Συμπτωματική μακροσφαιριναιμία Waldenström	21
<i>α. Επιδημιολογία</i>	21
<i>β. Διάγνωση – Κλινικές εκδηλώσεις</i>	21
<i>γ. Σταδιοποίηση και εκτίμηση κινδύνου</i>	28
<i>δ. Θεραπευτική προσέγγιση</i>	31
<i>ε. Εκτίμηση της ανταπόκρισης</i>	47
<i>στ. Παρακολούθηση και πρόγνωση</i>	49
Ο ρόλος των μεταλλάξεων στα γονίδια MYD88 και CXCR4	51
<i>α. MYD88</i>	51
<i>β. CXCR4</i>	56
2. <u>Υγρές βιοψίες - Cell-free DNA</u>	60
Εισαγωγή	60
Βασικές αρχές	67
<i>α. Προ-αναλυτικές μεταβλητές</i>	67
<i>β. Αναλυτική εγκυρότητα</i>	67

<i>γ. Ερμηνεία και αναφορά αποτελεσμάτων</i>	68
<i>δ. Κλινική εγκυρότητα και αξία</i>	69
Εφαρμογές του cell-free DNA	73
3. Σκοποί	76
V. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	77
1. Συμμετέχοντες και κριτήρια ένταξης	77
2. Υλικά και μέθοδοι	78
3. Στατιστική ανάλυση	84
4. Αποτελέσματα	85
A. Αρχική ανάλυση – προσδιορισμός ευαισθησίας	85
<i>Γονοτυπική αξιολόγηση του MYD88 σε cfDNA και tDNA</i>	87
<i>Προβλεπτικοί παράγοντες</i>	92
<i>Γονοτυπική αξιολόγηση του CXCR4 σε cfDNA και tDNA</i>	93
B. Μελέτη επέκτασης – τελική ανάλυση	99
<i>Γονοτυπική αξιολόγηση του MYD88 σε cfDNA και tDNA – τελική ανάλυση</i>	100
<i>Προβλεπτικοί παράγοντες</i>	101
<i>Γονοτυπική αξιολόγηση του CXCR4 σε cfDNA και tDNA – τελική ανάλυση</i>	102
<i>Προβλεπτικοί παράγοντες της ποσότητας cfDNA και CD19+ επιλεγμένων κυττάρων</i>	103
VI. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	104
VII. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	110
VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	111

I. ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

- **ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Όνοματεπώνυμο: Ιωάννης Ντάνας-Σταθόπουλος

Ημερομηνία γέννησης: 27/05/1992

Τόπος γέννησης: Αθήνα, Αττική

Υπηκοότητα: Ελληνική

Διεύθυνση εργασίας: Θεραπευτική Κλινική, ΓΝ Αλεξάνδρα, 115 28, Αθήνα

Τηλέφωνο: 2132162547

Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: johnntanasis@med.uoa.gr, johnntanasis@gmail.com

- **ΠΑΡΟΥΣΑ ΘΕΣΗ**

Ειδικευόμενος Παθολογίας (Γενικό Μέρος για την ειδικότητα της Παθολογικής Ογκολογίας) από 11/2019

Θεραπευτική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ΓΝ Αλεξάνδρα

- **ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΗ ΘΗΤΕΙΑ**

Ιατρός Μονάδας στο Στρατό Ξηράς (Ιανουάριος-Σεπτέμβριος 2018)

- **ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ-ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ**

Προπτυχιακή εκπαίδευση:

Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αποφοίτηση 7/2016 με βαθμό: «Άριστα» (9.18/10).

Μεταπτυχιακή εκπαίδευση:

Κάτοχος Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών (MSc) «Cancer & Therapeutics» Barts Cancer Institute, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, UK. Βαθμός: «Άριστα» (Distinction). Θέμα διπλωματικής εργασίας: «The evolving role of immunotherapy in multiple myeloma therapeutics». Επιβλέπων Καθηγητής: Dr Andrejs Braun (9/2017-10/2019).

- **ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ**

Συμμετοχή στη θεωρητική και πρακτική εκπαίδευση των φοιτητών στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Κλινικές Μελέτες: Σχεδιασμός και Εκτέλεση» της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

- **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ**

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΔΙΕΘΝΕΙΣ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Από το Σεπτέμβριο του 2016 έως και σήμερα συμμετέχω σε άνω των 25 πολυκεντρικών μελετών ως συνερευνητής που πραγματοποιούνται στην Ογκολογική-Αιματολογική Μονάδα της Θεραπευτικής Κλινικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΩΣ ΚΡΙΤΗΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΣΤΟ PUBMED

PlosOne

International Journal of Cancer

World Journal of Surgical Oncology

Expert Opinion On Pharmacotherapy

• **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ**

Εντός Pubmed: 80

Εκτός Pubmed: 4

Google scholar: 640 citations, h-index 13, i10-index: 19

Ενδεικτικά αναφέρονται οι 5 σημαντικότερες:

1. Bagratuni T*, Ntanasis-Stathopoulos I*, Gavriatopoulou M, Mavrianou-Koutsoukou N, Liacos C, Patseas D, Kanellias N, Migkou M, Ziogas DC, Eleutherakis-Papaiakovou E, Roussou M, Fotiou D, Terpos E, Kastritis E, Dimopoulos MA. Detection of MYD88 and CXCR4 mutations in cell-free DNA of patients with IgM monoclonal gammopathies. *Leukemia*. 2018 Dec;32(12):2617-2625.
2. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer J*. 2018 Jan 12;8(1):7.
3. Gavriatopoulou M, Kastritis E, Ntanasis-Stathopoulos I, Fotiou D, Roussou M, Migkou M, Ziogas D, Kanellias N, Terpos E, Dimopoulos MA. The addition of IMiDs on daratumumab refractory multiple myeloma patients can overcome refractoriness in both agents. *Blood*. 2017 Nov 22. pii: blood-2017-10-809293.

4. Ntanasis-Stathopoulos I, Tsilimigras DI, Georgiadou D, Kanavidis P, Riccioni O, Salla C, Psaltopoulou T, Sergentanis TN. Squamous cell carcinoma of the pancreas: a systematic review and pooled survival analysis. Eur J Cancer. 2017 Jul;79:193-204.
5. Ntanasis-Stathopoulos I, Tzanninis IG, Philippou A, Koutsilieris M. Epigenetic regulation on gene expression induced by physical exercise. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2013 Jun;13(2):133-46.

- **ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ: 11

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ (POSTER): άνω των 40

- **ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ: 20

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ (POSTER): άνω των 60

- **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

Αγγλικά – επίπεδο C2

Γαλλικά – επίπεδο C2

Γερμανικά – επίπεδο C1

- **ΓΝΩΣΕΙΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ**

- Microsoft Office 2016

- SPSS

II. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υγρή βιοψία ενσωματώνεται με ταχείς ρυθμούς στο διαγνωστικό αλγόριθμο ποικίλων κακοήθων νοσημάτων με σημαντικές θεραπευτικές προεκτάσεις. Ωστόσο, ο ρόλος της στη μακροσφαιριναιμία Waldenström (Waldenström's Macroglobulinemia, WM) και στις υπόλοιπες IgM μονοκλωνικές γαμμαπάθειες παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστος. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε το ρόλο του εξωκυττάριου καρκινικού DNA (cell-free DNA, cfDNA) σε περιφερικό αίμα ως προς τη δυνατότητα να ανιχνευθεί η πιθανή ύπαρξη μεταλλάξεων των γονιδίων MYD88 και CXCR4 σε ασθενείς με IgM μονοκλωνικές γαμμαπάθειες. Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 207 ασθενείς και 10 άτομα με μη IgM παραπρωτεϊναιμίες ως ομάδα ελέγχου. Από τους ασθενείς, 40 άτομα ήταν διαγνωσμένοι με IgM μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), 47 με WM σε ύφεση και 103 με ασυμπτωματική (smoldering), νεοδιαγνωσθείσα ή υποτροπιάζουσα WM. Από τους συμμετέχοντες στη μελέτη συλλέχθησαν ταυτόχρονα δείγματα κατά ζεύγη από αναρρόφηση του μυελού των οστών, όπου ανιχνεύεται το DNA του όγκου (tumor DNA, tDNA) και περιφερικό αίμα, όπου ανιχνεύεται το cfDNA. Αναφορικά με τη L265P μετάλλαξη του γονιδίου MYD88, 150 είχαν διαθέσιμο υλικό τόσο για tDNA όσο και cfDNA. Το συνολικό ποσοστό συμφωνίας μεταξύ tDNA και cfDNA για την ύπαρξη ή όχι της μετάλλαξης ήταν 97% (145/150) ($p < 0.001$). Τα ποσοστά συμφωνίας ήταν αντίστοιχα και για τις υποκατηγορίες των νοσημάτων. Όσον αφορά στις μεταλλάξεις του CXCR4, 131 ασθενείς είχαν διαθέσιμο υλικό τόσο για tDNA όσο και cfDNA. Το συνολικό ποσοστό συμφωνίας μεταξύ tDNA και cfDNA για την ύπαρξη ή όχι κάποιας μετάλλαξης ήταν 84% (110/131) ($p < 0.001$), ενώ αντίστοιχα ήταν και τα ποσοστά ανά υποκατηγορία νοσημάτων. Όλοι οι συμμετέχοντες στην ομάδα ελέγχου

δεν έφεραν μεταλλάξεις σε κανένα από τα υπό μελέτη γονίδια. Συμπερασματικά, η ανάλυση cfDNA του περιφερικού αίματος αποτελεί μια χρήσιμη, ελάχιστα επεμβατική, οικονομικά και χρονικά αποδοτική μέθοδο για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια MYD88 και CXCR4 σε ασθενείς με IgM παραπρωτεϊναιμίες, ελαχιστοποιώντας την ανάγκη πραγματοποίησης αναρρόφησης μυελού των οστών.

III. ABSTRACT

Liquid biopsy is being integrated into cancer diagnostics with profound therapeutic implications. However, its role in Waldenström's Macroglobulinemia (WM) and IgM monoclonal gammopathies is still unclear. In this study, we evaluated the role of peripheral blood cell-free DNA (cfDNA) in characterizing the mutational status of MYD88 and CXCR4 of patients with IgM monoclonal gammopathies. Paired bone marrow tumor DNA (tDNA) and peripheral blood cfDNA samples from 207 patients (40 MGUS, 47 with WM in remission, 103 with smoldering WM, newly diagnosed or relapsed WM) and 10 controls with non-IgM monoclonal gammopathies were analyzed. Regarding MYD88^{L265P} mutation, 150 patients had paired tDNA and cfDNA informative samples. The overall concordance rate was 97% (145/150) ($p < 0.001$). Similar concordance rates were detected among disease subgroups. For CXCR4 mutations, 131 patients had paired informative tDNA and cfDNA samples. The overall concordance rate was 84% (110/131) ($p < 0.001$). The corresponding concordance rates among disease subgroups were similar. All controls were wild-type for MYD88 and CXCR4. In conclusion, peripheral blood cfDNA is a useful, minimally invasive, cost effective and time-effective tool for the identification of the presence of MYD88 and CXCR4 mutations in patients with IgM monoclonal gammopathies avoiding unnecessary bone marrow assessment.

IV. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. IgM μονοκλωνικές γαμμαπάθειες και Μακροσφαιριναιμία Waldenström

Εισαγωγή

Το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου αποτελείται από τη φυσική και την ειδική ανοσία. Κύριοι τελεστές της ειδικής ανοσίας είναι τα B- και T- λεμφοκύτταρα. Μια εξειδικευμένη ομάδα ώριμων B-λεμφοκυττάρων ονομάζονται πλασματοκύτταρα και παράγουν αντισώματα, δηλαδή ειδικές πρωτεΐνες που στρέφονται εναντίον των παθογόνων παραγόντων. Η δυσλειτουργία των πλασματοκυττάρων έχει ως κλινικό αποτέλεσμα την εμφάνιση πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών (δυσκρασία = κακή λειτουργία) [1].

Η μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (monoclonal gammopathy of undetermined significance – MGUS) αποτελεί τη συχνότερη πλασματοκυτταρική δυσκρασία. Σημαντικές μελέτες σε μεγάλους πληθυσμούς δείχνουν ότι η επίπτωση της MGUS υπολογίζεται στο 2-3% στις ηλικίες άνω των 50 [1]. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία μικρής ποσότητας μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης τύπου IgG ή IgA ή IgM ή ελαφρών αλύσεων (κάπα ή λάμδα) στον ορό ή/και στα ούρα. Οι ασθενείς με μη-IgM υπότυπο έχουν αυξημένο κίνδυνο προόδου σε συμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα που υπολογίζεται σε 0.5-1% ανά έτος [2, 3]. Σε αντίθεση με τη συμπτωματική νόσο, στη MGUS απουσιάζουν στοιχεία που υποδεικνύουν βλάβη σε όργανα στόχους όπως λυτικές εστίες στα οστά, νεφρική ανεπάρκεια, αναιμία, υπερασβεστιαμία [4]. Αυτή η παθολογική πρωτεΐνη είναι μονοκλωνική, δηλαδή ο κάθε ασθενής έχει κατά κανόνα μόνο ένα συγκεκριμένο τύπο ανοσοσφαιρίνης, και εμφανίζεται συνήθως στην περιοχή των γ-σφαιρινών στην ηλεκτροφόρηση λευκωμάτων ορού, γι' αυτό και ονομάζεται μονοκλωνική γαμμαπάθεια.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ορού συστήνεται ως μέθοδος διαλογής σε ασθενείς που εμφανίζουν [5]:

- Αυξημένη ταχύτητα καθίζησης ερυθρών αιμοσφαιρίων (ΤΚΕ) ή παρατεταμένα υψηλούς δείκτες οξείας ή χρόνιας φλεγμονής
- Κλινική υποψία μονοκλωνικής γαμμαπάθειας
- Αναιμία, κυτταροπενίες που δε δικαιολογούνται διαφορετικά
- Νεφρική νόσο
- Ηπατική νόσος
- Πολυνευροπάθεια
- Μεταβολές στην ποσότητα των ολικών λευκωμάτων
- Υποψία κακοήθειας
- Υποψία ανοσολογικής διαταραχής
- Υπερασβεστιαμία που δε δικαιολογείται από ορμονολογικές διαταραχές

Με την επιβεβαίωση της ύπαρξης παραπρωτεϊνης συστήνεται ακολούθως εξέταση ανοσοκαθήλωσης, ποσοτικός προσδιορισμός των ανοσοσφαιρινών και περαιτέρω διερεύνηση ανάλογα με τα ευρήματα.

IgM MGUS

Περίπου 10-20% των ασθενών με MGUS έχουν IgM υπότυπο. Η φυλή φαίνεται να συσχετίζεται με τη συχνότητα της ασθένειας. Συνολικά, υπολογίζεται ότι ο επιπολασμός της MGUS στους Αφρομερικάνους είναι 3.7% συγκριτικά με 2.3% στους Καυκάσιους [6]. Ωστόσο, ο IgM υπότυπος φαίνεται να είναι αρκετά συχνότερος στους Καυκάσιους (15.4% έναντι 2.7% στους Αφρομερικάνους), το οποίο συνάδει με την παρατηρούμενη αύξηση της επίπτωσης της μακροσφαιριναιμίας Waldenström και των συναφών νεοπλασιών του λεμφικού ιστού στην καυκάσια φυλή [6]. Οι ασθενείς με IgM MGUS παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μακροσφαιριναιμίας Waldenström και άλλων κακοηθειών του λεμφικού ιστού σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Σε αυτό το πλαίσιο, σημαντική είναι η μελέτη των Kyle και συνεργατών σχετικά με τα μακροχρόνια αποτελέσματα 213 ασθενών με IgM MGUS [3]. Μετά από διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 6.3 ετών ανά ασθενή, παρατηρήθηκε κατά 16 φορές αυξημένη συχνότητα εμφάνισης νεοπλασιών του λεμφικού ιστού σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Ο αθροιστικός κίνδυνος ήταν περίπου 10% στα 5 έτη και 24% στα 15 έτη παρακολούθησης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα μακροσφαιριναιμίας Waldenström (σχετικός κίνδυνος 262), μη-Hodgkin λεμφώματος (σχετικός κίνδυνος 14.8), συστηματικής αμυλοείδωσης (σχετικός κίνδυνος 16.3) και χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (σχετικός κίνδυνος 5.7) [3]. Ως αναμένετο, οι ασθενείς αυτοί εμφάνισαν και μικρότερη ολική επιβίωση σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (7 έναντι 10.8 έτη, αντίστοιχα). Επιπλέον μια ανεξάρτητη Σουηδική μελέτη που συμπεριέλαβε 116 ασθενείς με IgM MGUS έδειξε ότι η ομάδα αυτών των ασθενών εμφανίζει κατά 15 φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοηθειών του λεμφικού ιστού, κυρίως με τη μορφή της μακροσφαιριναιμίας Waldenström [2].

Ασυμπτωματική μακροσφαιριναιμία Waldenström

Στο ίδιο νοσολογικό φάσμα με την IgM MGUS βρίσκεται και η ασυμπτωματική μακροσφαιριναιμία Waldenström, η οποία σχετίζεται με ακόμη μεγαλύτερο κίνδυνο προόδου σε συμπτωματική νόσο. Χαρακτηρίζεται από επίπεδα IgM ανοσοσφαιρίνης στον ορό μεγαλύτερα από 3gr/dl, και / ή διήθηση του μυελού των οστών από κακοήγη λεμφοπλασματοκύτταρα σε ποσοστό άνω του 10%, χωρίς συνοδό παρουσία βλάβης σε όργανα στόχους, δηλαδή χωρίς να συνυπάρχει αναιμία, υπεργλοιοίτητα, οργανομεγαλία (ηπατομεγαλία, σπληνομεγαλία), λεμφαδενοπάθεια ή άλλα συμπτώματα εκ της νόσου. Περίπου 25% από τους ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί κατά τη διάγνωση και δεν χρήζουν καμίας θεραπείας, παρά μόνο συστηματικής παρακολούθησης [7, 8]. Στον Πίνακα 1 συνοψίζονται τα βασικά χαρακτηριστικά των διαταραχών που σχετίζονται με την IgM παραπρωτεΐνη.

Πίνακας 1. Σύνοψη των βασικών χαρακτηριστικών των διαταραχών που

	IgM μονοκλωνική πρωτεΐνη	Διήθηση του μυελού από κακοήγη λεμφοπλασματοκύτταρα	Βλάβη οργάνου-στόχου
Συμπτωματική WM	Οποιαδήποτε τιμή	Οποιαδήποτε τιμή	NAI
Ασυμπτωματική WM	>3gr/dL	>10%	OXI
IgM MGUS	<3gr/dL	<10%	OXI

σχετίζονται με την IgM παραπρωτεΐνη (IgM MGUS, ασυμπτωματική και συμπτωματική μακροσφαιριναιμία Waldenström). Τροποποιημένο από [9].

WM: μακροσφαιριναιμία Waldenström

Οι Kyle και συνεργάτες πραγματοποίησαν μία από τις πρώτες συστηματικές προσπάθειες καταγραφής των ασθενών με ασυμπτωματική νόσο [10]. Μετά από μια διάμεση περίοδο παρακολούθησης 15.4 ετών, 34 από τους 48 ασθενείς παρουσίασαν πρόοδο σε συμπτωματική νόσο που έχρηζε συστηματικής θεραπείας. Η αθροιστική πιθανότητα στα 10 έτη παρακολούθησης υπολογίστηκε στο 69%. Ο κίνδυνος κατά τα πρώτα 5 έτη ανήλθε στο 12% ανά έτος και για τα επόμενα 5 έτη έπεσε στο 2%. Συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου υγιών μαρτύρων ισοζυγισμένη για το φύλο και την ηλικία ο επιπλέον κίνδυνος νόσησης ήταν 8000 φορές μεγαλύτερος [10].

Πρόσφατα, δημοσιεύτηκαν τα αποτελέσματα μιας συνεργατικής προσπάθειας προσδιορισμού παραγόντων κινδύνου σε ασθενείς με ασυμπτωματική μακροσφαιριναιμία Waldenström στην οποία συμμετείχαν το Ινστιτούτο Dana-Farber στη Βοστώνη, η Κλινική Mayo στο Ρότσεστερ και η Θεραπευτική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών [11]. 439 ασθενείς με ασυμπτωματική νόσο παρακολούθηθηκαν για μια διάμεση περίοδο 7.8 ετών σε συνολική διάρκεια 23 ετών. Το 72% (317 ασθενείς) χρειάστηκε να λάβουν θεραπεία λόγω εξέλιξης σε συμπτωματική νόσο. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση αναδείχθηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για πρόοδο νόσου τα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης IgM ίσα ή άνω του 4500mg/dL, η διήθηση του μυελού από μονοκλωνικά λεμφοπλασματοκύτταρα πλέον του 70%, η τιμή της β2 μικροσφαιρίνης ίση ή μεγαλύτερη του 4mg/dL, καθώς και η τιμή της αλβουμίνης ορού ίση ή μικρότερη του 3.5g/dL. Με βάση αυτά τα ευρήματα οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε 3 κατηγορίες: υψηλού κινδύνου με διάμεσο διάστημα έως την πρόοδο νόσου τα 1.8 έτη, ενδιάμεσου κινδύνου με 4.8 έτη και χαμηλού κινδύνου με 9.3 έτη, αντίστοιχα. Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι το μοντέλο αυτό

επαληθεύτηκε σε δύο ανεξάρτητες, εξωτερικές ομάδες ασθενών [11]. Με αυτό τον τρόπο, μπορεί να προσδιοριστεί μια ομάδα ασθενών υψηλότερου κινδύνου που θα πρέπει να παρακολουθείται συχνότερα και ίσως να αξιολογηθεί το ενδεχόμενο οφέλους από πρόωμη θεραπευτική παρέμβαση.

Συμπτωματική μακροσφαιριναιμία Waldenström

α. Επιδημιολογία

Η μακροσφαιριναιμία Waldenström αποτελεί ένα λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας που χαρακτηρίζεται από διήθηση του μυελού των οστών από κλωνικό λεμφοπλασματοκυτταρικό πληθυσμό που παράγει μονοκλωνική παραπρωτεΐνη IgM [7, 12, 13]. Η διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση της νόσου είναι τα 63-68 έτη και η διάμεση συνολική επιβίωση κυμαίνεται από 7 έως 10 έτη [8, 14-16]. Αποτελεί περίπου το 1-2% του συνόλου των αιματολογικών κακοηθειών. Συγγενείς α' βαθμού έχουν 20 φορές αυξημένη πιθανότητα να νοσήσουν συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό [17]. Οι ασθενείς είναι συνήθως άντρες και ανήκουν στη λευκή φυλή. Η μακροσφαιριναιμία Waldenström είναι συχνότερη στους Καυκάσιους σε σύγκριση με τους Αφροαμερικανούς [18].

β. Διάγνωση – Κλινικές εκδηλώσεις

Η διάγνωση της μακροσφαιριναιμία Waldenström τίθεται με βάση την ιστοπαθολογική επιβεβαίωση της διήθησης του μυελού των οστών από μονοκλωνικά λεμφοπλασματοκύτταρα και την παρουσία της μονοκλωνικής παραπρωτεΐνης IgM με τη μέθοδο της ανοσοηλεκτροφόρησης. Για τον ορισμό της συμπτωματικής νόσου είναι απαραίτητη η παρουσία βλάβης σε όργανα στόχους (Πίνακας 1). Η παρουσία του κλωνικού λεμφοπλασματοκυτταρικού πληθυσμού απαιτεί τη διενέργεια

οστεομυελικής βιοψίας ή/και αναρρόφησης παράλληλα με τη διενέργεια ανοσοφαινοτυπικών μελετών. Στη μακροσφαιριναιμία Waldenström τα κύτταρα εκφράζουν δείκτες της Β-λεμφοκυτταρικής σειράς (CD19, CD20, CD22 και CD79a) και τυπικά είναι αρνητικά για CD3 και CD103 [19].

Η κυτταρογενετική ανάλυση δεν είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση της διάγνωσης και δεν υπάρχουν συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες που να χαρακτηρίζουν αποκλειστικά τη νόσο. Η απώλεια του χρωμοσώματος 6 και η τρισωμία του χρωμοσώματος 4 είναι σχετικά συχνές στη μακροσφαιριναιμία Waldenström και ενίοτε μπορούν να βοηθήσουν στη διαφοροδιάγνωση από το IgM πολλαπλόν μυέλωμα το οποίο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη της διαμετάθεσης t(11;14) [20]. Το έλλειμμα 6q χρωμοσώματος ανευρίσκεται στο 42% των ασθενών και σχετίζεται με κακή πρόγνωση [18].

Περισσότερο από το 90% των ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström φέρουν στα λεμφοπλασματοκύτταρα τους τη μετάλλαξη L265P στο γονίδιο MYD88 [21]. Δυνητικά, η παρουσία της μετάλλαξης έχει αξία στη διαφορική διάγνωση σε σχέση με άλλα νοσήματα όπως το πολλαπλό μυέλωμα, το σπληνικό λέμφωμα οριακής ζώνης και το MALT λέμφωμα. Ωστόσο, η παρουσία της μετάλλαξης δεν είναι απόλυτα διαγνωστική για τη μακροσφαιριναιμία Waldenström, καθώς ανευρίσκεται σε περίπου 50–80% των ασθενών με IgM MGUS. Αξίζει να σημειωθεί ότι 5–10% των ασθενών με διαγνωσμένη μακροσφαιριναιμία Waldenström δε φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη είτε γιατί μπορεί να έχουν κάποια άλλη μετάλλαξη του MYD88 ή να μη φέρουν καθόλου μετάλλαξη [22]. Επιπλέον, η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο CXCR4 δεν έχει διαγνωστική αξία και ως εκ τούτου δε συστήνεται στην καθημερινή κλινική πρακτική παρά μόνο στα πλαίσια κλινικών πρωτοκόλλων.

Η αρχική εκτίμηση του ασθενούς πρέπει να περιλαμβάνει πλήρη αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο, ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ορού και ούρων 24ώρου και ποσοτικό προσδιορισμό των ανοσοσφαιρινών. Επιπλέον θα πρέπει να εκτιμώνται τα επίπεδα της β2-μικροσφαιρίνης, που αποτελεί προγνωστικό δείκτη για την επιβίωση και συστατικό του Διεθνούς Προγνωστικού Συστήματος Βαθμονόμησης για τη μακροσφαιριναιμία Waldenström (IPSSWM) [23] (Πίνακας 2).

Ανάμεσα στις συχνότερες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου συμπεριλαμβάνονται η αναιμία, τα Β-συμπτώματα (νυχτερινοί ιδρώτες, δεκατική πυρετική κίνηση, κόπωση, απώλεια βάρους), η εκδήλωση υπεργλοιοτήτας (αιμορραγικές εκδηλώσεις, προβλήματα όρασης, νευρολογικές εκδηλώσεις), οι κυτταροπενίες, λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία, αιμολυτική αναιμία, περιφερική νευροπάθεια [7, 24].

Η αναιμία είναι συνήθως ορθόχρωμη, ορθοκυτταρική και συναντάται σε περισσότερο από το ένα τρίτο των ασθενών κατά τη διάγνωση [25]. Η αιτιολογία είναι πολυπαραγοντική – σχετίζεται κυρίως με τη διήθηση του μυελού των οστών από τα κακοήγη λεμφοπλασματοκύτταρα που οδηγεί σε μη ικανοποιητική ερυθροποίηση και δευτερευόντως με λανθάνουσα απώλεια αίματος συνήθως από το γαστρεντερικό σύστημα εξαιτίας της υπεργλοιοτήτας, με μειωμένο χρόνο ζωής των ερυθροκυττάρων λόγω αιμόλυσης που επάγεται από την IgM, με συνοδό ανεπάρκεια σιδήρου ή / και με μειωμένη παραγωγή ερυθροποιητίνης αντισταθμιστικά της αυξημένης γλοιοτήτας του αίματος [25, 26]. Επιπλέον, η υπερπαραγωγή της εψιδίνης μπορεί να συμβάλλει στην εμφάνιση αναιμίας χρόνιας νόσου σε ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström [27].

Η λεμφαδενοπάθεια και η οργανομεγαλία συναντώνται στο 20-25% των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών και οφείλονται στη διήθηση από τα κακοήγη λεμφοπλασματοκύτταρα [25]. Ωστόσο, διήθηση άλλων οργάνων σε ασθενείς με

μακροσφαιριναιμία Waldenström είναι μάλλον σπάνια, όπως ασυνήθης είναι και η νεφρική ανεπάρκεια και οι οστεολύσεις. Σπάνια επιπλοκή αποτελεί το σύνδρομο Bing-Neel, που συνίσταται σε προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος από νεοπλασματικά λεμφοπλασματοκύτταρα και συνοδεύεται από νευρολογικές διαταραχές [28].

Το σύνδρομο υπεργλοιοπάθειας σχετίζεται με πολύ υψηλές τιμές IgM και είναι σχετικά συχνό, καθώς παρατηρείται σε έως και το ένα τρίτο των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström [25]. Η IgM ανοσοσφαιρίνη είναι πενταμερής, έχει μεγάλο μέγεθος και συσσωρεύεται στα αγγεία αυξάνοντας τη γλοιοπάθεια. Η μέτρηση της γλοιοπάθειας του ορού είναι απαραίτητη σε ασθενείς με συμπτώματα υπεργλοιοπάθειας (κεφαλαλγίες, θόλωση ή απώλεια όρασης, σύγχυση, επιστάξεις). Η βυθοσκόπηση στους ασθενείς αυτούς έχει χαρακτηριστική απεικονιστική εικόνα [29]. Συμπτώματα υπεργλοιοπάθειας συνήθως εκδηλώνονται με τιμές γλοιοπάθειας ορού άνω των 4 centipoise. Σε περίπτωση αιμολυτικής αναιμίας συστήνονται εξέταση Coombs και τίτλοι ψυχοσυγκολλητινών, ενώ σε ασθενείς με συμπτώματα Raynaud, ακροκυάνωση, έλκη άκρων ποδών και συμπτώματα υπεργλοιοπάθειας συστήνεται η μέτρηση των τίτλων των κρυσφαιρινών. Η κρυσφαιριναιμία και η νόσος από ψυχοσυγκολλητίνες παρατηρούνται σε περίπου 10% των νέων διαγνώσεων [25]. Σε περιπτώσεις αιμορραγικής διάθεσης συστήνεται έλεγχος για νόσο von Willebrand [30].

Η νευροπάθεια είναι αρκετή συχνή σε ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström και ενίοτε αποτελεί τη μοναδική ένδειξη για έναρξη θεραπείας. Ωστόσο, οι ασθενείς θα πρέπει να αξιολογούνται πολύ προσεκτικά προκειμένου να αποκλειστούν άλλες πιθανές αιτίες νευροπάθειας. Η νευρολογική εκτίμηση κρίνεται χρήσιμη για τη διάγνωση και την αξιολόγηση αυτών των ασθενών [31]. Η

συσχετιζόμενη με τη νόσο περιφερική νευροπάθεια μπορεί να οφείλεται στη λεμφοπλασματοκυτταρική διήθηση των νευρικών ινών, στην εναπόθεση της IgM, σε αυτοαντισώματα, στην κρουσφαιριναιμία ή στην αμυλοείδωση. Η πιο συχνή κλινική εκδήλωση είναι η απομυελινωτική, συμμετρική, αισθητικού τύπου περιφερική νευροπάθεια που συνήθως ξεκινάει από τα κάτω άκρα και παρουσιάζει αργή εξέλιξη [31]. Τα αντισώματα έναντι της σχετιζόμενης με τη μυελίνη σφαιρίνης (MAG) ανιχνεύονται στον ορό σε περίπου 50% των ασθενών αυτών [32]. Σε περίπτωση που προεξάρχει η κινητικού τύπου νευροπάθεια ανιχνεύονται τα αντισώματα anti-GM1 [33]. Νευροπάθεια των μικρών ινών μπορεί επίσης να παρατηρηθεί σε ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström. Χαρακτηρίζεται από αίσθημα καύσου ή ηλεκτρικού ρεύματος που διαπερνά τις παλάμες και τα πέλματα ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της νύχτας. Η κλινική εξέταση, ειδικές εργαστηριακές εξετάσεις και νευρολογική εκτίμηση που περιλαμβάνει ηλεκτρομυογράφημα και ταχύτητες αγωγής νεύρων πρέπει να πραγματοποιούνται σε όλους τους ασθενείς με αντίστοιχη συμπτωματολογία. Η βιοψία νεύρου δεν κρίνεται απαραίτητη και μπορεί να επιπλακεί με μόνιμη βλάβη.

Η αμυλοείδωση δεν είναι συχνή επιπλοκή της μακροσφαιριναιμία Waldenström και συσχετίζεται με αυξημένη θνητότητα και θνησιμότητα επηρεάζοντας κυρίως τη λειτουργία των νεφρών, της καρδιάς, του ήπατος και του περιφερικού νευρικού συστήματος [34, 35]. Ο πιο συχνός τύπος αμυλοείδωσης σε πάσχοντες από μακροσφαιριναιμία Waldenström είναι η AL αμυλοείδωση εξ ελαφρών αλυσίδων μολονότι έχουν περιγραφεί και περιστατικά με AA αμυλοείδωση. Σε περίπτωση κλινικής υποψίας, η βιοψία λίπους και η χρώση ερυθρού του Congo σε οστεομυελική βιοψία μπορεί να θέσει τη διάγνωση. Η εκτίμηση των πιθανών οργάνων στόχων πρέπει να πραγματοποιείται με υπερηχογράφημα και μαγνητική καρδιάς, εκτίμηση

καρδιακών βιοδεικτών (NTproBNP, τροπονίνες), νεφρικών βιοδεικτών (πρωτεϊνουρία, eGFR) και δεικτών ηπατικής λειτουργίας.

Πίνακας 2. Διαγνωστική προσέγγιση ασθενούς με πιθανή μακροσφαιριναιμία Waldenström. Τροποποιημένο από [12, 36].

- ✓ Ιστορικό και Φυσική Εξέταση κατά συστήματα – συμπεριλαμβανομένου οικογενειακού ιστορικού για μακροσφαιριναιμία Waldenström και άλλα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα από Β-λεμφοκύτταρα

- ✓ Ανασκόπηση συστημάτων (Β-συμπτωματολογία, οργανομεγαλία, συμπτώματα υπεργλοιοτίας, νευροπάθεια, σύνδρομο Raynaud's, εξάνθημα, περιφερικά οιδήματα, δύσπνοια)

Επί υψηλής IgM (≥ 3.0 g/dL) ή/και κλινικής υποψίας υπεργλοιοτίας απαιτείται επιπλέον βυθοσκόπηση οφθαλμού

- ✓ Εργαστηριακές εξετάσεις
 - Γενική αίματος
 - Πλήρες βιοχημικό προφίλ
 - Επίπεδα ανοσοσφαιρινών ορού (IgA, IgG, IgM)
 - Ηλεκτροφόρηση και ανοσοκαθήλωση ορού και ούρων 24ώρου
 - $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη ορού

- ✓ Μυελόγραμμα και οστεομυελική βιοψία
- Ανοσοϊστοχημεία (απαιτείται για τη διάγνωση)
- Κυτταρομετρία ροής (προαιρετικά, επί μη διαθέσιμης ανοσοϊστοχημείας)
- Έλεγχος για τη μετάλλαξη L265P στο γονίδιο MYD88

- ✓ Αξονική τομογραφία θώρακος, κοιλίας και πυέλου (σε ασθενείς που είναι υποψήφιοι για θεραπεία)

Επί κλινικών ενδείξεων

- ❖ Κρυσφαιρίνες
- ❖ Τίτλος ψυχοσυγκολλητινών
- ❖ Γλοιότητα ορού
- ❖ Έλεγχος για νόσο von Willebrand
- ❖ Προσδιορισμός λευκόματος ούρων 24ώρου
- ❖ Ελεύθερες ελαφρές αλυσίδες (FLCs)
- ❖ NTproBNP, Καρδιακές Τροπονίνες
- ❖ Νευρολογική εκτίμηση και έλεγχος τίτλου αντισωμάτων anti-MAG, anti-GM1
- ❖ Έλεγχος για μεταλλάξεις στο γονίδιο CXCR4 ειδικά σε ασθενείς υποψήφιους για θεραπεία με ιμπρουτινίμπη
- ❖ PET/CT επί υποψίας εκτροπής σε λέμφωμα από μεγάλα B-κύτταρα ή παρουσίας δεύτερης κακοήθειας

γ. Σταδιοποίηση και εκτίμηση κινδύνου

Για τους συμπτωματικούς ασθενείς, ηλικία >65 έτη, αιμοσφαιρίνη ≤ 11.5 g/dl, αριθμός αιμοπεταλίων $\leq 100000/\mu\text{l}$, $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη $\geq 3\text{mg/L}$ και μονοκλωνική παραπρωτεΐνη IgM $\geq 7\text{g/dl}$ αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες [23]. Υψηλές τιμές γαλακτική αφυδρογονάσης (LDH) ορού έχουν συσχετιστεί επίσης με κακή πρόγνωση [37]. Η εκτίμηση κινδύνου των ασθενών βασίζεται στο διεθνές προγνωστικό σύστημα βαθμονόμησης για τη μακροσφαιριναιμία Waldenström (IPSSWM) [23]. Οι ασθενείς διακρίνονται σε 3 ομάδες κινδύνου με βάση την ηλικία, τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης, τη θρομβοπενία, τη $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη και τα πολύ υψηλά επίπεδα της IgM (Πίνακας 3).

Ωστόσο υπάρχουν και άλλοι σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες όπως τα χαμηλά επίπεδα αλβουμίνης και τα υψηλά επίπεδα LDH που δεν συμπεριλαμβάνονται στο IPSSWM [37]. Γι'αυτό το λόγο κρίθηκε αναγκαία η αναθεώρηση του κλασικού συστήματος σταδιοποίησης, που να αντικατοπτρίζει σαφέστερα την πρόγνωση των ασθενών στην εποχή της χημειο-ανοσοθεραπείας. Η Ελληνική Ομάδα Μελέτης του Μυελώματος ανέλυσε δεδομένα 492 ασθενών με συμπτωματική μακροσφαιριναιμία Waldenström και διάμεσο διάστημα παρακολούθησης τα 7 έτη [38]. Η πολυπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε την ηλικία, τη $\beta 2$ μικροσφαιρίνη, την αλβουμίνη ορού και την LDH ως ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες επιβίωσης. Με βάση αυτούς τους παράγοντες οι ασθενείς χωρίστηκαν σε πέντε προγνωστικές ομάδες με διακριτά ποσοστά επιβίωση τόσο στα 5 όσο και στα 10 έτη (Πίνακας 4). Η εφαρμογή του προτεινόμενου αναθεωρημένου συστήματος σταδιοποίησης σε ανεξάρτητες σειρές ασθενών αναμένεται να καθορίσει την κλινική του αξία.

Πίνακας 3: Σύστημα σταδιοποίησης για τη μακροσφαιριναιμία Waldenström (IPSSWM). Τροποποιημένο από [23].

Πίνακας 3α: Παράγοντες κινδύνου

Παράγοντες κινδύνου*
<ul style="list-style-type: none"> • Ηλικία ≥ 65 έτη • Αιμοσφαιρίνη ≤ 11.5 g/dl • Αιμοπετάλια $\leq 100.000 \times 10^9/l$ • $\beta 2$-μικροσφαιρίνη >3 mg/l • IgM >70 g/l

* Κάθε παράγοντας κινδύνου αντιστοιχεί σε 1 βαθμό.

Πίνακας 3β. Πρόγνωση (5ετής συνολική επιβίωση) ανάλογα με το στάδιο της νόσου

	Στάδιο 1 (Χαμηλού κινδύνου)	Στάδιο 2 (Ενδιάμεσου κινδύνου)	Στάδιο 3 (Υψηλού κινδύνου)
Παρουσία παραγόντων κινδύνου	0–1 (εκτός από την ηλικία)	Ηλικία ≥ 2	≥ 3
5-ετής Συνολική Επιβίωση (OS)	87%	68%	36%

Πίνακας 4: Αναθεωρημένο σύστημα σταδιοποίησης για τη μακροσφαιριναιμία Waldenström (rIPSSWM). Τροποποιημένο από [38].

Πίνακας 4α: Παράγοντες κινδύνου

Παράγοντες κινδύνου	Βαθμονόμηση
Ηλικία < 65 έτη	0
Ηλικία 66-75 έτη	1
Ηλικία > 75 έτη	2
β2-μικροσφαιρίνη > 4 mg/L	1
LDH >250 IU/L	1
Αλβουμίνη ορού < 3.5 gr/dL	1

Πίνακας 4β: Πρόγνωση ανάλογα με το στάδιο της νόσου

Στάδιο κινδύνου	Βαθμοί	3ετής θνησιμότητα WM-σχετιζόμενη	5ετής ολική επιβίωση	10ετής ολική επιβίωση
Πολύ χαμηλού	0	0%	95%	84%
Χαμηλού	1	10%	86%	59%
Ενδιάμεσου	2	14%	78%	37%
Υψηλού	3	38%	47%	19%
Πολύ υψηλού	4-5	48%	36%	9%

δ. Θεραπευτική προσέγγιση

Η θεραπευτική προσέγγιση οφείλει να είναι εξατομικευμένη και βασίζεται στη βαρύτητα και το είδος των συμπτωμάτων, την ανάγκη για άμεσο έλεγχο της νόσου, τη δυνατότητα αυτόλογης μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, την ηλικία, τις συννοσηρότητες, και τις προηγούμενες γραμμές θεραπείας [39-42]. Έχουν αναπτυχθεί μάλιστα μοντέλα θεραπευτικής παρέμβασης ανάλογα με τον κίνδυνο όπως το μοντέλο mSMART της Mayo Clinic [43]. Η ύπαρξη μεταλλάξεων στα γονίδια MYD88 και CXCR4 επηρεάζουν την απάντηση και την εξέλιξη της ανταπόκρισης στην ιμπρουτινίμη [22, 44]. Τα περισσότερα θεραπευτικά σχήματα περιλαμβάνουν τη ριτουξιμάμη (rituximab), ενώ πρόσφατα έλαβε έγκριση και το φάρμακο ιμπρουτινίμη (ibrutinib) ως μονοθεραπεία αλλά και σε συνδυασμό με τη ριτουξιμάμη τόσο για νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς όσο και για προθεραπευμένους ασθενείς. Νεότερες θεραπείες με στοχευμένους παράγοντες εφαρμόζονται στα πλαίσια κλινικών μελετών και μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν αναστολείς πρωτεασώματος (μπορτεζομίμη, ιξαζομίμη, καρφιλζομίμη), νεότερους αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του Bruton (ακαλαμπρουτινίμη, ζανουμπρουτινίμη, βεκαμπρουτινίμη), αναστολείς του αντι-αποπτωτικού μορίου BCL2 (βενετοκλάξη) και μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του σηματοδοτικού μορίου CXCR4 (ουλοκουπλουμάμη) [8, 40, 44-47].

Οι ασθενείς με ασυμπτωματική νόσο πρέπει να τίθενται σε παρακολούθηση χωρίς να λαμβάνουν κάποιο είδος θεραπείας [42, 48]. Ο μέσος χρόνος εμφάνισης συμπτωμάτων σε αυτούς τους ασθενείς ξεπερνάει τα 5-10 έτη που για ορισμένους ηλικιωμένους ασθενείς μπορεί να ξεπερνάει και το μέσο όρο επιβίωσης.

Οι κύριες ενδείξεις έναρξης θεραπείας συνοψίζονται στον Πίνακα 5. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης IgM δεν αποτελούν από μόνα τους κριτήριο έναρξης θεραπείας [42, 48].

Πίνακας 5. Σύνοψη των ενδείξεων για έναρξη θεραπείας Τροποποιημένο από [42].

Κλινικές ενδείξεις

- Υποτροπιάζουσα δεκατική πυρετική κίνηση, νυχτερινοί ιδρώτες, απώλεια βάρους, κακουχία
- Υπεργλοιότητα
- Λεμφαδενοπάθεια, συμπτωματική ή ογκόμορφη (≥ 5 εκ μέγιστη διάμετρος)
- Συμπτωματική ηπατομεγαλία και / ή σπληνομεγαλία
- Συμπτωματική οργανομεγαλία και / ή διήθηση οργάνου ή ιστού
- Περιφερική νευροπάθεια αποδιδόμενη στη μακροσφαιριναιμία Waldenström

Εργαστηριακές ενδείξεις

- Συμπτωματική κρυοσφαιριναιμία
- Αναιμία εκ ψυχροσυγκολλητινών
- Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία και / ή θρομβοπενία
- Νεφροπάθεια σχετιζόμενη με τη μακροσφαιριναιμία Waldenström
- Αμυλοείδωση σχετιζόμενη με τη μακροσφαιριναιμία Waldenström
- Αιμοσφαιρίνη ≤ 10 g/dL
- Αριθμός αιμοπεταλίων $< 100 \times 10^9/L$

Η επιλογή θεραπευτικού σχήματος 1^{ης} γραμμής καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Θεραπευτικές επιλογές ανάλογα με την κλινική εικόνα της νόσου.
Τροποποιημένο από [42].

<i>Κλινική εικόνα</i>	<i>Επιλογές 1ης γραμμής</i>
Υπεργλοιότητα	Θεραπεία βασισόμενη σε ΑΠ (BDR) Θεραπεία βασισόμενη σε αναστολείς BTK (ιμπρουτινίμη) Μπενταμουστίνη-Ριτουξιμάμη
Κυτταροπενίες	Δεξαμεθαζόνη-Ριτουξιμάμη-Κυκλοφωσφαμίδη (DRC) Θεραπεία βασισόμενη σε ΑΠ (BDR) Μπενταμουστίνη-Ριτουξιμάμη Ιμπρουτινίμη (+/- Ριτουξιμάμη)
Ογκόμορφη νόσος	Μπενταμουστίνη-Ριτουξιμάμη Θεραπεία βασισόμενη σε ΑΠ (BDR) Ιμπρουτινίμη (+/- Ριτουξιμάμη)
Νευροπάθεια	Δεξαμεθαζόνη-Ριτουξιμάμη-Κυκλοφωσφαμίδη (DRC) Μπενταμουστίνη-Ριτουξιμάμη Ιμπρουτινίμη (+/- Ριτουξιμάμη)
AL Αμυλοείδωση	Θεραπεία βασισόμενη σε ΑΠ (BDR) Μπενταμουστίνη-Ριτουξιμάμη

ΑΠ: αναστολείς πρωτεασώματος; BDR: μπορτεζομίμη, δεξαμεθαζόνη, ριτουξιμάμη; DRC: δεξαμεθαζόνη, ριτουξιμάμη, κυκλοφωσφαμίδη

Ο θεραπευτικός αλγόριθμος των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών συνοψίζεται στην Εικόνα 1. Για την επείγουσα αντιμετώπιση της υπεργλοιοποίησης η πλασμαφαίρεση πρέπει να εφαρμόζεται σε συνδυασμό με την κατάλληλη θεραπευτική αγωγή [42, 49].

Οι συνδυασμοί που βασίζονται στη ριτουξιμάμπη αποτελούν τον πυλώνα της θεραπείας του νοσήματος. Οι συνδυασμοί αυτού του αντι-CD20 αντισώματος με ενδοφλέβια ή από του στόματος κυκλοφωσφαμίδη και δεξαμεθαζόνη (DRC) επάγουν υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης σε σχέση με τη μονοθεραπεία με ριτουξιμάμπη μολονότι τα ποσοστά πλήρους ύφεσης είναι αρκετά χαμηλά. Ο συνδυασμός αυτός συσχετίζεται με παρατεταμένο διάστημα έως την πρόοδο της νόσου (περίπου 3 έτη), με διάστημα έως την επόμενη θεραπεία μεγαλύτερο από 4 έτη και μέση συνολική επιβίωση περίπου 8 έτη. Παράλληλα το σχήμα αυτό είναι καλά ανεκτό και ασφαλές τόσο βραχυπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα [50]. Ο συνδυασμός DRC και άλλοι παρόμοιοι αποτελούν πρωταρχικές επιλογές σε ασθενή με χαμηλό φορτίο νόσου ή με συννοσηρότητες.

Ο συνδυασμός της μενταμουστίνης με τη ριτουξιμάμπη (B-R) έχει συσχετιστεί με μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου και μεγαλύτερη συνολική επιβίωση συγκριτικά με το R-CHOP (ριτουξιμάμπη, κυκλοφωσφαμίδη, δοξορουβικίνη, βινκριστίνη, πρεδνιζολόνη) αλλά και με λιγότερη τοξικότητα και θεωρείται ως μια από τις πρωταρχικές επιλογές [51]. Το σχήμα αυτό δεν έχει συγκριθεί με το DRC, αλλά θεωρείται θεραπεία εκλογής για ασθενείς με υψηλό φορτίο νόσου.

Μελέτες φάσης 2 σε ασθενείς με νέα διάγνωση μακροσφαιριναιμία Waldenström αλλά και σε ασθενείς με νόσο σε υποτροπή έχουν δείξει πως η μπορτεζομίμη μόνη της ή σε συνδυασμό με ριτουξιμάμπη είναι πολύ δραστική [46, 52, 53]. Η παρακολούθηση των ασθενών αυτών για μεγάλο χρονικό διάστημα ανέδειξε μέσο διάστημα έως την υποτροπή περίπου 3.5 έτη, μέση διάρκεια διατήρησης της μείζονος

ανταπόκρισης τα 5.5 έτη και μέση επιβίωση στα 7 έτη σε ποσοστό 66%. Η κυριότερη παρενέργεια αυτού του συνδυασμού είναι η νευροτοξικότητα. Οι συνδυασμοί της μπορτεζομίμπης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπεία 1^{ης} γραμμής σε ασθενείς με πολύ υψηλά επίπεδα IgM ή υπεργλοιοότητα.

Συνδυασμοί που περιλαμβάνουν πιο εντατική χημειοθεραπεία (R-CHOP) ή νουκλεοσιδικά ανάλογα (FR ή FCR) επάγουν υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης αλλά με σημαντική τοξικότητα και δε συστήνονται ως πρωταρχικές επιλογές για την 1^η γραμμή στην αντιμετώπιση του νοσήματος [42, 49].

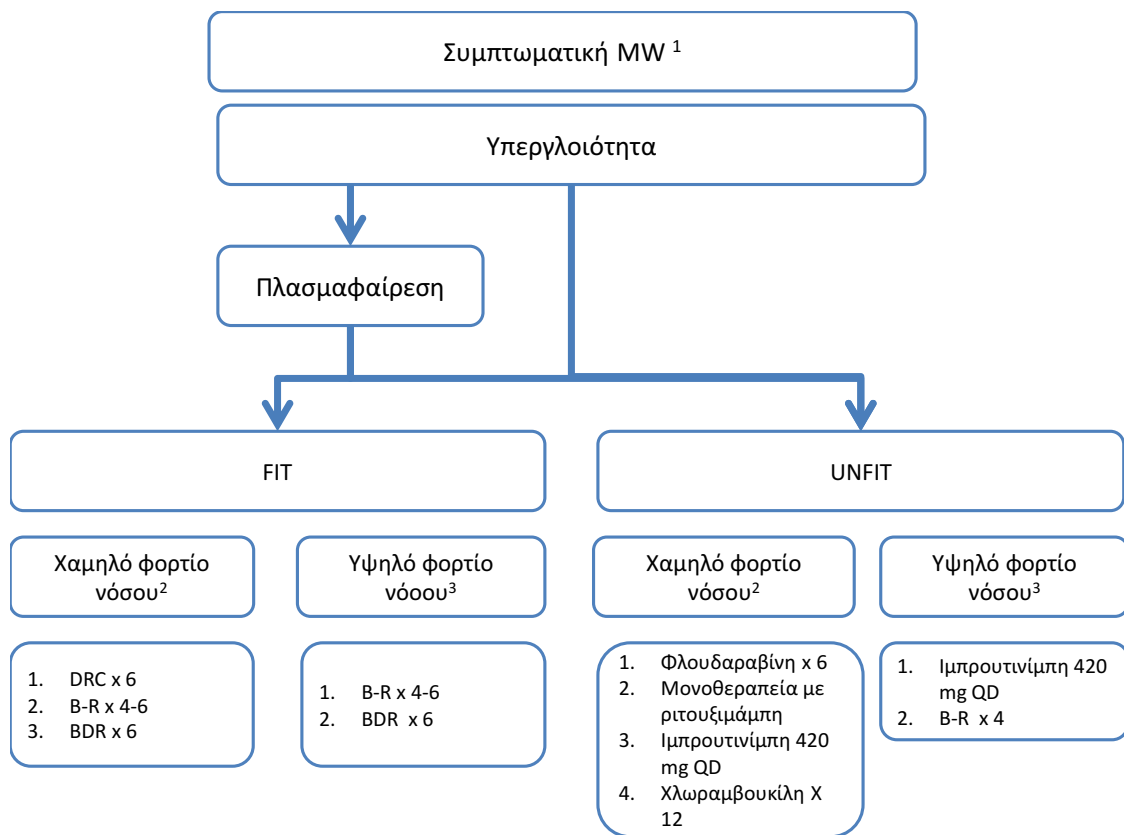
Η χρήση μονοθεραπείας με αλκυλιούντες παράγοντες, νουκλεοσιδικά ανάλογα ή ριτουξιμάμπη επιτυγχάνει χαμηλά ποσοστά ανταπόκρισης και για το λόγο αυτό θεωρείται ως θεραπευτική επιλογή για ασθενείς με συννοσηρότητες που δε μπορούν να λάβουν κάποιο πιο εντατικό θεραπευτικό σχήμα.

Η ιμπρουτινίμπη είναι ένας αναστολέας της τυροσινικής κινάσης του Bruton με εκσεσημασμένη δραστηριότητα και υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης σε προθεραπευμένους ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström [44, 54]. Η ιμπρουτινίμπη έχει εγκριθεί για ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström που έχουν υποτροπιάσει μετά τη θεραπεία 1^{ης} γραμμής και για νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς που δεν είναι υποψήφιοι για χημειοανοσοθεραπεία. Πρόσφατα, η ιμπρουτινίμπη έλαβε έγκριση σε συνδυασμό με τη ριτουξιμάμπη για τη θεραπεία ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström που είτε έχουν λάβει προηγούμενες γραμμές θεραπείας είτε είναι νεοδιαγνωσθέντες. Η έγκριση βασίστηκε στα αποτελέσματα της μελέτης φάσης 3 iNNOVATE, στην οποία συμμετείχαν 150 ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν ριτουξιμάμπη με ιμπρουτινίμπη ή με εικονικό φάρμακο [55]. Οι ασθενείς που έλαβαν τον ενεργό συνδυασμό είχαν 80% μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι ελεύθεροι προόδου νόσου στους 30 μήνες παρακολούθησης

συγκριτικά με όσους έλαβαν μονοθεραπεία με ριτουξιμάμπη. Το όφελος ήταν ανεξάρτητο από την παρουσία ή μη μεταλλάξεων στα γονίδια MYD88 και CXCR4.

Δεν υπάρχουν δεδομένα από προοπτικές μελέτες για το ρόλο της ριτουξιμάμπης ως θεραπεία συντήρησης και για το λόγο αυτό δε συστήνεται η χρήση της στους ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström [56].

Εικόνα 1. Θεραπευτικός αλγόριθμος για νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με μακροσφαιριναίμια Waldenström. Τροποποιημένο από [57].



¹Μακροσφαιριναίμια Waldenström

²Χαμηλό φορτίο νόσου: όχι μείζονες κυτταροπενίες, όχι υπεργλοιότητα ή οργανομεγαλία

³Υψηλό φορτίο νόσου: παρουσία οποιουδήποτε από τα επόμενα: σοβαρές κυτταροπενίες, υπεργλοιότητα, οργανομεγαλία

B-R: bendamustine rituximab [51], DRC: Rituximab, Cyclophosphamide, dexamethasone [50], BDR: Bortezomib, rituximab, dexamethasone [46], από του στόματος φλουδαραβίνη και από του στόματος χλωραμβουκίλη [58], ιμπρουτινίμπη με ή χωρίς ριτουξιμάμπη [55]

Η θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με υποτροπιάζουσα ή / και ανθεκτική μακροσφαιριναιμία Waldenström συνοψίζεται στην Εικόνα 2. Η μονοθεραπεία με ιμπρουτινίμη έχει δείξει σημαντική δραστηριότητα [44, 54] συμπεριλαμβανομένων των ασθενών που είναι ανθεκτικοί στη ριτουξιμάμπη [44] και έχει λάβει έγκριση σε αυτή την ένδειξη με βάση δεδομένα από μελέτες φάσης 2. Η ιμπρουτινίμη πρέπει να χορηγείται μέχρι πρόοδο νόσου, ενώ οι υποτροπές είναι συχνές με τη διακοπή του φαρμάκου. Η τοξικότητα του φαρμάκου είναι διαχειρίσιμη αλλά το κόστος της συνεχιζόμενης θεραπείας με ιμπρουτινίμη είναι υψηλό. Η ιμπρουτινίμη αποτελεί θεραπεία 1ης γραμμής για ασθενείς με υποτροπιάζουσα MW και θεραπεία εκλογής για ασθενείς ανθεκτικούς στη ριτουξιμάμπη. Η ιμπρουτινίμη με ή χωρίς ριτουξιμάμπη αποτελεί πιθανότατα την πρώτη επιλογή για ασθενείς που υποτροπιάζουν σε λιγότερο από ένα χρόνο από την τελευταία γραμμή θεραπείας με ριτουξιμάμπη [44, 55].

Για τους ασθενείς που υποτροπιάζουν 2-3 έτη μετά από την τελευταία γραμμή θεραπείας με ριτουξιμάμπη, συνδυασμός με βάση τη ριτουξιμάμπη μπορεί να επαναχορηγηθεί [57]. Εάν έχει χρησιμοποιηθεί ο συνδυασμός ριτουξιμάμπης με κυκλοφωσφαμίδη (πχ DRC), τότε είτε ο συνδυασμός της ριτουξιμάμπης με την μπενταμουστίνη (B-R) είτε με τη βορτεζομίμη (πχ BDR/BR) μπορεί να χορηγηθεί. Ο συνδυασμός ριτουξιμάμπης με νουκλεοσιδικά ανάλογα (F-R, FCR) είναι πολύ δραστικός αλλά επίσης τοξικός και θα πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή. Για ασθενείς που πετυχαίνουν μακροχρόνια ύφεση με την 1η γραμμή θεραπείας (πάνω από 3-4 έτη), η επαναχορήγηση της θεραπείας αυτής ενδέχεται να είναι μια επιλογή [57].

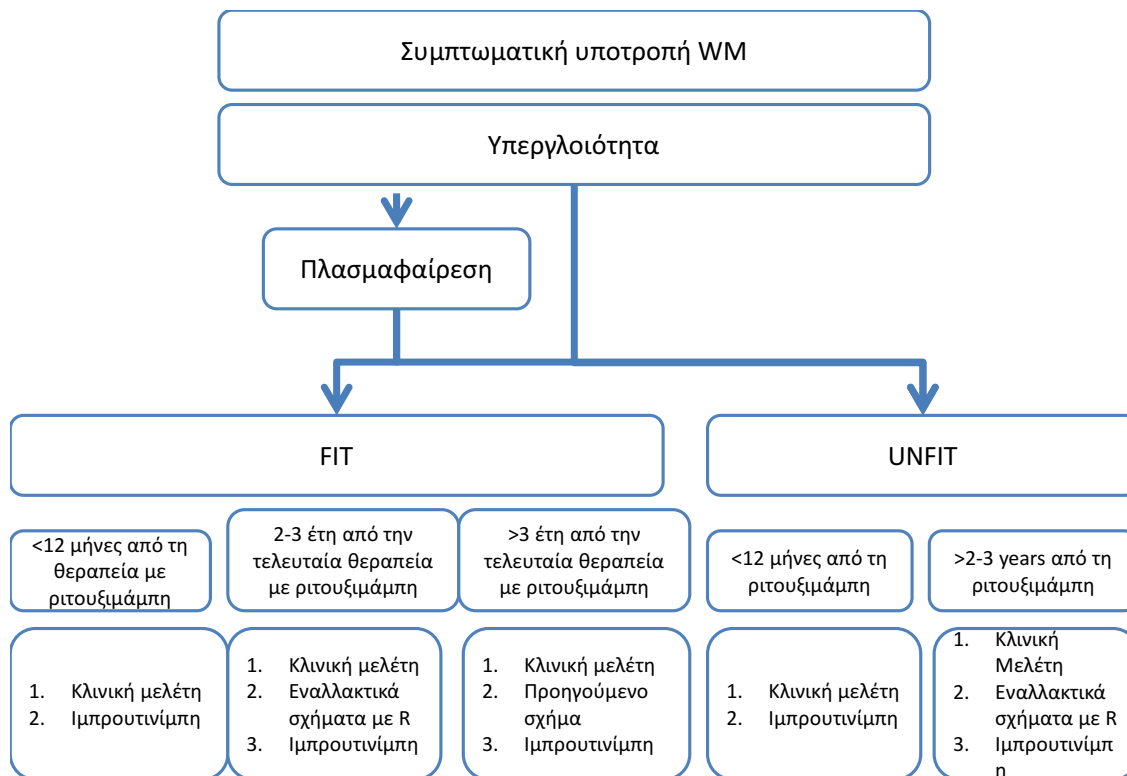
Η μεγαθεραπεία ακολουθούμενη από αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μυελού των οστών έχει ρόλο για τη θεραπεία νέων ασθενών

με χημειοευαίσθητη νόσο και κατά προτίμηση έχει θέση στην πρώτη ή στη δεύτερη υποτροπή [59]. Ο ρόλος της αλλογενούς μεταμόσχευσης είναι περιορισμένος εκτός του πλαισίου κλινικών δοκιμών και έχει θέση μόνο σε εξαιρετικά επιλεγμένους νέους ασθενείς με επιθετική νόσο [60].

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα θεραπευτικά σχήματα και θεραπευτικοί συνδυασμοί ανά κατηγορία σύστασης (I, II, III), ο βαθμός τεκμηρίωσής τους (Πίνακας 8) και η θέση που κατέχουν στις διεθνείς οδηγίες (NCCN, ESMO) [12, 36].

Στον Πίνακα 9 αναλύονται τα δοσολογικά σχήματα και το χρονοδιάγραμμα των συχνότερων θεραπευτικών επιλογών τόσο στη διάγνωση όσο και στην υποτροπή.

Εικόνα 2. Θεραπευτικός αλγόριθμος για ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική μακροσφαιριναιμία Waldenström. Τροποποιημένο από [57].



WM: μακροσφαιριναιμία Waldenström; R: ριτουξιμάμπη

Η ριτουξιμάμπη μπορεί να προστεθεί στην ιμπρουτινίμπη με βάση τα αποτελέσματα της iNNOVATE [55].

Πίνακας 7. Συγκριτική αξιολόγηση διαθέσιμων θεραπευτικών σχημάτων για τη μακροσφαιριναμία Waldenström.

ΝΕΟΔΙΑΓΝΩΣΘΕΝΤΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ			
ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟ ΣΧΗΜΑ	ΟΦΕΛΟΣ	ΣΧΟΛΙΟ	ΔΙΕΘΝΕΙΣ ΟΔΗΓΙΕΣ
Πλασμαφαίρεση	Συμπτωματική αντιμετώπιση	Υπεργλοιότητα	IV, A
DRC	TTP, OS	Χαμηλό φορτίο νόσου ή συννοσηρότητες	III, B
BR	PFS, OS	Υψηλό φορτίο νόσο	II, B
Βορτεζομίμη +/- Ριτουξιμάμη	PFS, OS	Υψηλά επίπεδα IgM levels ή υπεργλοιότητα	III, B
RCHOP	ΔΕΝ συστήνεται λόγω τοξικότητας		III, C
FR / FCR	ΔΕΝ συστήνονται λόγω τοξικότητας		III, C
Μονοθεραπεία με αλκυλιούντες παράγοντες / νουκλεοσιδικά ανάλογα / ριτουξιμάμη		Συννοσηρότητες	
Ιμπρουτινίμη	PFS	Νεοδιαγνωσθέντες που δεν είναι υποψήφιοι για χημειοανοσοθεραπεία	V, C

Ιμπρουτινίμπη + Ριτουξιμάμπη	PFS	Νεοδιαγνωσθέντες	I
Ριτουξιμάμπη συντήρηση	ΔΕΝ συστήνεται		IV, C
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΥΠΟΤΡΟΠΙΑΖΟΥΣΑ / ΑΝΘΕΚΤΙΚΗ ΝΟΣΟ			
ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟ ΣΧΗΜΑ	ΟΦΕΛΟΣ	ΣΧΟΛΙΟ	ΔΙΕΘΝΕΙΣ ΟΔΗΓΙΕΣ
Ιμπρουτινίμπη+/-Ριτουξιμάμπη	PFS	Υποτροπιάζουσα / Ανθεκτική νόσος Υποτροπή <1 έτος από ριτουξιμάμπη	I, A
BR , BDR	TTP, PFS	Υποτροπή > 2-3 έτη από DRC	IV, B
FR / FCR	PFS	Προσοχή στην τοξικότητα Μακροχρόνια	III, C
Επαναχορήγηση σχήματος		ύφεση με την 1η γραμμή θεραπείας (> 3-4 έτη)	IV, B
Μεγαθεραπεία και ΑΜΑΑΚ		Νέοι ασθενείς με χημειοευαίσθητη νόσο, στην 1η ή 2η υποτροπή	IV, B

TTP (Time to progression): διάστημα έως πρόοδο νόσου; OS (Overall survival): ολική επιβίωση; PFS (Progression-free survival): διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου; BDR (Bortezomib, Dexamethasone, Rituximab): μπορτεζομίμπη, δεξαμεθαζόνη,

ριτουξιμάμπη; DRC (Dexamethasone, Rituximab, Cyclophosphamide):
δεξαμεθαζόνη, ριτουξιμάμπη, κυκλοφωσφαμίδη; FCR (Fludarabine,
Cyclophosphamide, Rituximab): φλουδαραβίνη, κυκλοφωσφαμίδη, ριτουξιμάμπη;
BR (Bendamustine, Rituximab): μπενταμουστίνη, ριτουξιμάμπη; RCHOP
(Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, Prednisolone):
ριτουξιμάμπη, κυκλοφωσφαμίδη, δοξορουβικίνη, βινκριστίνη, πρεδρινοζολόνη;
AMAAK: αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μυελού των
οστών

Πίνακας 8. Βαθμός τεκμηρίωσης (Levels of evidence) και βαθμονόμηση συστάσεων (grades of recommendation)

Βαθμός τεκμηρίωσης

I Στοιχεία από τουλάχιστον μία τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη κλινική μελέτη καλής μεθοδολογικής ποιότητας (μικρή πιθανότητα για σφάλμα) ή καλά σχεδιασμένες μετα-αναλύσεις ή τυχαιοποιημένες μελέτες χωρίς ετερογένεια

II Μικρές τυχαιοποιημένες μελέτες ή μεγάλες τυχαιοποιημένες μελέτες με υποψία σφάλματος (χαμηλότερης μεθοδολογικής ποιότητας) ή μετα-αναλύσεις τέτοιων κλινικών μελετών ή μελετών με εκσεσημασμένη ετερογένεια

III Προοπτικές μελέτες κοορτής

IV Αναδρομικές μελέτες κοορτής ή μελέτες ασθενών-μαρτύρων

V Μελέτες χωρίς ομάδα ελέγχου, αναφορές περιπτώσεων, απόψεις ειδικών

Βαθμονόμηση συστάσεων

A Ισχυρή απόδειξη αποτελεσματικότητας με σαφές κλινικό όφελος, ισχυρή σύσταση

B Ισχυρή ή μέτρια απόδειξη αποτελεσματικότητας αλλά με περιορισμένο κλινικό όφελος, γενική σύσταση

C Ανεπαρκής απόδειξη για αποτελεσματικότητα ή το όφελος δεν υπερτερεί των κινδύνων ή των ανεπιθύμητων ενεργειών, προαιρετικό

D Μέτρια απόδειξη για μη αποτελεσματικότητα ή για ανεπιθύμητα αποτελέσματα, γενικά μη συνιστώμενα

E Ισχυρή απόδειξη για μη αποτελεσματικότητα ή για ανεπιθύμητα αποτελέσματα, μη συνιστώμενα

Πίνακας 9. Κύρια δοσολογικά σχήματα και χρονοδιαγράμματα για τη μακροσφαιριναίμια Waldenström.

Ιμπρουτινίμπη	420 mg PO άπαξ ημερησίως μέχρι πρόοδο νόσου
Ιμπρουτινίμπη – Ριτουξιμάμπη	Ιμπρουτινίμπη 420 mg PO άπαξ ημερησίως μέχρι πρόοδο νόσου Ριτουξιμάμπη 375 mg/m ² σε εβδομαδιαίες εγχύσεις τις εβδομάδες 1 έως 4 και 17 έως 20
DRC	Δεξαμεθαζόνη 20 mg IV ημέρα 1 Ριτουξιμάμπη 375 mg/m ² IV ημέρα 1 Κυκλοφωσφαμίδη 100 mg/m ² PO BID ημέρες 1-5 Κύκλος 21 ημερών επί 6
BDR	Βορτεζομίμπη 1.3 mg/m ² ημέρες 1, 4, 8, 11 κύκλος 1 (διάρκειας 21 ημερών) Δεξαμεθαζόνη 40 mg IV και Ριτουξιμάμπη 375 mg/m ² IV και Βορτεζομίμπη 1.6 mg/m ² ημέρες 1, 8, 15, 22 κύκλοι 2 και 5 (διάρκειας 36 ημερών) Βορτεζομίμπη 1.6 mg/m ² ημέρες 1, 8, 15, 22 κύκλοι 3 και 4 (διάρκειας 36 ημερών) Συνολικά 5 κύκλοι
BR	Μπενταμουστίνη 90 mg/m ² IV ημέρες 1-2 Ριτουξιμάμπη 375 mg/m ² IV ημέρα 1 Κύκλος 21 ημερών επί 6
FCR	Φλουδαραβίνη 25 mg/m ² IV ημέρες 1-3 Κυκλοφωσφαμίδη 250 mg/m ² IV ημέρες 1-3

	<p>Ριτουξιμάμπη 375 mg/m² IV ημέρα 1</p> <p>Κύκλος 28 ημερών επί 4-6</p> <p>+/- Μιτοξανδρόνη 10 mg/m² ημέρα 1</p>
FR	<p>Φλουδαραβίνη 25 mg/m² IV ημέρες 1-5</p> <p>Ριτουξιμάμπη 375 mg/m² IV ημέρα 1</p> <p>Κύκλος 28 ημερών επί 4-6</p>
Ριτουξιμάμπη μονοθεραπεία	<p>Ριτουξιμάμπη 375 mg/m² IV εβδομαδιαίως επί 4 εβδομάδες</p>

BDR (Bortezomib, Dexamethasone, Rituximab): μπορτεζομίμπη, δεξαμεθαζόνη, ριτουξιμάμπη; BR (Bortezomib, Rituximab): μπορτεζομίμπη, ριτουξιμάμπη; DRC (Dexamethasone, Rituximab, Cyclophosphamide): δεξαμεθαζόνη, ριτουξιμάμπη, κυκλοφωσφαμίδη; FCR (Fludarabine, Cyclophosphamide, Rituximab): φλουδαραβίνη, κυκλοφωσφαμίδη, ριτουξιμάμπη; FR (Fludarabine, Rituximab): φλουδαραβίνη, ριτουξιμάμπη; po: από του στόματος; iv: ενδοφλέβια; bid: δύο φορές ημερησίως

ε. Εκτίμηση της ανταπόκρισης

Η εκτίμηση της ανταπόκρισης στη μακροσφαιριναιμία Waldenström στηρίζεται σε διαδοχικές μετρήσεις της μονοκλωνικής IgM παραπρωτεΐνης στον ορό. Το είδος της ανταπόκρισης καθορίζεται με βάση τη σχετική μείωση της IgM (Πίνακας 10) [61]. Η αξιολόγηση του μυελού δεν αποτελεί ρουτίνα για την εκτίμηση της ανταπόκρισης παρά μόνο για την τεκμηρίωση της πλήρους ανταπόκρισης. Ωστόσο, στα πλαίσια κλινικών μελετών συστήνεται ισχυρά η συχνή εκτίμηση του μυελού. Με αρκετούς θεραπευτικούς παράγοντες έχει αναφερθεί δυσανολογία μεταξύ της μείωσης της IgM και της διήθησης του μυελού. Εκτίμηση της ανταπόκρισης με απεικονιστικές μεθόδους θα πρέπει να γίνεται μόνο σε ασθενείς με λεμφαδενοπάθεια, οργανομεγαλία ή εξωμυελική νόσο κατά τη διάγνωση ή επί κλινικής υποψίας εξέλιξης της νόσου σε υψηλού βαθμού κακοήθεια.

Πίνακας 10. Είδος και κριτήρια ανταπόκρισης. Τροποποιημένο από [61].

Είδος ανταπόκρισης	Κριτήρια ανταπόκρισης
Πλήρης Ανταπόκριση (CR)	(i) Απουσία μονοκλωνικής IgM παραπρωτεΐνης με ανοσοκαθίλωση (ii) Φυσιολογικά επίπεδα IgM ορού (iii) Πλήρης υποχώρηση λεμφαδενοπάθειας και σπληνομεγαλίας εάν υπήρχαν κατά τη διάγνωση (iv) Μορφολογικά φυσιολογική αναρρόφηση μυελού των οστών και οστεομυελική βιοψία
Πολύ καλή μερική	(i) Ανιχνεύσιμη μονοκλωνική IgM παραπρωτεΐνη (ii) $\geq 90\%$ μείωση στην IgM ορού από τη διάγνωση

ανταπόκριση (VGPR)	(iii) Μειωμένη λεμφαδενοπάθεια / σπληνομεγαλία εάν υπήρχε κατά τη διάγνωση (iv) Απουσία νέων σημείων ή συμπτωμάτων ενεργού νόσου
Μερική ανταπόκριση (PR)	(i) Ανιχνεύσιμη μονοκλωνική IgM παραπρωτεΐνη (ii) $\geq 50\%$ αλλά $< 90\%$ μείωση στην IgM ορού από τη διάγνωση (iii) Μειωμένη λεμφαδενοπάθεια / σπληνομεγαλία εάν υπήρχε κατά τη διάγνωση (iv) Απουσία νέων σημείων ή συμπτωμάτων ενεργού νόσου
Ελάχιστη ανταπόκριση (MR)	(i) Ανιχνεύσιμη μονοκλωνική IgM παραπρωτεΐνη (ii) $\geq 25\%$ αλλά $< 50\%$ μείωση στην IgM ορού από τη διάγνωση (iii) Απουσία νέων σημείων ή συμπτωμάτων ενεργού νόσου
Σταθερή νόσος (SD)	(i) Ανιχνεύσιμη μονοκλωνική IgM παραπρωτεΐνη (ii) $< 25\%$ μείωση και $< 25\%$ αύξηση στην IgM ορού από τη διάγνωση (iii) Μη επιδείνωση λεμφαδενοπάθειας/σπληνομεγαλίας (iv) Απουσία νέων σημείων ή συμπτωμάτων ενεργού νόσου
Πρόοδος νόσου (PD)	(i) $\geq 25\%$ αύξηση στην IgM ορού από τη χαμηλότερη ναδίρ τιμή και / ή (ii) Κλινική πρόοδος νόσου

* Οι ανταποκρίσεις ή η πρόοδος νόσου πρέπει να επιβεβαιώνονται με 2 διαδοχικές μετρήσεις IgM είτε με πυκνομετρία είτε με ποσοτικοποίηση με νεφελομετρία.

στ. Παρακολούθηση και πρόγνωση

Η παρακολούθηση ασυμπτωματικών ασθενών πρέπει να περιλαμβάνει λήψη ιστορικού, φυσική εξέταση, γενική αίματος, βιοχημικό προφίλ, ηλεκτροφόρηση λευκωμάτων ορού και ποσοτικό προσδιορισμό της IgM κάθε 3 μήνες για τα πρώτα 2 έτη, κάθε 4-6 μήνες για τα επόμενα 3 έτη και ακολούθως μια φορά ετησίως. Για τους συμπτωματικούς ασθενείς που βρίσκονται υπό θεραπεία ή σε ύφεση της νόσου, η συχνότητα των εξετάσεων καθορίζεται σε εξατομικευμένη βάση, ανάλογα με τις κλινικές εκδηλώσεις, το θεραπευτικό σχήμα, τις συννοσηρότητες και την τοξικότητα από τη θεραπεία. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην πιθανή εξέλιξη σε υψηλής κακοήθειας λέμφωμα και τις δευτεροπαθείς κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένης της λευχαιμίας. Ο απεικονιστικός έλεγχος δεν αποτελεί ρουτίνα, και θα πρέπει να γίνεται επί κλινικών ενδείξεων (λεμφαδενοπάθεια ή/και οργανομεγαλία κατά τη διάγνωση, κλινική υποψία υποτροπής ή εξέλιξης σε υψηλής κακοήθειας λέμφωμα ή δευτεροπαθούς κακοήθειας) (Πίνακας 11).

Η διάμεση επιβίωση για τους νέους ασθενείς ξεπερνά τη δεκαετία. Για τους ηλικιωμένους η διάμεση επιβίωση είναι μικρότερη αλλά ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών θα καταλήξει από αιτίες ανεξάρτητες από τη μακροσφαιριναιμία Waldenström [15]. Η εξέλιξη της νόσου σε υψηλής κακοήθειας λέμφωμα και η ανάπτυξη μυελοδυσπλασίας δεν είναι πολύ συχνή και παρατηρείται στο 2-6% [58, 62] και στο 1-6% [58, 63] των ασθενών, αντίστοιχα. Δευτεροπαθείς μη αιματολογικές κακοήθειες μπορεί να παρατηρηθούν στο 16-20%, ειδικά σε ηλικιωμένους ασθενείς [58, 64].

Πίνακας 11. Εξετάσεις για την παρακολούθηση ασθενών με MW

- Ιστορικό και Φυσική Εξέταση κατά συστήματα
- Ανασκόπηση συστημάτων (Β-συμπτωματολογία, οργανομεγαλία, συμπτώματα υπεργλοιότητας, νευροπάθεια, σύνδρομο Raynaud's, εξάνθημα, περιφερικά οιδήματα, δύσπνοια)
- Εργαστηριακές εξετάσεις (γενική αίματος, πλήρες βιοχημικό προφίλ, επίπεδα ανοσοσφαιρινών ορού, ηλεκτροφόρηση και ανοσοκαθήλωση λευκωμάτων ορού)

Επί ενδείξεων

- Βυθοσκόπηση οφθαλμού
- Αξονική τομογραφία θώρακος, κοιλίας και πυέλου
- Κρυσφαιρίνες
- Τίτλος ψυχοσυγκολλητινών
- Γλοιότητα ορού
- Έλεγχος για νόσο von Willebrand
- β2-μικροσφαιρίνη ορού
- Προσδιορισμός λευκώματος ούρων 24ώρου
- Ηλεκτροφόρηση και ανοσοκαθήλωση ούρων 24ώρου
- Ελεύθερες ελαφρές αλυσίδες (FLCs)
- NTproBNP, Καρδιακές Τροπονίνες
- Anti-MAG, Anti-GM1 (νευρολογική εκτίμηση)
- Μυελόγραμμα και οστεομυελική βιοψία
- Έλεγχος για μεταλλάξεις στα γονίδια MYD88 και CXCR4

Ο ρόλος των μεταλλάξεων στα γονίδια MYD88 και CXCR4

α. MYD88

Η σημαντικότερη εξέλιξη στην κατανόηση της βιολογίας και της παθογένειας της νόσου τα τελευταία χρόνια υπήρξε η διαπίστωση από την ερευνητική ομάδα των Treon και συνεργατών ότι μια σωματική μετάλλαξη στο γονίδιο MYD88 ανευρίσκεται στη συντριπτική πλειοψηφία των αρρώστων με μακροσφαιριναιμία Waldenström. Περίπου 90-95% των ασθενών φέρουν τη μετάλλαξη L265P στο γονίδιο MYD88. Η ανεύρεση της μετάλλαξης έγινε μετά την αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (whole-genome sequencing) λεμφοπλασματοκυτταρικών κυττάρων ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström [21]. Μια σωματική μετάλλαξη στη θέση 38182641 του χρωμοσώματος 3p22.2 ενός νουκλεοτιδίου από T (θυμίνη) σε C (κυτοσίνη) στο γονίδιο MYD88 έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή από λευκίνη σε προλίνη στη θέση 265 (L265P) της παραγόμενης πρωτεΐνης που λειτουργεί ως υποδοχέας τύπου Toll. Η πρωτεΐνη MYD88 που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο γονίδιο είναι μια σηματοδοτική πρωτεΐνη που προσδένεται στο ενδοκυττάριο τμήμα υποδοχέων τύπου Toll και υποδοχέων των ιντερλευκινών 1 και 18 και προκαλεί τον ομοδιμερισμό τους. Ακολούθως, η κινάση 4 του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (IRAK4) προσδένεται στο MYD88 και φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες IRAK1 και IRAK2. Σχηματίζεται έτσι το «μυντόσωμα» (“myddosome”) που προάγει τη μεταβίβαση του σήματος μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης του Bruton (BTK), του μονοπατιού του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB) και του μοριακού καταρράκτη των πρωτεϊνικών κινασών ενεργοποιούμενων από μιτογόνα (MAPK), που προάγει την επιβίωση του κυττάρου [65, 66]. Επιπλέον, ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι των πρωτεϊνών JAK-STAT3 που ευοδώνει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του

λεμφοπλασματοκυττάρου. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη MYD88 επάγει επίσης την ενεργοποίηση της τυροσινικής πρωτεϊνικής κινάσης HCK, που ανήκει στην οικογένεια των SRC κινασών. Πρόσφατα έχει αναδειχθεί ο σημαντικός ρόλος της HCK, καθώς προάγει τα σηματοδοτικά μονοπάτια της BTK, της πρωτεϊνικής κινάσης B (AKT) και της εξωκυτταρίως ρυθμιζόμενης κινάσης (ERK) 1/2, τα οποία διασφαλίζουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των λεμφοπλασματοκυττάρων στους ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström (Εικόνα 3) [67, 68].

Η συγκεκριμένη μετάλλαξη μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διαφορική διάγνωση του νοσήματος από λοιπές φαινοτυπικά ομοιάζουσες ασθένειες [69]. Δεν ανιχνεύεται συνήθως σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα ή IgG MGUS ή σε υγιείς. Ωστόσο, μπορεί να ανιχνευτεί σε έως και 10% των ασθενών με σπληνικό λέμφωμα οριακής ζώνης (splenic marginal zone lymphoma), 4% των ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, 25% των ασθενών με διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα B-κύτταρα (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) του υποτύπου του ενεργοποιημένου B-κυττάρου (ABC), καθώς και σε ένα μεγάλο ποσοστό έως και 70% των ασθενών με DLBCL κεντρικού νευρικού συστήματος [70]. Επομένως, η ύπαρξη της μετάλλαξης MYD88^{L265P} θα πρέπει να συναξιολογείται με βάση τα υπόλοιπα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα.

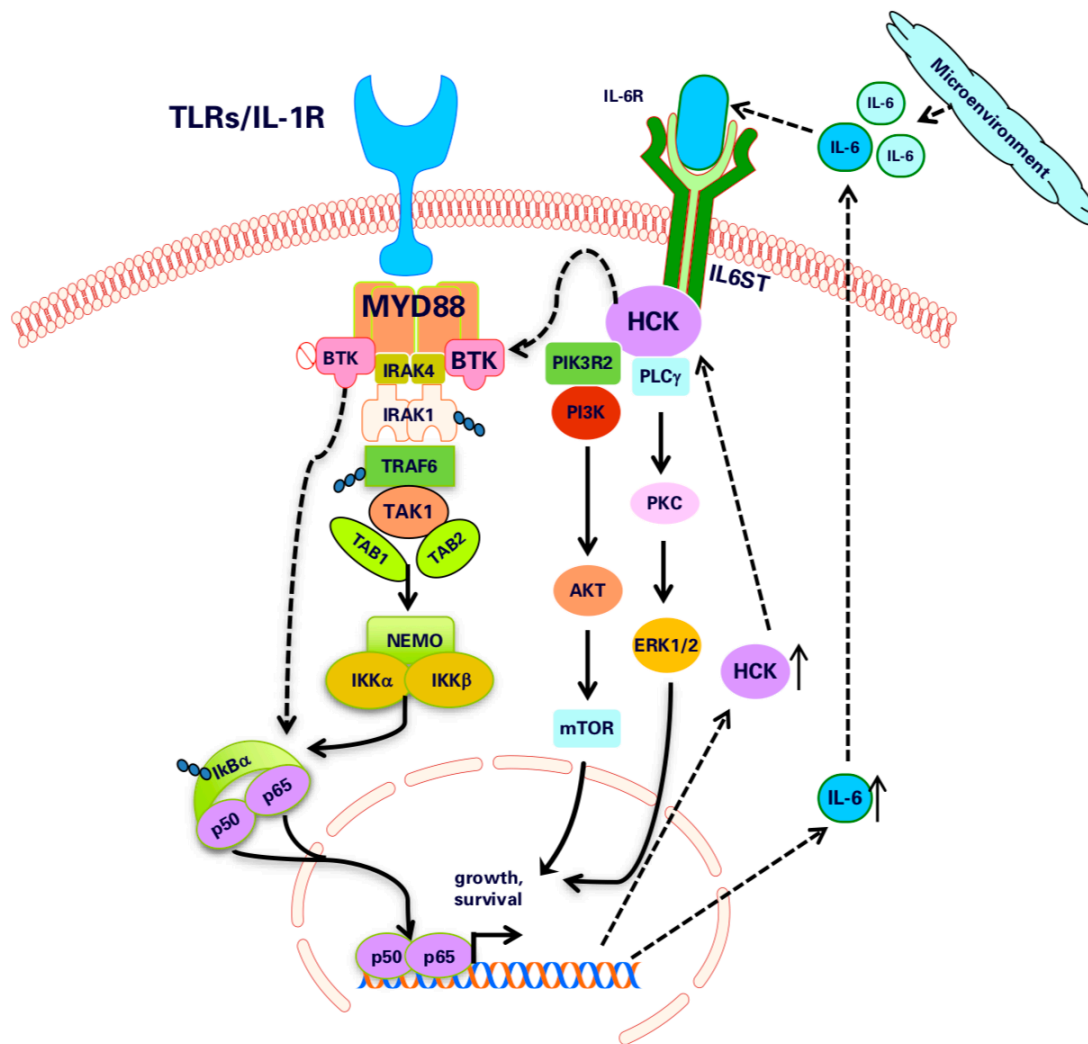
Η έκφραση του MYD88 έχει επίσης περιγραφεί και σε ασθενείς με IgM μονοκλωνική γαμμαπάθεια απροσδιορίστου σημασίας (IgM MGUS). Έχει προταθεί λοιπόν ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη αποτελεί ένα πρώιμο γεγονός της αλληλουχίας IgM MGUS → ασυμπτωματική μακροσφαιριναιμία Waldenström → συμπτωματική νόσος [70-73]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι ασθενείς με ασυμπτωματική νόσο που είναι ομόζυγοι ως προς τη μη μεταλλαγμένη «αγρίου τύπου» μορφή του γονιδίου MYD88, εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο προόδου σε

συμπτωματική νόσο (λόγος κινδύνου 2.7) ανεξάρτητα από τους υπόλοιπους πιθανούς παράγοντες κινδύνου [11].

Η παρουσία της μετάλλαξης L265P στο γονίδιο MYD88 μπορεί να έχει επίσης προγνωστική σημασία. Ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη έχουν συνήθως μεγαλύτερο φορτίο νόσου αλλά και καλύτερη πρόγνωση. Σε μια μελέτη που συμπεριέλαβε 326 ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström το εκτιμώμενο ποσοστό ολικής επιβίωσης στα 10 έτη ήταν 90% και 73% για αυτούς που έφεραν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο και το «αγρίου τύπου» αλληλόμορφο, αντίστοιχα [74, 75]. Ωστόσο, μια άλλη μελέτη που συμπεριέλαβε κλινικά δεδομένα 219 ασθενών δεν ανέδειξε διαφορές ως προς το φορτίο της νόσου ή την επιβίωση ανάλογα με την παρουσία ή όχι της μετάλλαξης L265P στο γονίδιο MYD88 [76]. Οι διαφορές μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στα κριτήρια επιλογής των ασθενών στις δύο μελέτες, ωστόσο ο προγνωστικό ρόλος της MYD88^{L265P} αναμένεται να διευκρινιστεί σε μελλοντικές μελέτες που θα συμπεριλαμβάνουν μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία με στοχευμένους παράγοντες. Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη σε 1147 ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström ανέδειξε ότι η ομοζυγωτία ως προς το «αγρίου τύπου» (wild type) αλληλόμορφο MYD88^{WT} αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για αυξημένο κίνδυνο μετατροπής σε υψηλής κακοήθειας λέμφωμα (16% 5ετής κίνδυνος) καθώς και για συντομότερο χρονικό διάστημα έως τη μετατροπή σε σχέση με τους ασθενείς που έφεραν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο MYD88^{L265P} (2.8% 5ετής κίνδυνος) [77].

Μια άλλη σημαντική παράμετρος είναι ο προβλεπτικός ρόλος των μεταλλάξεων του MYD88 ως προς την ανταπόκριση στη θεραπευτική αγωγή. Η ιμπρουτινίμη αποτελεί έναν αναστολέα της τυροσινικής κινάσης του Bruton (BTK) που συμμετέχει στη MYD88-επαγόμενη ενδοκυττάρια μεταβίβαση σήματος (Εικόνα 4). Πιο

συγκεκριμένα, μειώνει την ισχύ της αλληλεπίδρασης μεταξύ της BTK και της MYD88. Έχει λάβει έγκριση τόσο ως μονοθεραπεία όσο και σε συνδυασμό με ριτουξιμάμπη για ασθενείς με συμπτωματική μακροσφαιριναιμία Waldenström ανεξάρτητα από την παρουσία της μετάλλαξης MYD88^{L265P} [65, 78, 79]. Αρχικές μελέτες ανέφεραν ότι ασθενείς που έφεραν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη και έλαβαν ιμπρουτινίμπη είχαν σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα ανταπόκρισης σε σύγκριση με αυτούς που δεν την έφεραν. Ωστόσο, μόνο 5 ασθενείς είχαν χαρακτηριστεί ως MYD88 «αγρίου τύπου» [22, 54]. Ομοίως, στο σκέλος μονοθεραπείας με ιμπρουτινίμπη της μελέτης iNNOVATE μόνο ένας ασθενής δεν έφερε τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη και ως εκ τούτου δεν εξήχθησαν ασφαλή συμπεράσματα σχετικό με το προβλεπτικό ρόλο της μετάλλαξης [44]. Μεταξύ των ασθενών που έλαβαν το συνδυασμό ιμπρουτινίμπης με ριτουξιμάμπη στην τελική ανάλυση της μελέτης iNNOVATE οι ασθενείς που έφεραν τη μετάλλαξη L265P στο MYD88 (n=58) είχαν 97% συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης σε σύγκριση με το 81% μεταξύ αυτών που δεν έφεραν τη μετάλλαξη (n=11) [55]. Στην ομάδα που έλαβε εικονικό φάρμακο και ριτουξιμάμπη δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάλογα με την παρουσία ή όχι του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου. Επίσης δεν παρατηρήθηκε διαφορά ως προς το διάστημα ελεύθερο νόσου μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών [55]. Σειρές ασθενών που έχουν λάβει σχήματα με χημειοανοσοθεραπεία (BR, DRC) δεν έχουν αναδείξει διαφορές ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης MYD88^{L265P} [80, 81]. Σε κάθε περίπτωση, δεδομένα από μεγαλύτερες σειρές ασθενών είναι αναγκαία ώστε να προσδιοριστεί ο πιθανός προβλεπτικός ρόλος των μεταλλάξεων του MYD88.



Εικόνα 3. Η πρωτεΐνη MYD88 είναι μια σηματοδοτική πρωτεΐνη που προσδένεται στο ενδοκυττάριο τμήμα υποδοχέων τύπου Toll και υποδοχέων των ιντερλευκινών 1 και 18 και προκαλεί τον ομοδιμερισμό τους. Ακολούθως, η IRAK4 προσδένεται στο MYD88 και φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες IRAK1 και IRAK2. Σχηματίζεται έτσι το «μυντόσωμα» (“myddosome”) που προάγει τη μεταβίβαση του σήματος μέσω της ενεργοποίησης της BTK και του μονοπατιού του NF-κB και του μοριακού καταρράκτη των MAPK. Παράλληλα, επάγεται η ενεργοποίηση της τυροσινικής πρωτεϊνικής κινάσης HCK, που ανήκει στην οικογένεια των SRC κινασών. Η HCK, προάγει τα σηματοδοτικά μονοπάτια της BTK, της πρωτεϊνικής κινάσης B (AKT) και εξωκυτταρίως ρυθμιζόμενης κινάσης (ERK) 1/2, τα οποία διασφαλίζουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των λεμφοπλασματοκυττάρων της μακροσφαιριναιμίας Waldenström. Προσαρμοσμένο από [67].

β. CXCR4

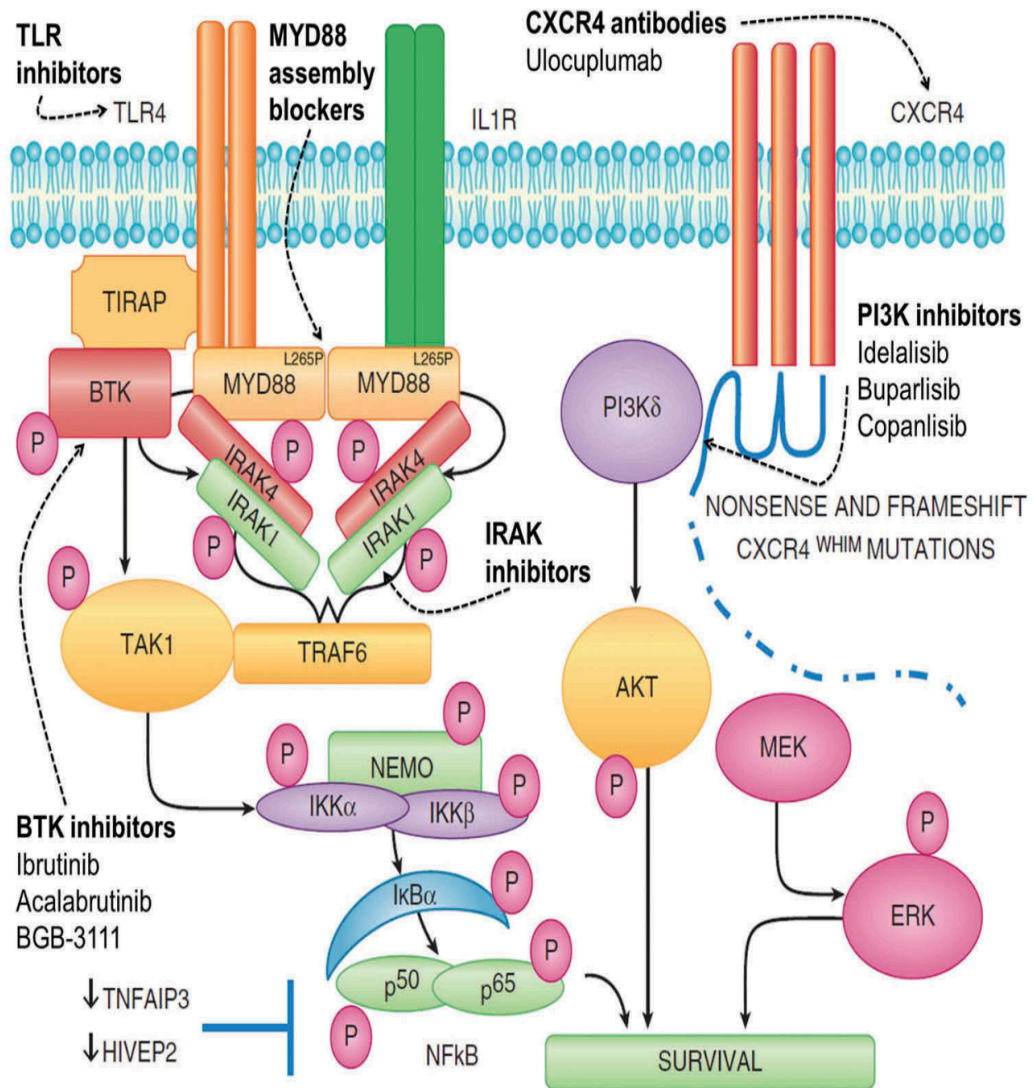
Στους ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström έχουν επίσης περιγραφεί μεταλλάξεις στο γονίδιο CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) που περιλαμβάνουν το καρβοξυ-τελικό άκρο (C άκρο) και επιτελεί ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση της πρωτεΐνης CXCR4. Οι μεταλλάξεις είναι ενεργοποιητικές, δηλαδή έχουν ως αποτέλεσμα τη συνεχή λειτουργία της πρωτεΐνης [82]. Η πρωτεΐνη CXCR4 είναι ένας υποδοχέας στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων χημοκινών με κύριο συνδέτη το CXCL12 (SDF-1) και προάγει την ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω του μοριακού μονοπατιού της 3-κινάσης της φωσφοινοσιτόλης (PI3K) που ευοδώνει την επιβίωση του λεμφοπλασματοκυττάρου (Εικόνα 4) [83]. Επιπλέον, η CXCR4 συμμετέχει στην αλληλεπίδραση των νεοπλασματικών κυττάρων με τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος στο μυελό των οστών [82]. Τουλάχιστον 40 διαφορετικές σωματικές μεταλλάξεις που προκαλούν αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης ή πρόιμη λήξη της μεταγραφής και επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργικότητα του C άκρου της πρωτεΐνης έχουν περιγραφεί σε έως και 30% των ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström [84]. Αντίστοιχες γενετικές μεταλλάξεις παρατηρούνται και σε ασθενείς που πάσχουν από έναν τύπο συγγενούς ανοσοανεπάρκειας, το σύνδρομο κονδυλωμάτων, υπογαμμασφαιριναιμίας, λοιμώξεων και μυελοκαταστολής (WHIM) [85]. Αξίζει να σημειωθεί ότι 98% των ασθενών με μεταλλάξεις στο CXCR4 φέρουν επίσης τη μετάλλαξη L265P στο γονίδιο MYD88, το οποίο υποδηλώνει μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ των δύο οδών ενδοκυττάριας σηματοδότησης. Η σηματοδότηση μέσω του CXCR4 μπορεί να ευοδωθεί και από αυξημένη έκφραση ρυθμιστικών μορίων, και επίσης σχετίζεται με σύμπλοκες κυτταρογενετικές ανωμαλίες [86]. Η συχνότερη και ίσως πιο χαρακτηριστική μετάλλαξη του CXCR4 είναι η S338X, η οποία έχει συσχετιστεί με αυξημένη ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω των ενδοκυττάριας κινασών BTK, AKT και ERK [87].

Υπάρχουν ενδείξεις ότι ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στο CXCR4 εμφανίζουν σε μικρότερο ποσοστό λεμφαδενοπάθεια σε σύγκριση με τους υπόλοιπους [88]. Επίσης, οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό σύνθεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή IgM παραπρωτεΐνης και συνοδό υπεργλοιοίτητα [74, 87]. Δεν υπάρχουν στοιχεία που να συνηγορούν σε θετική ή αρνητική επίδραση των μεταλλάξεων του CXCR4 στην επιβίωση των ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström [74].

Η αξία των μεταλλάξεων στο γονίδιο CXCR4 ως προβλεπτικός παράγοντας ανταπόκρισης στη θεραπευτική αγωγή βρίσκεται υπό διερεύνηση. Προκλινικά στοιχεία δείχνουν ότι κυτταρικές σειρές που φέρουν μεταλλάξεις εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη θεραπευτική αγωγή με στοχευμένους παράγοντες. Τόσο οι Rocarro και συνεργάτες όσο οι Cao και συνεργάτες έδειξαν ότι τα νεοπλασματικά λεμφοπλασματοκύτταρα που φέρουν μεταλλάξεις στο CXCR4 παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην αγωγή με μπρουτινίμη [89, 90]. Παράλληλα, κλινικά στοιχεία υποστήριζαν τα ανωτέρω αποτελέσματα, καθώς ασθενείς με τη μετάλλαξη L265P στο γονίδιο MYD88 που έφεραν και μεταλλάξεις στο CXCR4 είχαν μικρότερα ποσοστά ανταπόκρισης στην μπρουτινίμη συγκριτικά με ασθενείς που δεν εμφάνισαν μεταλλάξεις στο CXCR4 [22, 54]. Ωστόσο, στη μελέτη φάσης 3 iNNOVATE δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην πιθανότητα ανταπόκρισης ανάλογα με την παρουσία ή όχι μεταλλάξεων στο CXCR4 μεταξύ των ασθενών που έφεραν τη MYD88^{L265P}. Αυτό ίσχυε και για τους ασθενείς που έλαβαν μπρουτινίμη με ριτουξιμάμη και για όσους έλαβαν ριτουξιμάμη με εικονικό φάρμακο [55]. Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της μελέτης των Treon και συνεργατών που χορήγησαν μπρουτινίμη σε 30 νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström [88]. Οι ασθενείς

που δεν έφεραν μεταλλάξεις στο CXCR4 εμφάνιζαν σε μεγαλύτερο ποσοστό λεμφαδενοπάθεια και είχαν τάση για χαμηλότερες τιμές IgM ανοσοσφαιρίνης. Το ποσοστό των πολύ καλών μερικών ανταποκρίσεων ήταν επίσης καλύτερο σε αυτή την ομάδα των ασθενών (31% έναντι 7%), παρόλο που δεν κρίθηκε στατιστικά σημαντικό. Σημαντική ήταν όμως η διαφορά των δύο ομάδων ασθενών ως προς το διάμεσο χρόνο μέχρι τη μέγιστη ανταπόκριση. Οι ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στο CXCR4 χρειάζονταν 7.3 μήνες έναντι 1.8 μηνών για όσους δεν έφεραν μεταλλάξεις ($p=0.01$). Επομένως, η ιμπρουτινίμη δε φαίνεται να είναι η καταλληλότερη επιλογή για ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο CXCR4 που είναι έντονα συμπτωματικοί και χρήζουν άμεσης θεραπευτικής παρέμβασης [88]. Οι μεταλλάξεις στο CXCR4 δε φαίνεται να έχουν προβλεπτικό ρόλο ανταπόκρισης στη θεραπεία με κλασική χημειοανοσοθεραπεία [81].

Συμπερασματικά, η ύπαρξη σωματικών μεταλλάξεων τόσο στο MYD88 όσο και στο CXCR4 έχει διαγνωστική και προγνωστική αξία όσον αφορά στην ανταπόκριση στη θεραπεία και στην επιβίωση των ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström, ενώ αποτελούν αντικείμενο ενεργής έρευνας ως προς την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών [22, 74].



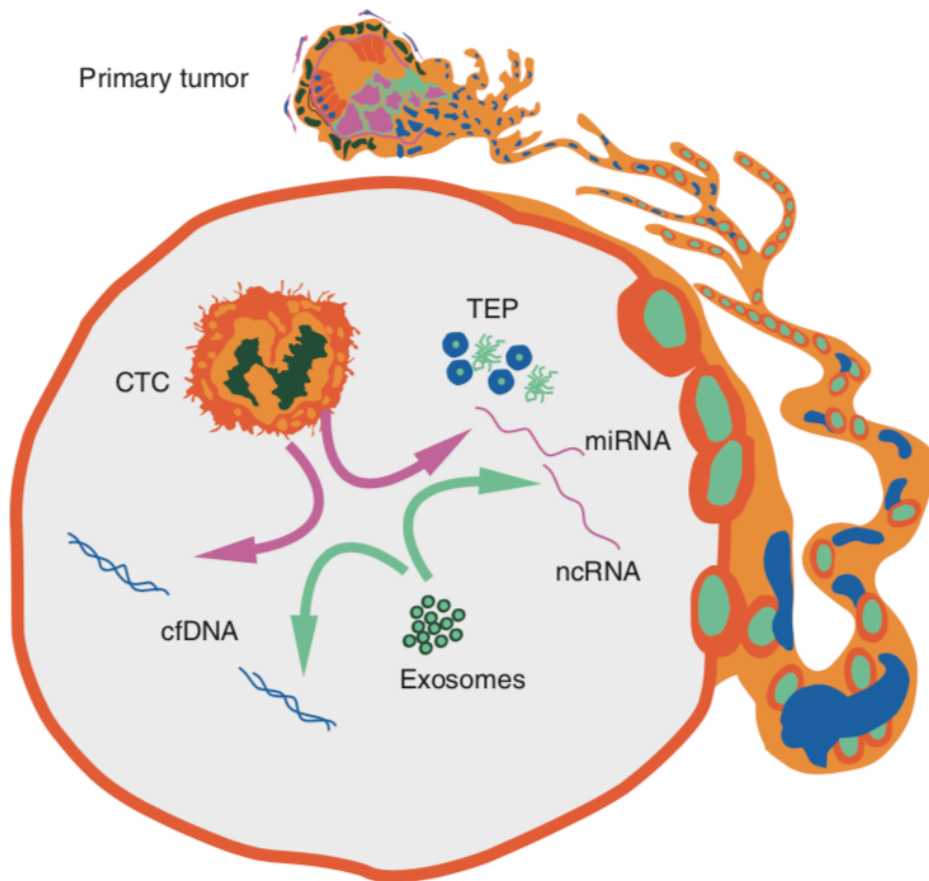
Εικόνα 4. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MYD88 και CXCR4 στη μακροσφαιριναιμία Waldenström, καθώς και στοχεύουσες θεραπείες (αναστολείς κινασών BTK, IRAK, PI3K, μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του CXCR4, αναστολείς υποδοχέων TLR, αναστολείς του «myddosome») υπό κλινική αξιολόγηση. Προς το παρόν μόνο η μπρουτινίμη έχει λάβει έγκριση από τις ρυθμιστικές αρχές. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν αναστολή του αντίστοιχου μονοπατιού. Προσαρμοσμένο από [83].

2. Υγρές βιοψίες - Cell-free DNA

Εισαγωγή

Η εξατομίκευση της θεραπείας με βάση το μοριακό προφίλ της κακοήθειας κάθε ασθενούς αποτελεί αναμφίβολα τη μεγαλύτερη πρόκληση για τη σύγχρονη Θεραπευτική στην Αιματολογία-Ογκολογία. Όσον αφορά στις συμπαγείς κακοήθειες, έχει δειχθεί ότι το γονιδιακό προφίλ του κυκλοφορούντος μη ενδοκυττάριου DNA (cell-free DNA ή cfDNA), που περιλαμβάνεται στο κυκλοφορούν DNA των καρκινικών κυττάρων, (circulating tumor DNA-ctDNA), έχει μεγάλο βαθμό συμφωνίας με τα αντίστοιχα αποτελέσματα προερχόμενα από βιοψίες καρκινικού ιστού [91]. Υπό αυτό το πλαίσιο, διερευνάται η πιθανότητα αντικατάστασης της βιοψίας ιστού, η οποία είναι αφενός επίπονη διαδικασία και αφετέρου ενέχει και το κίνδυνο δειγματοληπτικού σφάλματος, από την «υγρή βιοψία» (liquid biopsy) και την ανάλυση του ctDNA ή cfDNA για τον καθορισμό της θεραπευτικής στρατηγικής [91].

Ο όρος «υγρή βιοψία» εισήχθη σχεδόν μια δεκαετία πριν από τους Pantel και Alix-Panabieres για να περιγράψουν την εφαρμογή μιας εξέτασης αίματος που παρέχει την ίδια διαγνωστική πληροφορία με μια βιοψία ιστού [92]. Υπό τον όρο «υγρή βιοψία» μπορεί να συμπεριληφθεί η μέτρηση διαλυτών παραγόντων όπως πρωτεΐνες, καρκινικοί δείκτες, κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα και κυκλοφορούντα εξωκυττάρια νουκλεϊκά οξέα (Εικόνα 5) [93]. Στον πίνακα 12 παρουσιάζεται η βασική ορολογία σχετικά με τις υποκατηγορίες και τα χαρακτηριστικά των υγρών βιοψιών.



Εικόνα 5. Η υγρή βιοψία μπορεί να παρέχει πληθώρα πληροφοριών σχετικά με τα χαρακτηριστικά της κακοκήθειας, το μεταστατικό δυναμικό και την πιθανότητα υποτροπής. Τα κυριότερα παραδείγματα μορίων είναι τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), το γενετικό και πρωτεϊνικό τους προφίλ, τα επίπεδα του κυκλοφορούντος DNA/RNA προερχόμενο από τον όγκο, τα εξωσώματα και η παρουσία ή η απουσία μεταλλάξεων και επιγενετικών υπογραφών. Τα στοιχεία αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εξατομίκευση της θεραπείας σε κάθε ασθενή. Τροποποιημένο από [93].

Πίνακας 12. Ορολογία και περιγραφή βασικών εννοιών σχετικά με τις υγρές βιοψίες. Τροποποιημένο από [94].

Όρος	Ορισμός
Εξωκυττάριο DNA (cell-free DNA)	Συνολική ποσότητα του εξωκυττάριου DNA στο πλάσμα ή στον ορό, που μπορεί να προέρχεται από διάφορες πηγές συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων.
Κυκλοφορούν καρκινικό DNA (circulating tumor DNA - ctDNA)	Το κλάσμα του εξωκυττάριου DNA που προέρχεται από τα καρκινικά κύτταρα. Η παρουσία κυκλοφορούντος καρκινικού DNA γενικά πιστοποιείται με την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων – συνεπώς η παρουσία του επιβεβαιώνεται μόνο με την πραγματοποίηση ctDNA ανάλυσης.
Ανάλυση κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA assay) ή Ανάλυση κυκλοφορούντος καρκινικού DNA πλάσματος (circulating cell free plasma DNA assay) ή Γενοτυπική ανάλυση πλάσματος (plasma genotyping assay)	Κλινική δοκιμασία σχεδιασμένη να εντοπίσει σωματικές μεταλλάξεις στο ctDNA. Συμπεριλαμβάνει στοχευμένες αναλύσεις που μπορεί να ελέγχουν μία παραλλαγή ενός γονιδίου ή πολλαπλές παραλλαγές σε πολλά γονίδια με ευρέως φάσματος αναλύσεις.
Υγρή βιοψία (liquid biopsy)	Ευρεία κατηγορία που συμπεριλαμβάνει ελάχιστα επεμβατικές τεχνικές χρησιμοποιώντας δείγμα περιφερικού αίματος για την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων ή θραυσμάτων DNA που προέρχονται από τον όγκο και κυκλοφορούν στο αίμα. Γενετικές και γενωμικές

	αναλύσεις αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα.
Κλάσμα παραλλαγμένων αλληλομόρφων (variant allele fraction)	Το κλάσμα των αλληλομόρφων σε ένα δείγμα που περιλαμβάνει την παραλλαγή ή τη μετάλλαξη. Για παράδειγμα, ένας αμιγής πληθυσμός καρκινικών κυττάρων στον οποίο εντοπίζεται ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο και το άλλο είναι «άγριου τύπου» (όχι μεταλλαγμένο ή παραλλαγμένο) έχει 50% κλάσμα παραλλαγμένων αλληλομόρφων.
Προ-ανάλυση (pre-analytical)	Συμπεριλαμβάνει τη συλλογή, διαχείριση, μεταφορά, επεξεργασία και αποθήκευση ενός δείγματος που μπορεί να επηρεάσει τις ακόλουθες αναλύσεις.
Αναλυτική εγκυρότητα (analytical validity)	Ικανότητα μιας ανάλυσης να εντοπίσει και να μετρήσει την παρουσία του βιοδείκτη ενδιαφέροντος, με στατιστική σημαντικότητα, ακρίβεια, αναπαραγωγιμότητα και αξιοπιστία.
Κλινική εγκυρότητα (clinical validity)	Ικανότητα μιας ανάλυσης να διαχωρίσει με στατιστική σημαντικότητα έναν πληθυσμό σε μια ή περισσότερες ομάδες με βάση τα αποτελέσματα όπως η παρουσία καρκίνου ή η ανταπόκριση στη θεραπεία.
Κλινική αξία (clinical utility)	Ικανότητα μιας ανάλυσης να καταδείξει με στατιστική σημαντικότητα βελτίωση στη διάγνωση, στη θεραπεία, στην αντιμετώπιση ή στην πρόληψη του καρκίνου στην ομάδα που εφαρμόζεται η ανάλυση συγκριτικά με την ομάδα που δεν την εφαρμόζει.

Συγκριτικά με μια κλασική βιοψία, οι υγρές βιοψίες πραγματοποιούνται πιο εύκολα και ελαχιστοποιούν τους κινδύνους για τον ασθενή (Πίνακας 13). Επιπλέον, η συλλογή είναι λιγότερο δαπανηρή και συνεπώς είναι πιο εύκολο να πραγματοποιηθούν σε διαδοχικές χρονικές στιγμές. Θεωρητικά, η υγρή βιοψία μπορεί να παρέχει πιο πλήρεις πληροφορίες σχετικά με το συνολικό φορτίο της καρκινικής νόσου επειδή το δείγμα θεωρητικά αντιπροσωπεύει το σύνολο του καρκινικού DNA στη συστηματική κυκλοφορία, σε αντίθεση με το χωρικό περιορισμό της βιοψίας μιας μονήρους βλάβης σε μια συγκεκριμένη ανατομική θέση [94].

Βέβαια, για να συγκρίνουμε αντικειμενικά και να προσδιορίσουμε το ρόλο της υγρής βιοψίας έναντι της κλασικής βιοψίας ιστού στη διάγνωση και τη θεραπεία των νεοπλασματικών νοσημάτων θα πρέπει να λάβουμε υπόψη τρεις βασικούς άξονες σύμφωνα με την Πρωτοβουλία του Κέντρου Ελέγχου Νόσων για την Αξιολόγηση των Γενωμικών Εφαρμογών στην Κλινική Πρακτική και Πρόληψη καθώς και του Ινστιτούτου Ιατρικής των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής: την αναλυτική εγκυρότητα, την κλινική εγκυρότητα και την κλινική αξία [95, 96]. Η αναλυτική εγκυρότητα αναφέρεται στην ικανότητα ενός διαγνωστικού τεστ να εντοπίζει τις παραμέτρους υπό εξέταση και περιλαμβάνει μέτρα ακρίβειας, ευαισθησίας, ειδικότητας και ανθεκτικότητας των αποτελεσμάτων. Η κλινική εγκυρότητα έγκειται στο ότι η διαγνωστική δοκιμασία μπορεί να εντοπίζει με ακρίβεια την παρουσία ή την απουσία μιας παθολογικής κατάστασης ή να προβλέψει τα αποτελέσματα για ομάδες ασθενών με διαφορετικά αποτελέσματα. Η κλινική αξία πιστώνεται όταν υπάρχει υψηλό επίπεδο αποδείξεων που να δηλώνουν ότι η εφαρμογή της διαγνωστικής δοκιμασίας βελτιώνει τα αποτελέσματα των ασθενών συγκριτικά με τη μη εφαρμογή αυτής. Για να καθοριστεί η κλινική εγκυρότητα ή αξία, είναι απαραίτητο να οριστεί η προσδοκώμενη κλινική εφαρμογή του βιοδείκτη υπό μελέτη. Σε αυτό

συμπεριλαμβάνονται η διαστρωμάτωση κινδύνου για τη νόσο, ο έλεγχος του γενικού πληθυσμού για τη νόσο, η διαφορική διάγνωση μιας κακοήθειας, η πρόγνωση χωρίς περαιτέρω θεραπευτική παρέμβαση, η πρόβλεψη αποτελεσματικότητας μιας συγκεκριμένης θεραπείας και η παρακολούθηση της ενεργότητας της νόσου σε όλα της τα στάδια, από τα αρχικά έως και τα πιο προχωρημένα ή/και μεταστατικά, είτε για την ανίχνευση επικείμενης υποτροπής σε ασυμπτωματικό ασθενή χωρίς άλλα ενδείξεις υποτροπής είτε για τη διαπίστωση προόδου νόσου σε ασθενείς με γνωστή κακοήθεια υπό θεραπεία.

Πίνακας 13. Βασικές διαφορές μεταξύ ανάλυσης κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA) και βιοψίας ιστού. Τροποποιημένο από [94].

Κατηγορία	ctDNA ανάλυση	Ανάλυση βιοψίας ιστού
Διαδικασία	Εύκολη δειγματοληψία Κίνδυνοι φλεβοκέντησης Εύκολη η διαδοχική δειγματοληψία	Επεμβατική, πιο περίπλοκη δειγματοληψία Κίνδυνοι βιοψίας Δύσκολη η διαδοχική δειγματοληψία
Βιολογία	Αδυναμία άμεσου συσχετισμού αποτελεσμάτων με τον ιστολογικό ή κυτταρικό φαινότυπο Πιο πιθανή η αντιπροσώπευση ολόκληρου του καρκινικού φορτίου αλλά ο	Δυνατότητα άμεσου συσχετισμού με τον ιστολογικό ή κυτταρικό φαινότυπο Αντιπροσώπευση μιας συγκεκριμένης περιοχής του όγκου

	<p>διαφοροποιημένος κύκλος ζωής των καρκινικών κυττάρων μπορεί να εισάγει σφάλμα (bias) αντιπροσώπευσης</p>	
<p>Προ-ανάλυση</p>	<p>Εύκολη τυποποίηση της διαδικασίας</p> <p>Απαιτεί ειδική επεξεργασία και χειρισμό εκτός εάν χρησιμοποιηθούν σωλήνες σταθεροποίησης των κυττάρων</p> <p>Περιορισμένα δεδομένα σχετικά με συγχυτικούς παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή</p>	<p>Δύσκολη τυποποίηση της διαδικασίας</p> <p>Χρησιμοποιεί υπάρχουσες, επικυρωμένες τεχνικές επεξεργασίας και χειρισμού του ιστού</p>
<p>Κλινική αξία</p>	<p>Περιορισμένες αποδείξεις για επιλογή θεραπευτικής αγωγής σε προχωρημένες κακοήθειες</p> <p>Απουσία αποδείξεων για άλλες πιθανές ενδείξεις</p>	<p>Σημαντικό ποσό αποδείξεων για την επιλογή θεραπείας σε πολλαπλές κακοήθειες τόσο σε πρώιμο όσο και σε προχωρημένο στάδιο</p>

Βασικές αρχές

Με βάση και με τα ανωτέρω, οι βασικές αρχές για την αξιολόγηση του ctDNA σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Κλινικής Ογκολογίας και του Αμερικανικού Κολλεγίου Παθολογοανατόμων συνοψίζονται ως εξής [94]:

α. Προ-αναλυτικές μεταβλητές

- Σύμφωνα με τις αποδείξεις, το πλάσμα είναι ο βέλτιστος τύπος δείγματος για την ανάλυση ctDNA.
- Σύμφωνα με τις αποδείξεις, προτείνεται η χρήση σωληναρίων είτε με σταθεροποιητικό παράγοντα κυττάρων είτε με EDTA αντιπηκτικό. Ωστόσο τα EDTA σωληνάρια πρέπει να επεξεργαστούν όσο το δυνατόν γρηγορότερα εντός 6 ωρών από τη συλλογή. Τα σωληνάρια σταθεροποίησης λευκοκυττάρων επιτρέπουν έως 48 ώρες περιθώριο από τη συλλογή στην επεξεργασία ενώ τα Streck tubes ακόμα περισσότερο.
- Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να διαπιστωθούν άλλες προ-αναλυτικές μεταβλητές που μπορεί να επηρεάσουν την ανάλυση ctDNA συμπεριλαμβανομένων της δειγματοληψίας, του χειρισμού των δειγμάτων, της αποθήκευσης, του χρονικού ορίου και βιολογικών παραμέτρων που σχετίζονται με τον ασθενή.

β. Αναλυτική εγκυρότητα

- Η αναλυτική εγκυρότητα οφείλει να είναι εδραιωμένη για κάθε διαδικασία ανάλυσης ctDNA, ενώ ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στην ανίχνευση παραλλαγών πλησίον του κατώτερου ορίου ανίχνευσης. Ιδανικά η πιστοποίηση περιλαμβάνει αξιολόγηση των τυποποιημένων δειγμάτων που επιτρέπει τις διασταυρούμενες συγκρίσεις εντός της ανάλυσης.

- Σύμφωνα με τις αποδείξεις, βέλτιστα κατώτερα όρια ανίχνευσης για ποικίλους τύπους σωματικών παραλλαγών δεν έχουν καθιερωθεί. Αυτά μπορεί να ποικίλλουν με βάση την προσδοκώμενη χρήση της ανάλυσης ctDNA, ωστόσο είναι χαμηλότερα από τη γενοτυπική ανάλυση του όγκου.
- Διαφορετικές αναλύσεις ctDNA μπορεί να μην έχουν τα ίδια αποτελέσματα λόγω διαφορετικών χαρακτηριστικών απόδοσης, όπως διαφορετικό κατώτερο όριο ανίχνευσης.
- Μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να επικεντρωθούν σε διασταυρούμενες συγκρίσεις εντός της ανάλυσης, ανθεκτικότητα των αποτελεσμάτων της ανάλυσης και τη δημιουργία μηχανισμών ελέγχου της επάρκειας της ανάλυσης.

γ. Ερμηνεία και αναφορά αποτελεσμάτων

- Σύμφωνα με τις αποδείξεις, έχει ιδιαίτερη σημασία η ενσωμάτωση κλινικών πληροφοριών και δεδομένων από την ανάλυση του όγκου με σκοπό την αναγνώριση καίριων σωματικών παραλλαγών στην ανάλυση ctDNA ώστε να επιλεγθεί η κατάλληλη θεραπευτική αγωγή.
- Το ποσοστό του ctDNA εκφραζόμενο ως κλάσμα του συνολικού cell-free DNA πλάσματος ποικίλλει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών ασθενών και οι πιθανές προγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές του κλάσματος των παραλλαγών των αλληλομόρφων στην ανάλυση ctDNA απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.
- Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά την ερμηνεία των παραλλαγών που εντοπίζονται στο ctDNA και αφορούν γονίδια που είναι μεταλλαγμένα κατά την κλωνική αιμοποίηση απροσδιορίστου δυναμικού. Επιπλέον έρευνα απαιτείται για να καθοριστεί ο τρόπος ερμηνείας και αναφοράς των γονιδιακών παραλλαγών.

- Η αναφορά των αποτελεσμάτων των αναλύσεων ctDNA στα οποία η σωματική παραλλαγή αναγνωρίζεται ή όχι θα πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποδίδει την πιθανότητα μη συμφωνίας με την ανάλυση της βιοψίας ιστού.

δ. Κλινική εγκυρότητα και αξία

- Εκτός από τις μεθόδους ctDNA αναλύσεων που έχουν λάβει ρυθμιστική έγκριση, οι περισσότερες μέθοδοι διαθέτουν ανεπαρκείς αποδείξεις κλινικής εγκυρότητας και αξίας. Ορθά σχεδιασμένες κλινικές μελέτες ή ισοδύναμα αυτών είναι απαραίτητες για να αναδείξουν την κλινική αξία των περισσότερων μεθόδων.

- Σύμφωνα με τις αποδείξεις, υπάρχει ασυμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων των αναλύσεων ctDNA και της βιοψτικής γονοτυπικής μελέτης και υποστηρίζει την αξία της βιοψίας για την επιβεβαίωση μη ανιχνεύσιμων ευρημάτων με μεθόδους ctDNA.

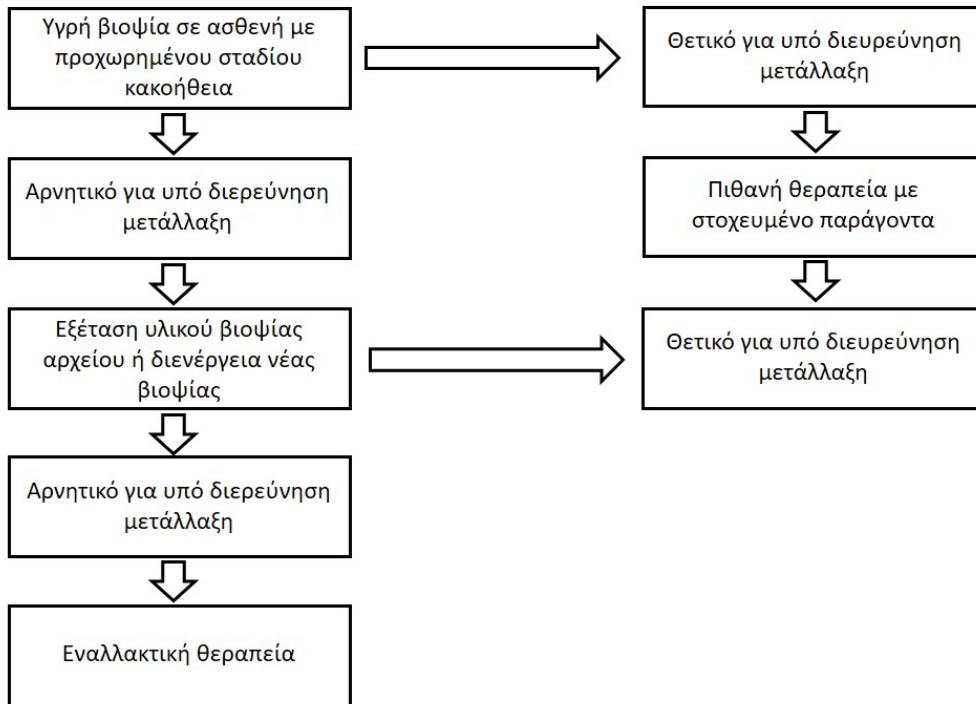
- Για κακοήθειες προχωρημένου σταδίου, οι αποδείξεις δείχνουν ότι τα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα προκύπτουν όταν η ανάλυση ctDNA πραγματοποιείται τη στιγμή της προόδου νόσου και όχι της ανταπόκρισης κατά την προηγούμενη θεραπεία.

- Υπάρχουν αποδείξεις ότι τα θετικά ευρήματα από καλά επικυρωμένες αναλύσεις ctDNA μπορούν να υποστηρίξουν την έναρξη στοχευμένης θεραπείας όταν η διαγνωστική μέθοδος για τον γενωμικό δείκτη υπό μελέτη έχει δείξει κλινική αξία σε βιοψίες.

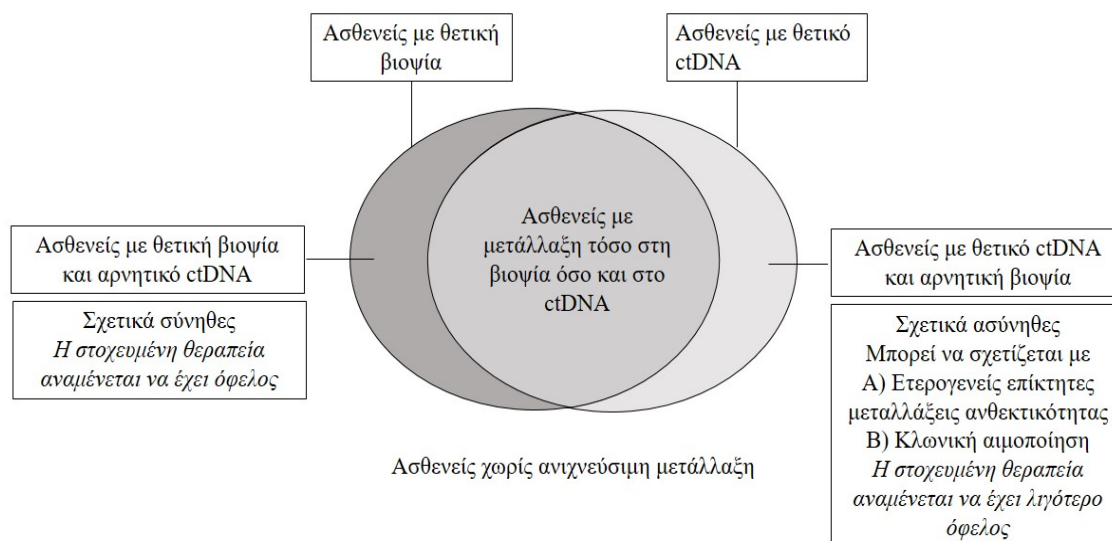
- Σχετικά με την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, αποδείξεις κλινικής εγκυρότητας βρίσκονται υπό έρευνα και προς το παρόν δεν υπάρχει καμία απόδειξη που να προτείνει ότι οι αναλύσεις ctDNA είναι χρήσιμες σε αυτό το πλαίσιο, εκτός κλινικών μελετών.

- Για κακοήθειες σε πρώιμο στάδιο, αποδείξεις κλινικής εγκυρότητας βρίσκονται υπό έρευνα και προς το παρόν δεν υπάρχει καμία απόδειξη κλινικής αξίας που να προτείνει ότι οι αναλύσεις ctDNA είναι χρήσιμες στη διάγνωση ή επικουρικά μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, εκτός κλινικών μελετών.
- Για τον προσυμπτωματικό έλεγχο του καρκίνου, δεν υπάρχουν αποδείξεις κλινικής εγκυρότητας και αξίας που να υποστηρίζουν ότι οι αναλύσεις ctDNA είναι χρήσιμες σε αυτό το πλαίσιο, εκτός κλινικών μελετών.

Συνοψίζοντας, οι σύγχρονες μέθοδοι υγρής βιοψίας έχει φανεί ότι δεν έχουν τη βέλτιστη ευαισθησία και επίσης δε μπορεί να παραβλεφθεί το ποσοστό ασυμφωνίας με τα αποτελέσματα του γονιδιακού ελέγχου σε βιοψία ιστού. Επομένως, σε ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα υγρής βιοψίας για την ύπαρξη μιας συγκεκριμένης μετάλλαξης ή γονιδιακής παραλλαγής η υγρή βιοψία μεμονωμένα μπορεί να καθοδηγήσει τη θεραπευτική προσέγγιση με στοχευμένους παράγοντες. Αντίθετα, επί αρνητικού αποτελέσματος είναι απαραίτητος ο έλεγχος αρχειακών δειγμάτων ιστικής βιοψίας ή / και η εκ νέου διενέργεια βιοψίας ιστού (Εικόνα 6). Κι αυτό γιατί η αρνητική υγρή βιοψία δε μπορεί να αποκλείσει την ύπαρξη της μετάλλαξης στον αντίστοιχο ιστό (Εικόνα 7).



Εικόνα 6. Η θέση της υγρής βιοψίας στο διαγνωστικό αλγόριθμο με βάση τις υπάρχουσες αποδείξεις. Τροποποιημένο από [94].



Εικόνα 7. Αλληλεπικάλυψη των αποτελεσμάτων του γονιδιακού ελέγχου σε βιοψία ιστού και υγρή βιοψία κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA) σε ασθενείς με προχωρημένου σταδίου κακοήθεια. Το ορθογώνιο παραλληλόγραμμα περικλείει το χώρο που αντιπροσωπεύει τους ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε γονιδιακή ανάλυση βιοπτικού υλικού και υγρής βιοψίας ctDNA – πολλοί από αυτούς θα έχουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα και με τις δύο προσεγγίσεις. Στους περισσότερους από τους ασθενείς στους οποίους έχει ανιχνευθεί μετάλλαξη στον ιστό ή στο ctDNA αναμένεται να έχουν σύμφωνα αποτελέσματα και με τις δύο μεθόδους. Η ασυμφωνία των αποτελεσμάτων οφείλεται συνήθως στη χαμηλή ευαισθησία των ctDNA μεθόδων. Παράγοντες που μπορεί να ευθύνονται είναι η χρονική ετερογένεια (αρχειοθετημένο δείγμα), η χωρική ετερογένεια (υπο-κλωνική μετάλλαξη), η κλωνική αιμοποίηση αδιευκρίνιστου δυναμικού και λάθη της ίδιας της δοκιμασίας (ψευδώς αρνητικά ή ψευδώς θετικά αποτελέσματα). Οι ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα στον ιστό και αρνητικό στην υγρή βιοψία αναμένεται να ανταποκριθούν στην αντίστοιχη στοχευμένη θεραπεία. Τροποποιημένο από [94].

Εφαρμογές του cell-free DNA

Μια ελάχιστα επεμβατική cfDNA εξέταση αίματος που ανιχνεύει πολλαπλές κακοήθειες σε πρώιμα στάδια είναι ιδιαίτερα επιθυμητή καθώς η ίαση είναι πιο πιθανό να επιτευχθεί σε αυτή τη φάση της νόσου. Η μελέτη «Γενωμικός Άτλας του κυκλοφορούντος εξωκυττάριου καρκινικού DNA» CCGA (Circulating Cell-free Genome Atlas) με αριθμό καταγραφής NCT02889978 στη βάση κλινικών μελετών Clinicaltrials.gov είναι μια προοπτική, πολυκεντρική μελέτη παρατήρησης που αποσκοπεί στη δημιουργία μιας μεθόδου ανίχνευσης πολλαπλών κακοηθειών βασισμένη στο cfDNA. Τα προκαταρκτικά της αποτελέσματα παρουσιάστηκαν στο ετήσιο συνέδριο της Αμερικανικής Εταιρείας Κλινικής Ογκολογίας ASCO 2018 [97]. Σε μια προσχεδιασμένη υπομελέτη, 1627 δείγματα συλλέχθηκαν προοπτικά από 749 υγιείς, χωρίς διάγνωση κακοήθειας, και 878 ασθενείς με νεοδιαγνωσθείσα κακοήθη νόσο (20 διαφορετικοί υπότυποι συμπεριλαμβανομένων όλων των σταδίων) χωρίς να έχουν προηγουμένως λάβει θεραπεία. Πραγματοποιήθηκαν τρεις μέθοδοι αλληλούχισης του DNA: α) στοχευμένη αλληλούχιση 507 γονιδίων για πολυμορφισμούς μονήρων νουκλεοτιδίων σε περιφερικό cfDNA και λευκά αιμοσφαίρια κατά ζεύγη (WBC, βάθος αλληλούχισης 60,000X), β) ολική αλληλούχιση του γονιδιώματος για μεταβολές στον αριθμό των αντιγράφων γονιδίων σε περιφερικό cfDNA και λευκά αιμοσφαίρια κατά ζεύγη (WGS, βάθος αλληλούχισης 30X), και γ) ολική δισουλφιδική αλληλούχιση γονιδιώματος σε περιφερικό cfDNA ως δείκτη της κατάστασης μεθυλίωσης των γονιδίων (WGBS, βάθος αλληλούχισης 30X). Με κάθε μέθοδο ξεχωριστά αναπτύχθηκε ένα μοντέλο ανίχνευσης ασθενών με οποιαδήποτε κακοήθεια. Οι ασθενείς με κακοήθεια και οι υγιείς είχαν ίδια ηλικία, φύλο, συνήθειες καπνίσματος. Η μέθοδος WGBS είχε την υψηλότερη ευαισθησία, ενώ τα αποτελέσματα συμβάδιζαν με όλες τις μεθόδους.

Μεταξύ των ανιχνευθέντων κακοηθειών (ευαισθησία [95% CI]) (στάδια I-III) συμπεριλαμβάνονταν 28 κολορθικοί καρκίνοι (66% [48-84]), 19 οισοφάγου (63% [38-84]), 5 κεφαλής-τραχήλου (56% [21-86]), 5 χολαγγειοηπατικοί (80% [28-99]), 73 πνεύμονα (59% [47-70]), 17 λεμφώματα (77% [50-93]), 11 ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα (73% [39-94]), 10 ωοθήκης (90% [56-99]), 10 παγκρετατικοί (80% [44-98]), τριπλά αρνητικός καρκίνος μαστού (58% [43-72]), HER2 θετικός καρκίνος μαστού (40% [28-54]), θετικός για ορμονικούς υποδοχείς και HER2 αρνητικός καρκίνος μαστού (15% [10-20]) [97]. Κακοήθειες με κάτω του 10% ευαισθησία ήταν ο καρκίνος προστάτη χαμηλού Gleason σκορ και καρκίνος θυρεοειδούς, μήτρας, νεφρού και μελάνωμα. Συμπερασματικά, σύμφωνα με τα ανωτέρω είναι δυνατός ο προσδιορισμός πολλαπλών κακοηθειών με υψηλή ευαισθησία, συμπεριλαμβανομένων και θανατηφόρων όπου η διάγνωση σε πρωιμότερο στάδιο μπορεί να έχει επίπτωση στη θνησιμότητα.

Παράλληλα, η κλινική αξία του cfDNA αξιολογείται σε ένα πλήθος ογκολογικών νόσων τόσο ως προγνωστικός και προβλεπτικός παράγοντας όσο και ως μέθοδος παρακολούθησης της ανταπόκρισης στη θεραπεία και της πρώιμης ανίχνευσης υποτροπών [98-104]. Σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα ή του παχέος εντέρου η αξιολόγηση των δυναμικών αλλαγών στο γονιδιακό προφίλ του cfDNA επιτρέπει την εξατομίκευση της θεραπευτικής προσέγγισης σε όλα τα στάδια της νόσου και ενδεχομένως αυξάνει τις θεραπευτικές επιλογές των ασθενών [105-107]. Επιπλέον, η ανάλυση του cfDNA έχει ακόμα μεγαλύτερη αξία σε πρωτοπαθή ή μεταστατικά νεοπλάσματα του κεντρικού νευρικού συστήματος όπου η διενέργεια ιστοικής βιοψίας είναι ιδιαίτερα δυσχερής και προτιμάται η λήψη εγκεφαλονωτιαίου υγρού [108].

Όσον αφορά στις αιματολογικές κακοήθειες, τα τελευταία χρόνια αξιολογούνται όλο και περισσότερο οι δυνατότητες που προσφέρει η ανάλυση του cfDNA. Στο πολλαπλό μυέλωμα, μια σημαντική προσέγγιση είναι η ανίχνευση των κλωνικών V(D)J αναδιατάξεων σε διάφορες φάσεις στην πορεία της νόσου και η δυνατότητα παρακολούθησης της ανταπόκρισης, της ελάχιστα υπολειπόμενης νόσου και της έγκαιρης διάγνωσης της βιοχημικής υποτροπής [109-112]. Επιπλέον το cfDNA παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με το μοριακό προφίλ της νόσου και μπορεί να αντικατοπτρίζει τόσο τη γενετική όσο και τη χωρική ετερογένεια, αντιπροσωπεύοντας και τις εξωμυελικές εστίες [112-115]. Επιπρόσθετα, η ποσότητα του cfDNA μπορεί να έχει προγνωστική αξία στους ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα [111, 116]. Έτσι, αναδείχθηκαν οι προοπτικές της συγκεκριμένης τεχνικής στο πολλαπλούν μυέλωμα, και κατ'έκταση στις υπόλοιπες πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες, όπως η μακροσφαιριναιμία Waldenström.

3. Σκοποί

Κύριος στόχος της παρούσας ερευνητικής μελέτης είναι ο προσδιορισμός των μεταλλάξεων στα γονίδια MYD88 και CXCR4 σε ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström τόσο σε δείγματα από αναρρόφηση μυελού των οστών όσο και σε δείγματα περιφερικού αίματος με την τεχνική του cfDNA και ο προσδιορισμός του ποσοστού συμφωνίας των δύο μεθόδων. Διερευνήθηκε επίσης η πιθανή συσχέτιση μεταξύ της πιθανότητας ανίχνευσης των μεταλλάξεων με χαρακτηριστικά των ασθενών και της νόσου.

V. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Συμμετέχοντες και κριτήρια ένταξης

Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν:

A) Ασθενείς που ήταν διαγνωσμένοι με IgM μονοκλωνική γαμμαπάθεια συμπεριλαμβανομένων των:

α) IgM μονοκλωνικής γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS),

β) Ασυμπτωματικής (smoldering) μακροσφαιριναιμίας Waldenström,

γ) Νεοδιαγνωσθείσας συμπτωματικής μακροσφαιριναιμίας Waldenström,

δ) Προθεραπευθείσας Μακροσφαιριναιμίας Waldenström σε ύφεση, και

ε) Υποτροπιάζουσας μακροσφαιριναιμίας Waldenström, καθώς και

B) Άτομα που δεν έπασχαν από IgM μονοκλωνική γαμμαπάθεια (ομάδα ελέγχου, controls).

Κατά την ένταξή τους στη μελέτη, όλοι οι συμμετέχοντες παρακολουθούνταν στη Μονάδα Πλασματοκυτταρικών Δυσκρασιών, Τμήμα Αιματολογίας και Παθολογικής Ογκολογίας, Θεραπευτική Κλινική και Ομώνυμο Εργαστήριο, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα». Πριν την πραγματοποίηση οποιασδήποτε διαδικασίας της παρούσας μελέτης, το ερευνητικό πρωτόκολλο έλαβε έγκριση από την Επιστημονική Επιτροπή του Νοσοκομείου ΓΝ «Αλεξάνδρα». Όλοι οι συμμετέχοντες παρείχαν γραπτή ενημερωμένη συγκατάθεση για τη συλλογή και ανάλυση των περιγραφόμενων βιολογικών υλικών.

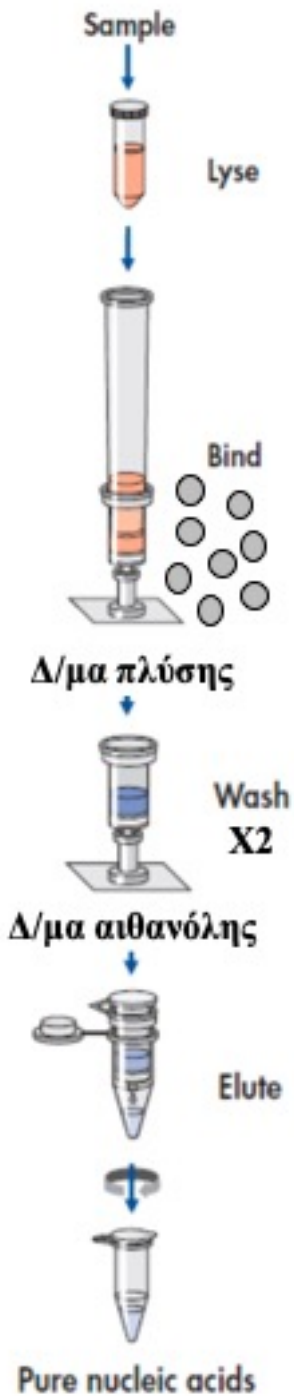
2. Υλικά και μέθοδοι

Από τους συμμετέχοντες στη μελέτη συλλέχθηκαν δείγματα κατά ζεύγη ταυτόχρονα από αναρρόφηση του μυελού των οστών (5-10 mL), όπου ανιχνεύεται το DNA του όγκου (tumor DNA, tDNA) και περιφερικό αίμα (10-12mL), όπου ανιχνεύεται το cfDNA.

Το περιφερικό αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια με αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA tubes) και επεξεργάστηκε άμεσα προς χειροκίνητη εξαγωγή του cfDNA χρησιμοποιώντας την τεχνική απομόνωσης cfDNA MagMax cell free DNA isolation kit (ThermoFisher Scientific) σύμφωνα με τις οδηγίες του παραγωγού (Thermo Fisher Scientific Inc. MagMAX™ Cell - Free DNA Isolation Kit User Guide. Catalog Number A29319. Publication Number MAN0014327. Revision C.0; 2016) [117].

Συνοπτικά, τα βήματα που ακολουθήθηκαν είχαν ως εξής (Εικόνα 8):

- α) Προετοιμασία δειγμάτων πλάσματος με cfDNA,
- β) Λύση των δειγμάτων και σύνδεση του cfDNA με τα μαγνητικά beads,
- γ) Ξέπλυμα με διάλυμα πλύσης,
- δ) Διπλό ξέπλυμα με διάλυμα αιθανόλης 80%,
- ε) Έκλυση του cfDNA.



Εικόνα 8. Διαδοχικά βήματα απομόνωσης του cfDNA με τη χρήση μαγνητικών beads και διπλής έκπλυσης με διάλυμα αιθανόλης (MagMAX™ ThermoFisher Scientific).

Η ποσότητα του cfDNA προσδιορίστηκε με το φθορόμετρο qubit χρησιμοποιώντας το HS dsDNA kit (ThermoFisher Scientific). Η συγκέντρωση του cfDNA που εξήχθη κυμαινόταν από 6 ng/μL έως 80 ng/μL.

Δείγματα αναρρόφησης από το μυελό των οστών συλλέχθηκαν ταυτόχρονα με τα δείγματα περιφερικού αίματος ανά ασθενή και επεξεργάστηκαν με σκοπό των εμπλουτισμό των CD19 κυττάρων [70]. Συνοπτικά, τα μονοκύτταρα από την αναρρόφηση του μυελού των οστών απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση βαθμίδωσης κατά Ficoll-Paque και θετική επιλογή με CD19 μαγνητικά beads μυελού των οστών (Miltenyi Biotec). Το DNA από τα CD19+ επιλεγμένα κύτταρα (tDNA) απομονώθηκε με το Allprep DNA/RNA mini kit (QIAGEN, Valencia, CA) και ποσοτικοποιήθηκε με το HS dsDNA kit.

Τα κατά ζεύγη δείγματα tDNA και cfDNA από την ομάδα των ασθενών και την ομάδα ελέγχου επεξεργάστηκαν για την ανίχνευση πιθανής ύπαρξης της μετάλλαξης L265P στο εξόνιο 5 του γονιδίου MYD88 και μεταλλάξεων όλων των εξονίων του γονιδίου CXCR4.

Η ανίχνευση της μετάλλαξης L265P πραγματοποιήθηκε με ειδική για το αλληλίο αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Allele-Specific PCR, AS-PCR) και άμεση αλληλούχιση (direct sequencing) τόσο στο tDNA όσο και στο cfDNA, όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί [118].

Πιο συγκεκριμένα, η PCR πραγματοποιήθηκε με έως 15 ng cfDNA ή tDNA, ανάλογα με τη διαθέσιμη ποσότητα σε κάθε δείγμα. Οι συνθήκες θέρμανσης καθορίστηκαν ως εξής: 5 λεπτά στους 94⁰C ακολουθούμενα από 35 κύκλους πολλαπλασιασμού (amplification) χρησιμοποιώντας 60 δευτερόλεπτα στους 94⁰C, 60 δευτερόλεπτα στους 60⁰C και 60 δευτερόλεπτα στους 72⁰C, και τέλος 5 λεπτά επέκτασης (extension) στους 72⁰C.

Η AS-PCR πραγματοποιήθηκε με προκαθορισμένους εμπροσθόδρομους εκκινητές (forward primers) με υποκατάσταση μονήρους βάσης στο τέλος του εκκινητή ως ακολούθως:

MYDW-F, 5'-GTGCCCATCAGAAGCGCCT-3' («αγρίου» τύπου χωρίς μετάλλαξη, wild type),

MYDM-F, 5'-GTGCCCATCAGAAGCGCCC-3' (μεταλλαγμένος, mutant), και

MYD-R, 5'-GACGTGTCTGTGAAGTTGGCATCTC-3' (οπισθόδρομος, reverse).

Οι MYDW-F και MYDM-F εκκινητές πολλαπλασίασαν DNA μήκους 224 ζεύγη βάσεων (bp) και οπτικοποιήθηκαν σε γέλη αγαρόζης με 1.5% συγκέντρωση βρωμιούχου εθιδίου (EtBr agarose gel). Οι συνθήκες θέρμανσης της PCR ήταν οι ίδιες με αυτές που περιγράφησαν ανωτέρω. Ο οπισθόδρομος εκκινητής ήταν ο ίδιος με την AS-PCR, όπως περιγράφεται ανωτέρω, ενώ ο εμπροσθόδρομος εκκινητής ήταν ως εξής:

MYD_F, 5'-GGGATATGCTGAACTAAGTTGCCAC-3' (Forward)

Το αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού των ανωτέρω είχε μήκος 726 ζεύγη βάσεων.

Η αλληλούχιση του γονιδίου CXCR4 πραγματοποιήθηκε με βάση τους ακόλουθους εκκινητές:

CXCR4_1, 5'-GCTGAATTGGAAGTGAATGTCC-3' (εμπροσθόδρομος, forward)

CXCR4_1, 5'-GTCATCTACACAGTCAACCTCT-3' (οπισθόδρομος, reverse)

CXCR4_2, 5'-CCGTGGCAAACCTGGTACTTT-3' (εμπροσθόδρομος, forward)

CXCR4_2, 5'-TCACTCCAGCTAACACAGATG-3' (οπισθόδρομος, reverse)

Το μήκος των αντιγράφων για τα CXCR4 1 και 2 ήταν 389 και 775 ζεύγη βάσεων, αντιστοίχως. Δεδομένου ότι το μήκος του cfDNA είναι μικρό, περίπου 166 ζεύγη βάσεων), σχεδιάσαμε εκκινητές για το γονίδιο CXCR4 με μικρότερο μέγεθος αντιγράφου (100 έως 220 ζεύγη βάσεων) και με αυτό τον τρόπο πολλαπλασιάσαμε

δείγματα cfDNA που είχαν υποστεί αποσύνθεση. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναλύονται στον Πίνακα 14. Οι συνθήκες θέρμανσης για τα ανωτέρω ήταν οι ίδιες που έχουν περιγραφεί προηγουμένως για το MYD88.

Ο πολλαπλασιασμός και η αλληλούχιση για το MYD88 και το CXCR4 πραγματοποιήθηκε μια φορά σε κάθε δείγμα, εκτός εάν δεν προέκυπτε επιτυχές αποτέλεσμα οπότε ήταν απαραίτητη η επανάληψη των διαδικασιών.

Πίνακας 14. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για το CXCR4.
Τροποποιημένο από [119].

Όνομασία	Αλληλουχία εκκινητή	Κατεύθυνση	Μέγεθος αντιγράφου (bp)
CXCR4_1	5'-ACTGGGTTAATGCTTGCTGA-3'	F	184
	5' - TGCCCACCATCTACTCCATC-3'	R	
CXCR4_2	5'- GCCCACCATCTACTCCATCA-3'	F	158
	5'-TGTCATCACGCTTCCCTTCT-3'	R	
CXCR4_3	5'- TGTCATCACGCTTCCCTTCT-3'	F	219
	5'-AAGGTGGTCTATGTTGGCG-3'	R	
CXCR4_4	5'-AAGGTGGTCTATGTTGGCGT-3'	F	162
	5'-TTCAGCACATCATGGTTGGC-3'	R	
CXCR4_5	5'-ATCTGTGACCGCTTCTACCC-3'	F	216
	5'-CCTGTTGGCTGCCTTACTAC-3'	R	
CXCR4_6	5'-CTCATCCTGGCTTTCTTCGC-3'	F	173
	5'-TGTTGTCTGAACCCCATCCT-3'	R	
CXCR4_7	5'-CATCCTCTATGCTTTCCTTGGAG-3'	F	171
	5'-TCACTCCAGCTAACACAGATG-3'	R	

F: εμπροσθόδρομη (forward)

R: οπισθόδρομη (reverse)

3. Στατιστική ανάλυση

Οι ποιοτικές μεταβλητές εκφράστηκαν ως απόλυτος αριθμός (%) και οι ποσοτικές μεταβλητές ως διάμεση τιμή (εύρος). Μη παραμετρικές μέθοδοι (Wilcoxon rank test, Spearman's rho) εφαρμόστηκαν για τη διερεύνηση διαφορών και συσχετίσεων μεταξύ των μεταβλητών. Όλες οι τιμές p-values ήταν two-sided και τα όρια αξιοπιστίας αναφέρονται στο 95% διάστημα. Τιμές p-value <0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS v.24.

4. Αποτελέσματα

A. Αρχική ανάλυση – προσδιορισμός ευαισθησίας

Στην αρχική ανάλυση της μελέτης συμπεριελήφθησαν 98 ασθενείς και 10 άτομα που δεν έπασχαν από IgM μονοκλωνική γαμμαπάθεια (ομάδα ελέγχου, controls). Από τους ασθενείς, 9 άτομα ήταν διαγνωσμένοι με IgM μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), 45 με μακροσφαιριναιμία Waldenström σε ύφεση, 44 με ασυμπτωματική (smoldering), νεοδιαγνωσθείσα ή υποτροπιάζουσα μακροσφαιριναιμία Waldenström. Τα χαρακτηριστικά της ομάδας των ασθενών καθώς και της ομάδας ελέγχου παρέχονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Σύνοψη των χαρακτηριστικών των ασθενών. Τροποποιημένο από [119].

IgM ασθενείς (n)	98
IgM MGUS	9
Ασυμπτωματική WM	23
Νεοδιαγνωσθείσα συμπτωματική WM	12
Υποτροπιάζουσα WM	9
WM κατά τη διάρκεια θεραπείας και σε ύφεση	17
WM μετά την ολοκλήρωση θεραπείας	28
LC: Κάππα / Λάμδα	79 /19
Ηλικία (χρόνια, διάμεση τιμή, εύρος)	72.5 (23 - 88)
Διήθηση μυελού των οστών (%; διάμεση τιμή, εύρος)	25 (0- 90)
IgM επίπεδα (mg/dL, διάμεση τιμή, εύρος)	1260 (85 – 7810)
Ομάδα ελέγχου (n)	10
Συμπτωματικό ΠΜ (n)	5
Ασυμπτωματικό ΠΜ (n)	2
Μη-IgM MGUS (n)	3
Ηλικία (χρόνια; διάμεση τιμή, εύρος)	67 (57-81)

IgM: Ανοσοσφαιρίνη M; WM: Μακροσφαιριναιμία Waldenström; ΠΜ: Πολλαπλό μυέλωμα; MGUS: Μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας; LC: Τύπος ελαφράς αλυσίδα

Γονοτυπική αξιολόγηση του MYD88 σε cfDNA και tDNA

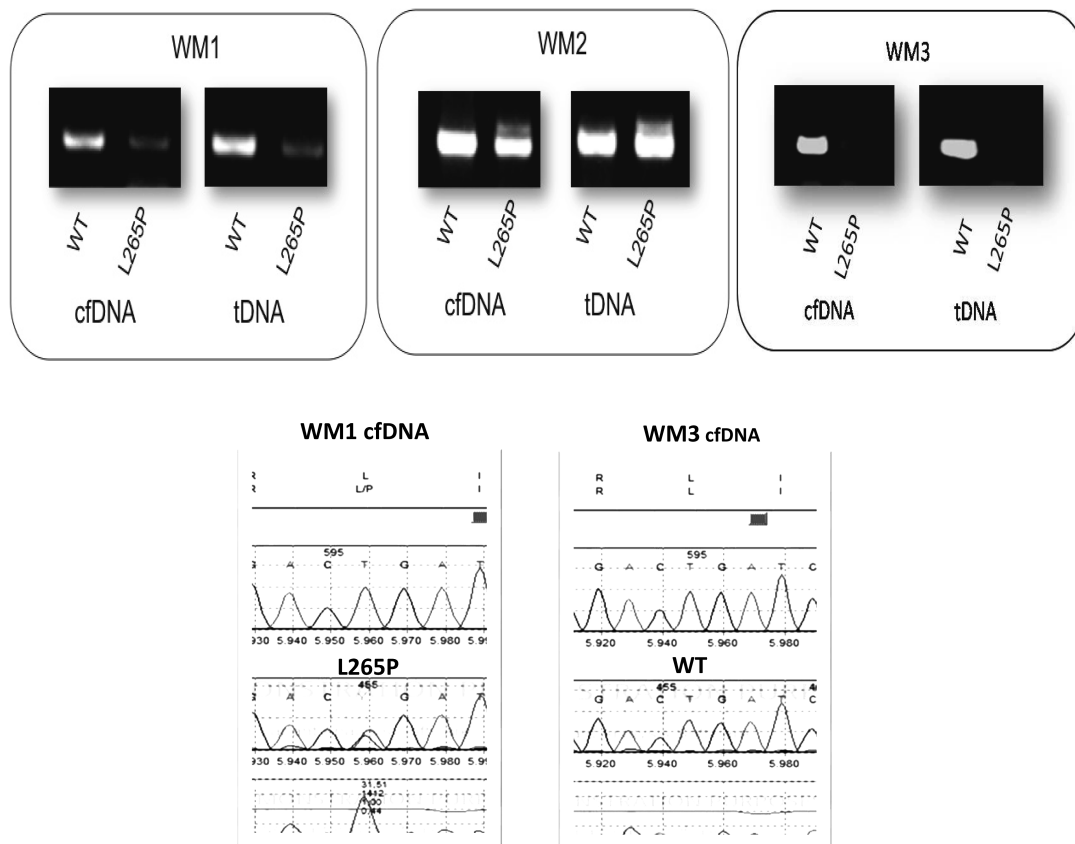
Από τους 98 ασθενείς με IgM μονοκλωνική γαμμαπάθεια, η αξιολόγηση της πιθανής ύπαρξης μετάλλαξης (mutation status) στο γονίδιο MYD88 ήταν δυνατή για 84 ασθενείς (84/98, 86%) στο tDNA και για 84 ασθενείς (84/98, 86%) στο cfDNA.

Σε 14 ασθενείς στο tDNA (14/98, 14%) και σε 14 στο cfDNA (14/98, 14%) δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί το mutation status του MYD88 λόγω αδυναμίας αναρρόφησης μυελού των οστών (όπως στην περίπτωση ξηράς αναρρόφησης – dry tap) και ύπαρξης DNA χαμηλής ποιότητας (ευρέως αποδομημένο), αντίστοιχα. Οι περισσότεροι ασθενείς με ανεπαρκές tDNA είχαν πολύ μικρό ποσοστό διήθησης του μυελού των οστών από λεμφοπλασματοκύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, 3 ασθενείς είχαν IgM MGUS, 4 ασυμπτωματική μακροσφαιριναιμία Waldenström, ένας ασθενής ήταν νεοδιαγνωσθείς και 6 είχαν νόσο σε ύφεση μετά από θεραπεία. Ωστόσο, το 57% μεταξύ αυτών (8/14) είχαν διαθέσιμη πληροφορία για το MYD88 status από την ανάλυση του cfDNA. Από τους 14 ασθενείς στους οποίους δεν ήταν δυνατή η ανάλυση του cfDNA, δύο είχαν IgM MGUS, 3 ασυμπτωματική νόσο, ένας νεοδιαγνωσθείσα νόσο με σχετικά χαμηλή διήθηση περίπου 12% και 8 είχαν νόσο σε ύφεση.

Στη συνέχεια, επιδιώξαμε να διαλευκάνουμε τη δυνατότητα ανίχνευσης της μετάλλαξης L265P του MYD88 στο cfDNA 84 ασθενών με διαθέσιμο υλικό. Η εν λόγω μετάλλαξη ανιχνεύθηκε στο 81% των ασθενών (68/81). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 9, η σωματική μετάλλαξη L265P του γονιδίου MYD88 είναι ξεκάθαρα εμφανής στα δείγματα cfDNA με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε γέλη αгарόζης με AS-PCR. Για να πιστοποιήσουμε τα αποτελέσματά μας από την ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης με AS-PCR, το μεταλλαγμένο αντίγραφο αναλύθηκε επίσης και με τη μέθοδο direct sequencing, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9. Η ικανότητα του cfDNA

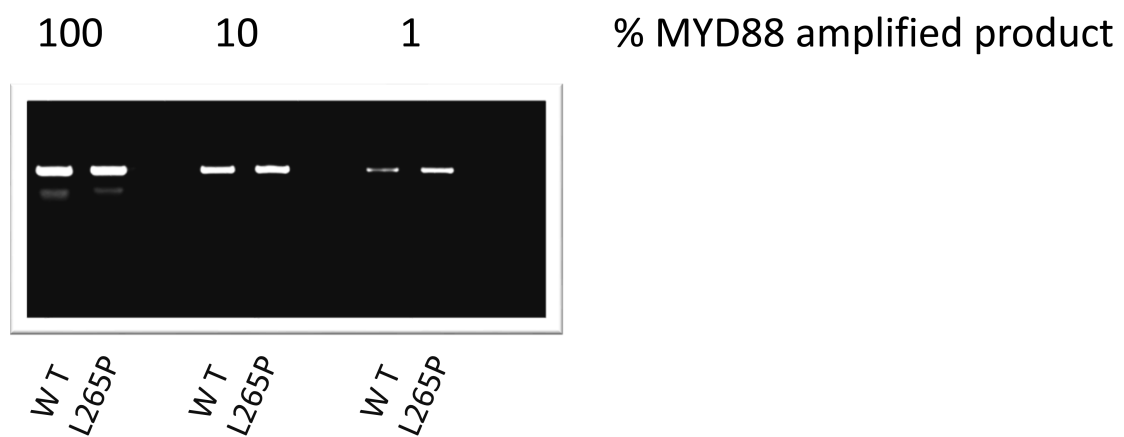
να προσδιορίζει την ύπαρξη ή μη μετάλλαξης στο γονίδιο MYD88 είναι όμοια με αυτήν του tDNA (Εικόνα 9).

Η ζυγωτία της μετάλλαξης, δηλαδή η ύπαρξη ενός ή δύο μεταλλαγμένων αλληλομόρφων εκτιμήθηκε με AS-PCR, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9, όπου η παρουσία τόσο των μεταλλαγμένων όσο και των μη-μεταλλαγμένων («αγρίου τύπου») αλληλομόρφων στη γέλη αγαρόζης υποδεικνύει την ετεροζυγωτία του δείγματος ως προς τη μετάλλαξη L265P του γονιδίου MYD88. Αντίθετα, η ομοζυγωτία ως προς τη μετάλλαξη L265P του γονιδίου MYD88 καθορίζεται από την απώλεια του μη-μεταλλαγμένου («αγρίου τύπου») αλληλόμορφου, όπως αντικατοπτρίζεται είτε στη μάντα της PCR, είτε στην κορυφή της αλληλούχισης κατά Sanger, και στην ενίσχυση μόνο του μεταλλαγμένου αλληλίου. Σε δείγματα που χαρακτηρίστηκαν από απουσία μετάλλαξης (MYD88 «αγρίου τύπου», MYD88WT), μόνο το «αγρίου τύπου» αλληλόμορφο ενισχύθηκε (Εικόνα 9). Η κατάσταση ζυγωτίας ως προς το MYD88 επιβεβαιώθηκε επίσης με την τεχνική αλληλούχισης κατά Sanger με βάση την παρουσία μονής ή διπλής κορυφής.



Εικόνα 9. AS-PCR και αλληλούχιση κατά Sanger για την ανίχνευση της μετάλλαξης L265P του γονιδίου MYD88 στο tDNA και cfDNA. Οι ασθενείς WM1 και WM2 παρουσιάζουν και οι δύο τόσο μεταλλαγμένα όσο και μη μεταλλαγμένα (wild-type) αλληλόμορφα, ενώ ο ασθενής WM3 παρουσιάζει μόνο «αγρίου τύπου» αλληλόμορφα. Παρουσιάζεται επίσης η ανάλυση αλληλούχισης για τους ασθενείς WM1 και WM3. Τροποποιημένο από [119].

Για να ελέγξουμε την ευαισθησία της AS-PCR για τα δείγματα cfDNA, πραγματοποιήσαμε διαδοχικές αραιώσεις σε ένα δείγμα με παρουσία μεταλλαγμένου αλληλομόρφου. Ο έλεγχος ευαισθησίας της μεθόδου έδειξε ότι η μετάλλαξη L265P του γονιδίου MYD88 ήταν ανιχνεύσιμη ακόμα και σε χαμηλή συγκέντρωση DNA της τάξεως των 5ng σε αραιώση έως 1%, που αντιστοιχεί σε 0.05ng DNA, ώστε η μπάντα ηλεκτροφόρησης που αντιστοιχεί στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο να παραμένει ευδιάκριτη (Εικόνα 10). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι επιπλέον αραιώσεις είναι δυνατές.



Εικόνα 10. Ο έλεγχος ευαισθησίας της AS-PCR σε δείγματα cfDNA τόσο για την ύπαρξη μεταλλαγμένου όσο και μη μεταλλαγμένου αλληλομόρφου, όπως φανερώνεται στην ηλεκτροφόρηση με γέλη αγαρόζης 1.5%. Τα δύο αλληλόμορφα ανιχνεύτηκαν επίσης και σε αραιώση 1%. Τροποποιημένο από [119].

Παράλληλα, εξετάσαμε την εφαρμογή τόσο συμβατικής AS-PCR και άμεσης αλληλούχισης για την ανίχνευση της μετάλλαξης L265P του γονιδίου MYD88 σε tDNA προερχόμενο από CD19-επιλεγμένα κύτταρα του μυελού των οστών. Η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε στο 84% των δειγμάτων (71/84). Όλοι οι ασθενείς που ήταν θετικοί ή αρνητικοί για τη μετάλλαξη με την AS-PCR, ήταν αντιστοίχως θετικοί ή αρνητικοί για τη μετάλλαξη με την άμεση αλληλούχιση (100% συμφωνία αποτελεσμάτων). Αυτό αφορούσε τόσο το cfDNA όσο και το tDNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν απόλυτη αναπαραγωγιμότητα μεταξύ των αντιγράφων σε διαφορετικούς κύκλους αντιγραφής.

Από τους υπό εξέταση ασθενείς, 76 είχαν διαθέσιμα δείγματα τόσο tDNA όσο και cfDNA για ανάλυση. Η μετάλλαξη L265P του γονιδίου MYD88 ανιχνεύτηκε στο 82% των ασθενών (62/76) τόσο στο tDNA όσο και στο cfDNA. Στο 5% (4/76) η μετάλλαξη ήταν παρούσα μόνο στο tDNA και όχι στο cfDNA, ενώ 13% (10/76) των ασθενών έφεραν το «αγρίου τύπου» αλληλόμορφο τόσο στο tDNA όσο και στο cfDNA. Συνεπώς, το ολικό ποσοστό συμφωνίας μεταξύ tDNA και cfDNA για το γονότυπο του MYD88 ήταν 94% (72/76).

Μεταξύ των ασθενών που είχαν διαγνωσθεί με IgM MGUS, μακροσφαιριναιμία Waldenström σε ύφεση και ασυμπτωματική / νεοδιαγνωσθείσα / υποτροπιάζουσα μακροσφαιριναιμία Waldenström, τα ποσοστά συμφωνίας των αποτελεσμάτων μεταξύ tDNA και cfDNA ήταν 100% (6 στους 6 ασθενείς), 97% (33 στους 34) και 91% (33 στους 36), αντίστοιχα. Συνολικά, η μετάλλαξη L265P στο γονίδιο MYD88 ανιχνεύτηκε είτε στο cfDNA είτε στο tDNA στο 100% των ασθενών με IgM MGUS (6 στους 6), στο 79% των ασθενών με νόσο σε ύφεση (27 στους 34) και στο 81% των ασθενών με ασυμπτωματική ή νεοδιαγνωσθείσα ή υποτροπιάζουσα νόσο (36 στους 44). Όλοι οι ασθενείς που έφεραν τη μετάλλαξη ήταν ετεροζυγώτες ως προς αυτή.

Ομάδα ελέγχου

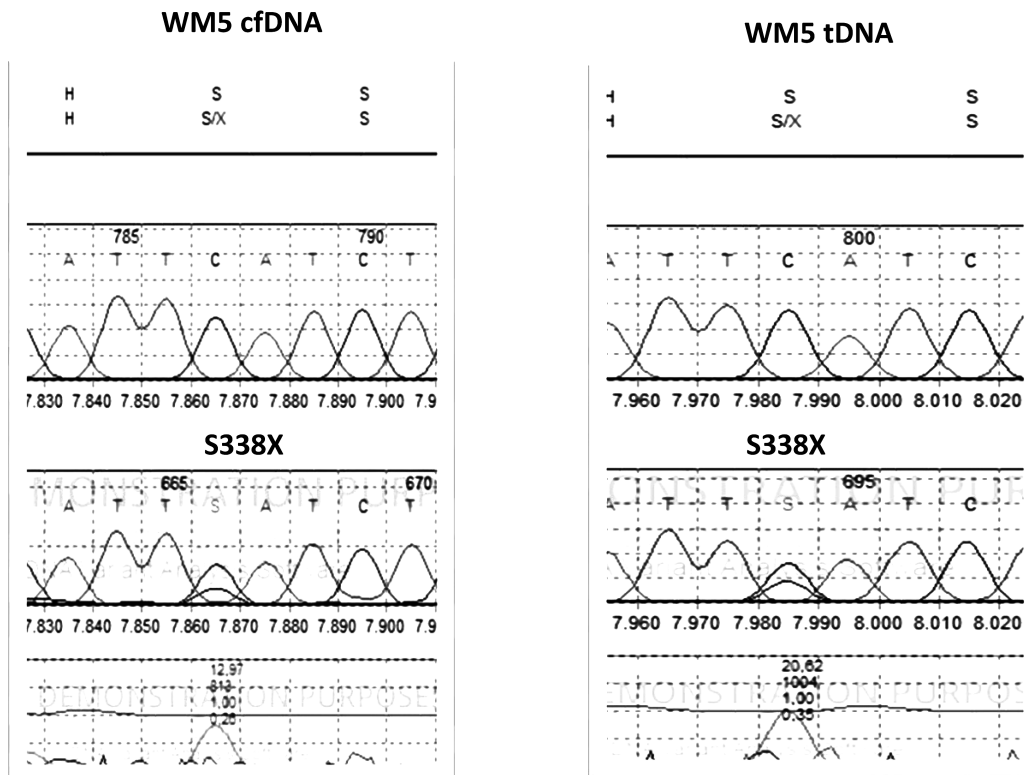
Αναφορικά με την ομάδα ελέγχου που αποτελούνταν από ασθενείς διαγνωσμένους με μη-IgM MGUS καθώς και πολλαπλό μυέλωμα, δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο MYD88 ούτε στο tDNA (8 στους 8) ούτε στο cfDNA (6 στους 6). Ένας ασθενής διαγνωσμένος με λέμφωμα οριακής ζώνης έφερε τη μετάλλαξη L265P του MYD88 τόσο στο tDNA όσο και στο cfDNA.

Προβλεπτικοί παράγοντες

Επιπλέον, εξετάσαμε εάν ο βαθμός της διήθησης του μυελού των οστών, το οποίο αντικατοπτρίζει σε μεγάλο βαθμό το φορτίο του κακοήθους κλώνου, και τα επίπεδα της IgM ανοσοσφαιρίνης σχετίζονταν με το ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων. Στη μονοπαραγοντική ανάλυση, η πιθανότητα ανίχνευσης της μετάλλαξης L265P του γονιδίου MYD88 σε CD19+ επιλεγμένα κύτταρα οριακά συσχετίστηκε με τη διήθηση στο μυελό ($p=0.062$) αλλά συσχετίστηκε σημαντικά και με τα επίπεδα της IgM ($p=0.012$). Στην αντίστοιχη ανάλυση για την πιθανότητα ανίχνευσης της μετάλλαξης στο cfDNA, αναδείχθηκε σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα της IgM ανοσοσφαιρίνης ($p=0.045$), αλλά μη στατιστικά σημαντική με τη διήθηση του μυελού των οστών ($p=0.126$). Η ποσότητα του cfDNA συσχετίστηκε πολύ οριακά με τη διήθηση στο μυελό των οστών ($p=0.083$) αλλά δε συσχετίστηκε με τα επίπεδα της IgM ($p=0.188$). Αντιθέτως, όπως ήταν αναμενόμενο, διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ των συλλεχθέντων CD19+ επιλεγμένων κυττάρων με τη διήθηση στο μυελό των οστών ($p=0.012$), αλλά όχι με τα επίπεδα της IgM ($p=0.074$). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν τη δυνητική χρησιμότητα του cfDNA ακόμα και σε ασθενείς με πολύ χαμηλά επίπεδα διήθησης του μυελού των οστών.

Γονοτυπική αξιολόγηση του CXCR4 σε cfDNA και tDNA

Έπειτα εξετάσαμε την ικανότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο CXCR4 στο cfDNA. Από τους συμμετέχοντες στη μελέτη, η ανάλυση ήταν δυνατή στο cfDNA 79 ασθενών (79 σε σύνολο 98, 80%) και στο tDNA 73 ασθενών (73 σε σύνολο 98, 74%). Η αξιολόγηση της ύπαρξης μεταλλάξεων του CXCR4 ήταν δυνατή σε 65 ασθενείς (σε σύνολο 98, 66%). Σε 11 ασθενείς (11 στους 65, 17%), οι μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν τόσο στο cfDNA όσο και στο tDNA. Η ανίχνευση μεταλλάξεων είτε στο cfDNA είτε στο tDNA ήταν δυνατή σε 2 από τους 9 ασθενείς με MGUS (22%), σε 10 από τους 37 με νόσο σε ύφεση (27%) και σε 6 από τους 29 με ασυμπτωματική / νεοδιαγνωσθείσα νόσο / νόσο σε υποτροπή (20%). Η παθογενετική μετάλλαξη S338X (rs104893626) βρέθηκε σε τρεις ασθενείς συμπεριλαμβανομένου ενός με ασυμπτωματική νόσο και δύο νεοδιαγνωσθέντες (Εικόνα 11). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι το αποτέλεσμα αντικατάστασης μιας μονήρους βάσης από C σε G που οδηγεί στη δημιουργία ενός κωδικονίου λήξης στη γονιδιακή θέση 338 που αντιστοιχεί στο αμινοξύ σερίνη.



Εικόνα 11. Αλληλούχιση κατά Sanger του cfDNA και του tDNA για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο CXCR4. Ο ασθενής WM5 χαρακτηρίζεται από την παρουσία της παθογενετικής μετάλλαξης S338X, όπως φαίνεται στα χρωματογράμματα αλληλούχισης τόσο του tDNA όσο και του cfDNA. Τροποποιημένο από [119].

Οι ανευρεθείσες μεταλλάξεις στο γονίδιο CXCR4 φαίνονται στον Πίνακα 16. Συνώνυμες μεταλλάξεις ανευρεθησαν σε 5 ασθενείς. Πέντε ασθενείς έφεραν παραπάνω από μια μετάλλαξη. 56 ασθενείς χαρακτηρίστηκαν ως ομοζυγώτες ως προς το αλληλόμορφο «αγρίου τύπου» με βάση την αλληλούχιση τόσο του tDNA όσο και του cfDNA. Σε 3 από τους 65 ασθενείς, οι truncating μεταλλάξεις E343D, H228Q and L50X ανιχνεύτηκαν στο tDNA αλλά όχι στο cfDNA. Αντίστροφα, η μετάλλαξη L210P (1 στους 65) καθώς και οι V54G, K110R and V99G (1 στους 65) ανιχνεύτηκε στο cfDNA αλλά όχι στο tDNA.

Συνολικά, το ποσοστό συμφωνίας μεταξύ tDNA και cfDNA ήταν 90% (59 στους 65 ασθενείς). Το ποσοστό συμφωνίας ήταν 100% μεταξύ των ασθενών με IgM MGUS (7 στους 7), 82% μεταξύ των ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström σε ύφεση (23 στους 28), και 93% μεταξύ των ασθενών με ασυμπτωματική / νεοδιαγνωσθείσα νόσο / υποτροπιάζουσα νόσο (28 στους 30).

Από τους 4 ασθενείς που ήταν δυνατή η ανάλυση μόνο του tDNA για ανίχνευση πιθανών μεταλλάξεων του CXCR4, ένας παρουσίασε πολλούς πολυμορφισμούς στο γονίδιο CXCR4. Από τους 8 ασθενείς που ήταν δυνατή η ανάλυση μόνο του cfDNA, ανευρέθηκαν οι μεταλλάξεις V99G (1 στους 65 ασθενείς) και V82G (1 στους 65 ασθενείς). Όλοι οι πολυμορφισμοί ανιχνεύτηκαν σε 1 ασθενή τη φορά, εκτός από τις S338X και V99G που βρέθηκαν σε τρεις και δύο, αντίστοιχα. Μεταξύ των ανιχνευθέντων μεταλλάξεων, μόνο οι S338X και E343D αφορούν το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην έκφραση του CXCR4 και στη ρύθμιση της μοριακής σηματοδότησης [87].

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 16, μένει να αποδειχθεί ποιες από τις ανωτέρω περιγραφείσες μεταλλάξεις και σε ποιο βαθμό είναι ειδικές για τη μακροσφαιριναιμία Waldenström, έχουν ρόλο στην παθογένεση της νόσου και έχουν κλινική αξία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αναμένεται να έχουν οι μεταλλάξεις που έχουν μεγαλύτερη επίπτωση στη λειτουργικότητα του γονιδιακού προϊόντος, με βάση τον αριθμό Provean.

Πίνακας 16. Ανιχνευθείσες μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί του γονιδίου CXCR4 με συνοδό πρόβλεψη της πιθανής τους επίπτωσης στο γονιδιακό προϊόν. Τροποποιημένο από [119].

Μετάλλαξη (Hg19)	Μετάλλαξη (Hg38)	Γονίδιο	Αριθμός Provean	Πρόβλεψη	Αναφερόμενοι SNP
P27T	P31T	CXCR4	-2.986	Επιβλαβής	ΔΑ
F29L	F33L	CXCR4	-0.778	Ουδέτερη	ΔΑ
L50X	L54X	CXCR4		Παθογενετική	ΔΑ
I53L	I57L	CXCR4	-0.121	Ουδέτερη	rs56400844
V54G	V58G	CXCR4	-4.11	Επιβλαβής	ΔΑ
V82G	V86G	CXCR4	- 5.5	Επιβλαβής	ΔΑ
V99G	V103G	CXCR4	-1.952	Ουδέτερη	ΔΑ
K110R	K114R	CXCR4	-2.4	Ουδέτερη	ΔΑ
L136Q	L140Q	CXCR4	-5.5	Επιβλαβής	ΔΑ
H228Q	H232Q	CXCR4	-0.306	Ουδέτερη	rs762625278
S338X	S342X	CXCR4		Παθογενετική	rs104893626
E343D	E347D	CXCR4	-1.244	Ουδέτερη	ΔΑ

SNP: Πολυμορφισμοί μονήρους νουκλεοτιδίου; ΔΑ: Δεν αναφέρονται

Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι δείγματα με ικανοποιητική ποσότητα cfDNA ελέγχθηκαν με εκκινητές που στοχεύουν στη δημιουργία αντιγράφων μικρότερου γονιδιακού μήκους. Αυτή η προσέγγιση υιοθετήθηκε επειδή το μέγεθος του cfDNA είναι σχετικά μικρό και δυνητικά εύκολα διασπώμενο, και συνεπώς ενδέχεται να μη μπορεί να αντιγραφεί με εκκινητές που οδηγούν σε αντίγραφα μεγαλύτερου γονιδιακού μήκους. Οι εκκινητές που οδηγούν σε αντίγραφα μικρότερου γονιδιακού μήκους εφαρμόστηκαν σε 4 δείγματα με ικανοποιητική ποσότητα cfDNA στα οποία η αλληλούχιση ήταν ανεπιτυχής. Επιπλέον εφαρμόστηκαν σε 10 δείγματα (5 cfDNA και 5 tDNA) με ικανοποιητικά αποτελέσματα αλληλούχισης ώστε να αξιολογηθεί η συμφωνία με την ομάδα των εκκινητών που οδηγούν σε αντίγραφα μεγαλύτερου γονιδιακού μήκους. Παρατηρήσαμε ότι η αλληλούχιση με αυτή την προσέγγιση, είχε τα ίδια αποτελέσματα με την αλληλούχιση DNA δειγμάτων στα οποία είχαν χρησιμοποιηθεί οι κλασικοί εκκινητές. Στα δείγματα με αρχικά ανεπιτυχή αλληλούχιση, δεν κατέστη δυνατή η πραγματοποίηση της διαδικασίας ούτε με την εναλλακτική μέθοδο.

Ομάδα ελέγχου

Αναφορικά με την ομάδα ελέγχου που αποτελούνταν από ασθενείς διαγνωσμένους με μη-IgM MGUS καθώς και πολλαπλό μυέλωμα, δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο CXCR4 ούτε στο tDNA (8 στους 8) ούτε στο cfDNA (7 στους 7).

Πίνακας 17. Ποσοστά ανίχνευσης της μετάλλαξης L265P του γονιδίου MYD88 καθώς και των μεταλλάξεων του γονιδίου CXCR4 σε CD19+ επιλεγμένα κύτταρα του μυελού των οστών και σε cfDNA, ανά νοσολογική οντότητα, σε 98 ασθενείς με μονοκλωνική IgM γαμμαπάθεια που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη. Τροποποιημένο από [119].

	CD19+ MYD88L265P	cfDNA MYD88L265P	CD19+ CXCR4mut	cfDNA CXCR4mut
IgM MGUS	(N=6) 100%	(N=7) 86%	(N=7) 29%	(N=9) 22%
Ασυμπτωματική WM	(N=21) 95%	(N=22) 82%	(N=17) 29%	(N=16) 19%
Νεοδιαγνωσθείσα συμπτωματική WM	(N=11) 91%	(N=11) 73%	(N=8) 38%	(N=12) 25%
Υποτροπιάζουσα WM	(N=9) 100%	(N=9) 100%	(N=8) 0%	(N=9) 0%
WM υπό θεραπεία	(N=13) 69%	(N=13) 62%	(N=11) 27%	(N=15) 27%
WM μετά από θεραπεία	(N=26) 81%	(N=24) 83%	(N=22) 18%	(N=20) 10%
Σύνολο	(N=86) 87%	(N=86) 80%	(N=73) 23%	(N=81) 17%

IgM: Ανοσοσφαιρίνη M; WM: Μακροσφαιριναιμία Waldenström; MGUS: Μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας

B. Μελέτη επέκτασης – τελική ανάλυση

Κατόπιν των ανωτέρω ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων, αποφασίστηκε η συνέχιση της μελέτης με στόχο τον διπλασιασμό των δειγμάτων. Για την τελική ανάλυση συγκεντρώθηκαν δείγματα από 207 ασθενείς με IgM μονοκλωνικές γαμμαπάθειες, συμπεριλαμβανομένων και 33 ασθενών από τους οποίους ελήφθη μόνο cfDNA προς αποφυγή διενέργειας αναρρόφησης μυελού των οστών. Η κατανομή ανά διάγνωση φαίνεται στον Πίνακα 18. Κατά τη λήψη των δειγμάτων, 26 ασθενείς βρίσκονταν υπό θεραπεία με βάση τη ριτουξιμάμπη ή αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του Bruton.

Πίνακας 18. Σύνοψη των χαρακτηριστικών των ασθενών της τελικής ανάλυσης.

IgM ασθενείς (n)	207
IgM MGUS	40
Ασυμπτωματική WM	50
Νεοδιαγνωσθείσα συμπτωματική WM	33
Υποτροπιάζουσα WM	15
WM κατά τη διάρκεια θεραπείας και σε ύφεση	21
WM μετά την ολοκλήρωση θεραπείας	31
Πρωτοδιάγνωση - υπό διερεύνηση	17

IgM: Ανοσοσφαιρίνη M; WM: Μακροσφαιριναιμία Waldenström; MGUS: Μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας

Γονοτυπική αξιολόγηση του MYD88 σε cfDNA και tDNA – τελική ανάλυση

Από τους 207 ασθενείς με IgM μονοκλωνική γαμμαπάθεια, η αξιολόγηση της πιθανής ύπαρξης μετάλλαξης (mutation status) στο γονίδιο MYD88 ήταν δυνατή για 162 ασθενείς (162/174, 93%) στο tDNA και για 188 ασθενείς (188/207, 91%) στο cfDNA. Οι λόγοι μη αξιόπιστου δείγματος στους υπόλοιπους ασθενείς ήταν οι ίδιοι που έχουν ήδη περιγραφεί. Η συχνότητα ανεύρεσης της μετάλλαξης L265P του γονιδίου MYD88 ήταν 91% (147/162) στο tDNA και 89% (168/188) στο cfDNA.

Συνολικά, 150 ασθενείς είχαν διαθέσιμα δείγματα τόσο tDNA όσο και cfDNA για ανάλυση (150/174, 86%). Μεταλλάξεις του γονιδίου MYD88 ανιχνεύτηκαν στο 90% των ασθενών (135/150) τόσο στο tDNA όσο και στο cfDNA. Όλοι έφεραν τη μεταλλαγή L265P εκτός από έναν ασθενή που έφερε την S283F. Στο 3% (5/150) η μετάλλαξη MYD88^{L265P} ήταν παρούσα μόνο στο tDNA και όχι στο cfDNA, ενώ 7% (10/150) των ασθενών έφεραν το «αγρίου τύπου» αλληλόμορφο τόσο στο tDNA όσο και στο cfDNA. Συνεπώς, το ολικό ποσοστό συμφωνίας μεταξύ tDNA και cfDNA για το γονότυπο του MYD88 ήταν 97% (145/150) ($p < 0.001$).

Μεταξύ των ασθενών που είχαν διαγνωσθεί με IgM MGUS, μακροσφαιριναιμία Waldenström σε ύφεση και ασυμπτωματική / νεοδιαγνωσθείσα / υποτροπιάζουσα μακροσφαιριναιμία Waldenström, τα ποσοστά συμφωνίας των αποτελεσμάτων μεταξύ tDNA και cfDNA ήταν 96% (27 στους 28 ασθενείς), 97% (36 στους 37) και 96% (76 στους 79), αντίστοιχα.

Προβλεπτικοί παράγοντες

Η πιθανότητα ανίχνευσης μετάλλαξης του γονιδίου MYD88 στο tDNA συσχετίστηκε σημαντικά με την ποσότητα των CD19+ επιλεγμένων κύτταρων ($p=0.007$) και με τα επίπεδα της IgM ($p=0.048$), ενώ παρουσίασε οριακή συσχέτιση με το ποσοστό διήθησης του μυελού από κλωνικά λεμφοπλασματοκύτταρα ($p=0.057$). Επίσης συσχετίστηκε σημαντικά με τις τιμές της β2 μικροσφαιρίνης ορού ($p=0.027$). Στην αντίστοιχη ανάλυση για την πιθανότητα ανίχνευσης της μετάλλαξης στο cfDNA, αναδείχθηκε μη στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα της IgM ανοσοσφαιρίνης ($p=0.071$), με το ποσοστό της διήθησης του μυελού των οστών ($p=0.634$), καθώς και με τη ποσότητα του απομονωθέντος cfDNA ($p=0.601$). Επιπλέον, η πιθανότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων στους ασθενείς με συμπτωματική μακροσφαιριναιμία Waldenström δε συσχετίστηκε με την παρουσία κάπα ή λάμδα ελαφριάς αλυσίδας, ούτε με τις τιμές αιμοσφαιρίνης, λευκών αιμοσφαιρίων, λεμφοκυττάρων, αιμοπεταλίων ή την ύπαρξη λεμφαδενοπάθειας, οργανομεγαλίας, υπεργλοιοπάθειας ή νευροπάθειας. Ομοίως σε ασθενείς με ασυμπτωματική νόσο οι τιμές αιμοσφαιρίνης, λευκών αιμοσφαιρίων, λεμφοκυττάρων, αιμοπεταλίων και ο τύπος της ελαφριάς αλυσίδας δε συσχετίστηκαν με την πιθανότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων του γονιδίου MYD88.

Γονοτυπική αξιολόγηση του CXCR4 σε cfDNA και tDNA – τελική ανάλυση

Συνολικά, η ανάλυση ήταν δυνατή στο cfDNA 157 ασθενών (157/207, 76%) και στο tDNA 146 ασθενών (146/174, 84%). 44 ασθενείς εμφάνισαν μεταλλάξεις στο tDNA (44/146, 30%) και 43 στο cfDNA (43/157, 27%). Η αξιολόγηση της ύπαρξης μεταλλάξεων του CXCR4 τόσο στο tDNA όσο και στο cfDNA των ίδιων ασθενών ήταν δυνατή σε 131 ασθενείς (131/174, 75%). Σε 26 ασθενείς (26/131, 20%), μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν τόσο στο cfDNA όσο και στο tDNA. 13 ασθενείς (10%) παρουσίασαν μεταλλάξεις στο γονίδιο CXCR4 μόνο στο tDNA και 8 (6%) μόνο στο cfDNA. Σε 84 ασθενείς (64%) ανιχνεύτηκε το γονίδιο «αγρίου τύπου» τόσο στο tDNA όσο και στο cfDNA. Συνολικά, η παθογενετική μετάλλαξη S338X βρέθηκε σε πέντε ασθενείς ενώ η παθογενετική μετάλλαξη L50X ανιχνεύτηκε σε έναν ασθενή. Συνολικά, το ποσοστό συμφωνίας μεταξύ tDNA και cfDNA ήταν 84% (110/131) ($p < 0.001$). Το ποσοστό συμφωνίας ήταν 88% μεταξύ των ασθενών με IgM MGUS (22/25), 82% μεταξύ των ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström σε ύφεση (27/33), και 85% μεταξύ των ασθενών με ασυμπτωματική / νεοδιαγνωσθείσα νόσο / υποτροπιάζουσα νόσο (58/68). Η πιθανότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο CXCR4 δε συσχετίστηκε με τον τύπο της ελαφριάς αλυσίδας, ούτε με τις τιμές αιμοσφαιρίνης, λευκών αιμοσφαιρίων, λεμφοκυττάρων, αιμοπεταλίων ή την ύπαρξη λεμφαδενοπάθειας, οργανομεγαλίας, υπεργλοιοίτητας ή νευροπάθειας.

Προβλεπτικοί παράγοντες της ποσότητας cfDNA και CD19+ επιλεγμένων κυττάρων

Στην τελική ανάλυση, η ποσότητα του cfDNA δε συσχετίστηκε με τη διήθηση στο μυελό των οστών ($p=0.439$) και με τα επίπεδα της IgM ($p=0.717$). Αντιθέτως, διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ των συλλεχθέντων CD19+ επιλεγμένων κυττάρων με το ποσοστό διήθησης του μυελού των οστών από κλωνικά λεμφοπλασματοκύτταρα ($p<0.001$), καθώς και με τα επίπεδα της IgM ($p=0.01$) και της $\beta 2$ μικροσφαιρίνης ($p=0.045$). Η ποσότητα του cfDNA δε συσχετίστηκε με την ποσότητα συλλεχθέντων CD19+ επιλεγμένων κυττάρων ($p=0.65$). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν τη δυνητική χρησιμότητα του cfDNA ακόμα και σε ασθενείς με πολύ χαμηλά επίπεδα διήθησης του μυελού των οστών και IgM.

VI. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη συστηματική προσπάθεια να αξιολογηθεί η δυνατότητα ανίχνευσης σωματικών μεταλλάξεων στα γονίδια MYD88 και CXCR4 σε cfDNA προερχόμενο από το περιφερικό αίμα σε ένα μεγάλο αριθμό ασθενών διαγνωσμένων με μακροσφαιριναιμία Waldenström και IgM μονοκλωνική γαμμαπάθεια [119]. Η αξιολόγηση της δυνατότητας του cfDNA να ανιχνεύσει μεταλλάξεις και ο ρόλος του στην εκτίμηση και παρακολούθηση του φορτίου της νόσου σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες όπως στο πολλαπλό μυέλωμα έχει περιγραφεί προσφάτως. Συγκεκριμένα για το πολλαπλό μυέλωμα έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα του ανιχνευθέντος cfDNA είναι σημαντικά υψηλότερα συγκριτικά με άλλες κακοήθειες, όπως έχει αναλυθεί προηγουμένως [120]. Επιπρόσθετα, έχει φανεί ότι η ευαισθησία της ανίχνευσης μεταλλάξεων στο πλάσμα είναι σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με το μυελό των οστών [120]. Παρόλο που για την εδραίωση της διάγνωσης της μακροσφαιριναιμίας Waldenström είναι απαραίτητη η εξέταση του μυελού των οστών, η εφαρμογή του cfDNA θα μπορούσε να συνεισφέρει στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία, καθώς και στον έλεγχο για υπολοιπούμενη νόσο (minimal residual disease, MRD) χωρίς την ανάγκη πραγματοποίησης επαναληπτικών δειγματοληψιών από το μυελό των οστών. Περαιτέρω μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström θα διαλευκάνουν αυτή την προοπτική της μεθόδου με την ανίχνευση μεταλλάξεων στο περιφερικό αίμα.

Στην παρούσα μελέτη βρήκαμε ότι σε ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström και IgM μονοκλωνικές γαμμαπάθειες η μετάλλαξη L265P του γονιδίου MYD88 καθώς και οι μεταλλάξεις στο γονίδιο CXCR4 μπορούν να ανιχνευθούν στο cfDNA σε υψηλό βαθμό συμφωνίας, και συγκεκριμένα 97% και 84%, αντίστοιχα,

συγκριτικά με τις μεταλλάξεις που ανιχνεύονται στο tDNA. Αυτά τα υψηλά ποσοστά συμφωνίας υποδηλώνουν ότι η ανάλυση του cfDNA αποτελεί ένα αξιόπιστο διαγνωστικό εργαλείο που θα μπορούσε να αντικαταστήσει τη διενέργεια οστεομυελικής βιοψίας ή / και αναρρόφησης μυελού των οστών σε πολλές περιπτώσεις. Βεβαίως, η αύξηση της ευαισθησίας και η βελτιστοποίηση της μεθόδου παραμένουν υπό διερεύνηση. Επιπλέον, η συλλογή διαδοχικών χρονικά δειγμάτων από τον ίδιο ασθενή πριν, κατά τη διάρκεια και μετά τη θεραπεία θα μπορούσε να παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη χρήση του cfDNA ως εργαλείου για παρακολούθηση των μεταβολών σε μοριακό επίπεδο καθώς και ως δείκτης ευαίσθητης μεθόδου για την ανίχνευση ελάχιστα υπολειπόμενης νόσου σε ασθενείς που φέρουν μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του MYD88 και έχουν επιτύχει βαθιά ύφεση.

Ο επιπολασμός της μετάλλαξης L265P του γονιδίου MYD88 στον πληθυσμό της μελέτης μας (91%) είναι συγκρίσιμος με αυτόν που έχει παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες (Πίνακας 19) [70, 73, 76, 121, 122]. Τα ποσοστά επιπολασμού είναι επίσης συγκρίσιμα με αυτά που έχουν περιγραφεί με βάση CD19+ επιλεγμένα κύτταρα από το περιφερικό αίμα [123, 124].

Πίνακας 19. Σύνοψη των κυριότερων μελετών που αναφέρονται στον επιπολασμό της μετάλλαξης L265P στο γονίδιο MYD88 σε ασθενείς με IgM γαμμαπάθειες. Τροποποιημένο από [125].

	METHOD	TISSUE	WM	SMW	IGM MGUS
Treon	WGS/SANGER	BM CD19 ⁺	91%		10%
Xu	AS-PCR	BM CD19 ⁺	93%		54%
Gachard	PCR	BM	70%		
Varettoni	AS-PCR	BM	100%		47%
Landgren	Sanger	BM			54%
Jimenez	AS-PCR	BM	86%	96%	87%
Poulain	PCR	BM CD19 ⁺	80%		
Ansell	Sanger	NA	70%		
Willenbacher	Sanger	BM	86%		
Correa	PCR	BM	84%	80%	27%

Προηγούμενες μελέτες χρησιμοποίησαν μη επιλεγμένα κύτταρα από το περιφερικό αίμα ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström που δεν είχαν λάβει θεραπεία, και ανέδειξαν τη δυνατότητα ανίχνευσης της μετάλλαξης L265P του γονιδίου MYD88. Ωστόσο, η ευαισθησία των μεθόδων αυτών είναι τόσο μικρή (39.5%) που ώθησε τους ερευνητές να εξετάσουν την πιθανή ύπαρξη της εν λόγω μετάλλαξης επιπρόσθετα σε CD19⁺ επιλεγμένα κύτταρα περιφερικού αίματος με τη χρήση μαγνητικών bead απομόνωσης για την AS-PCR [124]. Αναφορικά με την ευαισθησία ανίχνευσης της μετάλλαξης L265P του γονιδίου MYD88, έχει δειχθεί ότι η AS-PCR αποτελεί μια αρκετά ευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης της μετάλλαξης στα καρκινικά κύτταρα της τάξεως του 1.25%, παρόλο που το χαμηλό φορτίο της νόσου (όπως αυτό προσδιορίζεται με <10% διήθηση του μυελού των οστών από κλωνικά λεμφοπλασματοκύτταρα) μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα [126]. Τα ευρήματα της μελέτης μας επιβεβαιώνουν τα ανωτέρω, καθώς ήταν δυνατή η ανίχνευση της μετάλλαξης L265P στο cfDNA από περιφερικό αίμα με τη μέθοδο

της AS-PCR και της άμεσης αλληλούχισης ακόμα και σε ασθενείς με πολύ χαμηλή διήθηση του οστικού μυελού της τάξεως του 5%.

Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα δεδομένα από τη δημοσίευση των Drandi και συνεργατών σύμφωνα με τα οποία είναι δυνατή η ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου MYD88 σε cfDNA με την ιδιαίτερα ευαίσθητη τεχνική της ψηφιακής droplet PCR [127]. Τα αποτελέσματα από το cfDNA παρουσίασαν υψηλού βαθμού συσχέτιση με αυτά από το tDNA, με διάμεσο αριθμό μετάλλαξης 1.4×10^{-2} και 1.92×10^{-2} , αντίστοιχα. Η τεχνική της ψηφιακής droplet PCR έχει επίσης αναδειχθεί ως ιδιαίτερα χρήσιμη μέθοδος για την ανίχνευση μεταλλάξεων του MYD88 σε δείγματα cfDNA από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών που πάσχουν από πρωτοπαθή λεμφώματα του κεντρικού νευρικού συστήματος καθώς και κατά τη διερεύνηση και τη διαφορική διάγνωση του συνδρόμου Bing Neel σε ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström [128, 129]. Παράλληλα, οι Demos και συνεργάτες παρουσίασαν πρόσφατα τα ενθαρρυντικά προκαταρκτικά αποτελέσματα της μελέτης τους, όπου αξιολογούν την ανίχνευση της μετάλλαξης L265P στο γονίδιο MYD88 στο cfDNA συγκριτικά με άλλες διαθέσιμες μεθόδους [130]. Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν τα ευρήματα της δικής μας μελέτης και αναδεικνύουν την αξία του cfDNA σε ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström και IgM παραπρωτεϊναιμία.

Αναφορικά με τον προσδιορισμό της ζυγωτίας, θα πρέπει να σημειωθούν πιθανοί περιορισμοί και να προτείνουμε την προσεκτική ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Πράγματι, η εφαρμοσθείσα μέθοδος δε θεωρείται ιδανική για δείγματα από CD19-επιλεγμένα κύτταρα και cfDNA. Στην πρώτη περίπτωση, η καθαρότητα του δείγματος, δηλαδή η ύπαρξη αμιγώς καρκινικών κυττάρων, πρέπει να είναι ιδιαίτερα υψηλή. Ωστόσο, δεν υπάρχει η δυνατότητα να αποδείξουμε ότι ο πληθυσμός μας δεν εμπεριέχει φυσιολογικά, μη καρκινικά CD19 θετικά κύτταρα. Με αυτό το δεδομένο,

η παρουσία ενός «αγρίου τύπου» αλληλομόρφου μπορεί να αποτελεί απλά μια ένδειξη πρόσμειξης του δείγματος με φυσιολογικά B-λεμφοκύτταρα. Αυτός ο προβληματισμός είναι ακόμα πιο έκδηλος στις περιπτώσεις με χαμηλό φορτίο νόσου όπως στους ασθενείς με IgM MGUS ή μακροσφαιριναιμία Waldenström σε ύφεση. Στη δεύτερη περίπτωση, το απομονωθέν cfDNA του όγκου αποτελεί μόνο ένα κλάσμα του συνολικού cfDNA. Η παρουσία, λοιπόν, ενός «αγρίου τύπου» αλληλομόρφου μεμονωμένα δεν είναι δυνατό να θεωρηθεί ισχυρή απόδειξη της ετεροζυγωτίας.

Ενας επιπλέον περιορισμός της αξιολόγησης του cfDNA και εγγενώς των υγρών βιοψιών συνίσταται στην ανάγκη προσδιορισμού κλωνικών αιμοποιητικών μεταλλάξεων απροσδιορίστου δυναμικού (clonal haematopoietic mutations of indeterminate potential – CHIP) [131]. Ο όρος αναφέρεται σε σωματικές μεταλλάξεις που συσσωρεύονται με το γήρας στα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα και μπορεί να οδηγήσουν σε κλωνικό πολλαπλασιασμό χωρίς να υπάρχει κακόηθες δυναμικό [132]. Η παρουσία αυτών των μεταλλάξεων μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ειδικότητα των μεθόδων υγρής βιοψίας. Γι'αυτό το λόγο ο προσδιορισμός τους σε υγιείς πληθυσμούς είναι σε εξέλιξη, ώστε να αναπτυχθούν αντίστοιχοι μέθοδοι φιλτραρίσματος των αποτελεσμάτων [133].

Η ελάχιστη επεμβατική τεχνική του cfDNA θα μπορούσε να θεωρηθεί μια συμφέρουσα μέθοδος ως προς την ισορροπία κόστους και οφέλους. Αποφεύγονται οι κίνδυνοι και η δυσανασχέτηση του ασθενούς που σχετίζονται με τη διενέργεια αναρρόφησης του μυελού των οστών. Επιπλέον, παρακάμπτεται η χρονοβόρος διαδικασία επιλογής των CD19+ κυττάρων και η εξαγωγή του tDNA είτε από το μυελό των οστών είτε από το περιφερικό αίμα. Ακόμα πιο σημαντικό είναι ότι η τεχνική του cfDNA φαίνεται να είναι αντιπροσωπευτική του συνολικού φορτίου τόσο

της εξωμυελικής νόσου όσο και ολόκληρου του μυελού των οστών. Σε αντίθεση με την οστεομυελική βιοψία και αναρρόφηση, δεν προσφέρει στοιχεία αποκλειστικά και μόνο από το συγκεκριμένο σημείο της δειγματοληψίας, το οποίο μπορεί να μην αντικατοπτρίζει επαρκώς την κλωνική ετερογένεια και τη μεταβλητή κατανομή των κλωνικών πληθυσμών στο μυελό των οστών. Η εφαρμογή της ανάλυσης του cfDNA προσφέρει τη δυνατότητα για μια ελάχιστα επεμβατική μέθοδο με συνεχώς αυξανόμενο εύρος εφαρμογών ως προς την κατηγοριοποίηση των ασθενών σύμφωνα με τη γενετική τους ταυτότητα.

Επιπλέον, η ανάλυση του cfDNA θα μπορούσε να άρει την ανάγκη για πραγματοποίηση επαναληπτικής οστεομυελικής εξέτασης σε ασθενείς με διάγνωση IgM μονοκλωνικής γαμμαπάθειας, για τους οποίους δεν είναι γνωστή η ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης L265P του γονιδίου MYD88 και των μεταλλάξεων του γονιδίου CXCR4. Η συμβατική ανίχνευση των μεταλλάξεων σε tDNA από αναρρόφηση μυελού των οστών θα μπορούσε να περιοριστεί μόνο στους ασθενείς με ασαφή αποτελέσματα cfDNA. Προς αυτή την κατεύθυνση, περαιτέρω εφαρμογή της μεθόδου σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών σε διαφορετικές χρονικές στιγμές είναι απαραίτητη ώστε να αξιολογηθεί η δυνατότητα του cfDNA να ανιχνεύσει γενετικές μεταβολές και να μας παρέχει στοιχεία για τη δυναμική εξέλιξη της κακοήθειας.

VII. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η ανάλυση του cfDNA περιφερικού αίματος ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström και IgM μονοκλωνικές γαμμαπάθειες αποτελεί μια ελάχιστα επεμβατική, και ταυτόχρονα ευαίσθητη μέθοδο που μας παρέχει πολλές πληροφορίες ώστε να αξιολογούμε την ύπαρξη ή όχι μεταλλάξεων στα γονίδια MYD88 και CXCR4. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα της ανάλυσης του cfDNA έδειξαν υψηλό βαθμό συμφωνίας με τα αποτελέσματα της εξέτασης CD19+ επιλεγμένων κυττάρων από το μυελό των οστών. Η ανάλυση cfDNA περιφερικού αίματος θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για την αρχική αξιολόγηση της μετάλλαξης L265P του γονιδίου MYD88 και των μεταλλάξεων του γονιδίου CXCR4, αντικατοπτρίζοντας το ολικό φορτίο της νόσου σε ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström. Οι προοπτικές της μεθόδου είναι πολλές και αναμένει να διευκρινιστεί ο ρόλος της στον διαγνωστικό αλγόριθμο και στη θεραπευτική των ασθενών με μακροσφαιριναιμία Waldenström στην εποχή της εξατομικευμένης ιατρικής.

VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006; 354: 1362-1369.
2. Turesson I, Kovalchik SA, Pfeiffer RM et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and risk of lymphoid and myeloid malignancies: 728 cases followed up to 30 years in Sweden. *Blood* 2014; 123: 338-345.
3. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2003; 102: 3759-3764.
4. Mailankody S, Mena E, Yuan CM et al. Molecular and biologic markers of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2010; 51: 2159-2170.
5. Vavricka SR, Burri E, Beglinger C et al. Serum protein electrophoresis: an underused but very useful test. *Digestion* 2009; 79: 203-210.
6. Landgren O, Graubard BI, Katzmann JA et al. Racial disparities in the prevalence of monoclonal gammopathies: a population-based study of 12,482 persons from the National Health and Nutritional Examination Survey. *Leukemia* 2014; 28: 1537-1542.
7. Treon SP. How I treat Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2009; 114: 2375-2385.
8. Gavriatopoulou M, Terpos E, Kastritis E, Dimopoulos MA. Current treatment options and investigational drugs for Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Expert Opin Investig Drugs* 2017; 26: 197-205.
9. Mailankody S, Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and Waldenstrom's macroglobulinemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2016; 29: 187-193.

10. Kyle RA, Benson JT, Larson DR et al. Progression in smoldering Waldenstrom macroglobulinemia: long-term results. *Blood* 2012; 119: 4462-4466.
11. Bustoros M, Sklavenitis-Pistofidis R, Kapoor P et al. Progression Risk Stratification of Asymptomatic Waldenstrom Macroglobulinemia. *J Clin Oncol* 2019; 37: 1403-1411.
12. Buske C, Leblond V, Dimopoulos M et al. Waldenstrom's macroglobulinaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 Suppl 6: vi155-159.
13. Dimopoulos MA, Kyle RA, Anagnostopoulos A, Treon SP. Diagnosis and management of Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1564-1577.
14. Buske C, Leblond V. How to manage Waldenstrom's macroglobulinemia. *Leukemia* 2013; 27: 762-772.
15. Kastiris E, Kyrtsolis MC, Morel P et al. Competing risk survival analysis in patients with symptomatic Waldenstrom macroglobulinemia: the impact of disease unrelated mortality and of rituximab-based primary therapy. *Haematologica* 2015; 100: e446-449.
16. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR et al. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *CA Cancer J Clin* 2016.
17. Treon SP, Hunter ZR, Aggarwal A et al. Characterization of familial Waldenstrom's macroglobulinemia. *Ann Oncol* 2006; 17: 488-494.
18. Gertz MA. Waldenstrom macroglobulinemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 2017; 92: 209-217.

19. Kapoor P, Paludo J, Vallumsetla N, Greipp PR. Waldenstrom macroglobulinemia: What a hematologist needs to know. *Blood Rev* 2015; 29: 301-319.
20. Avet-Loiseau H, Garand R, Lode L et al. 14q32 Translocations discriminate IgM multiple myeloma from Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30: 153-155.
21. Treon SP, Xu L, Yang G et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2012; 367: 826-833.
22. Treon SP, Xu L, Hunter Z. MYD88 Mutations and Response to Ibrutinib in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2015; 373: 584-586.
23. Morel P, Duhamel A, Gobbi P et al. International prognostic scoring system for Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2009; 113: 4163-4170.
24. Stone MJ, Bogen SA. Evidence-based focused review of management of hyperviscosity syndrome. *Blood* 2012; 119: 2205-2208.
25. Garcia-Sanz R, Montoto S, Torrequebrada A et al. Waldenstrom macroglobulinaemia: presenting features and outcome in a series with 217 cases. *Br J Haematol* 2001; 115: 575-582.
26. Singh A, Eckardt KU, Zimmermann A et al. Increased plasma viscosity as a reason for inappropriate erythropoietin formation. *J Clin Invest* 1993; 91: 251-256.
27. Ciccarelli BT, Patterson CJ, Hunter ZR et al. Hepcidin is produced by lymphoplasmacytic cells and is associated with anemia in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011; 11: 160-163.
28. Castillo JJ, Treon SP. How we manage Bing-Neel syndrome. *Br J Haematol* 2019; 187: 277-285.

29. Menke MN, Feke GT, McMeel JW, Treon SP. Ophthalmologic techniques to assess the severity of hyperviscosity syndrome and the effect of plasmapheresis in patients with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009; 9: 100-103.
30. Gavriatopoulou M, Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I et al. Elevated vWF Antigen Serum Levels Are Associated With Poor Prognosis, and Decreased Circulating ADAMTS-13 Antigen Levels Are Associated With Increased IgM Levels and Features of WM but not Increased vWF Levels in Patients With Symptomatic WM. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2019; 19: 23-28.
31. D'Sa S, Kersten MJ, Castillo JJ et al. Investigation and management of IgM and Waldenstrom-associated peripheral neuropathies: recommendations from the IWWM-8 consensus panel. *Br J Haematol* 2017; 176: 728-742.
32. Levine T, Pestronk A, Florence J et al. Peripheral neuropathies in Waldenstrom's macroglobulinaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 224-228.
33. Vlam L, Piepers S, Sutedja NA et al. Association of IgM monoclonal gammopathy with progressive muscular atrophy and multifocal motor neuropathy: a case-control study. *J Neurol* 2015; 262: 666-673.
34. Milani P, Merlini G. Monoclonal IgM-related AL amyloidosis. *Best Pract Res Clin Haematol* 2016; 29: 241-248.
35. Sachchithanatham S, Roussel M, Palladini G et al. European Collaborative Study Defining Clinical Profile Outcomes and Novel Prognostic Criteria in Monoclonal Immunoglobulin M-Related Light Chain Amyloidosis. *J Clin Oncol* 2016; 34: 2037-2045.

36. Roccaro AM, Sacco A, Jia X et al. microRNA-dependent modulation of histone acetylation in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2010; 116: 1506-1514.
37. Kastritis E, Kyrtsolis MC, Hadjiharissi E et al. Validation of the International Prognostic Scoring System (IPSS) for Waldenstrom's macroglobulinemia (WM) and the importance of serum lactate dehydrogenase (LDH). *Leuk Res* 2010; 34: 1340-1343.
38. Kastritis E, Morel P, Duhamel A et al. A revised international prognostic score system for Waldenstrom's macroglobulinemia. *Leukemia* 2019; 33: 2654-2661.
39. Dimopoulos MA, Kastritis E, Owen RG et al. Treatment recommendations for patients with Waldenstrom macroglobulinemia (WM) and related disorders: IWWM-7 consensus. *Blood* 2014; 124: 1404-1411.
40. Dimopoulos MA, Kastritis E, Ghobrial IM. Waldenstrom's macroglobulinemia: a clinical perspective in the era of novel therapeutics. *Ann Oncol* 2016; 27: 233-240.
41. Owen RG, Pratt G, Auer RL et al. Guidelines on the diagnosis and management of Waldenstrom macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 2014; 165: 316-333.
42. Leblond V, Kastritis E, Advani R et al. Treatment recommendations from the Eighth International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Blood* 2016; 128: 1321-1328.
43. Kapoor P, Ansell SM, Fonseca R et al. Diagnosis and Management of Waldenstrom Macroglobulinemia: Mayo Stratification of Macroglobulinemia and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Guidelines 2016. *JAMA Oncol* 2017.
44. Dimopoulos MA, Trotman J, Tedeschi A et al. Ibrutinib for patients with rituximab-refractory Waldenstrom's macroglobulinaemia (iNNOVATE): an open-

label substudy of an international, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18: 241-250.

45. Dimopoulos MA, Kastritis E, Roussou M et al. Rituximab-based treatments in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009; 9: 59-61.

46. Gavriatopoulou M, Garcia-Sanz R, Kastritis E et al. BDR in newly diagnosed patients with WM: final analysis of a phase 2 study after a minimum follow-up of 6 years. *Blood* 2017; 129: 456-459.

47. Castillo JJ, Treon SP. What is new in the treatment of Waldenstrom macroglobulinemia? *Leukemia* 2019; 33: 2555-2562.

48. Kyle RA, Treon SP, Alexanian R et al. Prognostic markers and criteria to initiate therapy in Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30: 116-120.

49. Kapoor P, Ansell SM, Fonseca R et al. Diagnosis and Management of Waldenstrom Macroglobulinemia: Mayo Stratification of Macroglobulinemia and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Guidelines 2016. *JAMA Oncol* 2017; 3: 1257-1265.

50. Kastritis E, Gavriatopoulou M, Kyrtsonis MC et al. Dexamethasone, rituximab, and cyclophosphamide as primary treatment of Waldenstrom macroglobulinemia: final analysis of a phase 2 study. *Blood* 2015; 126: 1392-1394.

51. Rummel MJ, Niederle N, Maschmeyer G et al. Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2013; 381: 1203-1210.

52. Ghobrial IM, Xie W, Padmanabhan S et al. Phase II trial of weekly bortezomib in combination with rituximab in untreated patients with Waldenstrom Macroglobulinemia. *Am J Hematol* 2010; 85: 670-674.
53. Treon SP, Ioakimidis L, Soumerai JD et al. Primary therapy of Waldenstrom macroglobulinemia with bortezomib, dexamethasone, and rituximab: WMCTG clinical trial 05-180. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3830-3835.
54. Treon SP, Tripsas CK, Meid K et al. Ibrutinib in previously treated Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2015; 372: 1430-1440.
55. Dimopoulos MA, Tedeschi A, Trotman J et al. Phase 3 Trial of Ibrutinib plus Rituximab in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2018; 378: 2399-2410.
56. Treon SP, Hanzis C, Manning RJ et al. Maintenance Rituximab is associated with improved clinical outcome in rituximab naive patients with Waldenstrom Macroglobulinaemia who respond to a rituximab-containing regimen. *Br J Haematol* 2011; 154: 357-362.
57. Kastritis E, Leblond V, Dimopoulos MA et al. Waldenstrom's macroglobulinaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018; 29: iv41-iv50.
58. Leblond V, Johnson S, Chevret S et al. Results of a randomized trial of chlorambucil versus fludarabine for patients with untreated Waldenstrom macroglobulinemia, marginal zone lymphoma, or lymphoplasmacytic lymphoma. *J Clin Oncol* 2013; 31: 301-307.
59. Kyriakou C, Canals C, Sibon D et al. High-dose therapy and autologous stem-cell transplantation in Waldenstrom macroglobulinemia: the Lymphoma Working

Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2227-2232.

60. Kyriakou C, Canals C, Cornelissen JJ et al. Allogeneic stem-cell transplantation in patients with Waldenstrom macroglobulinemia: report from the Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4926-4934.

61. Owen RG, Kyle RA, Stone MJ et al. Response assessment in Waldenstrom macroglobulinaemia: update from the VIth International Workshop. *Br J Haematol* 2013; 160: 171-176.

62. Castillo JJ, Gustine J, Meid K et al. Histological transformation to diffuse large B-cell lymphoma in patients with Waldenstrom macroglobulinemia. *American Journal of Hematology* 2016; 91: 1032-1035.

63. Leleu X, Soumerai J, Roccaro A et al. Increased incidence of transformation and myelodysplasia/acute leukemia in patients with Waldenstrom macroglobulinemia treated with nucleoside analogs. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: 250-255.

64. Castillo JJ, Olszewski AJ, Hunter ZR et al. Incidence of secondary malignancies among patients with Waldenstrom macroglobulinemia: An analysis of the SEER database. *Cancer* 2015; 121: 2230-2236.

65. Yang G, Zhou Y, Liu X et al. A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2013; 122: 1222-1232.

66. Liu X, Hunter ZR, Xu L et al. Targeting Myddosome Assembly in Waldenstrom Macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 2017; 177: 808-813.

67. Hunter ZR, Yang G, Xu L et al. Genomics, Signaling, and Treatment of Waldenstrom Macroglobulinemia. *J Clin Oncol* 2017; 35: 994-1001.

68. Yang G, Buhrlage SJ, Tan L et al. HCK is a survival determinant transactivated by mutated MYD88, and a direct target of ibrutinib. *Blood* 2016; 127: 3237-3252.
69. Burnworth B, Wang Z, Singleton TP et al. Clone-specific MYD88 L265P and CXCR4 mutation status can provide clinical utility in suspected Waldenstrom macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphoma. *Leuk Res* 2016; 51: 41-48.
70. Xu L, Hunter ZR, Yang G et al. MYD88 L265P in Waldenstrom macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood* 2013; 121: 2051-2058.
71. Cao XX, Meng Q, Cai H et al. Detection of MYD88 L265P and WHIM-like CXCR4 mutation in patients with IgM monoclonal gammopathy related disease. *Ann Hematol* 2017.
72. Landgren O, Staudt L. MYD88 L265P somatic mutation in IgM MGUS. *N Engl J Med* 2012; 367: 2255-2256; author reply 2256-2257.
73. Poulain S, Roumier C, Decambon A et al. MYD88 L265P mutation in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2013; 121: 4504-4511.
74. Treon SP, Cao Y, Xu L et al. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2014; 123: 2791-2796.
75. Treon SP, Gustine J, Xu L et al. MYD88 wild-type Waldenstrom Macroglobulinaemia: differential diagnosis, risk of histological transformation, and overall survival. *Br J Haematol* 2018; 180: 374-380.

76. Abeykoon JP, Paludo J, King RL et al. MYD88 mutation status does not impact overall survival in Waldenstrom macroglobulinemia. *Am J Hematol* 2018; 93: 187-194.
77. Zanwar S, Abeykoon JP, Durot E et al. Impact of MYD88(L265P) mutation status on histological transformation of Waldenstrom Macroglobulinemia. *Am J Hematol* 2019.
78. Papanota AM, Ntanasis-Stathopoulos I, Kastritis E et al. Evaluating ibrutinib in the treatment of symptomatic Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Blood Med* 2019; 10: 291-300.
79. Gavriatopoulou M, Ntanasis-Stathopoulos I, Kastritis E, Dimopoulos MA. How I treat rituximab refractory patients with WM. *Oncotarget* 2018; 9: 36824-36825.
80. Paludo J, Abeykoon JP, Shreders A et al. Bendamustine and rituximab (BR) versus dexamethasone, rituximab, and cyclophosphamide (DRC) in patients with Waldenstrom macroglobulinemia. *Ann Hematol* 2018; 97: 1417-1425.
81. Laribi K, Poulain S, Willems L et al. Bendamustine plus rituximab in newly-diagnosed Waldenstrom macroglobulinaemia patients. A study on behalf of the French Innovative Leukaemia Organization (FILO). *Br J Haematol* 2019; 186: 146-149.
82. Ngo HT, Leleu X, Lee J et al. SDF-1/CXCR4 and VLA-4 interaction regulates homing in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2008; 112: 150-158.
83. Castillo JJ, Hunter ZR, Yang G, Treon SP. Novel approaches to targeting MYD88 in Waldenstrom macroglobulinemia. *Expert Rev Hematol* 2017; 10: 739-744.

84. Hunter ZR, Xu L, Yang G et al. The genomic landscape of Waldenstrom macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood* 2014; 123: 1637-1646.
85. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* 2003; 34: 70-74.
86. Hunter ZR, Xu L, Yang G et al. Transcriptome sequencing reveals a profile that corresponds to genomic variants in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2016; 128: 827-838.
87. Poulain S, Roumier C, Venet-Caillault A et al. Genomic Landscape of CXCR4 Mutations in Waldenstrom Macroglobulinemia. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 1480-1488.
88. Treon SP, Gustine J, Meid K et al. Ibrutinib Monotherapy in Symptomatic, Treatment-Naive Patients With Waldenstrom Macroglobulinemia. *J Clin Oncol* 2018; 36: 2755-2761.
89. Cao Y, Hunter ZR, Liu X et al. The WHIM-like CXCR4(S338X) somatic mutation activates AKT and ERK, and promotes resistance to ibrutinib and other agents used in the treatment of Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Leukemia* 2015; 29: 169-176.
90. Roccaro AM, Sacco A, Jimenez C et al. C1013G/CXCR4 acts as a driver mutation of tumor progression and modulator of drug resistance in lymphoplasmacytic lymphoma. *Blood* 2014; 123: 4120-4131.
91. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017.

92. Pantel K, Alix-Panabieres C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med* 2010; 16: 398-406.
93. Batth IS, Mitra A, Manier S et al. Circulating tumor markers: harmonizing the yin and yang of CTCs and ctDNA for precision medicine. *Ann Oncol* 2017; 28: 468-477.
94. Merker JD, Oxnard GR, Compton C et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol* 2018; 36: 1631-1641.
95. Teutsch SM, Bradley LA, Palomaki GE et al. The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group. *Genet Med* 2009; 11: 3-14.
96. Micheel C, Nass S, Omenn G. *Evolution of Translational Omics: Lessons Learned and the Path Forward*. National Academies Press, Washington, DC. 2012.
97. Klein E, Hubbell E, Maddala T et al. Development of a comprehensive cell-free DNA (cfDNA) assay for early detection of multiple tumor types: The Circulating Cell-free Genome Atlas (CCGA) study. *J Clin Oncol* 2018; 36: 12021-12021
98. Siravegna G, Mussolin B, Venesio T et al. How liquid biopsies can change clinical practice in oncology. *Ann Oncol* 2019; 30: 1580-1590.
99. Fernandez-Garcia D, Hills A, Page K et al. Plasma cell-free DNA (cfDNA) as a predictive and prognostic marker in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2019; 21: 149.
100. Hamfjord J, Guren TK, Dajani O et al. Total circulating cell-free DNA as a prognostic biomarker in metastatic colorectal cancer before first-line oxaliplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol* 2019; 30: 1088-1095.

101. Hanna GJ, Supplee JG, Kuang Y et al. Plasma HPV cell-free DNA monitoring in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer. *Ann Oncol* 2018; 29: 1980-1986.
102. Liu L, Toung JM, Jassowicz AF et al. Targeted methylation sequencing of plasma cell-free DNA for cancer detection and classification. *Ann Oncol* 2018; 29: 1445-1453.
103. Lee RJ, Gremel G, Marshall A et al. Circulating tumor DNA predicts survival in patients with resected high-risk stage II/III melanoma. *Ann Oncol* 2018; 29: 490-496.
104. Brancaccio M, Natale F, Falco G, Angrisano T. Cell-Free DNA Methylation: The New Frontiers of Pancreatic Cancer Biomarkers' Discovery. *Genes (Basel)* 2019; 11.
105. Li BT, Janku F, Jung B et al. Ultra-deep next-generation sequencing of plasma cell-free DNA in patients with advanced lung cancers: results from the Actionable Genome Consortium. *Ann Oncol* 2019; 30: 597-603.
106. Parseghian CM, Loree JM, Morris VK et al. Anti-EGFR-resistant clones decay exponentially after progression: implications for anti-EGFR re-challenge. *Ann Oncol* 2019; 30: 243-249.
107. Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV et al. Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. *J Thorac Oncol* 2018; 13: 1248-1268.
108. Seoane J, De Mattos-Arruda L, Le Rhun E et al. Cerebrospinal fluid cell-free tumour DNA as a liquid biopsy for primary brain tumours and central nervous system metastases. *Ann Oncol* 2019; 30: 211-218.

109. Sata H, Shibayama H, Maeda I et al. Quantitative polymerase chain reaction analysis with allele-specific oligonucleotide primers for individual IgH VDJ regions to evaluate tumor burden in myeloma patients. *Exp Hematol* 2015; 43: 374-381 e372.
110. Oberle A, Brandt A, Voigtlaender M et al. Monitoring multiple myeloma by next-generation sequencing of V(D)J rearrangements from circulating myeloma cells and cell-free myeloma DNA. *Haematologica* 2017; 102: 1105-1111.
111. Biancon G, Gimondi S, Vendramin A et al. Noninvasive Molecular Monitoring in Multiple Myeloma Patients Using Cell-Free Tumor DNA: A Pilot Study. *J Mol Diagn* 2018; 20: 859-870.
112. Rustad EH, Coward E, Skytoen ER et al. Monitoring multiple myeloma by quantification of recurrent mutations in serum. *Haematologica* 2017; 102: 1266-1272.
113. Mithraprabhu S, Khong T, Ramachandran M et al. Circulating tumour DNA analysis demonstrates spatial mutational heterogeneity that coincides with disease relapse in myeloma. *Leukemia* 2017; 31: 1695-1705.
114. Guo G, Raje NS, Seifer C et al. Genomic discovery and clonal tracking in multiple myeloma by cell-free DNA sequencing. *Leukemia* 2018; 32: 1838-1841.
115. Mithraprabhu S, Sirdesai S, Chen M et al. Circulating Tumour DNA Analysis for Tumour Genome Characterisation and Monitoring Disease Burden in Extramedullary Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci* 2018; 19.
116. Mithraprabhu S, Morley R, Khong T et al. Monitoring tumour burden and therapeutic response through analysis of circulating tumour DNA and extracellular RNA in multiple myeloma patients. *Leukemia* 2019; 33: 2022-2033.
117. MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit. User guide. Isolation of cfDNA from plasma and serum samples. Catalogue number A29319. Publication Number MAN0014327. Revision C.0. Thermo Fisher Scientific Inc. In. 2016.

118. Mori N, Ohwashi M, Yoshinaga K et al. L265P mutation of the MYD88 gene is frequent in Waldenstrom's macroglobulinemia and its absence in myeloma. *PLoS One* 2013; 8: e80088.
119. Bagratuni T, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M et al. Detection of MYD88 and CXCR4 mutations in cell-free DNA of patients with IgM monoclonal gammopathies. *Leukemia* 2018; 32: 2617-2625.
120. Mithraprabhu S, Spencer A. Circulating tumour DNA analysis in multiple myeloma. *Oncotarget* 2017; 8: 90610-90611.
121. Gachard N, Parrens M, Soubeyran I et al. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenstrom macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia* 2013; 27: 183-189.
122. Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S et al. Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood* 2013; 121: 2522-2528.
123. Growkova K, Kufova Z, Sevcikova T et al. Diagnostic Tools of Waldenstroms Macroglobulinemia - Best Possibilities for Non-invasive and Long-term Disease Monitoring. *Klin Onkol* 30: 81-91.
124. Xu L, Hunter ZR, Yang G et al. Detection of MYD88 L265P in peripheral blood of patients with Waldenstrom's Macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia* 2014; 28: 1698-1704.
125. Landgren O, Tajeja N. MYD88 and beyond: novel opportunities for diagnosis, prognosis and treatment in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Leukemia* 2014; 28: 1799-1803.

126. Staiger AM, Ott MM, Parmentier S et al. Allele-specific PCR is a powerful tool for the detection of the MYD88 L265P mutation in diffuse large B cell lymphoma and decalcified bone marrow samples. *Br J Haematol* 2015; 171: 145-148.
127. Drandi D, Genuardi E, Dogliotti I et al. Highly sensitive MYD88(L265P) mutation detection by droplet digital polymerase chain reaction in Waldenstrom macroglobulinemia. *Haematologica* 2018; 103: 1029-1037.
128. Hiemcke-Jiwa LS, Minnema MC, Radersma-van Loon JH et al. The use of droplet digital PCR in liquid biopsies: A highly sensitive technique for MYD88 p.(L265P) detection in cerebrospinal fluid. *Hematol Oncol* 2018; 36: 429-435.
129. Hattori K, Sakata-Yanagimoto M, Suehara Y et al. Clinical significance of disease-specific MYD88 mutations in circulating DNA in primary central nervous system lymphoma. *Cancer Sci* 2018; 109: 225-230.
130. Demos M, Xu L, Tsakmaklis N et al. Cell-Free DNA as Alternative to Bone Marrow CD19+ Selection for Diagnostic MYD88 L265P in Waldenstrom's Macroglobulinemia International Myeloma Workshop, Boston, 2019, SP-185
131. Abbosh C, Swanton C, Birkbak NJ. Clonal haematopoiesis: a source of biological noise in cell-free DNA analyses. *Ann Oncol* 2019; 30: 358-359.
132. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* 2015; 126: 9-16.
133. Liu J, Chen X, Wang J et al. Biological background of the genomic variations of cf-DNA in healthy individuals. *Ann Oncol* 2019; 30: 464-470.