



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή

Μελέτη της Βιολογίας του Πολλαπλού Μυελώματος: Διερεύνηση Κυτταρικών Πληθυσμών και η Προγνωστική Αξιοποίησή τους

ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν. 5343/1932, άρθρο 202) και το κείμενο της Διδακτορικής Διατριβής δεν αποτελεί προϊόν λογοκλοπής

Μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Ουρανία Τσιτσιλώνη – Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ (Επιβλέπουσα)

Ευάγγελος Τέρπος – Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Ανδρέας Σκορίλας – Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Ουρανία Τσιτσιλώνη – Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ευάγγελος Τέρπος – Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Ανδρέας Σκορίλας – Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ευστάθιος Καστρίτης - Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Δημήτριος Στραβοπόδης – Αν. Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Μαργαρίτης Αυγέρης – Αν. Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Παναγιώτης Παπαγιώργης – Αν. Καθηγητής, Ευρωπαϊκό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Περίληψη

Το πολλαπλούν μυέλωμα (ΠΜ) είναι μια αιματολογική κακοήθεια, η οποία χαρακτηρίζεται από συσσώρευση κακοήθων πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών (ΜΟ). Επιπρόσθετα με τις γενετικές ανωμαλίες οι οποίες εμφανίζονται στους κλώνους ΠΜ, τα πλασματοκύτταρα επηρεάζονται και από το μικροπεριβάλλον του καρκίνου. Αρκετές εργαστηριακές μελέτες έχουν καταδείξει υποσχόμενους παράγοντες, που όμως δεν έχουν οδηγήσει σε κλινικό όφελος. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε περιορισμούς κατά την *ex vivo* δοκιμή του φαρμάκου, η οποία πιθανώς να έχει γίνει χωρίς το μικροπεριβάλλον της νόσου, αλλά και την έλλειψη της προσομοίωσης της τρισδιάστατης αρχιτεκτονικής του περιβάλλοντος του ΜΟ. Συνεπώς, ο χαρακτηρισμός της αποτελεσματικότητας των νέων παραγόντων θεραπείας δεν θα πρέπει μόνο να εκτιμά την άμεση επίδρασή τους στα μυελωματικά κύτταρα, αλλά να λαμβάνει υπόψιν και το συνολικό μικροπεριβάλλον της νόσου.

Βασικός σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη του μικροπεριβάλλοντος στο ΠΜ και η διερεύνηση των υποπληθυσμών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτό. Στο πλαίσιο αυτό, αρχικά διερευνήθηκαν τα υπάρχοντα μοντέλα μελέτης στο ΠΜ υπό το πρίσμα της κλινικής αξιοποίησης. Στη συνέχεια, έγινε *de novo* κατασκευή τρισδιάστατου *ex vivo* μοντέλου μελέτης με σκοπό τη διερεύνηση της προστατευτικής δράσης του μικροπεριβάλλοντος στα μυελωματικά κύτταρα υπό την επίδραση θεραπευτικών παραγόντων. Τέλος, με ευρεία ανοσοφαινοτύπηση σε δείγματα ΜΟ και περιφερικού αίματος (ΠΑ) ασθενών με ΠΜ, διευρύναμε την αναζήτηση υποπληθυσμών και αναζητήθηκαν συσχετίσεις με τις διαγνωστικές και θεραπευτικές πληροφορίες των ασθενών.

Κατά τη διερεύνηση των δημοσιευμένων *ex vivo* μοντέλων μελέτης τέθηκαν κριτήρια τα οποία πληρούνταν στο σύνολό τους, ώστε το προτεινόμενο μοντέλο να θεωρείται ότι προσομοιάζει το μικροπεριβάλλον της νόσου, αλλά και να δύναται να αξιοποιηθεί κλινικά. Τελικώς επιλέχθηκαν 15 δημοσιεύσεις οι οποίες πληρούσαν όλα τα κριτήρια και περιλάμβαναν μοντέλα με ικρίωματα γέλης, μοντέλα στερεών ικρίωμάτων, μοντέλα βιοαντιδραστήρα, μοντέλα μικρορευστότητας (microfluidics) και μοντέλα με χρήση πειραματόζων. Υπό αυτά τα δεδομένα αποφασίσθηκε η δοκιμή ικρίωμάτων γέλης και στερεών ικρίωμάτων.

Για την πειραματική κατασκευή του *ex vivo* μοντέλου αξιοποιήθηκαν οι μυελωματικές κυτταρικές σειρές U266 και H929, ενώ με χρήση μεσεγγυματικών στρωματικών κυττάρων μυελικής προέλευσης (BM-MSCs) από ασθενείς με ΠΜ μοντελοποιήθηκε το μικροπεριβάλλον της νόσου. Οι θεραπευτικοί παράγοντες που επιλέχθηκαν ήταν η δοξορουβικίνη (ανθρακυκλίνη) και η βορτεζομίμη (αναστολέας πρωτεασώματος). Αρχικά μελετήθηκε η ανάπτυξη των μυελωματικών

κυτταρικών, η συγκέντρωση ημίσειας αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (IC50) από τους παράγοντες και έγινε απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών BM-MSCs. Στη συνέχεια αξιολογήθηκαν μέθοδοι μέτρησης βιωσιμότητας των μυελωματικών κυττάρων, δηλαδή η μέθοδος MTT, η κυτταρομετρία ροής, η οπτική μέτρηση και ο αλγόριθμος αναγνώρισης εικόνας. Ο αλγόριθμος αναγνώρισης εικόνας αναπτύχθηκε ειδικά για αυτή την εφαρμογή και με τη χρήση του καταμετρώνται τα κύτταρα που έχουν χρωσθεί με κυανού του τρυπανίου. Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε ότι ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες όλες οι μέθοδοι εκτίμησης της βιωσιμότητας των μυελωματικών κυττάρων μπορούν να αξιοποιηθούν κατά περίπτωση.

Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η κατασκευή καλλιιεργειών με χρήση υδρογέλης, αλλά λόγω δυσκολίας στη μέτρηση της βιωσιμότητας των συγκαλλιιεργειών στα ικρίωματα υδρογέλης, συνεχίσαμε την ανάπτυξη του μοντέλου με στερεά ικρίωματα γαλακτικού οξέως (PLA). Τα ικρίωματα PLA που χρησιμοποιήθηκαν είχαν δομή πλέγματος με μέγεθος πόρου από 60 έως 120 μM και τοποθετήθηκαν σε μικροπλάκες 96 φρεατίων. Με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης διαπιστώθηκε ότι τα BM-MSCs αναπτύσσονται στα ικρίωματα, εκτεινόμενα ανάμεσα στις ίνες του πλέγματος, επομένως μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στο *ex vivo* μοντέλο. Έχοντας μελετήσει τα επιμέρους στοιχεία, το συνολικό *ex vivo* μοντέλο που περιλαμβάνει ικρίωματα PLA, δοκιμάστηκε με την κυτταρική σειρά H929 σε συγκαλλιιεργεία με BM-MSCs και υπό την επίδραση βορτεζομίμπης, και σε όλους τους τύπους ικρίωμάτων διαπιστώθηκε μεγαλύτερη βιωσιμότητα των μυελωματικών κυττάρων συγκριτικά με τη δισδιάστατη μονοκαλλιιεργεία.

Επεκτείνοντας τη μελέτη μας πέραν των μεσεγχυματικών κυττάρων, προχωρήσαμε σε ευρεία ανοσοφαινοτύπηση του μικροπεριβάλλοντος χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Εξετάστηκε διεξοδικά το ανοσολογικό προφίλ 94 ασθενών με ΠΜ, διερευνώντας κυτταρικούς υποπληθυσμούς μεταξύ των οποίων τα Β και Τ λεμφοκύτταρα και τους υποπληθυσμούς τους, τα Tregs, τα NK κύτταρα, και τα κατασταλτικά κύτταρα μυελικής προέλευσης (MDSCs). Ταυτόχρονα, αξιοποιήθηκε η πληροφορία για την ύπαρξη ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (EYN), καθότι οι ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη είχαν ελεγχθεί με κυτταρομετρία ροής επόμενης γενιάς για την παρουσία EYN σύμφωνα με το πρωτόκολλο του EuroFlow. Επίσης, ελέγχθηκαν πιθανοί συσχετισμοί των υποπληθυσμών με τα διάφορα στάδια της νόσου, το κυτταρογενετικό προφίλ και την ανταπόκριση των ασθενών στην εισαγωγική θεραπεία.

Από την αρχική ανάλυση σε δείγματα ΜΟ διαπιστώθηκε ότι η σύσταση του μικροπεριβάλλοντος του ΜΟ δεν εμφανίζει σημαντικές διαφορές στα διάφορα στάδια εξέλιξης του ΠΜ (MGUS, υφέρπον μύλωμα, ΠΜ, πλασματοκυτταρική λευχαιμία και ΠΜ σε πλήρη ύφεση), ενώ

το περιβάλλον του ΜΟ δεν αντικατοπτρίζει το περιβάλλον του ΠΑ σε ζεύγη δειγμάτων ΜΟ-ΠΑ των ίδιων ασθενών. Εξετάζοντας τις προγνωστικές πληροφορίες, βρέθηκε ότι το ανοσολογικό προφίλ διαφέρει στις διάφορες προγνωστικές ομάδες σύμφωνα με το διεθνές σύστημα σταδιοποίησης στο ΠΜ (ISS), αλλά και με το κυτταρογενετικό προφίλ. Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η απάντηση στη θεραπευτική αντιμετώπιση και βρέθηκε ότι σχετίζεται με συγκεκριμένη ανοσολογική υπογραφή κατά τη διάγνωση, ενώ αναλύοντας το ανοσολογικό προφίλ του ΜΟ μετά τη θεραπεία, διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς αρνητικοί για την παρουσία ΕΥΝ, έχουν ξεχωριστή ανοσολογική υπογραφή. Τέλος, αναλύοντας το ΠΑ ασθενών κατά την πλήρη ύφεση, βρέθηκε ότι το ποσοστό των παρθένων και των δραστικών/δραστικών-μνήμης CD4+ T λεμφοκυττάρων σχετίζονται με αρνητική ΕΥΝ και επιπλέον, κατασκευάσαμε έναν υπολογιστικό αλγόριθμο, όπου με βάση την έκφραση αυτών των υποπληθυσμών σε ανεξάρτητη ομάδα 20 ασθενών, επιτεύχθηκε η πρόβλεψη της ΕΥΝ με ευαισθησία 86% και ειδικότητα 85%.

Συνολικά, στο πλαίσιο αυτής της διατριβής κατασκευάστηκε ex vivo πλατφόρμα εξατομικευμένης εκτίμησης της ανταπόκρισης στη θεραπεία ασθενών με ΠΜ, η οποία δύναται να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μελέτες και διερευνήθηκαν οι κυτταρικοί υποπληθυσμοί στο περιβάλλον της νόσου. Δείχθηκε ότι το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον στο ΠΜ είναι δυναμικό και αποκτά διακριτά ανοσολογικά προφίλ στα διάφορα στάδια της νόσου όπως και στις διάφορες προγνωστικές ομαδοποιήσεις των ασθενών. Επιπλέον, αναδείχθηκε η ύπαρξη ανοσολογικής υπογραφής προγνωστικής αξίας, σχετιζόμενης με τη θεραπευτική ανταπόκριση και την παρουσία ΕΥΝ. Φαίνεται ότι η εξατομικευμένη ανάλυση του ανοσολογικού προφίλ στο ΠΜ μπορεί να συμβάλλει θετικά στη βελτιστοποίηση της θεραπευτικής διαδρομής των ασθενών.

Summary

Multiple myeloma (MM) is a hematologic malignancy characterized by the accumulation of malignant plasma cells in the bone marrow (BM). In addition to genetic aberrations, plasma cells are heavily influenced by the BM microenvironment. Several candidate agents have been identified through the outcome of laboratory research, but their predictive value has shown minimal clinical benefit. This could be due to *ex vivo* drug testing restrictions, such as the exclusion of the disease microenvironment in the assays performed and the lack of the 3D BM-structure simulation. Thus, the efficacy of new therapeutic agents should not only evaluate their direct effect on myeloma cells but consider the overall microenvironment of the disease.

The aim of this PhD thesis was to analyze the microenvironment in MM and to assess the relevant subpopulations that contribute to myeloma cell proliferation. Under the scope of evaluating current research in the field, we investigated existing MM models with clinical implications. Next, we constructed a *de novo* 3D model, aiming at the assessment of the protective effect of the microenvironment in MM cells following drug administration. Finally, utilizing deep immunophenotyping of BM and peripheral blood (PB) samples, we extended our research to the identification of the clinically and diagnostically most relevant subpopulations.

Initially, we set a number of criteria that should be fully fulfilled in order to consider a MM model effective in simulating the BM microenvironment and possibly be utilized in the clinical setting. Eventually, 15 studies were selected which included models using gel scaffolds, solid scaffolds, bioreactors, microfluidics and animal models. After thorough examination and evaluation of the aforementioned models, we proceeded to the selection of gel and solid scaffolds for our experiments.

For the set-up of the *ex vivo* model, we utilized the myeloma cell lines U266 and H929 and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from MM patients to simulate the MM microenvironment. Doxorubicin (an anthracycline) and bortezomib (a proteasome inhibitor) were selected as therapeutic agents for testing. Initially, we assessed the culture of MM cell lines, calculated the IC₅₀ values of the therapeutic agents and BM-MSCs were isolated and cultured from BM samples. We further tested and evaluated various viability assessment methods that were available in our lab, namely MTT, flow cytometry, manual optical count and an image recognition algorithm. The image recognition algorithm was developed specifically for the needs of this application and MM cell line counting was performed upon staining with trypan blue. In conclusion, depending on the experimental setup all methods for the assessment of myeloma cell viability can be utilized.

Next, we used gel scaffolds for myeloma cell cultures, but due to unexpected hurdles in assessing viability of MM cells in co-cultures (MM cell lines with BM-MSCs), we decided to finally test solid scaffolds. Disk-shaped Poly-lactic acid (PLA) porous scaffolds, with pores ranging from 60 to 120 μM were used, placed at the bottom of 96-well plates. Confocal scanning microscopy and electron scanning microscopy were employed for the study of BM-MSC growth and adherence on PLA scaffolds, and it was shown that BM-MSCs can tightly adhere on the scaffold fibers and extend between the pore spaces. Having examined the individual items of the ex vivo model, we combined all elements in an experimental set-up that included coculture of H929 cells with BM-MSCs on PLA scaffolds, under bortezomib treatment. By assessing the viability of H929 cells, we found higher viability rates of MM cells in all scaffolds compared to 2D cultures.

Extending our study beyond BM-MSCs, we proceeded to the deep immunophenotyping of the MM microenvironment using flow cytometry for the assessment of the immune profile of 94 MM patients. A wide panel of subpopulations were identified, including B and T lymphocytes and their subpopulations, Tregs, NK cells, and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). Additionally, minimal residual disease (MRD) assessment information was available, since patients' samples included in this study have been also analyzed for MRD detection according to the EuroFlow next-generation flow cytometry MRD protocol. The detected subpopulations were examined for their possible correlation with disease stages, the cytogenetic profile and patients' response to induction therapy.

Our initial analyses of BM samples across different disease stages (MGUS, smoldering myeloma, MM, plasmacytic leukemia and MM in complete remission) revealed that there are minimal differences of the populations' distribution. Also, by comparing paired PB and BM samples from the same patients, we found that the PB immune profile is not identical to that of the BM, thus BM samples cannot be substituted by liquid biopsy. Focusing on the diagnostic information of the patients, we found that the immune profile differs between different prognostic groups based on the International Staging System on MM (ISS) and the cytogenetic profile. Next, we investigated the immune profile at diagnosis in relation to response to therapy and found several population correlations, whereas patients achieving MRD negativity harbored a distinct immune signature after therapy. Lastly, our analysis focused on the PB of patients achieving complete response (CR) to therapy. Our results indicated that the relative frequencies of naïve and effector/effector memory CD4+ T cells were associated with MRD negativity. Based on this finding, we generated an algorithm for MRD prediction. By applying this algorithm to an independent cohort of 20 patients, the prediction of MRD status was achieved, with a sensitivity of 86% and a specificity of 85%.

Overall, in the context of this PhD thesis, we generated an ex vivo platform which enables the evaluation of a personalized therapy for MM and can be utilized in further studies. Moreover, immune subsets of the disease's microenvironment were assessed, showing that MM maintains an active microenvironmental profile, which differs across disease stages and prognostic groups by the expression of distinct immune signatures. The immune profiles are of prognostic significance in relation to response to therapy and MRD prediction. Personalized immune profiling of MM patients may positively contribute to the optimization of the selected therapeutic interventions on a personalized basis. Eventually, it may also lead to the improvement of the outcome of MM patients.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος Διδακτορικών Σπουδών του Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ανοσολογίας Ουρανίας Τσιτσιλώνη. Σε αυτή την τετραετή διαδρομή, συνέβαλλαν ουσιαστικά πολλοί συνεργάτες τους οποίους ευχαριστώ για τη συμπαράσταση, ενθάρρυνση, καθοδήγηση και πρακτική βοήθεια καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Κατ' αρχάς ευχαριστώ την κ. Ο. Τσιτσιλώνη για τη διαρκή επίβλεψη της διατριβής μου. Δρώντας με μητρικά ένστικτα με ενθάρρυνε να αναπτύξω τις ερευνητικές μου ιδέες, στάθηκε δίπλα μου και με καθοδήγησε ακόμη και στις πιο δύσκολες στιγμές. Η αλληλεπίδραση που είχαμε όλο αυτό τον καιρό με διαμόρφωσε σαν επιστήμονα, σαν επαγγελματία και σαν άνθρωπο.

Ευχαριστώ τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή, Δρ. Ι. Κωστόπουλο ο οποίος βρίσκεται δίπλα μου εδώ και περισσότερα από δέκα χρόνια με διάφορους ρόλους: ως σταθερός μου φίλος, ως συνομιλητής μου στις ερευνητικές μας αναζητήσεις, ως συνεργάτης σε πειραματικό και συγγραφικό επίπεδο και ως εμπειρότερος σύμβουλος στην πορεία της διατριβής. Η φιλία του και μόνο με τιμά.

Ευχαριστώ τον έταίρο Μεταδιδακτορικό Ερευνητή του εργαστηρίου μας Δρ. Ν. Ορολογά ο οποίος έχει υπάρξει για μένα φίλος, συνεργάτης, συνάδελφος και δάσκαλος. Τον ευχαριστώ επειδή με κράτησε στην οικογένεια της κυτταρομετρίας ροής, επειδή από το 2016 με παρότρυνε να συνεργαστώ με την κ. Ο. Τσιτσιλώνη και επειδή με βοήθησε σε όλη την πορεία της διατριβής μου.

Ευχαριστώ τα νέα παιδιά τα οποία συνεργάστηκαν μαζί μου στην προπτυχιακή τους εργασία σε κάθε έτος της διατριβής: Την Αναστασία, τον Ανδρέα, τον Ανέστη και τον Νίκο. Τους ευχαριστώ κυρίως επειδή πήρα μια γεύση της νέας γενιάς επιστημόνων και τους εύχομαι τα καλύτερα στην πορεία τους.

Ευχαριστώ τους Καθηγητές κ. Ε. Τέρπο και κ. Α. Σκορίλα οι οποίοι στήριξαν τη διατριβή μου με τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή από την αρχή της. Ο κ. Τέρπος δε, είχε εξ' αρχής την ιδέα της εφαρμογής της αναζήτησης ελάχιστης υπολειμματικής νόσου σε εργαστήριο εντός ΕΚΠΑ, κάτι που οδήγησε σε πλήθος εργασιών και ερευνητικών δραστηριοτήτων.

Ευχαριστώ τα τέσσερα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ε. Καστρίτη και τους Αναπληρωτές Καθηγητές κ. Δ. Στραβοπόδη, κ. Μ. Αυγέρη και κ. Π. Παπαγιώργη επειδή με τίμησαν με την συμμετοχή τους στο ανοικτό σεμινάριο και την Εξεταστική Επιτροπή, καθώς και για τα εποικοδομητικά σχόλια και ερωτήσεις. Επίσης ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στον καθηγητή κ. Ε. Καστρίτη ο οποίος συνέβαλλε έμπρακτα στην πορεία της διατριβής και η κλινική σκοπιά των γνώσεων του ήταν απαραίτητη στην ολοκλήρωση των δημοσιεύσεων.

Ευχαριστώ τα μέλη ΔΕΠ και το προσωπικό των Τομέων Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου και Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής για τη βοήθεια που μου προσέφεραν όποτε χρειάστηκε. Επίσης ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου μας, την Βιβή, τον Παντελή και την Χρυσάνθη οι οποίοι εξασφάλισαν την καθημερινή λειτουργία του σε υψηλό επίπεδο και με βοήθησαν σε αναρίθμητα πρακτικά ζητήματα.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Δρ. D. Portan και τον Καθηγητή κ. Β. Κωστόπουλο του Τμήματος Αεροναυπηγικής του Πανεπιστημίου Πατρών οι οποίοι μας παρείχαν τα στερεά ικρίωματα αλλά και μας συμβούλεψαν σχετικά με τη χρήση τους.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω την παρούσα εργασία στην Χριστίνα τον Άγγελο και τον Ορέστη. Η οικογένεια μου με στήριξε ουσιαστικά και αποτελεί τον βασικό λόγο για τον οποίο προσπαθώ συνεχώς να εξελίσομαι.

Κωνσταντίνος Παπαδημητρίου

Ιούλιος 2021

Στην Χριστίνα...

Στον Άγγελο...

Στον Ορέστη...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1. Πολλαπλούν μύελωμα.....	5
1.1.1 Γενικά στοιχεία.....	5
1.1.2 Επιδημιολογικά στοιχεία.....	6
1.1.3 Διάγνωση, σταδιοποίηση και ανταπόκριση στη θεραπεία.....	7
1.1.4 Θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	10
1.2 Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών στο πολλαπλούν μύελωμα.....	15
1.2.1 Μη κυτταρικό μικροπεριβάλλον.....	20
1.2.2 Οστεοβλάστες και οστεοκλάστες.....	22
1.2.3 T και NK κύτταρα.....	22
1.2.4 Ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα.....	24
1.2.5 Κατασταλτικά κύτταρα μυελικής προέλευσης.....	25
1.2.6 Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα μυελικής προέλευσης.....	26
1.2.7 Μακροφάγα σχετιζόμενα με τον καρκίνο.....	29
1.3 Ex vivo μοντέλα μελέτης.....	30
1.3.1 Γενικά στοιχεία για τις τρισδιάστατες καλλιέργειες.....	30
1.3.2 Οι τρισδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες ως μοντέλα μελέτης.....	31
1.3.3 Υδρογέλες.....	35
1.3.4 Στερεά ικρίωματα.....	36
1.4 Τρισδιάστατες καλλιέργειες στη μελέτη του καρκίνου.....	39
1.5 Η ανάγκη για εξατομικευμένη ex vivo πλατφόρμα στο πολλαπλούν μύελωμα.....	41
1.5.1 Ex vivo πλατφόρμες βασισμένες σε ικρίωματα γέλης.....	44
1.5.2 Συστήματα βιοαντιδραστήρων.....	47
1.5.3. Ex vivo μοντέλα σε συστήματα μικρορευστομηχανικής.....	47

1.6. Σκοπός μελέτης.....	49
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	51
2.1. Ομάδες μελέτης.....	53
2.1.1. Ομάδα μελέτης για ex vivo καλλιέργειες.....	54
2.1.2. Ομάδα μελέτης ανοσολογικού προφίλ.....	54
2.1.3. Συλλογή δειγμάτων.....	54
2.1.4. Κυτταρικές σειρές.....	55
2.2. Απομόνωση μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων μυελικής προέλευσης.....	55
2.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και βιωσιμότητας κυτταρικών εναιωρημάτων.....	58
2.4. Κατασκευή τρισδιάστατων κυτταροκαλλιιεργειών.....	59
2.5. Παρατήρηση ικριωμάτων με μικροσκοπία.....	63
2.5.1. Χρώση κυττάρων με χρωστική CFSE και παρατήρηση με μικροσκοπία φθορισμού.....	65
2.5.2. Προετοιμασία ικριωμάτων και παρατήρηση με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης.....	67
2.5.3. Προετοιμασία στερεών ικριωμάτων και παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης.....	69
2.6. Υπολογισμός συγκέντρωσης ημίσειας αναστολής (IC50) θεραπευτικών παραγόντων με χρήση δοκιμασίας MTT.....	70
2.7. Επεξεργασία δειγμάτων για έλεγχο έκφρασης επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής.....	72
2.7.1. Πρωτόκολλο εκτίμησης απόπτωσης/νέκρωσης κυτταρικών πληθυσμών με χρήση των χρώσεων Αννεξίνης-V και PI.....	73
2.7.2. Πρωτόκολλο μελέτης ανοσολογικού προφίλ λεμφοκυττάρων με χρήση επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών.....	74

2.7.3. Πρωτόκολλο μελέτης ανοσολογικού προφίλ κατασταλτικών κυττάρων μυελογενούς προέλευσης με χρήση επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών.....	76
2.8. Ανάλυση δεδομένων κυτταρομετρίας ροής.....	78
2.8.1. Στρατηγική ανάλυσης βιωσιμότητας μυελωματικών κυττάρων.....	78
2.8.2. Στρατηγική ανάλυσης ανοσολογικού προφίλ λεμφοκυττάρων.....	80
2.8.3. Στρατηγική ανάλυσης κατασταλτικών κυττάρων μυελογενούς προέλευσης..	85
2.9. Κυτταρογενετική ανάλυση.....	88
2.10. Στατιστική ανάλυση.....	88
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	89
3.1. Ανάπτυξη ex vivo μοντέλου στο πολλαπλούν μυέλωμα.....	91
3.1.1. Μελέτη ανάπτυξης ανθρώπινων μυελωματικών κυτταρικών σειρών.....	91
3.1.2. Αξιολόγηση αλγόριθμου ανάλυσης εικόνας για τη μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων της μυελωματικής κυτταρικής σειράς U266.....	94
3.1.3 Σύγκριση μεθόδων μέτρησης βιωσιμότητας σε δισδιάστατη καλλιέργεια U266: μέθοδος MTT, λογισμικό ανάλυσης εικόνας και κυτταρομετρία ροής.....	97
3.1.4. Καταγραφή της ανάπτυξης της καλλιέργειας μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων μυελικής προέλευσης.....	98
3.1.5 Προσδιορισμός της κατάλληλης σύστασης του ικρίωματος υδρογέλης.....	103
3.1.6 Σύγκριση βιωσιμότητας κυτταρικής σειράς μεταξύ 2D και 3D καλλιιεργειών μετά από έκθεση σε δοξορουβικίνη.....	106
3.1.7 Σύγκριση βιωσιμότητας της κυτταρικής σειράς U266 μεταξύ μονοκαλλιέργειας και συγκαλλιέργειας με μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα μυελικής προέλευσης μετά από έκθεση σε δοξορουβικίνη.....	107
3.1.8 Μελέτη κάλυψης ικρίωμάτων πολυγαλακτικού οξέος από μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα μυελικής προέλευσης με τη χρήση μικροσκοπίας.....	109

3.1.9 Δοκιμή της ex vivo πλατφόρμας: Συγκαλλιέργεια μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων μυελικής προέλευσης και μυελωματικών κυττάρων H929 σε ικρίωματα υπό την επίδραση βορτεζομίμπης.....	115
3.2 Μελέτη του ανοσολογικού προφίλ του μυελού των οστών στο πολλαπλούν μυέλωμα.....	117
3.2.1 Περιγραφή δημογραφικών, κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων των ασθενών.....	117
3.2.2. Σύγκριση του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών στα διάφορα στάδια του πολλαπλού μυελώματος.....	119
3.2.3 Σύγκριση ανοσολογικού προφίλ μυελού των οστών-περιφερικού αίματος...121	
3.2.4. Το ανοσολογικό προφίλ στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα σε ομάδες ασθενών με διαφορετική πρόγνωση.....	125
3.2.5. Η ανοσολογική υπογραφή κατά τη διάγνωση του πολλαπλού μυελώματος επηρεάζει το αποτέλεσμα της θεραπείας.....	130
3.2.6 Το ανοσολογικό προφίλ του μυελού των οστών κατά την πλήρη ύφεση συσχετίζεται με την παρουσία ελάχιστης υπολειμματικής νόσου.....	133
3.2.7 Το ανοσολογικό προφίλ του περιφερικού αίματος κατά την πλήρη ύφεση και συσχετισμός με παρουσία ελάχιστης υπολειμματικής νόσου.....	136
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	143
4.1. Αξιολόγηση των υπαρχόντων τρισδιάστατων μοντέλων στο πολλαπλούν μυέλωμα....	146
4.2 Το χρονικό πλαίσιο αξιοποίησης μιας ex vivo πλατφόρμας κατά την πορεία του πολλαπλού μυελώματος.....	149
4.3 Πρόταση για την υλοποίηση ex vivo μοντέλου στο πολλαπλούν μυέλωμα.....	151
4.4 Ανοσολογική μελέτη του μικροπεριβάλλοντος στο πολλαπλούν μυέλωμα.....	154
4.5 Τελικά συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι.....	159
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	161
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	175
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	177

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Ονομασία	Αγγλική απόδοση	Ελληνική απόδοση
ADP	adenosine diphosphate	διφωσφορική αδενοσίνη
ASCT	autologous stem cell transplantation	μεταμόσχευση αυτόλογων αρχέγονων αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων
BCMA	B cell maturation antigen	αντιγόνο ωρίμανσης Β λεμφοκυττάρων
BM-MSCs	bone marrow mesenchymal stromal cells	Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα μυελικής προέλευσης
CFSE	carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester	(πρότυπη ουσία για τη μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού)
CR	complete response	πλήρης ανταπόκριση
DMSO	dimethylsulfoxide	διμεθυλοσουλφοξείδιο
DPBS	Dulbecco's phosphate buffer solution	φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco's
ECM	extra-cellular matrix	εξωκυττάρια μήτρα
EDTA	ethylenediaminetetraacetate	αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
FBS	fetal bovine serum	ορός εμβρύου μόσχου
FSC	forward scatter	πρόσθιος σκεδασμός
HSCs	hematopoietic stem cells	αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα
IC50	half maximal inhibitory concentration	συγκέντρωση ημίσειας αναστολής
IgG, IgM, IgA	immunoglobulin G, M, A	ανοσοσφαιρίνη G, M, A
IL	interleukin	ιντερλευκίνη
IMWG	International Myeloma Working Group	Διεθνής Ομάδα Μελέτης του ΠΜ
ISS	International Staging System	Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης
MDSCs	myeloid derived suppressor cells	κατασταλτικά κύτταρα μυελικής προέλευσης
MGUS	monoclonal gammopathy of undetermined significance	μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας
MNC	mononuclear cell	μονοπύρηνο κύτταρο
NF-κB	nuclear factor kappa B	πυρηνικός παράγοντας κάππα Β

NK cell	natural killer cell	φυσικό φονικό (κύτταρο)
OPG	osteoprotegerin	οστεοπρωτεγερίνη
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	μονοπύρηνιο κύτταρο περιφερικού αίματος
PCA	principal component analysis	ανάλυση κύριων συνιστωσών
PD	progressive disease	πρόοδος νόσου
PLA	polylactic acid	πολυγαλακτικό οξύ
PR	partial response	μερική ανταπόκριση
SD	stable disease	σταθερή νόσος
sMM	smoldering Multiple Myeloma	υφέρπον πολλαπλούν μύελωμα
SSC	side scatter	πλάγιος σκεδασμός
TAMS	tumor-associated macrophages	μακροφάγα σχετιζόμενα με τον καρκίνο
TME	tumor micro-environment	μικροπεριβάλλον του όγκου
Treg	Regulatory T cell	ρυθμιστικό T λεμφοκύτταρο
VEGF	vascular endothelial growth factor	αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
VGPR	very good partial response	πολύ καλή μερική ανταπόκριση
VRd	Bortezomib-lenalidomide-dexamethazone	Βορτεζομίμπη-λεναλιδομίδη-δεξαμεθαζόνη (θεραπευτικό σχήμα)
β2M	β2 microglobulin	β2 μικροσφαιρίνη
EYN	minimal residual disease, MRD	ελάχιστη υπολειμματική νόσος
MO	bone marrow	μυελός των οστών
ΠΑ	peripheral blood	περιφερικό αίμα
ΠΜ	Multiple Myeloma	πολλαπλούν μύελωμα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

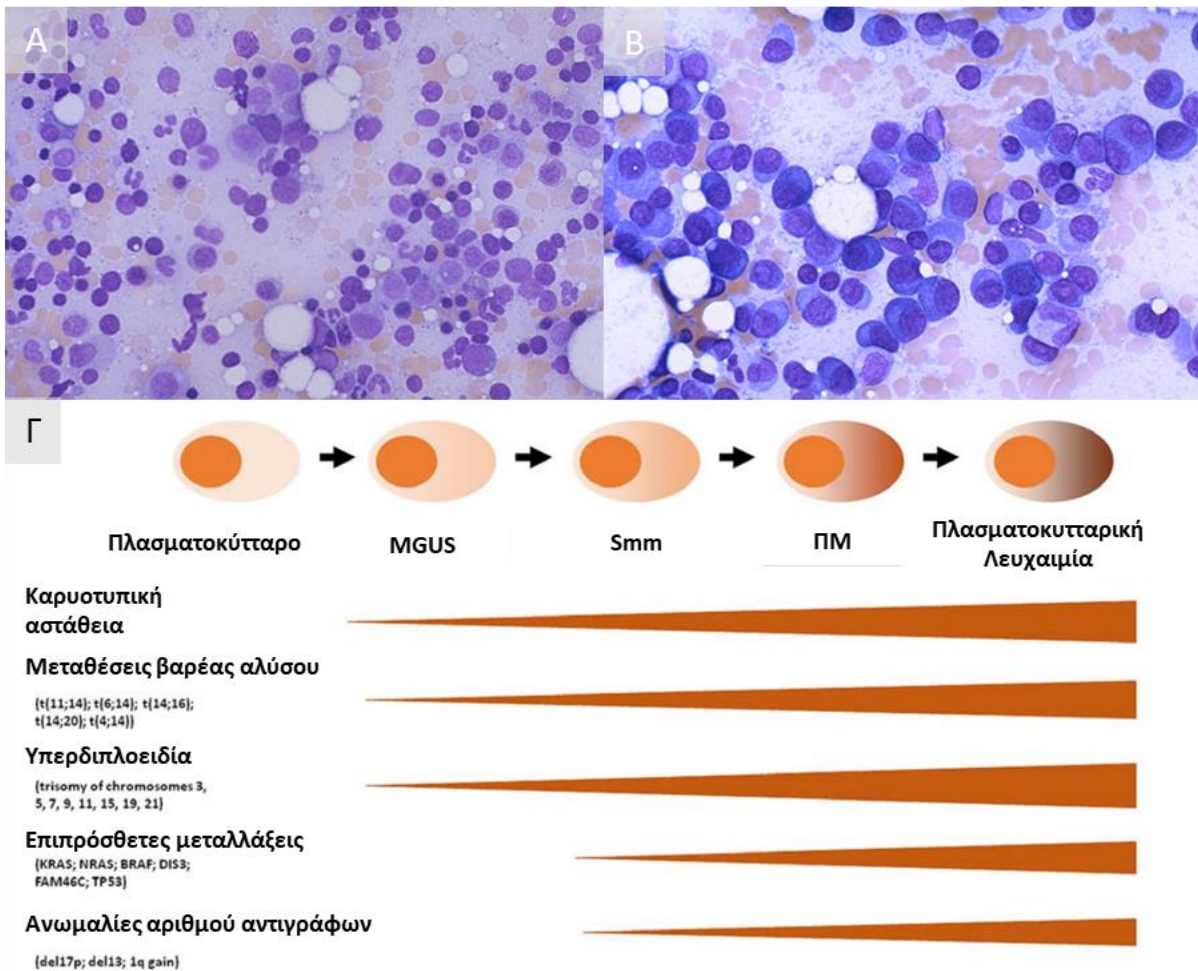
1.1. Πολλαπλούν μυέλωμα

1.1.1 Γενικά στοιχεία

Το πολλαπλούν μυέλωμα (ΠΜ) είναι ένα ανιάτο κακοήθες νεόπλασμα που ανήκει στο φάσμα των πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών. Το ΠΜ χαρακτηρίζεται από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό παθολογικών πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών (ΜΟ). Τα παθολογικά πλασματοκύτταρα παράγουν και εκκρίνουν μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη ή τμήμα ανοσοσφαιρίνης, η οποία ονομάζεται Μ-πρωτεΐνη ή παραπρωτεΐνη (**Εικόνα 1.1**). Οι πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες περιλαμβάνουν ευρύ φάσμα νοσημάτων με ποικίλη κλινική πορεία όπως η μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, MGUS), το μονήρες πλασματοκύττωμα, το υφέρπον ΠΜ (smoldering Multiple Myeloma, sMM) αλλά και σπάνια νοσήματα όπως η αμυλοείδωση, η νόσος των βαρέων ή ελαφρών αλύσεων και το σύνδρομο POEMS (Kyle and Rajkumar, 2004; Mutlu et al., 2015; Li and Wang, 2019).

Η καρκινική εξαλλαγή στο ΠΜ συμβαίνει κατά τη διαδικασία της αλλαγής ισotyπου, μετατρέποντας το αναπτυσσόμενο Β κύτταρο σε παθολογικό πλασματοκύτταρο. Έτσι, τα νεοπλασματικά κύτταρα στο ΠΜ προκύπτουν από έναν κλώνο, ο οποίος πολλαπλασιάζεται εντός του ΜΟ. Ο υπότυπος της Μ-πρωτεΐνης που εκκρίνεται από τα πλασματοκύτταρα στο ΠΜ είναι IgG στις μισές περίπου περιπτώσεις, IgA στο 20% των περιπτώσεων, μόνο ελαφριά αλυσίδα (κ ή λ) στο 20%, IgD στο 2% και IgM μόλις στο 0,5%. Τέλος, στο 2–3% των ασθενών με ΠΜ δεν ανιχνεύεται Μ-πρωτεΐνη και τότε το ΠΜ χαρακτηρίζεται ως μη-εκκριτικό (non-secretory Multiple Myeloma) (Kyle and Rajkumar, 2004; Jagannath, 2008; Chawla et al., 2015).

Σήμερα γνωρίζουμε ότι το ΠΜ αποτελεί τη φυσική πορεία εξέλιξης των πρόδρομων καταστάσεων MGUS και sMM (Da Vià et al., 2020). Είναι γνωστό ότι κατά την εξέλιξη της νόσου στα τέσσερα κλινικά στάδια (MGUS, sMM, ΠΜ και πλασματοκυτταρική λευχαιμία) συσσωρεύονται όλο και περισσότερες γενετικές αλλαγές (πχ αναδιατάξεις, υπερδιπλοειδίες, χρωμοσωμικές ελλείψεις, κ.ά.), γεγονός που συνεισφέρει στην αύξηση της παρατηρούμενης καρυοτυπικής αστάθειας (Rajkumar et al., 2014; Colombo et al., 2015).



Εικόνα 1.1. Εικόνες και η πορεία εξέλιξης του Πολλαπλού Μυελώματος (ΠΜ). Ιστολογική εικόνα από βιοψία μυελού των οστών (ΜΟ) από υγιές άτομο (Α) και από ασθενή με ΠΜ (Β). Στο ΠΜ είναι εμφανής η διήθηση του ΜΟ από πλασματοκύτταρα, τα οποία φαίνονται ως μεγαλύτερα κύτταρα με αρκετό γαλάζιο κυτταρόπλασμα και βαθύχρωμο μπλε πυρήνα (ανατύπωση από webpath.med.utah.edu). Στο (Γ) απεικονίζεται η πορεία εξέλιξης της νόσου στα 4 κλινικά στάδια: Μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (MGUS), υφέρπον ΠΜ (sMM), ΠΜ (Multiple Myeloma) και πλασματοκυτταρική λευχαιμία (Plasma cell leukemia), συναρτήσεως της συσσώρευσης ογκογενετικών γεγονότων (Colombo et al., 2015).

1.1.2 Επιδημιολογικά στοιχεία

Το ΠΜ είναι η δεύτερη πιο συχνή αιματολογική κακοήθεια και αντιπροσωπεύει το 10% όλων των αιματολογικών κακοηθειών. Στην Ευρώπη περίπου 40.000 άτομα διαγνώστηκαν με ΠΜ το 2015 και ο αριθμός αυτός προβλέπεται να αυξηθεί σε σχεδόν 46.000 έως το 2025 (Kazandjian, 2016).

Το ΠΜ είναι κατά κύριο λόγο ασθένεια των μεγαλύτερων σε ηλικία ατόμων, με διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση τα 69 έτη. Τόσο το ΠΜ όσο και η MGUS εμφανίζονται με διπλάσια συχνότητα στους Αφρικανούς σε σχέση με τους Καυκάσιους, ενώ είναι ελαφρώς πιο συχνά στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες, σε αναλογία 1,4:1. Τα ποσοστά θνησιμότητας είναι επίσης 2 έως 3 φορές υψηλότερα στους Αφρικανούς σε σύγκριση με τους Καυκάσιους. Χαρακτηριστικά αναφέρονται 7,9 διαγνώσεις ΠΜ ανά 100.000 άτομα στους Αφρικανούς άνδρες και 5,4 ανά 100.000 άτομα στις Αφρικανές γυναίκες, έναντι 4,0 ανά 100.000 στους Καυκάσιους άνδρες και 2,5 ανά 100.000 στις Καυκάσιες γυναίκες, αντίστοιχα (Tan, 2008; Bianchi and Anderson, 2014; Kazandjian, 2016).

1.1.3 Διάγνωση, σταδιοποίηση και ανταπόκριση στη θεραπεία

Στα αρχικά στάδια του ΠΜ, τα συμπτώματα μπορεί να συγχέονται με αυτά άλλων καταστάσεων, καθώς περιλαμβάνουν πόνο στα οστά, αίσθημα αδυναμίας, απώλεια όρεξης και ναυτία. Στα πιο προχωρημένα στάδια της νόσου εμφανίζονται συμπτώματα που στη διεθνή βιβλιογραφία συνοψίζονται με το ακρωνύμιο CRAB (hyperCalcemia, Renal failure, Anaemia, Bone disease). Συγκεκριμένα, στην υπερασβεστιαμία τα επίπεδα ασβεστίου στον ορό είναι υψηλότερα από 11,5 mg/dL, στη νεφρική ανεπάρκεια τα επίπεδα κρεατινίνης στον ορό είναι τουλάχιστον 2 mg/dL, ως αναιμία ορίζεται η κατάσταση με επίπεδα αιμοσφαιρίνης στο αίμα μικρότερα από 10 g/dL, ενώ η οστική νόσος χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη λυτικών αλλοιώσεων στα οστά (Jagannath, 2008; Rajkumar et al., 2014; Rajkumar, 2018). Για τη διάγνωση του ΠΜ, σύμφωνα με τα κριτήρια της Διεθνούς Ομάδας Μελέτης του ΠΜ (International Myeloma Working Group, IMWG), απαιτούνται (International Myeloma Working Group, 2003):

- Παρουσία στον ορό ή/ και στα ούρα μονοκλωνικής πρωτεΐνης
- Κλωνικά πλασματοκύτταρα στο ΜΟ ή πλασματοκύττωμα μαλακών μορίων
- Παρουσία βλαβών σε όργανα–ιστούς (CRAB)

Για τη σταδιοποίηση του ΠΜ χρησιμοποιείται το Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης του ΠΜ (International Staging System, ISS), το οποίο εκτιμά τα επίπεδα της β2-μικροσφαιρίνης (β2M) και της αλβουμίνης (albumin, alb) στον ορό. Το ΠΜ κατά ISS κατηγοριοποιείται σε τρία στάδια (Greipp et al., 2005):

- ISS-I: β2M < 3,5 mg/L και alb ≥ 3,5 g/100 mL (διάμεση επιβίωση 62 μήνες)
- ISS-II: όχι ISS-I ή ISS-III (διάμεση επιβίωση 44 μήνες)
- ISS-III: β2M ≥ 5,5 mg/L (διάμεση επιβίωση 29 μήνες)

Το 2015 από την IMWG εκδόθηκε το αναθεωρημένο σύστημα σταδιοποίησης (Revised International Staging System, R-ISS), συμπεριλαμβάνοντας δύο ακόμη προγνωστικούς παράγοντες:

- Το γενετικό κίνδυνο υπό τη μορφή κυτταρογενετικών πληροφοριών από την τεχνική του *in situ* υβριδισμού [Υψηλού κινδύνου χρωμοσωμικές ατυπίες είναι η έλλειψη $del(17p)$ και/ή μετάθεση $t(4;14)$ και/ή μετάθεση $t(14;16)$]
- Τα επίπεδα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (lactate dehydrogenase, LDH).

Επομένως τα στάδια κατά R-ISS διαμορφώνονται ως εξής:

- R-ISS-I: ISS σταδίου I χωρίς κυτταρογενετικές ατυπίες υψηλού κινδύνου και φυσιολογική τιμή LDH
- R-ISS-II: Όχι στάδια R-ISS-I ή R-ISS-III
- R-ISS-III: ISS σταδίου III και παρουσία κυτταρογενετικών ατυπιών υψηλού κινδύνου, ή υψηλά επίπεδα LHD

Πέραν του ΠΜ και της σταδιοποίησης του, το 2010, η IMWG όρισε ως MGUS την κατάσταση κατά την οποία η παρουσία M-πρωτεΐνης στον ορό ανιχνεύεται σε επίπεδα χαμηλότερα από 3 g/dL, τα κλωνικά πλασματοκύτταρα στο ΜΟ βρίσκονται σε επίπεδα χαμηλότερα από 10%, ενώ δεν παρατηρείται σχετιζόμενη με την πάθηση δυσλειτουργία σε άλλα όργανα. Ως sMM ορίστηκε η κατάσταση κατά την οποία παρότι η παρουσία M-πρωτεΐνης στον ορό υπερβαίνει τα 3 g/dL ή/και τα κλωνικά πλασματοκύτταρα στο ΜΟ υπερβαίνουν το επίπεδο του 10%, δεν εμφανίζεται σχετιζόμενη με την πάθηση δυσλειτουργία (Kyle et al., 2010).

Όσον αφορά τα κριτήρια ανταπόκρισης στη θεραπεία, σύμφωνα με το IMWG έχουν οριστεί συγκεκριμένα κριτήρια τα οποία εφαρμόζονται παγκοσμίως στην κλινική πράξη και σε κλινικές μελέτες για την εκτίμηση της ανταπόκρισης. Συνεπώς τα κριτήρια IMWG περιλαμβάνουν τους εξής τύπους ανταπόκρισης (International Myeloma Working Group, 2003):

- Πλήρης ανταπόκριση (complete response, CR): Αρνητική ανοσοκαθήλωση σε ορό και ούρα και απουσία όλων των εξωμυελικών πλασματοκυττωμάτων.
- Αυστηρή πλήρης ανταπόκριση (stringent complete response, SCR): CR, όπως ορίζεται παραπάνω και επιπλέον φυσιολογικός λόγος των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων και απουσία κλωνικών πλασματοκυττάρων στο ΜΟ με ανοσοϊστοχημεία ή ανοσοφθορισμό.
- Πολύ καλή μερική ανταπόκριση (very good partial response, VGPR): παρουσία μονοκλωνικού κλάσματος στον ορό, ανιχνεύσιμου μόνο με ανοσοκαθήλωση αλλά όχι με

ηλεκτροφόρηση ή >90% μείωση στο μονοκλωνικό κλάσμα στον ορό και μονοκλωνικό κλάσμα στα ούρα 24/ώρου <100 mg.

- Μερική ανταπόκριση (partial response, PR): ≥50% μείωση στο μονοκλωνικό κλάσμα στον ορό και μείωση στο μονοκλωνικό κλάσμα των ούρων 24/ώρου ≥90% ή κάτω από 200 mg.
- Σταθερή νόσος (stable disease, SD): όταν δεν πληρούνται τα κριτήρια όλων των παραπάνω αλλά δεν εμφανίζεται πρόοδος της νόσου.
- Πρόοδος νόσου (progressive disease, PD): αύξηση κατά 25% στο μονοκλωνικό κλάσμα στον ορό ή στα ούρα, στα επίπεδα των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων και στο ποσοστό πλασματοκυττάρων στο ΜΟ. Επίσης, εμφάνιση νέων οστεολύσεων ή εξωοστικών πλασματοκυττωμάτων ή αύξηση των διαστάσεων των υπαρχόντων και τέλος εμφάνιση υπερασβεστιαμίας.

Από τη δημοσίευση των προαναφερθέντων κριτηρίων έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του ΠΜ νέα φάρμακα με τα οποία το ποσοστό και το βάθος της ανταπόκρισης στη θεραπεία αυξήθηκαν σημαντικά. Η ύπαρξη όμως πολλών ασθενών οι οποίοι επιτυγχάνουν πλήρη ύφεση, σημαίνει ότι θα πρέπει να οριστούν νέες κατηγορίες ανταπόκρισης στη θεραπεία, ώστε να ανιχνεύονται με πιο αναλυτικό τρόπο τα επίπεδα ανταπόκρισης. Συμπεριλαμβάνοντας νέες διαγνωστικές μεθόδους όπως η κυτταρομετρία ροής, η αλληλούχηση DNA νέας γενιάς και οι απεικονιστικές μέθοδοι υψηλής ευαισθησίας, η IMWG το 2016 θέσπισε νέα κριτήρια που αφορούν στην ελάχιστη υπολειμματική νόσο (EYN). Τα κριτήρια αυτά μπορούν να αξιοποιηθούν εντός και εκτός κλινικών μελετών (Kumar et al., 2016):

- Παρατεταμένη αρνητική EYN (Sustained MRD-Negativity): η EYN παραμένει αρνητική για διάστημα μεγαλύτερο του έτους, όπως εκτιμάται με τις νέες διαγνωστικές μεθόδους
- Αρνητική EYN με κυτταρομετρία ροής (Flow MRD-negativity): απουσία κλωνικών πλασματοκυττάρων σε δείγμα ΜΟ, μετά από διερεύνηση με κυτταρομετρία ροής σύμφωνα με το πρωτόκολλο του EuroFlow (van Dongen et al., 2012)
- Αρνητική EYN με αλληλούχηση DNA νέας γενιάς (Sequencing MRD-Negativity): απουσία κλωνικών πλασματοκυττάρων σε δείγμα ΜΟ, μετά από αλληλούχηση με επικυρωμένη πλατφόρμα όπως το LymphoSIGHT (Sequentia, USA)
- Αρνητική EYN με απεικονιστική επιβεβαίωση (Imaging-positive MRD-negativity): αρνητική EYN με κυτταρομετρία ροής ή αλληλούχηση DNA νέας γενιάς, συνοδευόμενη από απουσία ευρημάτων με απεικόνιση ποζιτρονικής/αξονικής τομογραφίας (PET/CT)

Αξίζει να αναφερθεί ότι πλέον η ανίχνευση EYN θεωρείται ως ο σημαντικότερος ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της κλινικής έκβασης του ασθενούς. Η διατήρηση αρνητικής EYN

προσδίδει πλεονέκτημα επιβίωσης ακόμη και σε κατηγορίες ασθενών με δυσμενή προγνωστικά χαρακτηριστικά (Landgren and Rajkumar, 2016). Επιπλέον, το θετικό πλεονέκτημα της απουσίας EYN είναι ανεξάρτητο από τη χορηγηθείσα θεραπεία, καθότι σε κλινικές μελέτες στις οποίες συγκρίθηκαν διαφορετικές θεραπείες, η αρνητικότητα της EYN διαχώρισε μία ανεξάρτητη ομάδα αυξημένης επιβίωσης μέχρι επιδείνωση της νόσου (Kostoroulos et al., 2020). Επομένως, μετά από την πρόσφατη απόδειξη της υπεροχής της EYN ως προγνωστικής παραμέτρου, η διερεύνηση της EYN αποτελεί εναλλακτική επιλογή ως καταληκτικό σημείο των κλινικών μελετών, αλλά και ως παράμετρος εκτίμησης της επιβίωσης των ασθενών χωρίς πρόοδο νόσου (Avet-Loiseau et al., 2020).

1.1.4 Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Η σύγχρονη εποχή για τη θεραπεία του ΠΜ ουσιαστικά αρχίζει τη δεκαετία του 2000 με την εισαγωγή στην κλινική πράξη των ανάλογων θαλιδομίδης (thalidomide) και των αναστολέων πρωτεασώματος (proteasome inhibitors), φαρμακευτικές παρεμβάσεις που βελτίωσαν σημαντικά την επιβίωση των ασθενών. Στη δεκαετία του 2010, η βαθύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της νόσου οδήγησε σε αύξηση των εναλλακτικών θεραπευτικών στρατηγικών, με ποικιλία συνδυασμών φαρμάκων, αλληλουχίας χορήγησης αυτών και διάρκειας των θεραπειών. Στην τρέχουσα δεκαετία, οι γονιδιωματικές μελέτες έχουν αναδείξει τη σημασία της κλωνικής ετερογένειας στο ΠΜ και οι θεραπευτικές στρατηγικές εστιάζονται στοχευμένα πλέον σε ανοσολογικού τύπου παρεμβάσεις με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, αναστολέων σημείων ελέγχου και ανοσολογικών ρυθμιστών/τροποποιητών (Bergsagel, 2014).

Στοχευμένες θεραπείες

Η στοχευμένη θεραπεία σε αντίθεση με τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες επικεντρώνεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, τα οποία τους προσδίδουν πολλαπλασιαστικό δυναμικό και ικανότητα επιβίωσης. Η βορτεζομίμπη (bortezomib), η καρφιλζομίμπη (carfilzomib) και η ιξαζομίμπη (ixazomib) είναι στοχευμένα φάρμακα που δρουν ως αναστολείς του πρωτεασώματος (Gandolfi et al., 2017b). Τα πρωτεασώματα είναι μεγάλα πρωτεϊνικά συμπλέγματα που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών και ορισμένων βακτηρίων και η κύρια λειτουργία τους συνίσταται στην πρωτεόλυση μη λειτουργικών, γηρασμένων ή κατεστραμμένων πρωτεϊνών. Η επιτυχία αυτής της κατηγορίας θεραπευτικών παραγόντων οφείλεται στην εξαιρετική ευαισθησία των κυττάρων του μυελώματος στην αναστολή της 26S υπομονάδας του πρωτεασώματος, που παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση και την πρόοδο της ασθένειας. Η αναστολή του πρωτεασώματος έχει ως αποτέλεσμα

μια σειρά πολλαπλών καθοδικών επιδράσεων, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της σηματοδότησης του μονοπατιού του NF-κΒ και της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης λανθασμένα πτυχωμένων και μη πτυχωμένων πρωτεϊνών. Ο άμεσος αντίκτυπος της αναστολής της λειτουργίας του πρωτεασώματος είναι η πρόκληση ενδοκυτταρικού στρες, η μείωση της έκφρασης υποδοχέων αυξητικών παραγόντων από τα μυελωματικά κύτταρα, η καταστολή της έκφρασης μορίων προσκόλλησης και η αναστολή της αγγειογένεσης (Gandolfi et al., 2017a). Πλέον με την εξέλιξη των κλινικών μελετών και τη δοκιμή συνδυασμών θεραπευτικών παραγόντων, είναι γνωστό ότι οι αναστολείς πρωτεασώματος όταν συνδυάζονται με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες αυξάνουν κατά πολύ την αποτελεσματικότητά τους (Guerrero-Garcia et al., 2018).

Επιπλέον, στο πεδίο της στοχευμένης θεραπείας τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων που προσδένονται σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες των κυττάρων του μυελώματος, προκαλώντας το θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη τέτοιου τύπου εγκεκριμένη θεραπευτική προσέγγιση σε ανθεκτικό ή υποτροπιάζον ΠΜ, αφορά τη στόχευση του ενεργοποιητικού παράγοντα λεμφοκυτταρικής σηματοδότησης F7 (SLAMF7) από το μονοκλωνικό αντίσωμα ελοτουζουμάμπη (elotuzumab). Στην κλινική μελέτη φάσης III ELOQUENT-2, βάσει της οποίας έλαβε έγκριση, ο συνδυασμός της ελοτουζουμάμπης με τη λεναλιδομίδη και τη δεξαμεθαζόνη συγκριτικά με το συνδυασμό λεναλιδομίδης και δεξαμεθαζόνης, βελτίωσε την επιβίωση μέχρι επιδείνωση της νόσου από τους 14,9 στους 19,4 μήνες και τη συνολική επιβίωση από τους 39,6 στους 48,3 μήνες, αντίστοιχα (Dimopoulos et al., 2020). Η δεύτερη εγκεκριμένη θεραπευτική προσέγγιση αφορά τη στόχευση του CD38, μίας επιφανειακής γλυκοπρωτεΐνης με δράση υδρολάσης της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP), η οποία εκφράζεται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και ιδιαίτερα στα μυελωματικά κύτταρα. Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CD38 (daratumumab) έχει λάβει έγκριση σε συνδυασμό με τη λεναλιδομίδη και τη δεξαμεθαζόνη (σχήμα DRd) ή τη δεξαμεθαζόνη (σχήμα DVd) σε ανθεκτικό ή υποτροπιάζον ΠΜ βασιζόμενη σε κλινικές μελέτες φάσης III. Χαρακτηριστικά, στην κλινική μελέτη POLLUX, ο συνδυασμός DRd συγκριτικά με συνδυασμό λεναλιδομίδης και δεξαμεθαζόνης, βελτίωσε την επιβίωση μέχρι επιδείνωση της νόσου από τους 17,5 στους 45 μήνες, αντίστοιχα (Dimopoulos et al., 2016). Σε συνέχεια αυτών των ιδιαίτερα σημαντικών αποτελεσμάτων η στόχευση των επιτόπων CD38 συνεχίζει να διερευνάται με παράγοντες όπως το isatuximab και το MOR202/TJ202 για τους οποίους κλινικές δοκιμές φάσης III βρίσκονται υπό εξέλιξη (Offidani et al., 2021).

Η ευρεία χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων νωρίτερα στη θεραπευτική πορεία του ΠΜ έχει οδηγήσει σε νέες ανθεκτικές ομάδες ασθενών με λιγότερες θεραπευτικές επιλογές. Πλέον, η εξέλιξη των ανοσοθεραπειών εστιάζει στην ενίσχυση της απάντησης του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι στα μυελωματικά κύτταρα. Ο πιο διαδεδομένος στόχος ανοσολογικής ενίσχυσης

είναι το αντιγόνο ωρίμανσης των Β λεμφοκυττάρων (B cell maturation antigen, BCMA), ένας επιφανειακός υποδοχέας παραγόντων ανάπτυξης. Τα αντισώματα έναντι του BCMA είναι ένας από τους νεότερους παράγοντες στοχευμένης θεραπείας με ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην κλινική εξέλιξη του ΠΜ. Τα αντισώματα αυτά δρουν με αρκετούς διαφορετικούς μηχανισμούς, όπως η άμεση απόπτωση των μυελωματικών κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα και η ενεργοποίηση δραστικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Lancman et al., 2020).

Ανοσολογικές Θεραπείες

Τα ανοσορυθμιστικά φάρμακα στο ΠΜ είναι κυρίως η θαλιδομίδη (thalidomide), η λεναλιδομίδη (lenalidomide) και η πομαλιδομίδη (pomalidomide). Η χρήση τους ουσιαστικά ξεκίνησε μετά το 2006, όταν ο συνδυασμός ανοσορυθμιστικών φαρμάκων και δεξαμεθαζόνης κατάφεραν να αυξήσουν τα ποσοστά επίτευξης πλήρους ύφεσης και να επιμηκύνουν την παραμονή των ασθενών σε αυτήν (σε CR). Ο πλήρης μηχανισμός δράσης τους δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως καθότι δρουν με ποικίλους τρόπους, που συμπεριλαμβάνουν την αναστολή της αγγειογένεσης, τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και την αύξηση της κυτταροτοξικότητας (Holstein and McCarthy, 2017). Επιπλέον σύμφωνα με νεότερα ευρήματα, τα ανοσορυθμιστικά φάρμακα επιδρούν και στο σύστημα ουβικιτινίωσης και πρωτεόλυσης βασικών μεταγραφικών παραγόντων, επάγοντας έτσι την αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου (Abramson, 2018).

Μεταμόσχευση Αρχέγονων Αιμοποιητικών κυττάρων

Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (Hematopoietic Stem Cells, HSCs) είναι πολυδύναμα κύτταρα από τα οποία προκύπτουν οι διάφοροι τύποι κυττάρων του αίματος. Οι μεταμοσχεύσεις HSCs χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανασύσταση του ΜΟ σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπου αδυνατεί να επανακάμψει στη φυσιολογική του σύσταση, όπως μετά το πέρας μιας χημειοθεραπείας (Felfly and Haddad, 2014). Πλέον, η μεταμόσχευση αυτόλογων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (autologous stem cell transplantation, ASCT) θεωρείται θεραπεία εκλογής για τους νεότερους ασθενείς με ΠΜ, διότι έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερα ποσοστά πλήρους ύφεσης και μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επιβίωσης σε σχέση με τη συμβατική χημειοθεραπεία (Bladé et al., 2010). Σε συνδυασμό με τη μεταμόσχευση HSCs χρησιμοποιούνται διάφορα θεραπευτικά πρωτόκολλα, τόσο πριν όσο και μετά τη μεταμόσχευση, τα οποία περιλαμβάνουν χημειοθεραπεία για τη μείωση του καρκινικού φορτίου στο ΜΟ πριν τη μεταμόσχευση, χημειοθεραπεία υψηλής δόσης για την καταστολή της δράσης και του ανοσοποιητικού

συστήματος, αλλά και στοχευμένη βιολογική θεραπεία με στόχο την αύξηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας (Gertz and Dingli, 2014).

Χημειοθεραπευτικές ουσίες και Κορτικοστεροειδή

Οι χημειοθεραπευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του ΠΜ ανήκουν στους αλκυλιωτικούς παράγοντες όπως η μελφαλάνη και στις ανθρακυκλίνες όπως η δοξορουβικίνη. Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες δρουν σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, παρεμβαλλόμενοι μεταξύ των βάσεων στη διπλή έλικα του DNA (intercalation), με αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και το κυτταρικό θάνατο (Rahhan and Kaur, 2007). Στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με κορτικοστεροειδή (δεξαμεθαζόνη και πρεδνιζόνη) και στο παρελθόν η μελφαλάνη σε συνδυασμό με πρεδνιζόνη αποτελούσαν κομβική θεραπεία κατά του μυελώματος, επιτυγχάνοντας συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης έως 50% (Rajkumar et al., 2002).

Τα κορτικοστεροειδή είναι απαραίτητα στη θεραπεία του μυελώματος επειδή καταστέλλουν την μετανάστευση των λευκών αιμοσφαιρίων σε περιοχές όπου τα μυελωματικά κύτταρα προκαλούν φλεγμονή, ανακουφίζοντας τον ασθενή από τον πόνο. Επιπρόσθετα τα κορτικοστεροειδή βοηθούν στην πρόληψη της ναυτίας, του εμέτου και των αντιδράσεων υπερευαισθησίας κατά τη διάρκεια της θεραπείας με χημειοθεραπευτικά φάρμακα ή με ακτινοβολία (Wooldridge et al., 2001). Μάλιστα, σε υψηλές δόσεις, η δεξαμεθαζόνη έχει δράση κυτταροτοξική έναντι των μυελωματικών κυττάρων ενώ, ταυτόχρονα συνδυάζεται με άλλα φάρμακα αυξάνοντας την αποτελεσματικότητά τους (Kumar and Rajkumar, 2005).

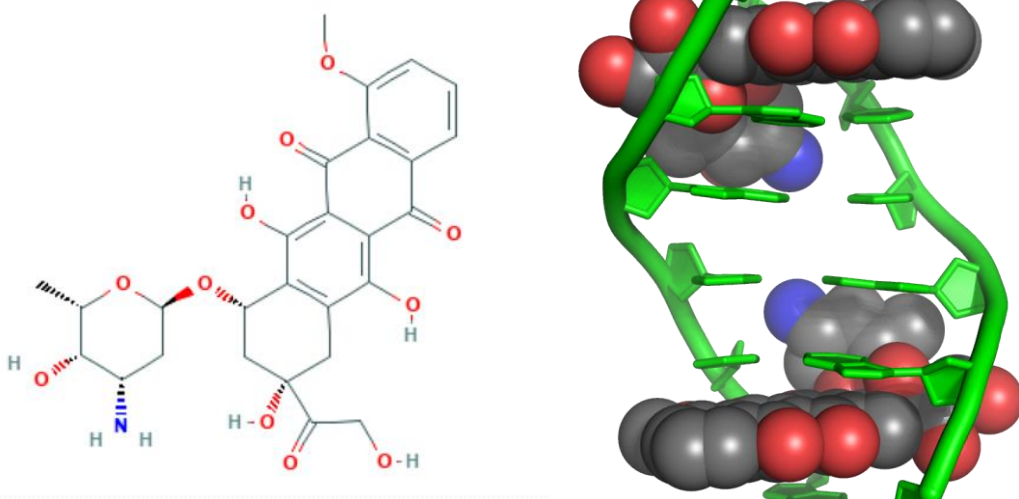
Στη συνέχεια αναφέρονται αναλυτικότερα τα χαρακτηριστικά και οι δράσεις των δύο θεραπευτικών παραγόντων στους οποίους εστίασαμε στην παρούσα διδακτορική διατριβή:

Δοξορουβικίνη

Η δοξορουβικίνη (doxorubicin, χημικός τύπος $C_{27}H_{29}NO_{11}$, **Εικόνα 1.2**) είναι χημειοθεραπευτικός παράγοντας που ανήκει στην ομάδα των ανθρακυκλινών και απομονώνεται από καλλιέργειες *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* (Patel and Kaufmann, 2012). Λόγω της χρήσης και της αποτελεσματικότητάς της έναντι πολλών τύπων καρκίνου (π.χ. καρκίνος του μαστού, καρκίνος ουροδόχου κύστεως, σάρκωμα Kaposi), συμπεριλαμβάνεται στη λίστα των βασικών αντικαρκινικών φαρμάκων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Minotti et al., 2004). Επιπλέον συμμετέχει σε συνδυασμούς παραγόντων στην εισαγωγική θεραπεία στο ΠΜ, όπως σε συνδυασμό με

βορτεζομίμη και δεξαμεθαζόνη, ή και συνοδευτικά με νεότερους παράγοντες όπως η νταρατουμουμάμη (Sekine et al., 2019; Zhou et al., 2020). Η δοξορουβικίνη δρα με δύο μηχανισμούς δράσης: Α) Παρεμβαλλόμενη μεταξύ των βάσεων στη διπλή έλικα του DNA και αναστέλλοντας την επιδιορθωτική δράση της τοποϊσομεράσης II και Β) με τη δημιουργία ελευθέρων ριζών οι οποίες προκαλούν βλάβες στην κυτταρική μεμβράνη, στο DNA και στις πρωτεΐνες (Thorn et al., 2011).

Τέλος, ένας ακόμη τρόπος δράσης της δοξορουβικίνης αφορά την ενεργοποίηση της σύνθεσης ενός λιπιδίου και συγκεκριμένα του κεραμιδίου. Το λιπίδιο αυτό ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα CREB3L1, ο οποίος προωθεί τη μεταγραφή πολλών γονιδίων-στόχων, συμπεριλαμβανομένων και γονιδίων αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Denard et al., 2011, 2012).



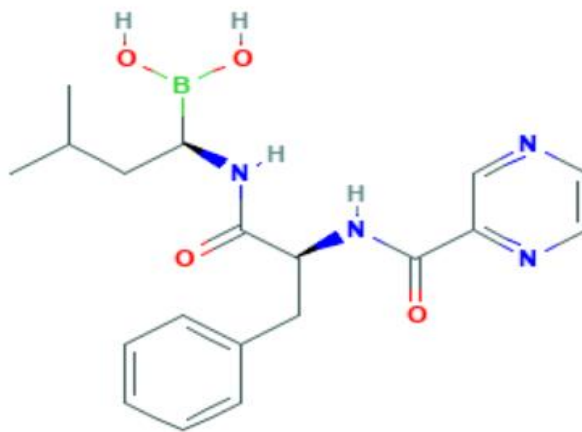
Εικόνα 1.2. Αριστερά, η μοριακή δομή της δοξορουβικίνης (ανατύπωση από Pubchem) και δεξιά δύο μόρια δοξορουβικίνης τα οποία παρεμβάλλονται στο DNA (ανατύπωση από Protein Data Bank).

Βορτεζομίμη

Η βορτεζομίμη (bortezomib, χημικός τύπος $C_{19}H_{25}BN_4O_4$, **Εικόνα 1.3**) είναι χημειοθεραπευτικός παράγοντας χρησιμοποιούμενος ευρέως στην αντιμετώπιση του ΠΜ, με μεγάλη αποτελεσματικότητα στην επίτευξη πλήρους ανταπόκρισης (Ri, 2016). Η βορτεζομίμη είναι ένα διπεπτίδιο βορονικού οξέος με ανασταλτική δράση στην ενεργοποίηση των $\beta 5$ και $\beta 1$ υπομονάδων του 20S πυρήνα του 26S πρωτεασώματος και ανήκει στην ομάδα των αναστολέων του πρωτεασώματος (Crawford et al., 2006). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση μη ορθά

αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου, την πρόκληση κυτταρικού στρες, τη συσσώρευση ενεργών ριζών οξυγόνου και προ-αποπτωτικών παραγόντων και τελικά την απόπτωση των μυελωματικών κυττάρων (Chauhan, 2005; Ri, 2016).

Επιπλέον, η χορήγηση βορτεζομίμπης οδηγεί σε απώλεια της έκφρασης του υποδοχέα της ιντερλευκίνης (interleukin, IL)-6 και σε μειωμένη έκφραση ποικίλων μορίων κυτταρικής προσκόλλησης από τα μυελωματικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών ERK, STAT3 και Akt και τη μειωμένη προσκόλληση των νεοπλασματικών κυττάρων στα στρωματικά κύτταρα του ΜΟ (Hideshima et al., 2003). Η μειωμένη προσκόλληση των νεοπλασματικών κυττάρων στα στρωματικά κύτταρα του ΜΟ οδηγεί σε αύξηση της ευαισθησίας τους σε αντικαρκινικούς παράγοντες (Ri, 2016).



Εικόνα 1.3. Η μοριακή δομή του *bortezomib* (ανατύπωση από Pubchem).

1.2 Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών στο πολλαπλούν μύελωμα

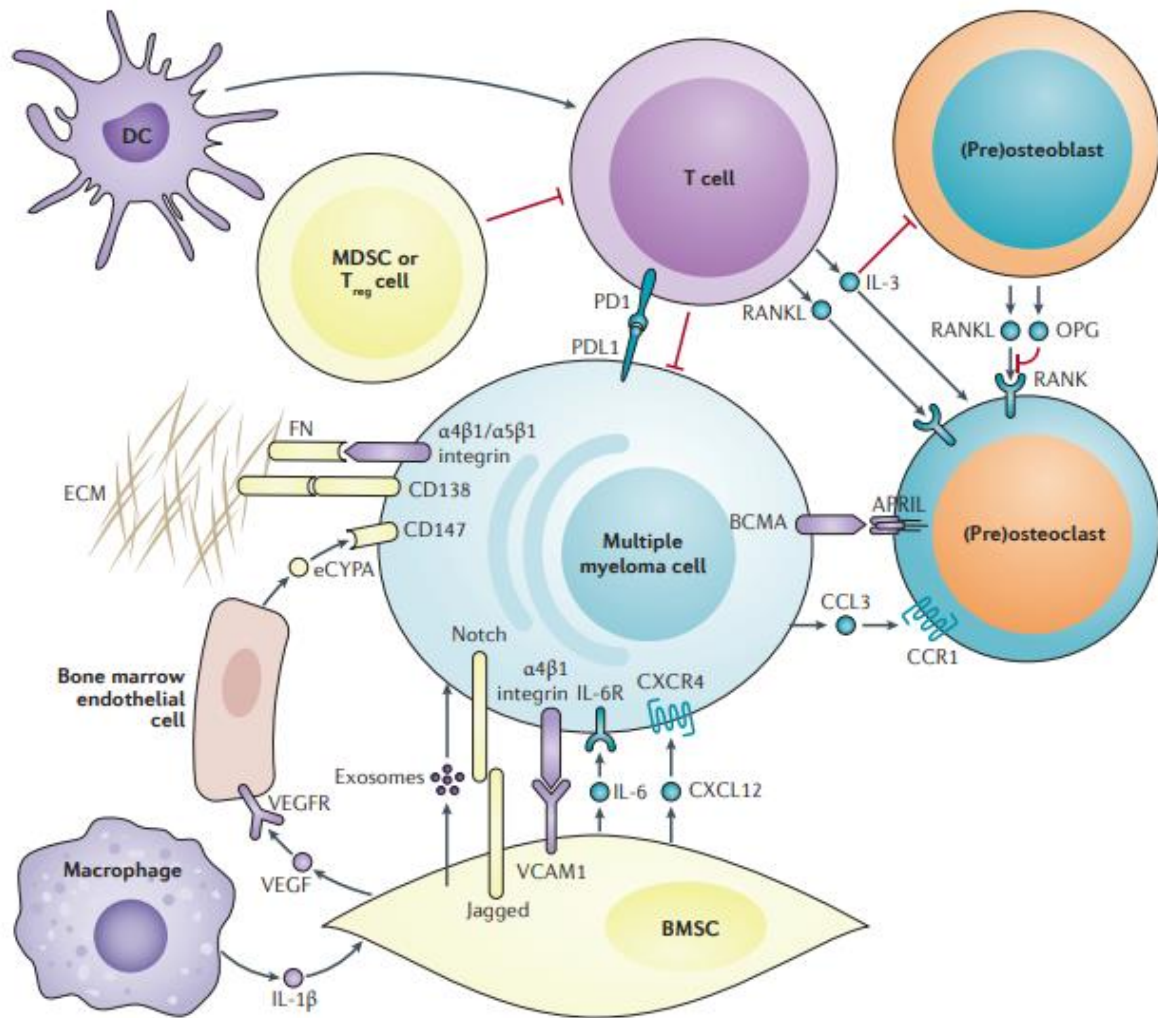
Κατά την παθογένεση του ΠΜ, τα Β λεμφοκύτταρα υφίστανται λανθασμένες θραύσεις περιοχών του DNA κατά τη διαδικασία ωρίμανσης στο βλαστικό κέντρο των δευτερογενών λεμφικών οργάνων. Χρωμοσωμικές μετατοπίσεις περιοχών που περιλαμβάνουν συγκεκριμένα ογκογονίδια μπορεί να προσφέρουν στα κύτταρα πλεονέκτημα ανάπτυξης, οδηγώντας σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η MGUS, το sMM και τελικά το ΠΜ. Έτσι, οι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις αποτελούν ένα πιθανό εναρκτήριο γεγονός για ένα υποσύνολο περιπτώσεων ΠΜ. Εναλλακτικό φαινόμενο κακοήθους εξαλλαγής, που μπορεί επιπλέον να αποτελεί εναρκτήριο γεγονός στο ΠΜ είναι ο ανευπλοειδισμός και ιδιαίτερα η υπερδιπλοειδία (Kumar et al., 2017b).

Ωστόσο, αν και αυτές οι αρχικές χρωμοσωμικές ατυπίες μπορούν να δημιουργήσουν έναν κακοήγη κλώνο πλασματοκυττάρων, θεωρούνται η αρχή της ογκογένεσης του ΠΜ αλλά δεν είναι επαρκείς ώστε να οδηγήσουν στη νόσο. Τα κλωνικά πλασματοκύτταρα, μόλις μεταναστεύσουν στο ΜΟ, λαμβάνουν ποικιλία σημάτων από το μικροπεριβάλλον τους, τόσο ενεργοποιητικών όσο και κατασταλτικών. Το γεγονός ότι δεν εξελίσσονται όλες οι περιπτώσεις MGUS/sMM σε κλινικά επιβεβαιωμένο ΠΜ (ακόμη και σε περιπτώσεις με κοινό γενετικό υπόβαθρο), υποδεικνύει ότι χρειάζονται και μη-γενετικές τροποποιήσεις για την εξέλιξη της νόσου.

Η συνέχεια της διαφοροποίησης του αρχικού κλώνου πιστεύεται ότι λαμβάνει χώρα στο ΜΟ, όπου το μικροπεριβάλλον είναι βασικός και καθοριστικός παράγοντας στην εξέλιξη της νόσου, από τις προ-μυελωματικές καταστάσεις στο ΠΜ. Το μικροπεριβάλλον του ΜΟ προωθεί την ανάπτυξη του όγκου, ενισχύει την αντοχή των μυελωματικών κυττάρων στην απόπτωση και συμβάλλει στη δημιουργία εξωμυελικών εντοπίσεων. Βρισκόμενα μέσα στους θύλακες του ΜΟ, τα προ-καρκινικά πλασματοκύτταρα, με τη μεσολάβηση κυτταροκινών, «συνομιλούν» (cross-talk) με ποικίλους κυτταρικούς τύπους που περιλαμβάνουν:

- Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα μυελικής προέλευσης (bone marrow mesenchymal stromal cells, BM-MSCs)
- Οστεοβλάστες (osteoblasts, OB) και οστεοκλάστες (osteoclasts, OC)
- Αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (vascular endothelial cells)
- Ινοβλάστες (fibroblasts)
- Λιποκύτταρα (adipocytes)
- Μονοκύτταρα (monocytes) και μακροφάγα
- Κατασταλτικά κύτταρα μυελικής προέλευσης (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)
- Τ λεμφοκύτταρα (T cells)
- φυσικά φονικά κύτταρα (natural killer cells, NK cells)

Αυτοί οι κυτταρικοί τύποι απεικονίζονται στην **Εικόνα 1.4** ενώ ο ρόλος τους αναλύεται διεξοδικότερα στη συνέχεια, στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον της νόσου.

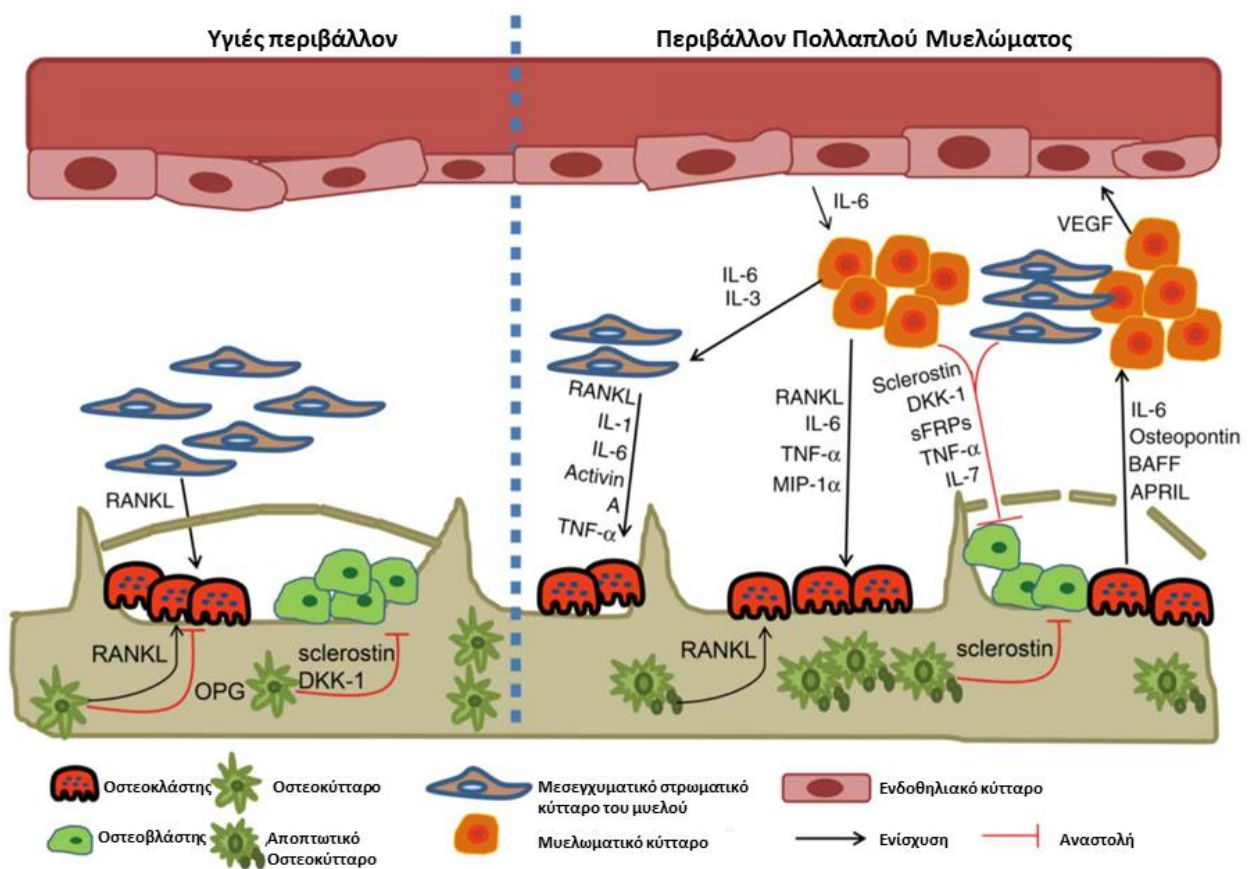


Εικόνα 1.4: Οι αλληλεπιδράσεις των μυελωματικών κυττάρων με την εξωκυττάρια μήτρα (ECM) και διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών που περιλαμβάνουν: ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (Treg cell), κατασταλτικά κύτταρα μυελικής προέλευσης (MDSC), T λεμφοκύτταρα (T cell), οστεοβλάστες (osteoblast), οστεοκλάστες (osteoclast), ενδοθηλιακά κύτταρα (Bone marrow endothelial cell) και μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα μυελικής προέλευσης (BMSC) (Kumar et al., 2017b).

Εκτός από τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις, οι κυτταροκίνες και οι διαλυτοί παράγοντες που παράγονται στο ΜΟ, προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κλωνικών πλασματοκυττάρων και αναστέλλουν τα αποπτωτικά μονοπάτια, παρέχοντας, παράλληλα, περισσότερες ευκαιρίες για επιπρόσθετες ογκογόνες μεταλλάξεις (Naymagon and Abdul-Hay, 2016). Συνολικά, το μικροπεριβάλλον του ΜΟ συνίσταται από:

- Το κυτταρικό τμήμα: στρωματικά κύτταρα, οστεοβλάστες, οστεοκλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.
- Το μη κυτταρικό τμήμα: την εξωκυτταρική μήτρα (extracellular matrix, ECM) και το υγρό περιβάλλον με τους διαλυτούς παράγοντες (κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες και χημειοκίνες) (Stakiw et al., 2017).

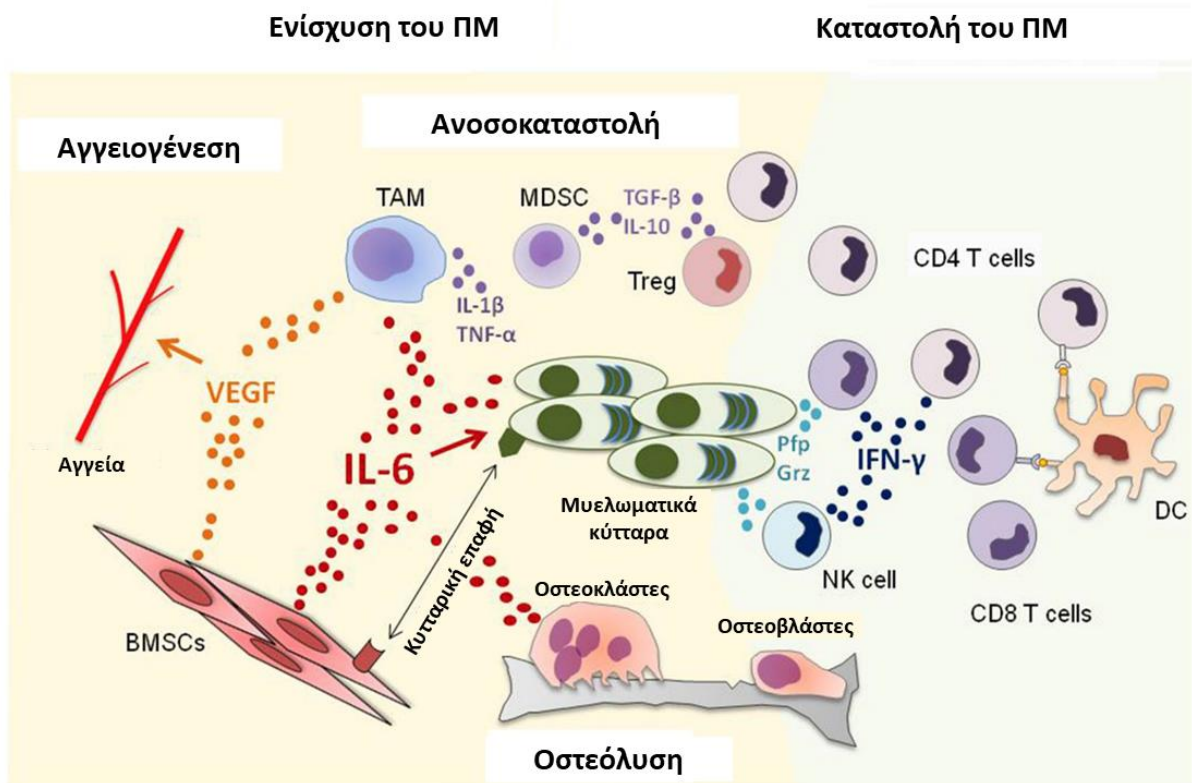
Αρχικά, η παρουσία των μυελωματικών κυττάρων διαταράσσει την ισορροπία του ΜΟ. Στους υγιείς υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ των διαδικασιών οστεόλυσης και αναδόμησης νέου οστίτη ιστού. Η δράση των οστεοβλαστών ελέγχεται από την ανασταλτική επίδραση των αναστολέων του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt, δηλαδή του παράγοντα dickkopf1 (DKK1) και της σκληροστοΐνης. Αντίστοιχα, οι οστεοκλάστες ελέγχονται από την οστεοπρωτεγερίνη (OPG), η οποία εκκρίνεται από τα οστεοκύτταρα. Ωστόσο, κατά την ανάπτυξη του ΠΜ στους θύλακες του ΜΟ, τα μυελωματικά κύτταρα επάγουν άμεσα την οστεόλυση μέσω της έκκρισης MIP-1α, IL-6 και έμμεσα με την αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης RANKL από τα στρωματικά κύτταρα. Με τη σειρά τους οι οστεοκλάστες αποκρίνονται εκκρίνοντας αντι-αποπτωτικές κυτταροκίνες, μεταξύ των οποίων οι IL-6, BAFF και APRIL, επάγοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των μυελωματικών κυττάρων (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μυελωματικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών, σε αντιπαράθεση με την αρχική κατάσταση ισορροπίας (Hou et al., 2019).

Πέραν όμως της διατάραξης της ισορροπίας των κυττάρων που αποτελούν τον οστίτη ιστό, η παρουσία ΠΜ συνοδεύεται και από αλλαγές στο ανοσολογικό μικροπεριβάλλον (**Εικόνα 1.6**). Σε αρχικά στάδια της νόσου, όπως στην MGUS, υπάρχει ανοσολογικός έλεγχος των μυελωματικών κυττάρων σε ένα ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον. Τα δενδριτικά κύτταρα ενεργοποιούν τα CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα μέσω της παρουσίας αντιγόνων από τα μυελωματικά κύτταρα, ενώ τα NK κύτταρα δρουν ανεξάρτητα λύοντας τα καρκινικά κύτταρα μέσω έκκριση κυτταροτοξικών μορίων, όπως περφορίνης και θρυμματίνης. Με την εξέλιξη σε ΠΜ, τα MDSCs αλλά και τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (Tregs) εκκρίνουν ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες επιτρέποντας τη διαφυγή των μυελωματικών κυττάρων από τους μηχανισμούς ανοσοεπιτήρησης (Guillerey et al., 2016).

Το επόμενο στάδιο εξέλιξης του μικροπεριβάλλοντος στο ΠΜ είναι η διαμόρφωση συνθηκών που θα επιτρέψουν την απελευθέρωση των μυελωματικών κυττάρων στην κυκλοφορία και την εξωμυελική εντόπισή τους. Το αρχικό βήμα περιλαμβάνει τη μετάβαση των μυελωματικών κυττάρων από φαινότυπο επιθηλιακού κυττάρου σε φαινότυπο μεσεγχυματικού κυττάρου (epithelial to mesenchymal transition, EMT). Ο φαινότυπος επιθηλιακού κυττάρου χαρακτηρίζεται από πλακοειδή μορφολογία και ανάπτυξη επιθηλίου στον όγκο, ενώ ο φαινότυπος μεσεγχυματικού κυττάρου χαρακτηρίζεται από έντονες μεμβρανικές πτυχώσεις που επιτρέπουν την απελευθέρωση του κυττάρου από το μικροπεριβάλλον του. Οι βασικότεροι ρυθμιστές της EMT είναι η έντονη έκφραση του υποδοχέα CXCR4 και στη συνέχεια, η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Snail, Slug και Twist που οδηγούν σε αποσιώπηση της έκφρασης της επιθηλιακής E-κατερίνης (E-cadherin), κύριος ρόλος της οποίας είναι η ανάπτυξη δεσμών προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων (Ullah, 2019).



Εικόνα 1.6. Το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών στο πολλαπλούν μυέλωμα (ΠΜ). Στα αρχικά στάδια της νόσου υπάρχει ανοσολογική καταστολή του ΠΜ, η οποία σταδιακά μεταστρέφεται σε καταστολή του ανοσολογικού μηχανισμού. Σε συνδυασμό με την αγγειογένεση και την οστεόλυση, τα μυελωματικά κύτταρα ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται (Guillerey et al., 2016).

1.2.1 Μη κυτταρικό μικροπεριβάλλον

Το μη κυτταρικό μέρος του μικροπεριβάλλοντος του ΜΟ απαρτίζεται από: i) την εξωκυττάρια μήτρα (ECM) και ii) το ενδιάμεσο υγρό μέσο (liquid milieu) που περιέχει χημειοκίνες, κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Η ECM είναι ένα ινώδες βασικό δομικό δίκτυο εκκρινόμενων πρωτεϊνών που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων. Η σύνθεσή της γίνεται από τους οστεοβλάστες και το οργανικό της μέρος αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου I ενώ περιλαμβάνονται και ένας μεγάλος αριθμός μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών, όπως πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες (Lin et al., 2020). Τα μυελωματικά κύτταρα προσκολλώνται στην ECM μέσω των επιφανειακών μορίων προσκόλλησης συνδεκάνης-1 και VLA-4, τα οποία συνδέονται με το κολλαγόνο τύπου I και με πρωτεΐνες όπως η φιβρονεκτίνη (Stakiw et al., 2017).

Τα σημαντικότερα σχετιζόμενα με το ΠΜ διαλυτά μόρια του ενδιάμεσου υγρού είναι η IL-6, ο αυξητικός παράγοντας 1 της ινσουλίνης (IGF-1), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και τα εξωσώματα. Οι παράγοντες αυτοί συμβάλλουν ουσιαστικά στην αντίσταση επαγόμενη από διαλυτούς παράγοντες (soluble factor-mediated resistance, SFM-DR) (Papadas and Asimakorou, 2018). Η δράση της IL-6 στο ΜΟ θεωρείται και αυτοκρινής και παρακρινής, ενώ διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην καρκινική φυσιολογία, επηρεάζοντας την κυτταρική μετανάστευση, την ανάπτυξη του όγκου, την απόπτωση, την αγγειογένεση και τη διαφοροποίηση των παθολογικών κυττάρων (Burger, 2013). Βασική δράση της IL-6 στο ΜΟ είναι η ενίσχυση της παραγωγής VEGF, ενώ επιπρόσθετα, η πρόσδεση της IL-6 στον υποδοχέα της οδηγεί στην ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών MEK/MAPK, JAK/STAT3 και PI3k/Akt. Τέλος, η IL-6 προκαλεί τη διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων ενεργοποιώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/Raf/MEK-ERK (Manier et al., 2012). Ο IGF-1 στο ΠΜ έχει συνδεθεί με την εδραίωση και την εξέλιξη της νόσου και η σημαντικότητά του αναδείχθηκε όταν η αναστολή μόνο της IL-6 δεν επέδρασε στην πορεία του ΠΜ. Η δέσμευση του ελεύθερου IGF-1 στον υποδοχέα του σηματοδοτεί τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των μυελωματικών κυττάρων. Εντός του ΜΟ, ο IGF-1 παράγεται συνεχώς από τους οστεοβλάστες και τα βλαστοκύτταρα (Bieghs et al., 2014, 2016).

Η αύξηση της αγγείωσης του ΜΟ έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση καθότι τα νέα αγγεία μεταφέρουν περισσότερο οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στα μυελωματικά κύτταρα προωθώντας την ανάπτυξή τους. Ο VEGF δρα και ως μιτογόνο και επηρεάζει την αγγειογενετική ισορροπία οδηγώντας στην εξέλιξη του ΠΜ, γι' αυτό και αποτελεί ένα σημαντικό θεραπευτικό στόχο (Podar and Anderson, 2005; Gkotszamanidou et al., 2013). Όσον αφορά τα εξωσώματα, τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να αναδεικνύεται ο ρόλος τους στην αμφίδρομη επικοινωνία των μυελωματικών κυττάρων με το μικροπεριβάλλον τους που οδηγεί σε αντίσταση στη θεραπεία (Di Marzo et al., 2016). Τα εξωσώματα μεταφέρουν ποικίλα μικρομοριακά στοιχεία μεταξύ των οποίων και μόρια mRNA, microRNAs κ.ά. Σημαντικά microRNA στην εξέλιξη του ΠΜ είναι τα miR-21, miR-146a, let-7b και miR-18a, που όταν ανιχνεύονται σε αυξημένο επίπεδο στα εξωσώματα αποτελούν πρώιμους βιοδείκτες δυσμενούς εξέλιξης του ΠΜ. Η υπερέκφραση τους οδηγεί σε παραγωγή και έκκριση πολλών κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένης της IL-6, οι οποίες ενισχύουν την επιβίωση και την επέκταση των μυελωματικών κυττάρων (De Veirman et al., 2016; Moloudizargari et al., 2019).

1.2.2 Οστεοβλάστες και οστεοκλάστες

Ο οστίτης ιστός βρίσκεται συνεχώς σε κατάσταση αποδόμησης-αναδόμησης. Φυσικοί και ορμονικοί παράγοντες οδηγούν στη σύνθεσή του από τους οστεοβλάστες ή στην απορρόφησή του από τους οστεοκλάστες. Η συνήθης ισορροπία μεταξύ απορρόφησης και δημιουργίας νέου οστικού ιστού διαταράσσεται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ΠΜ, με αποτέλεσμα την καταστροφή της οστικής δομής και την αντικατάσταση από οστεολυμένες περιοχές με επικράτηση των οστεοκλαστών.

Πιο συγκεκριμένα, τα μυελωματικά κύτταρα εκκρίνοντας τους παράγοντες MIPα/β και VEGF, προάγουν την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών. Αυτοί με τη σειρά τους παράγουν IL-6 ενισχύοντας την επιβίωση των μυελωματικών κυττάρων. Επομένως, η αλληλεπίδραση των μυελωματικών κυττάρων με τους οστεοκλάστες δημιουργεί νέους χώρους για την ανάπτυξη του μυελώματος και ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των κλωνικών πλασματοκυττάρων. Από την άλλη πλευρά, στο ΠΜ οι οστεοβλάστες δεν εκκρίνουν αρκετή πρωτεΐνη OPG (η οποία φυσιολογικά ανταγωνίζεται τον παράγοντα RANKL για τη σύνδεση στον υποδοχέα RANK, αναστέλλοντας τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών), οδηγώντας σε ενεργοποίηση των οστεοκλαστών. Τέλος, τα μυελωματικά κύτταρα εκκρίνουν τον παράγοντα sFRP-2, καταστέλλοντας και τη διαφοροποίηση των άωρων οστεοβλαστών (Moser-Katz et al., 2021).

Επομένως, η καταστολή της δράσης των οστεοβλαστών και η ενεργοποίηση των οστεοκλαστών είναι ο βασικός άξονας που εκμεταλλεύεται το ΠΜ για την εξωμυελική του εντόπιση στον οστίτη ιστό, και ο λόγος RANKL/OPG αποτελεί έναν προγνωστικό παράγοντα για την εξέλιξη της νόσου (Giuliani et al., 2001).

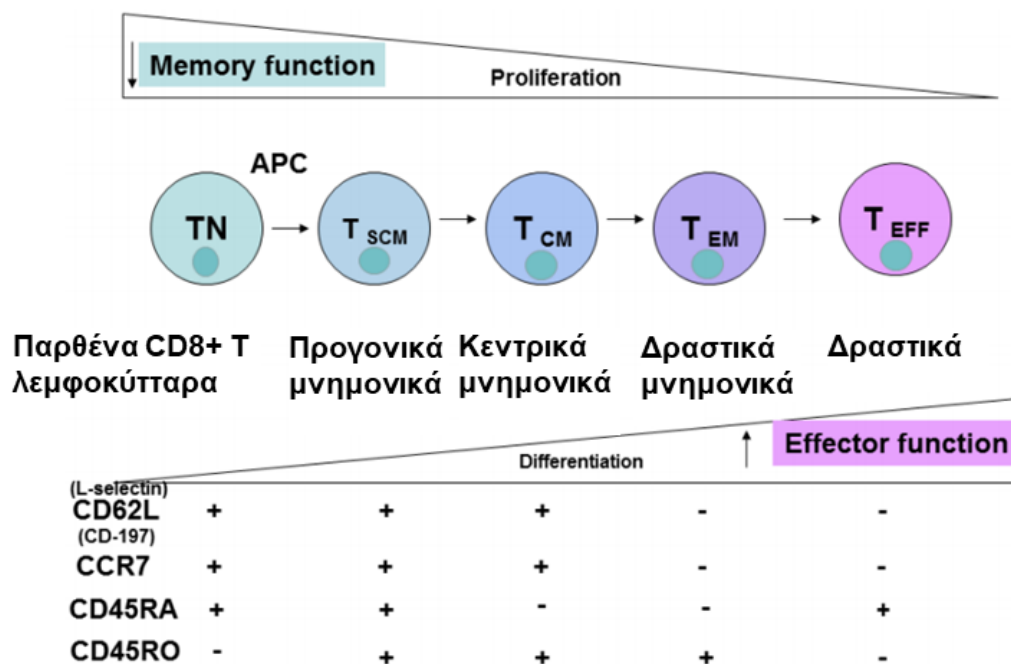
1.2.3 T και NK κύτταρα

Τα T λεμφοκύτταρα είναι βασικός υποπληθυσμός του ανοσοποιητικού συστήματος με ποικίλες δράσεις. Παράγουν κυτταροκίνες, ρυθμίζουν την ανοσολογική απάντηση και έχουν κυτταροτοξική δραστηριότητα. Κάθε T λεμφοκύτταρο έχει έναν ειδικό υποδοχέα (T cell receptor, TCR), ο οποίος αναγνωρίζει αντιγόνα που παρουσιάζονται από τα μόρια του μείζοντος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) και με βάση τον συν-υποδοχέα που φέρουν χωρίζονται σε:

- Βοηθητικά T λεμφοκύτταρα, CD4+, τα οποία συνδέονται με MHC μόρια τάξης II και συμμετέχουν στην κυτταρομεσολαβητική ανοσία.
- Κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, CD8+, που συνδέονται με MHC μόρια τάξης I και έχουν κυτταροτοξική δράση.

Η ωρίμανσή τους ανοσοφαινοτυπικά στηρίζεται στον άξονα CD45RA/CD45RO (Golubovskaya and Wu, 2016) (Εικόνες 1.7 και 1.8), και στο ΠΜ η κυτταροτοξική τους δράση μπορεί να κατασταλεί από την ενεργοποίηση συγκεκριμένων υποδοχέων, όπως του PD-1 και του CTLA-4 (Shay et al., 2016).

Τα NK κύτταρα είναι τύπος κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίσουν καρκινικά κύτταρα χωρίς τη μεσολάβηση MHC μορίων. Η δραστηριότητά τους σχετίζεται αντίστροφα με την πρόοδο του ΠΜ, ενώ η αντικαρκινική τους δράση έχειδειχθεί ότι ενισχύεται από παράγοντες, όπως η βορτεζομίμη και η λεναλιδομίδη. Συνεπώς, η διατήρηση της ενεργότητάς τους αποτελεί φαρμακευτικό στόχο, ο οποίος επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι η αναστολή του PD-1 στα NK κύτταρα ενισχύει την κυτταροτοξικότητά τους έναντι των μυελωματικών κυττάρων in vitro, ενώ η ex vivo καλλιέργεια και ενεργοποίησή τους μπορεί να διατηρήσει το δυναμικό τους και όταν επανεγχυθούν σε ασθενείς με ΠΜ (Benson et al., 2010; Szmania et al., 2015).



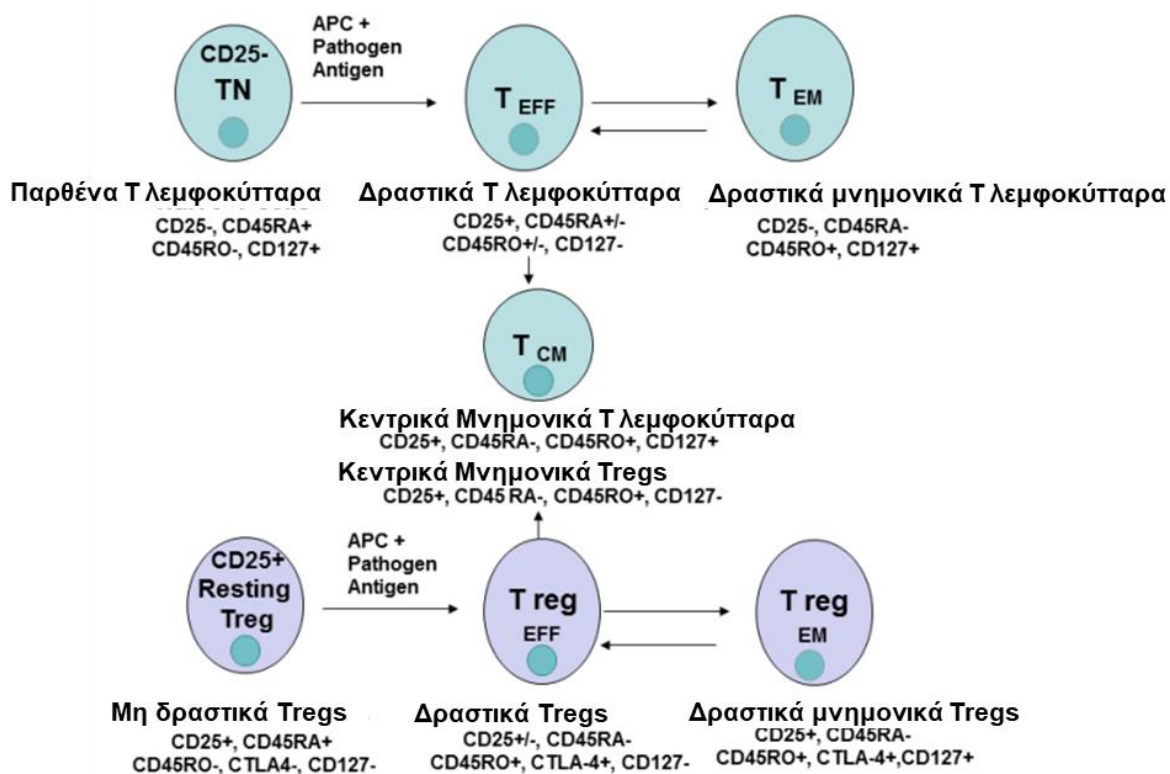
Εικόνα 1.7. Κατά τη διαφοροποίηση των CD8+ T λεμφοκυττάρων, το πολλαπλασιαστικό δυναμικό τους μειώνεται, ενώ αντίθετα η δραστηριότητά τους αυξάνεται (Golubovskaya and Wu, 2016).

1.2.4 Ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα

Όπως υποδεικνύει το όνομα, τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (regulatory T cells, Tregs) είναι T λεμφοκύτταρα τα οποία έχουν ρυθμιστικό ρόλο κυρίως στην καταστολή άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Η δράση τους είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της περιφερειακής ανοσολογικής ανοχής, την αποφυγή της αυτοανοσίας και τον περιορισμό των χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων. Εντούτοις, τα Tregs δρουν αρνητικά καταστέλλοντας την ανοσία και περιορίζοντας τις αντικαρκινικές ανοσολογικές απαντήσεις. Τα Tregs δρουν με τέσσερις κυρίως κατηγορίες ανασταλτικών δράσεων: εκκρίνοντας κατασταλτικές κυτταροκίνες, λύοντας τα δραστικά κύτταρα, μέσω διακοπής του κυτταρικού μεταβολισμού και τροποποιώντας την αντιγονοπαρουσιαστική λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων (Vignali et al., 2008).

Ανοσοφαινοτυπικά τα Tregs είναι CD4⁺ λεμφοκύτταρα που χαρακτηρίζονται από έκφραση του CD25 και του FoxP3. Η διαφοροποίηση των Tregs αρχίζει όταν τα αδρανή Tregs χάνουν την χαρακτηριστική έκφραση του CD45RA και εκφράζουν την ισομορφή CD45RO (**Εικόνα 1.8**). Τελικό στάδιο διαφοροποίησης των Tregs είναι τα τελικά δραστικά Tregs (terminal effector Tregs), που θεωρούνται ξεχωριστός υποπληθυσμός και χαρακτηρίζονται από την έκφραση του HLA-DR και του CTLA-4 (Nishikawa and Sakaguchi, 2010). Ένας ειδικός υποπληθυσμός των Tregs είναι αυτά τα οποία εκφράζουν το δείκτη CD39. Το CD39 είναι εξωνουκλεοσιδάση με ισχυρή κατασταλτική δράση, απενεργοποιώντας το εξωκυττάριο προ-φλεγμονώδες ATP. Επομένως η έκφραση του CD39 μπορεί να θεωρηθεί ως δείκτης ενεργών Tregs σε ασθενείς με φλεγμονώδεις ανοσολογικές απαντήσεις (Zhao et al., 2017), ενώ η ανάπτυξη ανταγωνιστή του CD39 αποτελεί τρέχοντα θεραπευτικό στόχο σε εγκεκριμένες κλινικές μελέτες για διάφορους τύπους καρκίνου (Moesta et al., 2020).

Στο ΠΜ, ο ΜΟ των ασθενών περιέχει Tregs ανεξαρτήτως του σταδίου της νόσου. Ο ρόλος τους στην εξέλιξη του ΠΜ δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και παρότι θεωρούνται λειτουργικά στο ΜΟ, είναι λιγότερο κατασταλτικά από ότι σε άλλες νεοπλασίες (πχ. στη χρόνια Β λεμφοκυτταρική λευχαιμία) όπου έχουν ενεργό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου (Lad et al., 2019).



Εικόνα 1.8. Η διαφοροποίηση των παρθένων CD4+ Τ λεμφοκυττάρων και των Tregs προς δραστικές μορφές (Golubovskaya and Wu, 2016).

1.2.5 Κατασταλτικά κύτταρα μυελικής προέλευσης

Τα κατασταλτικά κύτταρα μυελικής προέλευσης (Myeloid-derived suppressor cells, MDSCs), έχουν αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια σε σημαντικούς ρυθμιστές της ανοσολογικής απάντησης στον καρκίνο και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις. Προέρχονται από πρώιμα μυελοκύτταρα τα οποία τροφοδοτούν την παραγωγή λευκών αιμοσφαιρίων όταν υπάρχει ανάγκη, όπως σε κατάσταση φλεγμονής και μετά παραμένουν σε χαμηλά ποσοστά στο ΜΟ. Όταν όμως υπάρχει ένα χρόνιο νόσημα όπως (πχ καρκίνος) εξελίσσονται στα MDSCs, τα οποία παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο ΜΟ και στο περιφερικό αίμα (ΠΑ) παρεκκλίνοντας από το προγραμματισμένο μονοπάτι διαφοροποίησής τους. Σε αυτή την κατάσταση τα MDSCs χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να καταστέλλουν την ανοσολογική απάντηση έναντι του καρκίνου, ασκώντας αρνητική επίδραση στη δράση των Τ και ΝΚ κυττάρων (Veglia et al., 2018).

Τα MDSCs, αν και έχουν κοινή ονομασία, είναι ένας ετερογενής πληθυσμός που αποτελείται από: i) τα MDSCs πολυμορφοπυρηνικής προέλευσης (PMN-MDSC) τα οποία

χαρακτηρίζονται από την έκφραση του CD11b και του CD15, ii) τα MDSCs μονοκυτταρικής προέλευσης (M-MDSCs) που χαρακτηρίζονται από την έκφραση του CD14 και τη χαμηλή έκφραση του HLA-DR και τέλος iii) τα πρώιμα MDSCs (e-MDSCs) με χαρακτηριστική θετικότητα στο CD33 (Bronte et al., 2016). Αντίστοιχα οι κατασταλτικοί μηχανισμοί των τριών ομάδων διαφέρουν και συγκεκριμένα: τα PMN-MDSCs απελευθερώνουν ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) ενώ τα M-MDSCs απελευθερώνουν την επαγόμενη συνθάση του νιτρικού οξέως (iNOS) και αργινάση. Το κοινό αποτέλεσμα αυτών των μηχανισμών είναι η απενεργοποίηση του TCR και η καταστολή του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων. Επιπλέον, τα MDSCs αλληλεπιδρούν και με άλλους πληθυσμούς στο μικροπεριβάλλον του MO, μεταξύ των οποίων είναι και τα Tregs. Συγκεκριμένα, μέσω έκφρασης της συνδιεγερτικής πρωτεΐνης CD40 στην επιφάνεια τους και της έκκρισης κυτταροκινών (TGF-β, IFN-γ και IL-10) και αργινάσης τα MDSCs προκαλούν τον πολλαπλασιασμό των Tregs και την παραμονή τους στο μικροπεριβάλλον του MO (Serafini et al., 2008).

1.2.6 Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα μυελικής προέλευσης

Εξαιτίας της σύγχυσης που υπάρχει σχετικά με την ονομασία των μεσεγχυματικών κυττάρων, η Διεθνής Εταιρεία Κυτταρικής και Γονιδιακής Θεραπείας (International Society for Cell & Gene Therapy, Mesenchymal Stem Cell Committee, ISCT-MSC) διευκρίνισε το 2005 ότι ο όρος «μεσεγχυματικό βλαστοκύτταρο» (mesenchymal stem cell) δεν ταυτίζεται ούτε χρησιμοποιείται εναλλακτικά του όρου «μεσεγχυματικό στρωματικό κύτταρο» (mesenchymal stromal cell, MSC). Τα πρώτα είναι ένας πληθυσμός βλαστοκυττάρων με λειτουργία αυτο-πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης ανάλογη των προγονικών κυττάρων, ενώ τα δεύτερα είναι ένας ετερογενής πληθυσμός με χαρακτηριστικά εκκριτικά και ανοσορρυθμιστικά. Μάλιστα, η ISCT-MST έθεσε τα ελάχιστα απαραίτητα κριτήρια χαρακτηρισμού των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων:

- Είναι προσκολλώμενα κύτταρα, με πλαστικότητα στη μορφολογία τους
- Εκφράζουν τους δείκτες CD71, CD90 και CD105
- Δεν εκφράζουν τους δείκτες αιματολογικής και ενδοθηλιακής διαφοροποίησης CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a και HLA-DR
- Δύνανται να διαφοροποιηθούν in vitro σε λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα και οστεοβλάστες

Το 2019, η επιτροπή ISCT-MST, αναδιατυπώνοντας τον ορισμό και τα κριτήρια διαπίστωσε ότι στη διεθνή βιβλιογραφία ο όρος MSC αναφερόταν σε 54.858 δημοσιεύσεις ως βλαστοκύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης έναντι 58.111 δημοσιεύσεων όπου αναφερόταν ορθά ως στρωματικά κύτταρα (Viswanathan et al., 2019). Επομένως προβαίνοντας σε μια εξαρχής αποσαφήνιση του

όρου, στην παρούσα διδακτορική διατριβή ως MSCs εννοούμε τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα τα οποία πληρούν τα προαναφερθέντα κριτήρια. Η προέλευση των MSCs μπορεί να δηλώνεται στα αρχικά του ονόματος τους, επομένως τα MSCs με προέλευση το ΜΟ (BM) ονομάζονται μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα μυελικής προέλευσης, ή αλλιώς BM-MSCs.

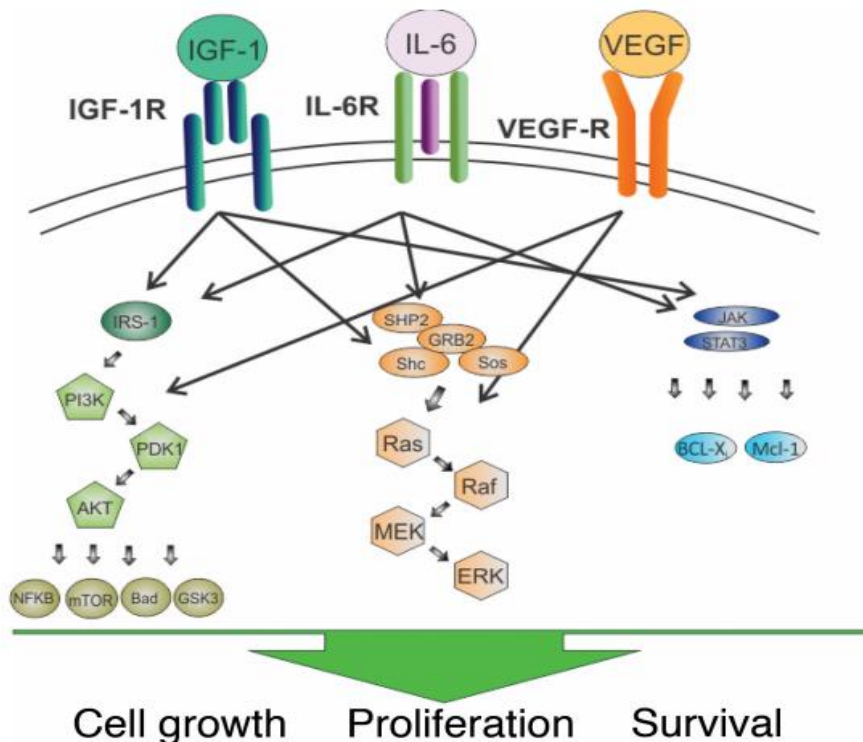
Τα BM-MSCs ανευρίσκονται σε πολύ μικρή σχετική συχνότητα (η αναλογία τους σε ένα φυσιολογικό δείγμα ΜΟ είναι μεταξύ 0,01% και 0,0001% επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων) και για το λόγο αυτό είναι δύσκολο να ανιχνευθούν σε δείγμα ΜΟ χωρίς κάποια ειδική διαδικασία απομόνωσης. Υπό ειδικές συνθήκες, τα MSCs μπορούν να καλλιεργηθούν *in vitro* και από τον αρχικό πληθυσμό τους να προκύψουν πολλοί κυτταρικοί τύποι. Οι πρωτογενείς πληθυσμοί BM-MSCs μπορούν να απομονωθούν από πληθυσμούς μονοπύρηνων κυττάρων του ΜΟ (Bone Marrow Mononuclear Cells, BM-MNCs) αλλά είναι σημαντικό να τονιστεί η κυτταρική ετερογένεια εντός μιας καλλιέργειας καθώς και το πώς αυτή μπορεί να ποικίλει ανάμεσα στους διάφορους δότες. Μάλιστα, όπως διαπιστώσαμε και στην παρούσα διδακτορική διατριβή, οι διαφορές στην κινητική της ανάπτυξης και στις σχετικές αναλογίες διαφορετικών τύπων κυττάρων ανάμεσα στα δείγματα από διαφορετικούς δότες είναι πολύ συνηθισμένες (Ramakrishnan et al., 2013).

Στο περιβάλλον του ΜΟ, τα πλασματοκύτταρα προσκολλώνται στα BM-MSCs και αυτό το γεγονός οδηγεί σε ποικιλία αλληλεπιδράσεων που αιτιολογούν το σπουδαίο ρόλο αυτής της «κυτταρικής συνομιλίας» στο ΠΜ. Είναι γνωστό εδώ και αρκετά χρόνια, ότι η αντίσταση των μυελωματικών κυττάρων σε συμβατικές θεραπείες, όπως στα γλυκοκορτικοειδή και σε κυτταροτοξικούς παράγοντες, ενισχύεται από την παρουσία των BM-MSCs (Mitsiades et al., 2007). Η θεωρία της επαγόμενης από την κυτταρική προσκόλληση αντίστασης στη θεραπεία (cell-adhesion-mediated drug resistance, CAM-DR), περιγράφει το ρόλο της κυτταρικής προσκόλλησης μέσω της φμπρονεκτίνης, η οποία προσδίδει αντοχή απέναντι στη χημειοθεραπεία. Η φμπρονεκτίνη, τα BM-MSCs, και οι ιντεγκρίνες που εκκρίνονται από τα κακοήθη πλασματοκύτταρα επάγουν την CAM-DR απέναντι σε ένα μεγάλο εύρος παραγόντων, όπως η βορτεζομίμπη, η βινκριστίνη, η δοξορουβικίνη και η δεξαμεθαζόνη (Katz, 2010).

Στο μικροπεριβάλλον της νόσου, η προσκόλληση των πλασματοκυττάρων στα BM-MSCs γίνεται μέσω των μορίων VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) και VLA-4 (Very Late Antigen 4). Η προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων στα BM-MSCs ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια επαγωγής αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών οι οποίες ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Πιο συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση μεταξύ πλασματοκυττάρων και BM-MSCs προκαλεί την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ και την έκκριση IL-6 από τα BM-MSCs (Lemaire et al., 2011). Όπως αναφέρθηκε, η IL-6 ενισχύει την παραγωγή και

την έκκριση του αυξητικού παράγοντα VEGF από τα μυελωματικά κύτταρα. Η ύπαρξη αυτού του παρακρινούς βρόχου καθιστά το μικροπεριβάλλον του ΜΟ ευνοϊκό για την επιβίωση και την ανάπτυξη των κυττάρων του ΠΜ.

Η αλληλεπίδραση των BM-MSCs με τα μυελωματικά κύτταρα επιτυγχάνεται επιπλέον μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch. Η επαφή των Notch-Notch συνδετών (Notch-Notch ligand) οδηγεί σε ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch, τόσο στα μυελωματικά κύτταρα, όσο και στα BM-MSCs, με άμεσο επακόλουθο την επαγωγή της παραγωγής των IL-6, VEGF και IGF-1 που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κλωνικών πλασματοκυττάρων (Εικόνα 1.9). Τέλος, τα BM-MSCs από ασθενείς με ΠΜ εκφράζουν διάφορα μόρια τα οποία προάγουν την αγγειογένεση, όπως οι αυξητικοί παράγοντες VEGF, bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), αγγειοποιητίνη 1 (Ang-1), TGF-β (Transforming Growth Factor-β), PDGF (Platelet-derived Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor) και η IL-1 (Manier et al., 2012).



Εικόνα 1.9: Σχηματική απεικόνιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από την πρόσδεση των IL-6, IGF-1 και VEGF στους ειδικούς υποδοχείς τους στην επιφάνεια των μυελωματικών κυττάρων και οδηγούν στην κυτταρική αύξηση, διαφοροποίηση και επιβίωσή τους (Lemaire et al., 2011).

Μία άλλη δραστηριότητα των BM-MSCs αφορά τα εξωσώματα, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μικροπεριβάλλον του ΜΟ. Έχει βρεθεί ότι τα BM-MSCs από ασθενείς με ΠΜ απελευθερώνουν εξωσώματα, τα οποία μεταφέρονται στα μυελωματικά κύτταρα και ρυθμίζουν την ανάπτυξη του όγκου με τη μεσολάβηση συγκεκριμένων microRNA (miRNA). Όπως έχει δειχθεί σε σχετικές μελέτες, το προφίλ των miRNAs διαφέρει μεταξύ των εξωσωμάτων από BM-MSCs που προέρχονται από υγιείς δότες και αυτών που προέρχονται από ασθενείς με ΠΜ (Moloudizargari et al., 2019). Για παράδειγμα, τα επίπεδα του miR-15a ήταν σημαντικά αυξημένα σε εξωσώματα που προέρχονταν από BM-MSCs φυσιολογικών δοτών σε σχέση με αυτά των ασθενών. Κάτι τέτοιο υποδεικνύει τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του miR-15a στους φυσιολογικούς δότες. Επιπλέον, η μείωση του miR-15a σε εξωσώματα προερχόμενα από φυσιολογικά BM-MSCs, προώθησε την ανάπτυξη μυελωματικών κυττάρων. Κατά συνέπεια, τα εξωσώματα αποτελούν φορείς γενετικών και πρωτεϊνικών πληροφοριών κατά την αλληλεπίδραση των μυελωματικών κυττάρων με τα BM-MSCs (Roccaro et al., 2013).

1.2.7. Μακροφάγα σχετιζόμενα με τον καρκίνο

Τα μακροφάγα σχετιζόμενα με τον καρκίνο (tumor associated macrophages, TAMs), προέρχονται από κυκλοφορούντα μονοκύτταρα και προσελκύονται στο μικροπεριβάλλον της νόσου από πλήθος επαγωγικών ουσιών που περιλαμβάνουν τον παράγοντα διέγερσης αποικιών-1 (CSF-1), της χυμοκίνης της οικογένειας CC (CCL-2, , CCL-3, CCL-4, CCL-5 και CCL-8) και τον παράγοντα VEGF. Η δραστηριότητα των μακροφάγων ξεκινάει με την ενεργοποίηση τους προς δύο κατευθύνσεις, τα μακροφάγα τύπου M1 και τα τύπου M2. Τα M1 επάγονται από την IFN-γ, από μικροβιακές εστίες, από κυτταροκίνες και από ενεργές ρίζες οξυγόνου. Με τη σειρά τους εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και διατηρούν υψηλά επίπεδα υπεροξειδικών ανιόντων και ελεύθερων ριζών. Η ενεργοποίηση των M2 επάγεται από τις IL-4 και IL-13 (Ribatti et al., 2014).

Σε καρκινικό περιβάλλον σε καταστολή πιστεύεται ότι υπερτερεί ο τύπος M1 με αντικαρκινική δραστηριότητα, ενώ στην εξέλιξη της νόσου η ισορροπία τείνει προς τον τύπο M2 όπου ευνοεί την δυσμενή πρόγνωση. Συγκεκριμένα, στο ΠΜ η πόλωση προς τον τύπο M2 έχει πρόσφατα προταθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας συσχετιζόμενος με μικρότερη επιβίωση μέχρι εξέλιξη νόσου και συνολική επιβίωση (Chen et al., 2017; Wang et al., 2019).

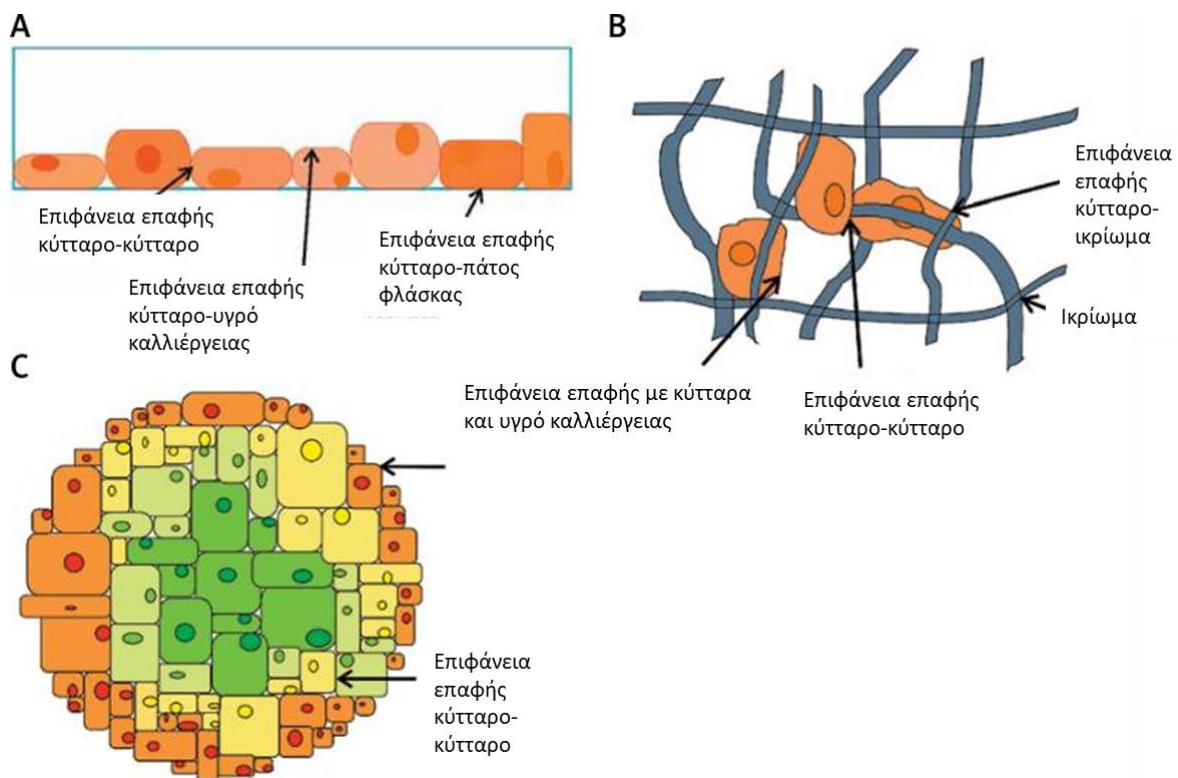
1.3 Ex vivo μοντέλα μελέτης

1.3.1 Γενικά στοιχεία για τις τρισδιάστατες καλλιέργειες

Οι καλλιέργειες κυττάρων αποτελούν σημαντικό ερευνητικό εργαλείο προσφέροντας ένα ασφαλές, προσβάσιμο και τροποποιήσιμο μοντέλο βιολογικών μηχανισμών ex vivo, δηλαδή στο εργαστήριο. Τόσο οι κυτταρικές σειρές, όσο και οι πρωτογενείς καλλιέργειες, είναι ανεκτίμητα εργαλεία για πληθώρα ερευνητικών εφαρμογών. Οι τεχνικές in vitro καλλιέργειας κυττάρων σε δισδιάστατα (2D) συστήματα είναι πλέον καθιερωμένα μοντέλα μελέτης. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, υπάρχει σημαντική πρόοδος στο πεδίο των κυτταροκαλλιεργειών με την εμφάνιση τρισδιάστατων (3D) συστημάτων καλλιέργειας (**Εικόνα 1.10**). Μάλιστα, σε συνδυασμό με την αλματώδη ανάπτυξη των απεικονιστικών μεθόδων και του λογισμικού ανάλυσης και επεξεργασίας εικόνων, οι πολλαπλές δυνατότητες που προσφέρουν τα συστήματα 3D καλλιέργειας τις καθιστούν όλο και συχνότερα χρησιμοποιούμενες (Antoni et al., 2015).

Οι 3D καλλιέργειες θεωρείται ότι προσεγγίζουν περισσότερο την in vivo κατάσταση σε σχέση με τις 2D. Σε ένα σύστημα 2D, τα κύτταρα των θηλαστικών αναπτύσσονται προσκολλημένα από τη μια τους πλευρά σε αφύσικα συμπαγή υλικά, όπως το γυαλί ή το πολυστυρένιο, ενώ η άλλη πλευρά τους εκτίθενται στο υγρό θρεπτικό μέσο. Οι επαφές κυττάρου-κυττάρου στη μονοστιβάδα δημιουργούνται μόνο στην περιφέρεια των κυττάρων. Αυτές οι συνθήκες καλλιέργειας ωστόσο, διαφέρουν σημαντικά από την πραγματική in vivo κατάσταση, καθώς οι ιστοί του ανθρώπινου σώματος είναι στην πλειονότητά τους τρισδιάστατοι (Karařczyřska et al., 2018).

Εκτός όμως από τις χωρικές διαφορές, σε συμβατικές 2D καλλιέργειες υπάρχει μεγάλη υποβάθμιση στα συστατικά του εξωκυττάριου περιβάλλοντος δηλαδή της ECM καθώς και στην αλληλεπίδραση του κυττάρου με το εξωκυττάριο περιβάλλον (cell-to-matrix), στοιχεία σημαντικά για τη μορφολογία, τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, τη γονιδιακή έκφραση αλλά και για άλλες κυτταρικές λειτουργίες όπως η μετανάστευση και η προσκόλληση (Dhaliwal, 2015). Αντίθετα, στα 3D συστήματα έχει παρατηρηθεί μεγαλύτερη απόθεση εξωκυττάριων ουσιών και κατ' επέκταση, καλύτερη έκφραση πολλών μορίων-δεικτών. Παράλληλα, οι παραπάνω κυτταρικές λειτουργίες (μετανάστευση, προσκόλληση, γονιδιακή έκφραση, κλπ.) προσεγγίζουν περισσότερο τις αντίστοιχες σε in vivo συνθήκες. Η αφθονία της εξωκυττάριας ουσίας καθιστά το περιβάλλον των κυττάρων βιολογικά ενεργό, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους, ενώ παράλληλα, η μικρο-αρχιτεκτονική του 3D ικριώματος (3D scaffold) ευνοεί τη βιοφυσική και βιοχημική αλληλεπίδραση των κυττάρων. Συνεπώς, οι 3D καλλιέργειες παρέχουν μια καλύτερη και πιο ρεαλιστική εικόνα, με δυνατότητα χρήσης ως αξιόπιστων προγνωστικών εργαλείων σε διάφορες ex vivo δοκιμασίες (Ravi et al., 2015).



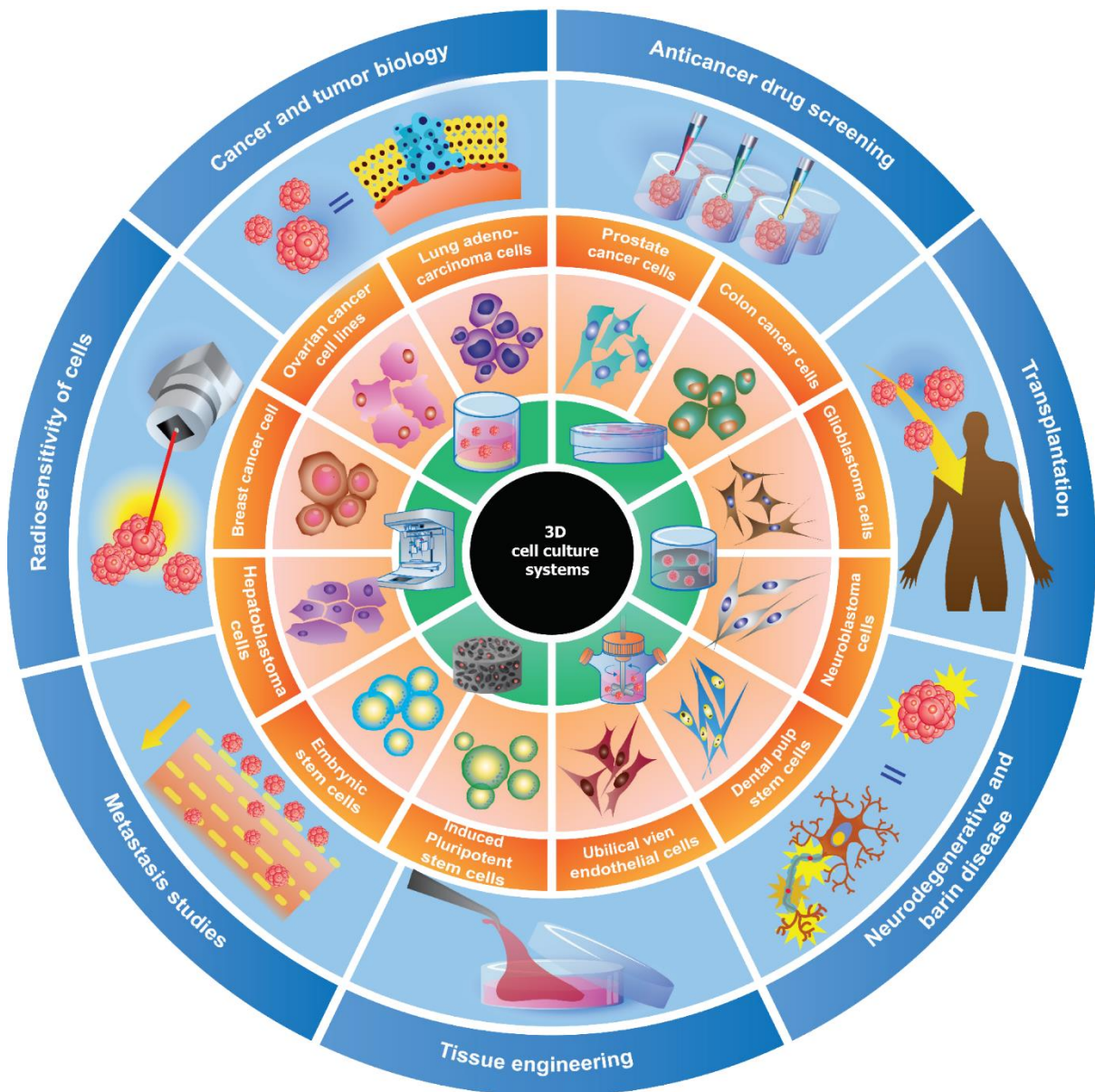
Εικόνα 1.10. Οι διάφοροι τύποι κυτταροκαλλιέργειών: **(Α)** Τα κύτταρα σε μονήρη στρώση στον πυθμένα της φλάσκας έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια του πυθμένα, το υγρό καλλιέργειας και με τα γειτονικά κύτταρα μόνο περιφερειακά. **(Β)** Τα κύτταρα που είναι προσκολλημένα σε ικρίωμα αναπτύσσονται προς όλες τις κατευθύνσεις και σε επαφή με τα γειτονικά κύτταρα και το καλλιεργητικό μέσο. **(Γ)** Μία ομάδα κυττάρων που αναπτύσσονται σφαιροειδώς σε υλικό γέλης μπορεί να έχουν κύτταρα εκτεθειμένα περισσότερο στο καλλιεργητικό μέσο στην περιφέρεια και κύτταρα που έρχονται σε επαφή με γειτονικά προς όλες τις κατευθύνσεις (Karaiczgyska et al., 2018).

1.3.2 Οι τρισδιάστατες κυτταροκαλλιέργειες ως μοντέλα μελέτης

Με την εξέλιξη της τεχνολογίας των υλικών, υπάρχει πλέον τεράστια ποικιλία διαφορετικών συστημάτων, βιοϋλικών και μεθόδων ως προς τις 3D καλλιέργειες, ωστόσο, δεν εφαρμόζονται όλες οι τεχνικές σε όλα τα μοντέλα που πρέπει να μελετηθούν (**Εικόνα 1.11**). Κατά την επιλογή ενός βιοϋλικού για ένα 3D μοντέλο, υπάρχουν πολλές ιδιότητες που πρέπει να ληφθούν υπόψιν, συμπεριλαμβανομένης της αντοχής, της βιοσυμβατότητας, της μεθόδου αποικοδόμησης, των μηχανικών ιδιοτήτων (ελαστικότητα/πλαστικότητα, ιξώδες), της διαμέτρου των πόρων, καθώς και της χημικής προσβασιμότητας (πρόσβαση σε οξυγόνο, θρεπτικά συστατικά και διάφορους

διαλυτούς παράγοντες), των οπτικών ιδιοτήτων, της προσκόλλησης, της πηγής προέλευσης (φυσικό ή συνθετικό υλικό) και πολλά άλλα. Τα συνθετικά υλικά εν γένει επιτρέπουν μεγαλύτερο έλεγχο, αλλά τα φυσικά υλικά συχνά επιτρέπουν περισσότερο τη φυσική αλληλεπίδραση των κυττάρων μεταξύ τους (cell-to-cell interaction) και των κυττάρων με την εξωκυττάρια μήτρα (cell-to-ECM).

Ένα κατάλληλο βιοϋλικό πρέπει να ρυθμίζει σωστά την κυτταρική συμπεριφορά ώστε αυτή να προσομοιάζει πιο ρεαλιστικά με την *in vivo* κατάσταση στα βιοχημικά, χημικά και τοπολογικά χαρακτηριστικά. Ένα 3D ικρίωμα συνήθως έχει τη δομή σπόγγου ή πλέγματος και η κατασκευή του εξαρτάται από το μοντέλο που θα πρέπει να προσομοιωθεί. Επομένως, οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψιν, όσον αφορά τη σύνθεση του είναι να παρέχει τα σωστά μηχανικά και λειτουργικά περιβαλλοντικά σήματα (π.χ. επιφανειακή χημεία και αρχιτεκτονική) ενώ παράλληλα θα πρέπει να διευκολύνει την κυτταρική προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση, χωρίς όμως να προκαλεί φλεγμονώδη απόκριση ή απόπτωση όταν πρόκειται να εισαχθεί σε ζωντανό οργανισμό (Sitarski and Reagan, 2017). Μάλιστα, το κατά πόσο εύκαμπτο ή δύσκαμπτο είναι το υλικό του ικρίωματος φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη γονιδιακή έκφραση, τη δομή του κυτταροσκελετού και την κυτταρική εξέλιξη (Rüdinger et al., 2014). Στον **Πίνακα 1.1** συνοψίζονται οι κυριότερες τεχνικές τρισδιάστατων καλλιιεργειών.



Εικόνα 1.11. Οι πιθανές εφαρμογές των τρισδιάστατων συστημάτων καλλιέργειας. Η εξέλιξη και διαφοροποίηση των συστημάτων επιτρέπει τη χρήση τους σε μεγάλο εύρος εφαρμογών, όπως διερεύνηση αντικαρκινικών φαρμάκων, μηχανική ιστών, έρευνα στη βιολογία του καρκίνου και στις νευροεκφυλιστικές νόσους (Chaicharoenaudomrung et al., 2019).

Πίνακας 1.1: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα διαφόρων τεχνικών τρισδιάστατης καλλιέργειας (Fang and Eglen, 2017; Chaicharoenaudomrung et al., 2019).

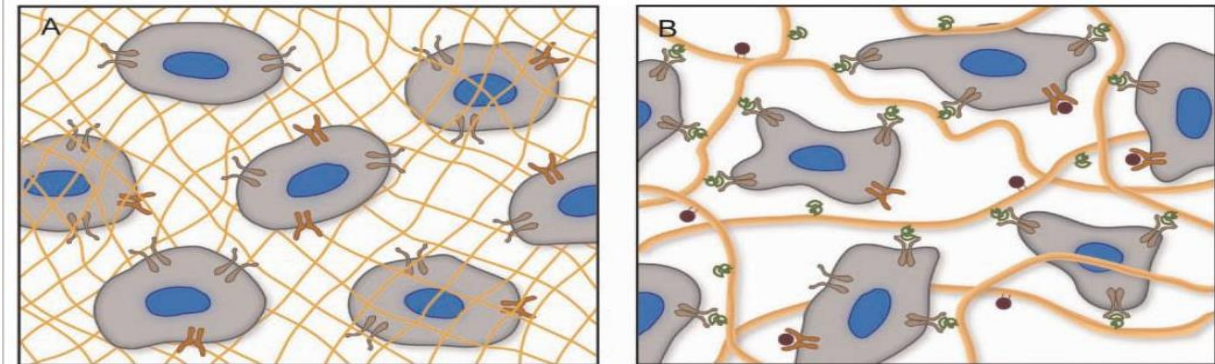
Τεχνική	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Εφαρμογές
Στρωμάτωση υγρής καλλιέργειας	<ul style="list-style-type: none"> • Εύκολο πρωτόκολλο • Όχι επιπρόσθετα υλικά • Έλεγχος μεγέθους σφαιροειδών/καλλιέργειας • Διαφανές • Αναπαραγωγίμο • Οικονομικό • Εύκολο στην λήψη δείγματος και εικόνων 	<ul style="list-style-type: none"> • Χωρίς πόρους • Μικρή ευελιξία • Ετερογένεια κυτταρικών σειρών • Έλλειψη αλληλεπίδρασης με εξωκυττάρια μήτρα/χώρο 	<ul style="list-style-type: none"> • Βασική έρευνα • Έρευνα φαρμακευτικών σκευασμάτων • Εξατομικευμένη ιατρική
Υδρογέλες	<ul style="list-style-type: none"> • Μεγάλη ποικιλία υλικών • Προσαρμόσιμο • Εύκολη συγκαλλιέργεια • Οικονομικό • Αναπαραγωγίμο 	<ul style="list-style-type: none"> • Ευαίσθητη η δημιουργία και διατήρηση υδρογέλης • Απροσδιόριστη σύσταση σε φυσικές υδρογέλες • Πιθανά μη διαφανή 	<ul style="list-style-type: none"> • Βασική έρευνα • Έρευνα φαρμακευτικών σκευασμάτων
Βιοαντιδραστήρες	<ul style="list-style-type: none"> • Απλοί στη χρήση • Εύκολη παραγωγή σε μεγάλη ποσότητα • Καλή παροχή θρεπτικών • Εύκολη πρόσβαση στα σφαιροειδή που δημιουργούνται 	<ul style="list-style-type: none"> • Ειδικός εξοπλισμός • Ανεξέλεγκτο μέγεθος καλλιέργειας • Έντονες μηχανικές πιέσεις στα κύτταρα 	<ul style="list-style-type: none"> • Βασική έρευνα • Μηχανική ιστών • Πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς
ΙΚριώματα	<ul style="list-style-type: none"> • Ποικιλία υλικών • Προσαρμόσιμα • Εύκολη συγκαλλιέργεια • Μέσο κόστος 	<ul style="list-style-type: none"> • Μεγάλη διαφοροποίηση ανάλογα με το ικρίωμα • Όχι διαφανή • Δύσκολη απομάκρυνση κυττάρων 	<ul style="list-style-type: none"> • Βασική έρευνα • Έρευνα φαρμακευτικών σκευασμάτων • Πολλαπλασιασμός κυτταρικής σειράς
3D εκτύπωση	<ul style="list-style-type: none"> • Τροποποιήσιμη δομή • Διαβάθμιση υλικών • Ικανότητα μεγάλης παραγωγής ικριωμάτων • Εύκολη συγκαλλιέργεια 	<ul style="list-style-type: none"> • Απαιτείται ακριβός εξοπλισμός βιο-εκτυπωτή • Πιθανές αστοχίες υλικού και δυσκολία χειρισμού κυττάρων 	<ul style="list-style-type: none"> • Έρευνα φαρμακευτικών σκευασμάτων/καρκίνος • Μηχανική ιστών

1.3.3 Υδρογέλες

Οι υδρογέλες αποτελούνται από διακλαδιζόμενα δίκτυα πολυμερών με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό και παρέχουν πολλαπλά πλεονεκτήματα καθώς μπορούν να σχεδιαστούν με μια μεγάλη ποικιλία "δομικών στοιχείων", από πλήρως συνθετικά έως φυσικά, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορους συνδυασμούς (Εικόνα 1.12). Λόγω της ικανότητάς τους να προσομοιάζουν τη φύση των περισσότερων μαλακών ιστών, οι υδρογέλες αποτελούν ένα εξαιρετικά ελκυστικό υλικό για την ανάπτυξη συνθετικών αναλόγων της ECM. Αυτές οι δομές διακλαδιζόμενων αλυσίδων πολυμερών έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, επιτρέπουν την εύκολη μεταφορά οξυγόνου, θρεπτικών συστατικών και αποβλήτων, καθώς και ρεαλιστική μεταφορά διαλυτών παραγόντων (π.χ. αυξητικών παραγόντων). Πολλές υδρογέλες μπορούν να σχηματιστούν υπό ήπιες, «κυτταροσυμβατές» συνθήκες και τροποποιούνται εύκολα ώστε να διαθέτουν επιθυμητά χαρακτηριστικά όπως ιξώδες, ελαστικότητα και ικανότητα αποικοδόμησης (Tibbitt and Anseth, 2009). Οι υδρογέλες μπορούν επίσης να συνδυαστούν με παράγοντες προσκόλλησης (π.χ. λαμινίνη, κολλαγόνο I, φμπρονεκτίνη, κλπ) και ανάπτυξης/διαφοροποίησης. Επιπλέον, το ποσοστό δυσκαμψίας, η διάμετρος των πόρων και η ελαστικότητα μπορούν εύκολα να προβλεφθούν σχεδιαστικά και να διαφοροποιηθούν κατά την κατασκευή του βιοϋλικού της υδρογέλης. Όπως προαναφέρθηκε, η σκληρότητα/ελαστικότητα του ικρίωματος παίζει καθοριστικό ρόλο στη σηματοδότηση γονιδιακής έκφρασης, την κυτταροσκελετική αρχιτεκτονική και την κυτταρική εξέλιξη (Ansari et al., 2017). Αυτή η τεράστια σχεδιαστική και κατασκευαστική ευελιξία των υδρογελών τις καθιστά σήμερα δημοφιλή επιλογή βιομημητικού υλικού για την πραγματοποίηση 3D καλλιιεργειών.

Ένας χρήσιμος τρόπος ταξινόμησης των υδρογελών γίνεται με βάση την προέλευσή τους σε φυσικές, συνθετικές ή ημισυνθετικές (βιοϋβριδικές) δομές. Οι φυσικές υδρογέλες είναι πρωτεΐνες ή πολυσακχαρίτες που προέρχονται από βιολογικές πηγές. Παραδείγματα περιλαμβάνουν πρωτεϊνικές υδρογέλες όπως κολλαγόνο, λευκωματίνη, ινώδες και πρωτεΐνες μεταξιού ή υδρογέλες πολυσακχαριτών, οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν γλυκάνη, υαλουρονικό οξύ, αγαρόζη και αλγινικό οξύ. Τυπικές συνθετικές υδρογέλες περιλαμβάνουν: την πολυ-αιθυλενογλυκόλη (PEG), την πολυ-βινυλική αλκοόλη (PVA), το πολυ-αιθυλενοξειδίο (PEO), το πολυ-ακρυλικό οξύ (PAA) και άλλα. Οι συνθετικές υδρογέλες μπορούν να παραχθούν σε μεγάλη ποσότητα με ομοιόμορφη ποιότητα και να έχουν μια καθορισμένη δομή. Απόλυτος έλεγχος του αρχιτεκτονικού σχεδιασμού και των φυσικών ιδιοτήτων όπως το ιξώδες και η ελαστικότητα είναι εφικτά (Xu et al., 2019). Ωστόσο, ένας σημαντικός περιορισμός των συνθετικών υδρογελών είναι το γεγονός ότι οι εξαιρετικά

επαναλαμβανόμενες συνθετικές δομές τους δεν δημιουργούν το καταλληλότερο μικροπεριβάλλον για τα κύτταρα σε αντίθεση με τις υδρογέλες φυσικής προέλευσης, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.12** (Rüdinger et al., 2014).



Εικόνα 1.12. (A) Υδρογέλες που αποτελούνται από συνθετικά πολυμερή (κίτρινο πλέγμα) παρέχουν ένα τρισδιάστατο περιβάλλον για την καλλιέργεια κυττάρων. Ωστόσο, αποτυγχάνουν να ενεργοποιήσουν τις ιντεγκρίνες (καφέ χρώμα) και άλλους επιφανειακούς υποδοχείς (πορτοκαλί χρώμα). Το συνθετικό περιβάλλον επιτρέπει την κυτταρική επιβίωση, καθώς τα κύτταρα αναδιαμορφώνουν το περιβάλλον που τα περιβάλλει. Από την άλλη πλευρά, οι υδρογέλες που δομούνται από φυσικά παράγωγα πολυμερών (B) παρουσιάζουν πληθώρα θέσεων πρόσδεσης ιντεγκρίνης (πράσινο χρώμα) και αυξητικών παραγόντων (κόκκινο χρώμα) διαμοιρασμένων στην εξωκυττάρια μήτρα (ECM) (κίτρινες ίνες) που προσαρμόζουν την κυτταρική συμπεριφορά μέσα από σηματοδοτικά μονοπάτια που εκκινούνται από την ενεργοποίηση υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια (Tibbitt and Anseth, 2009).

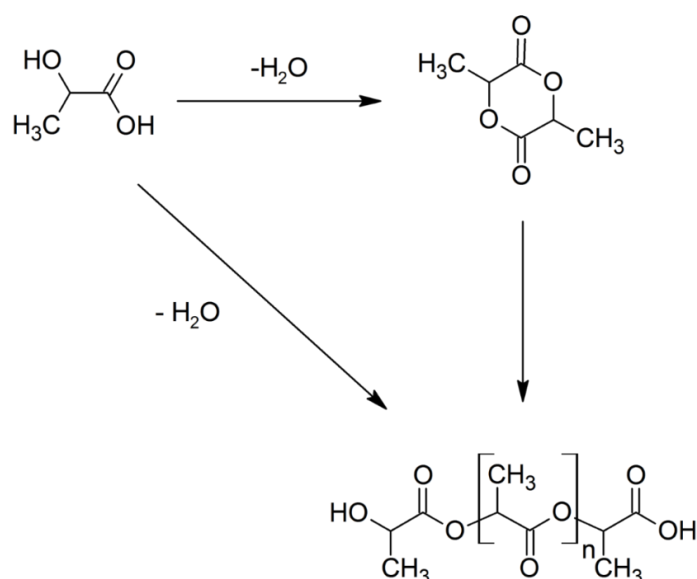
1.3.4 Στερεά ικρίωματα

Με βασικό σκοπό την αναδόμηση κατεστραμμένων ιστών και οργάνων, η επιστήμη της μηχανικής ιστών ασχολείται με την κατασκευή τεχνητών υποστηρικτικών δομών, τα «ικρίωματα», τα οποία φέρουν μέσα τους κυτταρικές καλλιέργειες, οι οποίες αναπτύσσονται ελεγχόμενα. Επομένως, τα στερεά ικρίωματα κατασκευάζονται ως πορώδεις δομές προεπιλεγμένου σχήματος με χαρακτηριστική εξωτερική γεωμετρία, μέγεθος πόρων και συνολικό εμβαδό εσωτερικής επιφάνειας. Στα ικρίωματα μπορούν να υποστηριχθούν και να αναπτυχθούν οστίτης ιστός, χόνδρος, τένοντες, δέρμα, αιμοφόρα αγγεία, νεύρα και μύες. Επειδή στην πλειοψηφία των βιοϊατρικών εφαρμογών τα ικρίωματα εισάγονται στο σώμα, κατασκευάζονται από βιο-αποικοδομήσιμα υλικά τα οποία απορροφώνται καθώς αναπτύσσεται ο ιστός. Οι πόροι δε των ικριωμάτων επιτρέπουν την

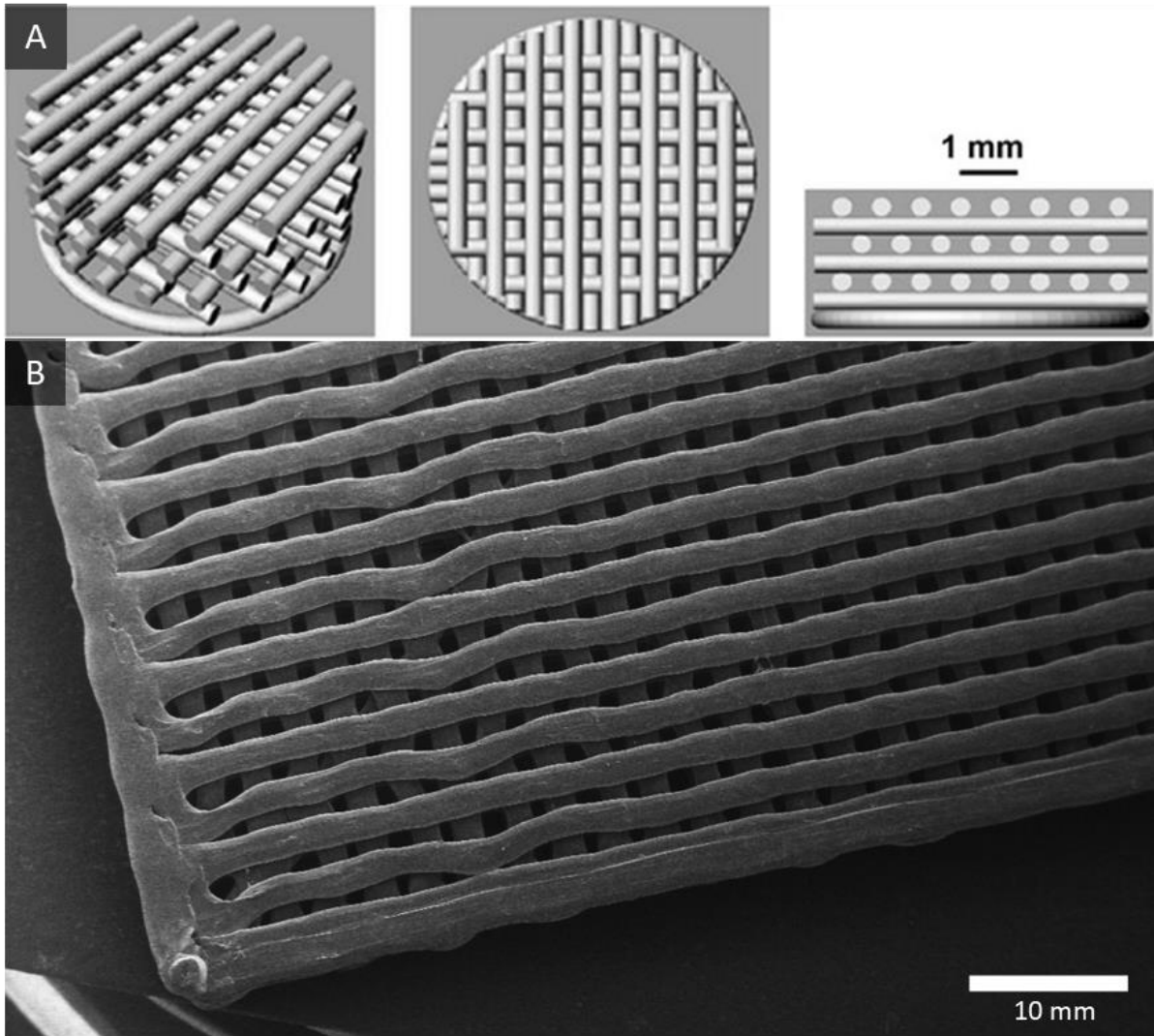
ανάπτυξη κυττάρων στο εσωτερικό τους και τη δημιουργία ενός εσωτερικού μικροπεριβάλλοντος (Turnbull et al., 2018; Nikolova and Chavali, 2019).

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή των ικριωμάτων χωρίζονται στις εξής κατηγορίες: i) πλήρως συνθετικά υλικά, ii) φυσικά υλικά, iii) κεραμικά υλικά και iv) διάφοροι συνδυασμοί των προηγούμενων κατηγοριών. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ικριώματα κατασκευάζονται από γραμμικούς αλιφατικούς πολυεστέρες, όπως το πολυγλυκολικό οξύ (polyglycolic acid, PGA), το πολυγαλακτικό οξύ ή πολυλακτίδιο (polylactic acid, PLA), και τα πολυμερή τους πολυγαλακτικό/γλυκολικό οξύ (polylactic co-glycolic acid, PLGA) (Gregor et al., 2017).

Συγκεκριμένα, το PLA το οποίο επιλέχθηκε για χρήση στην παρούσα διδακτορική διατριβή (**Εικόνα 1.13**), είναι ένα βιο-αποικοδομήσιμο υλικό που χρησιμοποιείται πολύ συχνά στη μηχανική ιστών, καθότι είναι εμπορικά προσβάσιμο και οικονομικό. Επιπλέον, είναι εύκολη η χρήση του σε τρισδιάστατους εκτυπωτές επιτυγχάνοντας ανάλυση εκτύπωσης περί τα 0,3 mm (**Εικόνα 1.14**). Αυτό το καθιστά ιδανικό υλικό για την εξομίωση του οστικού ιστού, όπου το επιθυμητό μέγεθος πόρου είναι 0,2–0,35 mm, ενώ σε περίπτωση εισαγωγής του στο σώμα, αποικοδομείται προς λακτικό οξύ, το οποίο ενυπάρχει φυσικά στον οργανισμό (Rodrigues et al., 2016).



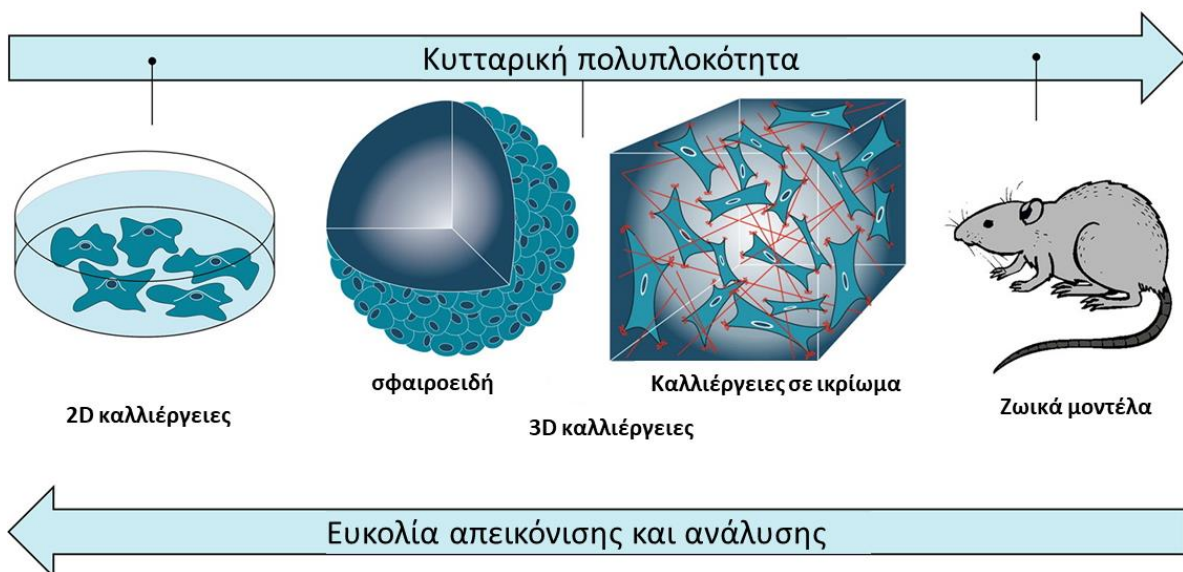
Εικόνα 1.13. Το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) παράγεται συνήθως από άμυλο καλαμποκιού, με τον πολυμερισμό του γαλακτικού οξέως για τη δημιουργία ρακεμικού μείγματος. Η πιο συνηθισμένη αντίδραση για το PLA είναι ο πολυμερισμός με άνοιγμα του δακτυλίου του λακτιδίου με διάφορους μεταλλικούς καταλύτες (συνήθως οκτανοϊκός κασσίτερος) (ανατύπωση από Wikipedia).



Εικόνα 1.14. (A) Η δομή ενός ικρίωματος τύπου πλέγματος. Οι αποστάσεις μεταξύ των ινών ορίζουν το επιθυμητό μέγεθος πόρου (Gregor et al., 2017). (B) Το ικρίωμα πολυγαλακτικού οξέως (PLA) που επιλέχθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή (εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης).

1.4 Τρισδιάστατες καλλιέργειες στη μελέτη του καρκίνου

Το μικροπεριβάλλον του όγκου (Tumor Microenvironment, TME) αποτελείται από διαφορετικούς τύπους μη καρκινικών κυττάρων όπως ινοβλάστες, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (λεμφοκύτταρα και μακροφάγα), BM-MSCs και ενδοθηλιακά κύτταρα, καθένας από τους οποίους έχει ειδικό ρόλο στη φυσιολογία, τη δομή και τη λειτουργία του όγκου. Τα καρκινικά κύτταρα και το μικροπεριβάλλον τους μέσω της αλληλεπίδρασής τους προκαλούν αμοιβαίες αλλαγές στον κυτταρικό φαινότυπο καθώς και τις επιμέρους λειτουργίες τους, υποστηρίζοντας τη συνεχιζόμενη διαδικασία ανάπτυξης και εξάπλωσης του όγκου. Η ανάγκη μελέτης των αλληλεπιδράσεων αυτών οδήγησε στην ανάπτυξη μοντέλων μελέτης τα οποία προσομοιάζουν το φυσιολογικό περιβάλλον του καρκινικού ιστού, και παράλληλα επιτρέπουν την έκφραση των περίπλοκων χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων, όπως η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός και η χημειοανθεκτικότητα (Εικόνα 1.15). Τα 3D μοντέλα μέχρι στιγμής φαίνεται ότι αντιπροσωπεύουν μία κατάσταση μεταξύ των 2D κυτταροκαλλιεργειών και των *in vivo* ζωικών μοντέλων (Hoarau-Véchet et al., 2018).

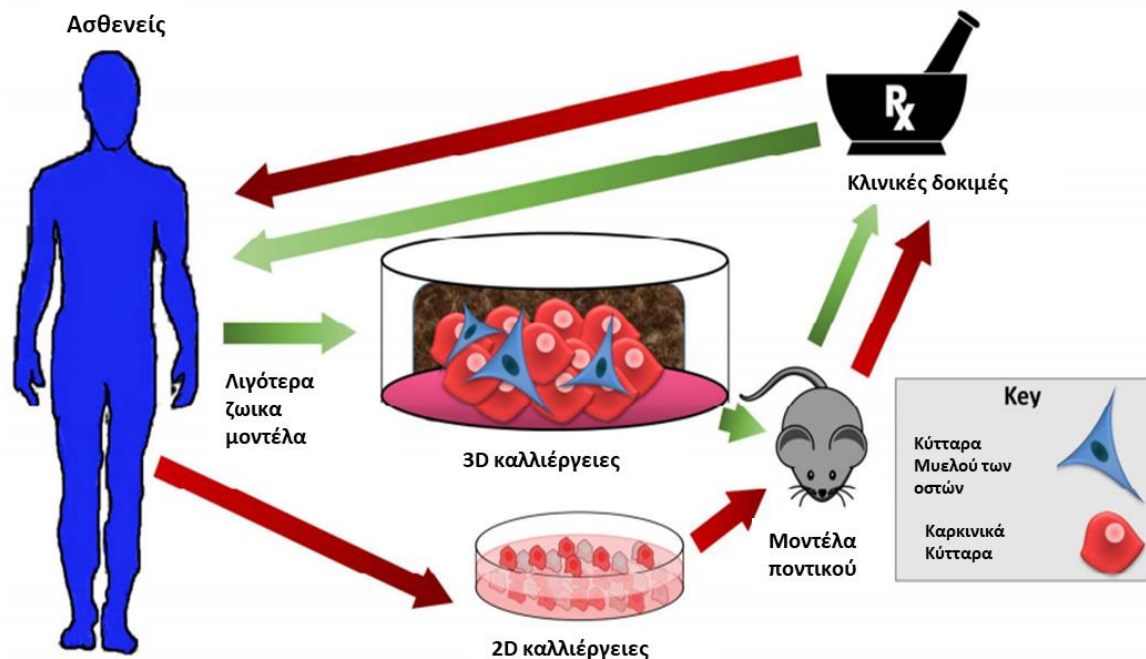


Εικόνα 1.15. Με τη μηχανική ιστών έχουν αναπτυχθεί τρισδιάστατα συστήματα καλλιέργειας τα οποία προσομοιάζουν το καρκινικό μικροπεριβάλλον και γεφυρώνουν το κενό μεταξύ δισδιάστατων καλλιεργειών και ζωικών μοντέλων (Alemany-Ribes and Semino, 2014).

Οι περιορισμοί που παρουσιάζονται στις 2D καλλιέργειες όπως αναλύθηκαν σε προηγούμενη παράγραφο, έχουν ενθαρρύνει την εμφάνιση πολλών 3D μεθόδων καλλιέργειας, οι οποίες αναπαριστούν πιο ρεαλιστικά τα σύνθετα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά του καρκινικού

μικροπεριβάλλοντος in vitro. Τα 3D μοντέλα μιμούνται καλύτερα την ετερογένεια του όγκου, δίνοντας μια πληρέστερη εικόνα του ρυθμιστικού ρόλου του περιβάλλοντός του, αφού επιτρέπουν μια πιο φυσική απόκριση στους διάφορους διαλυτούς παράγοντες που υπάρχουν στο καρκινικό μικροπεριβάλλον. Η ποικιλία των συστημάτων 3D καλλιέργειών παρέχει στους επιστήμονες τη δυνατότητα επιλογής του καταλληλότερου μοντέλου που να προσαρμόζεται στις εκάστοτε υπό διερεύνηση συνθήκες.

Συνήθως, για την επιβεβαίωση ενός φαινομένου ή τη μελέτη ενός μηχανισμού που παρατηρείται in vitro, κοινή πρακτική αποτελεί η πραγματοποίηση προτύπων δοκιμών σε ζώα, που συνήθως αναφέρονται ως ζωικά μοντέλα. Ωστόσο σε αρκετές περιπτώσεις χρήσης πειραματόζων όπου απαιτείται ο ενοφθαλμισμός τους με ανθρώπινα κύτταρα, έχει κατασταλεί το ανοσοποιητικό του σύστημα (ανοσοανεπαρκή ζώα) και κατά συνέπεια δεν είναι δυνατή η μελέτη της αλληλεπίδρασης μικροπεριβάλλοντος-όγκου όπως στον άνθρωπο (Hoarau-Véchet et al., 2018). Επομένως, η μετάβαση από τις 2D σε 3D καλλιέργειες υποκινείται από την ανάγκη δημιουργίας κυτταρικών μοντέλων που καταγράφουν καλύτερα την πολυπλοκότητα της βιολογίας των όγκων. Το ιδανικό μοντέλο 3D παρακάμπτει τις δια-ειδικές διαφορές (π.χ. ποντικού-ανθρώπου), επιτρέποντας τη δοκιμή φαρμάκων απευθείας σε ανθρώπινα in vitro μοντέλα τα οποία όμως προσομοιάζουν έντονα την in vivo κατάσταση (Fang and Eglen, 2017) (Εικόνα 1.16).



Εικόνα 1.16. Οι παραδοσιακές μέθοδοι σχεδιασμού και δοκιμής θεραπειών χρησιμοποιούν διαδιάστατες (2D) κυτταρικές καλλιέργειες, στη συνέχεια ζωικά μοντέλα και τελικά κλινικές δοκιμές

σε ασθενείς (κόκκινα βέλη). Χρησιμοποιώντας τρισδιάστατες (3D) κυτταρικές καλλιέργειες (πράσινα βέλη) επιτρέπεται η παράκαμψη των 2D μοντέλων χαμηλότερης αποτελεσματικότητας, η ελαχιστοποίηση της χρήσης μεγάλων και ακριβών ζωικών μοντέλων και η μείωση των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Όλα τα παραπάνω συνεισφέρουν στη βελτίωση της κλινικής έρευνας, καθώς υποβοηθούν την ταχύτερη αξιολόγηση υποσχόμενων θεραπειών και επιλογή των υποψήφιων ασθενών που θα ωφεληθούν από αυτές (Sitarski and Reagan, 2017).

1.5 Η ανάγκη για εξατομικευμένη ex vivo πλατφόρμα στο πολλαπλούν μυέλωμα

Η θεραπευτική επιλογή που θα ακολουθήσει ένας ασθενής με ΠΜ βασίζεται σε κλινικές παραμέτρους όπως η ηλικία, οι προγνωστικοί δείκτες (κλινικό στάδιο, κυτταρογενετική κατηγορία κ.α.) και οι συννοσηρότητες. Δεδομένης όμως της ετερογένειας της νόσου, οι κλινικές και γενετικές πληροφορίες των ασθενών βοηθούν στην πρόβλεψη της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας μόνο μερικώς (Lohr et al., 2014; Szalat and Munshi, 2015; Manier et al., 2017; Jagannath et al., 2018; Ledergor et al., 2018). Συνεπώς, για την κλινική αντιμετώπιση του ΠΜ έχει ιδιαίτερα μεγάλη σημασία η ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας, η οποία σε σύντομο χρονικό διάστημα θα μπορεί να εκτιμά την αποτελεσματικότητα πολλαπλών θεραπευτικών παραγόντων σε επίπεδο μεμονωμένου ασθενούς (Bustoros et al., 2017; González-Calle et al., 2017; Lionetti and Neri, 2017; Pawlyn and Davies, 2019; Ferreira et al., 2020). Ένα τέτοιο προκλινικό μοντέλο θα μπορεί αντίστοιχα να αποτρέψει τη χορήγηση μη αποτελεσματικής ή τοξικής θεραπείας.

Επιπλέον, οι κλινικές μελέτες που περιλαμβάνουν νέους παράγοντες, έχουν δείξει ότι κάποιες υπο-ομάδες ασθενών με μοριακά χαρακτηριστικά επωφελούνται από συγκεκριμένα σκευάσματα, ή συνδυασμούς τους (Kumar et al., 2017a; Jovanović et al., 2018; Auclair et al., 2019). Αν και οι πληροφορίες της μοριακής διαγνωστικής υποδεικνύουν την ευαισθησία των μυελωματικών κυττάρων σε γονιδιακό επίπεδο, εντούτοις και το μικροπεριβάλλον της νόσου (όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως) διαδραματίζει βασικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου και την αντοχή στη θεραπεία. Επομένως υπάρχει η βασική ανάγκη για μία πλατφόρμα εξατομικευμένης θεραπευτικής πρόγνωσης στο ΠΜ, η οποία θα συμπεριλαμβάνει, εκτός των άλλων, και μία προσομοίωση του μικροπεριβάλλοντος του ΜΟ του εκάστοτε ασθενούς (Hou et al., 2019).

Λαμβάνοντας υπόψιν τα ανωτέρω, στα πλαίσια αυτής της διατριβής αναζητήθηκαν οι ex vivo πλατφόρμες στο ΠΜ που έχουν δημοσιευθεί στη βιβλιογραφία και οι οποίες πληρούν συγκεκριμένα κριτήρια:

- Αναφέρονται σε συστήματα τα οποία προσομοιάζουν το μικροπεριβάλλον του ΜΟ, χρησιμοποιώντας όχι μόνο μυελωματικά κύτταρα αλλά και άλλους τύπους κυττάρων και ουσίες που διαδραματίζουν ρόλο στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις
- Τα μυελωματικά κύτταρα αναπτύσσονται τρισδιάστατα
- Έχει δοκιμαστεί τουλάχιστον ένας θεραπευτικός παράγοντας
- Το αποτέλεσμα της πλατφόρμας δίνεται με βάση τη βιωσιμότητα των μυελωματικών κυττάρων μετά την έκθεση σε θεραπευτικό παράγοντα
- Λειτουργούν σε επίπεδο μεμονωμένου ασθενούς

Με βάση την τρέχουσα βιβλιογραφία, 14 μελέτες πληρούν τα παραπάνω κριτήρια και πιθανώς αποτελούν τις πληρέστερες πλατφόρμες μελέτης στο ΠΜ μέχρι στιγμής (**Πίνακας 1.2**). Η αξιολόγηση τους παρουσιάζεται ξεχωριστά στο τμήμα της Συζήτησης και στη συνέχεια, αναφέρονται οι πιο χαρακτηριστικές εξ' αυτών.

Πίνακας 1.2 Επιλεγμένα ex vivo μοντέλα τα οποία προσομοιάζουν το περιβάλλον του μυελού των οστών ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα

Έτος και Δημοσίευση	Σύσταση Μοντέλου: Τύπος ικριώματος, συγκαλλιεργούμενα κύτταρα	Παράγοντες *	Εκτίμηση βιωσιμότητας
2008, Kirshner και συν. (Kirshner et al., 2008a)	Υδρογέλη: Στρωμάτωση φιμπρονεκτίνης/κολλαγόνου με Matrigel/φιμπρονεκτίνη. Πρωτογενή BM-MSCs και κύτταρα ΠΜ	MELPH, BTZ	Κυτταρομετρική ανάλυση με αννεξίνη-V
2018, Huang και συν. (Huang et al., 2018a)	Υδρογέλη: Στρωμάτωση φιμπρονεκτίνης/κολλαγόνου με Matrigel. Πρωτογενή BM-MSCs και κύτταρα ΠΜ, σειρές U266, RPMI8226	Stattic (αναστολέας STAT3), BTZ	Κιτ βιωσιμότητας MTT, CellTiter 96 (Promega, USA)
2015, De la Puente και συν. (de la Puente et al., 2015; de la Puente and Azab, 2016)	Υδρογέλη: Μηχανισμός πήξης Ινοδωγόνου. Πρωτογενή ενδοθηλιακά, μυελωματικά και στρωματικά κύτταρα. Κυτταρικές	DOXO, BTZ, CFZ	Κυτταρομετρία ροής

	σειρές MM1s, H929, RPMI8226, MM1s-GFP-Luc		
2016, Jakubikova και συν. (Jakubikova et al., 2016a)	Υδρογέλη: Puramatrix (BD, USA). Πρωτογενή BM-MSCs, μυελωματικά κύτταρα. OPM1, KMS11, OCIMY5	POM, LEN, THAL, BTZ, CFZ, DOXO, DEX, MELPH	CFSE και αννεξίνη-V με κυτταρομετρία ροής
2017, Arhoma και συν. (Arhoma et al., 2017a)	Υδρογέλη: Σχηματισμός σφαιροειδών σε γέλη αλγινικού οξέως. Κυτταρικές σειρές NCI-H929, RPMI 8226, OPM-2, JJN-3, U266 και πρωτογενής κυτταρική σειρά από ασθενή με πλασματοκυτταρική λευχαιμία (ADC-1)	TRAIL, HDAC αναστολείς	Μέτρηση δραστηριότητας της κασπάσης-3 με κυτταρομετρία ροής, βιωσιμότητα με κιτ χημειοφωταύγειας CellTiter-Glo (Promega, USA)
2017, Ji και συν. (Ji et al., 2017)	Υδρογέλη κολλαγόνου και υπολογιστικό μοντέλο. Πρωτογενή BM-MSCs, μεσεγχυματική σειρά HS-5 MSC και μυελωματικές σειρές U266, RPMI 8226	BTZ, LEN, THAL και συνδυασμοί τους	Μέθοδος MTT για εκτίμηση βιωσιμότητας
2018, Braham και συν. (Braham et al., 2018a, 2018b)	Υδρογέλη: Matrigel (BD, USA). Πρωτογενή BM-MSCs, προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα, μυελωματικές σειρές: OPM2, U266 και L363	TEGs (αβ-T κύτταρα, τροποποιημένα ώστε να εκφράζουν συγκεκριμένο γδTCR)	Εκτίμηση βιωσιμότητας με χρώση καλσεΐνης και μέτρηση με συνεστιακή μικροσκοπία
2017, Silva και συν. (Silva et al., 2017)	Υδρογέλη: Κολλαγόνο-I σε μικροπλάκες 384 και 1536 φρεατίων. Πρωτογενή BM-MSCs, πρωτογενή μυελωματικά κύτταρα και μυελωματική σειρά MM1S	31 θεραπευτικοί παράγοντες	Ανάλυση διαδοχικών εικόνων μικροσκοπίας και αναγνώριση ζωντανών κυττάρων από την κίνηση των μεμβρανών

<p>2014, 2015, Reagan και συν. (Reagan et al., 2014, 2015)</p>	<p>Στερεό ικρίωμα: Κυλινδρικά ικρίωματα από ίνες μεταξιού εμποτισμένα με ινωδογόνο, θρομβίνη και Matrigel (BD, USA). Πρωτογενή BM-MSCs, πρωτογενή μυελωματικά κύτταρα και μυελωματικές σειρές MM1S, OPM2</p>	<p>BTZ</p>	<p>Εκτίμηση βιωσιμότητας με χρώση καλσεΐνης και μέτρηση με συνεστιακή μικροσκοπία</p>
<p>2017 Ferrarini και συν., 2018 Belloni και συν. (Ferrarini et al., 2017; Belloni et al., 2018)</p>	<p>Βιοαντιδραστήρας RCCS (Syntheticon, USA). Πρωτογενή BM-MSCs, μυελωματικά κύτταρα, οστεοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα. Ινοβλάστες ποντικού, μεσεγχυματική σειρά HS-5 και μυελωματικές σειρές, MM1.S, U266, RPMI.8226</p>	<p>BTZ, MELPH, DEX, μονοκλωνικό anti-VLA-4 (natalizumab)</p>	<p>Αννεξίνη-V με κυτταρομετρία ροής</p>
<p>2017, Bonomi και συν. (Bonomi et al., 2017)</p>	<p>Βιοαντιδραστήρας RCCS (Syntheticon, USA). MSCs (Lonza, USA), σειρά αδενοκαρκινώματος CFPAC-1, μυελωματική σειρά RPMI8226</p>	<p>PTX, BTZ</p>	<p>Μέθοδος MTT για εκτίμηση βιωσιμότητας</p>
<p>2013, Khin και συν. (Khin et al., 2014)</p>	<p>Σύστημα μικρορευστομηχανικής με τρισδιάστατες καλλιεργητικές αντικειμενοφόρες πλάκες 3D Ibitreat (Ibidi, Germany), με κολλαγόνο-I. Πρωτογενή BM-MSCs και μυελωματικά κύτταρα. Μυελωματικές σειρές RPMI-8226, HS-5, H929, 8226</p>	<p>MELPH, BTZ</p>	<p>Ανάλυση διαδοχικών εικόνων μικροσκοπίας και αναγνώριση ζωντανών κυττάρων από την κίνηση των μεμβρανών</p>
<p>2015, Martowicz και συν. (Martowicz et al., 2015)</p>	<p>Ζωϊκό μοντέλο. Σφαιροειδή ανεπτυγμένα στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου κοτόπουλου.</p>	<p>BTZ</p>	<p>Μέτρηση σήματος κυττάρων όγκου χρωσμένων με eGFP με μέθοδο GFP-ELISA</p>

	Πρωτογενή BM-MSCs και μυελωματικές σειρές OPM-2, RPMI-8226		
2011, Calimeri και συν. (Calimeri et al., 2011)	Ζωϊκό μοντέλο. Ικρίωματα κυλίνδρων προκαπρολακτόνης εμφυτευμένα στα οστά της λεκάνης ποντικών με ανοσοανεπάρκεια	DEX, BTZ	Μέτρηση παραπρωτεΐνης στον ορό του ποντικού, και μέτρηση απόπτωσης στα κύτταρα των ικριωμάτων μετά την αφαίρεση τους

* BTZ: Βορτεζομίμη, CFZ: Καρφιλζομίμη, DEX: Δεξαμεθαζόνη, DOXO: Δοξορουβικίνη, HDAC: Αποακετυλάση ιστονών, LEN: Λεναλιδομίδη, MELPH: Μελφαλάνη, POM: Πομαλιδομίδη, PTX: Πακλιταξέλη, THAL: Θαλιδομίδη, TRAIL: Συνδέτης συσχετιζόμενος με παράγοντα νέκρωσης που επάγει την απόπτωση (Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand). Άλλες συντημήσεις: CFSE: διοξική καρβοξυ-φλουορεσκεΐνη (carboxyfluorescein succinimidyl ester), GFP: πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green fluorescent protein), MTT: μέθοδος αναγωγής της χρωστικής MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], TCR: υποδοχέας T λεμφοκυττάρων (T cell receptor)

1.5.1 Ex vivo πλατφόρμες βασισμένες σε ικρίωματα γέλης

Η πρώτη πλήρης προσπάθεια για τη μελέτη μοντέλου ΠΜ η οποία συμπεριελάμβανε προσθήκη θεραπευτικών παραγόντων με τη βοήθεια 3D καλλιέργειας έγινε το 2008 από τους Kirshner και συνεργάτες (Kirshner et al., 2008b). Στην εργασία αυτή, οι 3D πρωτογενείς καλλιέργειες πλασματοκυττάρων από ασθενείς με ΠΜ πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες επικαλυμμένες με δύο επιστρώσεις: μία επίστρωση φμπρονεκτίνης/κολλαγόνου I και πάνω από αυτή μία επίστρωση που περιείχε μονοπύρνα κύτταρα του MO σε διάλυμα της εμπορικά διαθέσιμης υδρογέλης φυσικής προέλευσης Matrigel και φμπρονεκτίνης. Στη συνέχεια, ακολούθησαν δοκιμές με τους θεραπευτικούς παράγοντες μελφαλάνη και βορτεζομίμη και εκτιμήθηκε ο αριθμός των κλωνικών κυττάρων που απέμειναν. Επιπλέον, το μοντέλο εκτιμήθηκε ως προς τη δομή του με μελέτη με συνεστιακή μικροσκοπία και ανοσοϊστοχημεία, αποδεικνύοντας την ομοιότητα του τεχνητού με το πραγματικό μικροπεριβάλλον του MO.

Στην εργασία των Huang και συνεργατών (Huang et al., 2018b) έγινε εφαρμογή μιας βελτιστοποιημένης εκδοχής του προηγούμενου πρωτοκόλλου για τη συγκριτική μελέτη της ενεργοποίησης του μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 (Signal Transducer and

Activator of Transcription 3) σε κύτταρα μυελωματικών κυτταρικών σειρών που καλλιιεργήθηκαν σε 3D και 2D συνθήκες, με και χωρίς την επίδραση των θεραπευτικών παραγόντων Stattic και βορτεζομίμπης. Το μονοπάτι STAT3 ήταν ενεργό μόνο στην περίπτωση της 3D καλλιέργειας και η ενεργοποίησή του εξαρτάτο από το 3D περιβάλλον, καθώς η ενεργή φωσφορυλιωμένη STAT3 (pSTAT3) απαντάται μόνο σε συνθήκες 3D καλλιέργειας και καθίσταται ανενεργός μετά από μεταφορά των κυττάρων σε συνθήκες συμβατικής καλλιέργειας. Η αναστολή του μονοπατιού STAT3 από τον φαρμακολογικό παράγοντα Stattic, οδήγησε σε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των πλασματοκυττάρων, ενώ παράλληλα, τα κατέστησε ευαίσθητα στη δράση της βορτεζομίμπης. Τα αποτελέσματα της μελέτης ήταν σημαντικά, καθότι με το παράδειγμα του παράγοντα Stattic αποδείχθηκε ότι μια 2D καλλιέργεια δεν θα ήταν επαρκής για τη διερεύνηση του μονοπατιού STAT3.

Στο μοντέλο των Arhoma και συνεργατών (Arhoma et al., 2017b), τα μυελωματικά κύτταρα καλλιιεργήθηκαν σε σφαιροειδή που αναπτύχθηκαν σε «χάντρες» πολυμερισμένου αλγινικού νατρίου (sodium alginate). Στη μελέτη αυτή, διερευνώντας τη συνεργιστική δράση ενός αναστολέα της αποακετυλάσης των ιστονών και του αντικαρκινικού παράγοντα TRAIL (Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα ήταν πολύ πιο ευαίσθητα στην επίδραση των παραγόντων στα σφαιροειδή συγκριτικά με την απλή κυτταροκαλλιέργεια. Συνεπώς αναδείχθηκε ένας μηχανισμός θεραπείας χάρη στη μετάβαση από το δισδιάστατο στο τρισδιάστατο μοντέλο.

Τέλος, στην εργασία των Jakubikova και συνεργατών (Jakubikova et al., 2016b), χρησιμοποιήθηκε μια εμπορικά διαθέσιμη υδρογέλη, το Corning Puramatrix peptide hydrogel (BD, USA), η οποία χρησιμοποιήθηκε και στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Σε αυτή τη μελέτη, σε συγκαλλιέργεια μυελωματικών κυττάρων με BM-MSCs έγινε μία ενδελεχής τεκμηρίωση του μοντέλου, καθότι: 1) εξετάστηκε η σύσταση της εξωκυττάριας μήτρας (μελέτη έκφρασης ιντεγκρινών, N-καδερίνης, CXCL12) που παράχθηκε στην 3D καλλιέργεια, 2) επιβεβαιώθηκε η ενεργοποίηση της οστεογένεσης εντός του 3D μοντέλου, 3) διαπιστώθηκε η αύξηση του πολλαπλασιασμού των πλασματοκυττάρων παρουσία των BM-MSCs, 4) πραγματοποιήθηκε ανάλυση ανοσολογικού προφίλ, η οποία κατέδειξε ότι η κατανομή υπο-ομάδων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος ήταν όμοια μεταξύ της 3D και της 2D καλλιέργειας, και 5) παρατηρήθηκε η χημειοανθεκτικότητα σε νέους (IMiDs, βορτεζομίμπη, καρφιλζομίμπη) αλλά και συμβατικούς θεραπευτικούς παράγοντες (δοξορουμπικίνη, δεξαμεθαζόνη, μελφαλάνη) σε σύστημα 3D συγκαλλιέργειας με BM-MSCs, με αποτελέσματα που αντανάκλουν τα παρατηρούμενα αποτελέσματα από τη χορήγηση των παραγόντων στους ασθενείς.

1.5.2 Συστήματα βιοαντιδραστήρων

Μια άλλη προσέγγιση για τη μελέτη του μικροπεριβάλλοντος του ΜΟ αποτελεί η χρήση των βιοαντιδραστήρων, συστημάτων τα οποία διαθέτουν πληθώρα δυνατοτήτων. Πρόκειται για οριζόντια περιστρεφόμενες διαφανείς συσκευές, οι οποίες διατηρούν ένα βιολογικά ενεργό περιβάλλον με συνεχή είσοδο θρεπτικού υλικού και έξοδο κυτταρικής μάζας. Με τον τρόπο αυτό, αποφεύγονται η καθίζηση των κυττάρων καθώς και η ανεπαρκής παροχή αερίων και θρεπτικών συστατικών σε ορισμένα σημεία της καλλιέργειας. Οι συσκευές αυτές, επιπρόσθετα, προσφέρουν τη δυνατότητα συγκαλλιέργειας διαφορετικών κυτταρικών τύπων σε μορφολογία τρισδιάστατων σφαιροειδών, ενώ επιτρέπουν και την παράλληλη χρήση άλλων τρισδιάστατων μοντέλων-ικριωμάτων για την επίτευξη τρισδιάστατης δομής. Χάρη στα πολλαπλά τους πλεονεκτήματα οι βιοαντιδραστήρες χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως για την καλύτερη κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου και της απόκρισής του σε φάρμακα, συμπεριλαμβανομένου και του ΠΜ, καθώς αναπαριστούν με ακρίβεια την πολυπλοκότητα της οργάνωσης του μικροπεριβάλλοντος του ΜΟ (Ahmed et al., 2019).

1.5.3. Ex vivo μοντέλα σε συστήματα μικρορευστομηχανικής

Τα συστήματα μικρορευστομηχανικής (microfluidic systems) χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στα πειράματα κυτταρικής βιολογίας με στόχο τη μελέτη της κυτταρικής συμπεριφοράς και λειτουργίας. Έναν κύριο λόγο για τη συνεχώς αυξανόμενη εφαρμογή τους αποτελεί η δυνατότητα που προσφέρουν τα συστήματα αυτά για πλήρη και ακριβή έλεγχο των φυσικών παραμέτρων σε επίπεδο μικροκλίμακας, όπως είναι η μεταφορά μορίων, που παίζει σημαντικό ρόλο στη βιοχημική σηματοδότηση και στη διακυτταρική επικοινωνία. Στις εργασίες των Zhang και συνεργατών (Zhang et al., 2013, 2015, 2017), χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα το οποίο αξιοποιεί έναν 3D οστεοποιημένο ιστό (3D ossified tissue), με στόχο τη μίμηση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και τη ρεαλιστική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρων του ΜΟ και των οστεοβλαστών. Για τον σκοπό αυτό, ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοβλαστών καλλιεργήθηκε σε μικρορευστομηχανική συσκευή οκτώ θαλάμων με στόχο τη διευκόλυνση της *ex vivo* ανάπτυξης μονοπύρηνων κυττάρων ΜΟ από ασθενείς με ΠΜ. Η παρακολούθηση των καλλιιεργειών σε πραγματικό χρόνο επιβεβαίωσε ότι τα μονοπύρηνια κύτταρα του ΜΟ έλκονται προς τη στοιβάδα των οστεοβλαστών. Αποδείχθηκε επίσης, ότι η μακροχρόνια επιβίωση των οστεοβλαστών λειτουργεί ως ο πιο καθοριστικός παράγοντας για τη διατήρηση της

βιωσιμότητας και της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων του ΠΜ ex vivo, ενώ βοηθητικό ρόλο παρείχε η παρουσία πλάσματος των ασθενών στο καλλιεργητικό μέσο. Συνεπώς, αυτή η προσέγγιση αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο 3D καλλιέργειας που μπορεί να υποβοηθήσει την εξατομικευμένη δοκιμή θεραπευτικών παραγόντων σε ασθενείς με ΠΜ.

1.6. Σκοπός μελέτης

Όπως αναφέρθηκε το ΠΜ είναι νόσος με σημαντική ετερογένεια, στην οποία το μικροπεριβάλλον του ΜΟ διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο. Σε αυτή τη διδακτορική διατριβή εστιάσαμε προς την κατεύθυνση της ανοσολογικής διερεύνησης του μικροπεριβάλλοντος στο ΠΜ και του ρόλου που διαδραματίζει στην εξέλιξη της νόσου, αλλά και στην ανάπτυξη μοντέλου που θα μπορεί να προσομοιώσει αυτό το μικροπεριβάλλον.

Συνεπώς, η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε τρεις διακριτούς στόχους:

- Τη διερεύνηση και αξιολόγηση των 3D ex vivo μοντέλων μελέτης στο ΠΜ με δυνατότητες εξατομίκευσης της θεραπείας
- Την εργαστηριακή ανάπτυξη ενός τέτοιου μοντέλου, στηριζόμενου κυρίως στη χρήση στερεών βιο-συμβατών ικριωμάτων
- Την αξιολόγηση του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος στο ΠΑ και το ΜΟ, ασθενών με ΠΜ σε διάφορα στάδια της νόσου, καθώς και τον πιθανό συσχετισμό του με τα κλινικά δεδομένα από τη διάγνωση, τη σταδιοποίηση και την ανταπόκριση στη θεραπεία.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στο κεφάλαιο αυτό παρατίθενται οι πληροφορίες για τις διάφορες ομάδες ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στις μελέτες, οι μέθοδοι/τεχνικές που ακολουθήθηκαν, καθώς και τα αναλώσιμα/όργανα που ήταν απαραίτητα για τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών. Η παρασκευαστική διαδικασία όλων των πειραμάτων της συγκεκριμένης διατριβής καθώς και οι αναλύσεις κυτταρομετρίας ροής διενεργήθηκαν στη Μονάδα Κυτταρομετρίας Ροής στον Τομέα Φυσιολογίας & Ζώων του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ.

Για τις ανάγκες των πειραμάτων ο βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός και τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν στις περισσότερες διαδικασίες ήταν:

- Πιπέτες μεταβλητού όγκου Pipetman 2, 20, 200 και 1000 μL (Gilson Inc, WI, USA)
- Ρύγχη πιπετών 10, 200 και 1000 μL (Greiner Bio-one, UK)
- Πλαστικές πιπέτες μίας χρήσης 1, 2, 5, 10 και 25 mL (Greiner Bio-one, UK)
- Πλαστικές πιπέτες Pasteur (Greiner Bio-One, UK)
- Κωνικά σωληνάρια φυγοκέντρησης 15 και 50 mL (Greiner Bio-one, UK)
- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 6, 24, 48 και 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα (Greiner Bio-one, UK)
- Επωαστικός κλίβανος 37°C και 5% CO₂ (Sanyo Electric Co, Japan)
- Φυγόκεντρος ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας με αποσπώμενες κεφαλές (Jouan, DJB Labcare, UK)
- Θάλαμος νηματικής ροής (Laminar Flow) BH-EN-2004 (Faster, Italy)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Novex, Italy) και ανάστροφο μικροσκόπιο (Euromex, Holland)

Βασικό όργανο των πειραμάτων της παρούσας διατριβής, αποτέλεσε ο αναλυτής κυτταρομετρίας ροής BD FACSCANTO II της εταιρείας Beckton Dickinson (BD, USA) με δυνατότητα ανάλυσης ταυτόχρονα 8 σημάτων φθορισμού. Το όργανο αυτό χρησιμοποιείται και για την ανάλυση της EYN σε δείγματα MO ασθενών με ΠΜ, επομένως βρισκόταν πάντα στην ενδεικνυόμενη για την ανάλυση λειτουργική κατάσταση και οι συστηματικές συντηρήσεις του οργάνου γίνονταν προγραμματισμένα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.1. Ομάδες μελέτης

Στην παρούσα διατριβή περιλαμβάνονται δύο ομάδες μελέτης οι οποίες αφορούν τη μελέτη του μικροπεριβάλλοντος στο ΠΜ και του ανοσολογικού προφίλ αντίστοιχα. Τα δείγματα όλων των

ασθενών ελήφθησαν στη Θεραπευτική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, η οποία στεγάζεται εντός του Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα». Όλοι οι ασθενείς παρακολουθούντο από τη Θεραπευτική Κλινική. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα», ενώ όλοι οι συμμετέχοντες υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης σύμφωνα με τις αρχές της Συνθήκης του Ελσίνκι.

2.1.1. Ομάδα μελέτης για τις ex vivo καλλιέργειες

Στην ομάδα μελέτης για τις ex vivo καλλιέργειες περιλήφθηκε ένα σύνολο 20 ασθενών με ΠΜ κατά τη διάγνωση, οι οποίοι κατά την προσέλευσή τους στη Θεραπευτική Κλινική διαγνώστηκαν σύμφωνα με τα τρέχοντα διαγνωστικά κριτήρια (Landgren and Rajkumar, 2016). Τα δείγματα ΜΟ αυτών των ασθενών χρησιμοποιήθηκαν μόνο για την απομόνωση BM-MSCs.

2.1.2. Ομάδα μελέτης για το ανοσολογικό προφίλ

Στη συγκεκριμένη μελέτη περιλήφθηκε μια ομάδα 94 ασθενών με ΠΜ, οι οποίοι επίσης διαγνώστηκαν στη Θεραπευτική Κλινική ΕΚΠΑ σύμφωνα με τα τρέχοντα διαγνωστικά κριτήρια (Landgren and Rajkumar, 2016). Από τους ασθενείς ελήφθη δείγμα ΠΑ και ΜΟ μετά από παρακέντηση, ενώ από 53 ασθενείς είχαμε διαθέσιμο τόσο ΠΑ όσο και ΜΟ. Η χρονική στιγμή λήψης του δείγματος ήταν για 53 ασθενείς κατά τη διάγνωση και για 51 ασθενείς κατά την ύφεση μετά την ASCT, ενώ σε 10 ασθενείς έγινε ανάλυση δειγμάτων και στα δύο χρονικά σημεία.

Με σκοπό τον περιορισμό της ετερογένειας και την επίδραση της θεραπείας στα αποτελέσματα, οι ασθενείς που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του ανοσολογικού προφίλ είχαν ακολουθήσει κοινή θεραπευτική πορεία. Συγκεκριμένα, όλοι οι νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς έλαβαν το συνδυασμό παραγόντων βορτεζομίμη, λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη (bortezomib, lenalidomide, dexamethasone, VRd) ως εισαγωγική θεραπεία, ενώ οι ασθενείς σε πλήρη ύφεση είχαν λάβει προηγουμένως θεραπεία υψηλής δόσης ακολουθούμενη από ASCT.

2.1.3. Συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή και ανάλυση των δειγμάτων στο σύνολο των ασθενών και στις δύο ομάδες μελέτης διήρκεσε 3 έτη. Η λήψη όλων των δειγμάτων έγινε από εξειδικευμένο προσωπικό της Θεραπευτικής Κλινικής του ΕΚΠΑ. Για τη λήψη ΠΑ από κάθε ασθενή έγινε συλλογή 2,5-5,0 ml με χρήση ειδικών συρίγγων σε φιαλίδιο γενικής αίματος με αντιπηκτικό EDTA (BD Vacutainers, BD,

USA). Κατά τη λήψη ΜΟ χρησιμοποιήθηκε βελόνα οστεομυελικής βιοψίας με την οποία έγινε αναρρόφηση 1,00-5,00 mL ΜΟ από την οπίσθια λαγόνια ακρολοφία της λεκάνης, σε φιαλίδιο γενικής αίματος με αντιπηκτικό EDTA. Όλα τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο εντός 3 ωρών από τη λήψη τους, και η επεξεργασία τους έγινε την ίδια ημέρα.

2.1.4. Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις κυτταρικές σειρές αθανатоποιημένων ανθρώπινων κυττάρων ΠΜ (<https://www.dsmz.de/>), οι H929, η L363, η JN3 και η U266B1 (U266) με τα εξής χαρακτηριστικά:

H929: μυελωματικά κύτταρα που έχουν προέλθει από υπεζωκοτική συλλογή θήλεος ασθενούς με IgA kappa πολλαπλό μύελωμα, ηλικίας 62 ετών.

L363: πλασματοκύτταρα που έχουν προέλθει από το ΠΑ θήλεος ασθενούς με IgG πλασματοκυτταρική λευχαιμία, ηλικίας 36 ετών.

JN3: πλασματοκύτταρα που έχουν προέλθει από τον ΜΟ θήλεος ασθενούς με IgA1 kappa πλασματοκυτταρική λευχαιμία, ηλικίας 57 ετών.

U266B1 (U266): μυελωματικά κύτταρα που έχουν προέλθει από το ΠΑ άρρενα ασθενούς με πολλαπλό μύελωμα, ηλικίας 53 ετών. Τα κύτταρα αυτά έχει βρεθεί ότι εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνη IgE ισοτύπου με λ ελαφριές αλυσίδες.

2.2. Απομόνωση μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων μυελικής προέλευσης

Τα BM-MSCs είναι προσκολλώμενα και δεν εντοπίζονται στην κυκλοφορία. Μπορούν να απομονωθούν από δείγμα ΜΟ με διάφορους τρόπους. Στην παρούσα διατριβή δοκιμάσαμε τρεις τρόπους απομόνωσης, οι οποίοι στη συνέχεια αξιολογήθηκαν ως προς την αποδοτικότητά τους. Στην απομόνωση με διαβάθμιση συγκέντρωσης, το δείγμα φυγοκεντρείται σε διάλυμα πολυσακχαρίτη και διατριζοϊκού νατρίου με τελική πυκνότητα 1,077 g/ml. Λόγω της διαβάθμισης συγκέντρωσης κατά τη φυγοκέντρωση οι πληθυσμοί διαχωρίζονται με βάση την πυκνότητά τους: στον πυθμένα συκολλούνται τα ερυθροκύτταρα λόγω του πολυσακχαρίτη αλλά συκεντρώνονται και τα πολυμορφοπύρρηνα λόγω υψηλής πυκνότητας. Τα μονοπύρρηνα κύτταρα και τα αιμοπετάλια σχηματίζουν μια επιφάνεια στο σημείο διαχωρισμού του πολυσακχαρίτη η οποία διευκολύνει τη συλλογή τους. Στο δεύτερο τρόπο απομόνωσης γίνεται χρήση λυτικού διαλύματος στο δείγμα και μετά τη λύση των ερυθρών μεταφορά σε φλάσκα καλλιέργειας, επιτυγχάνοντας την πλήρη απουσία των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν είναι επιθυμητά στην καλλιέργεια καθότι

δυσχεραίνουν την προσκόλληση των μεσεγχυματικών κυττάρων στη φλάσκα. Στην τρίτη μέθοδο εκμεταλλευόμαστε τη μακροχρόνια παραμονή των κυττάρων στον πυθμένα της φλάσκας κυτταροκαλλιέργειας με συνεχή ανανέωση του θρεπτικού υλικού για αρκετές μέρες (5-7 ημέρες), ώστε τα BM-MSCs να έχουν την ευκαιρία να προσκολληθούν. Σε όλες τις μεθόδους η απομόνωση είναι επιτυχής αν τα BM-MSCs παραμένουν προσκολλημένα στον πυθμένα της φλάσκας .

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Δείγμα MO συλλεγμένο σε σωληνάρια με αντιπηκτικό
- Διάλυμα διαχωρισμού λεμφοκυττάρων Histopaque (Lonza, Germany)
- Θρεπτικό υλικό A-MEM (Lonza, Italy)
- Διάλυμα αντιβιοτικού penicillin – streptomycin (pen-strep, Lonza, Italy)
- Θερμικά απενεργοποιημένος εμβρυϊκός ορός βοοειδών (FBS, Lonza, Italy)
- Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco's (DPBS), χωρίς Ca^{2+} , Mg^{2+} (Lonza, Italy)
- Διάλυμα λύσης ερυθρών BD FACS lysing solution (BD, USA)
- Πλαστικές φλάσκες καλλιέργειας με φίλτρο στο καπάκι (Greiner Bio-One, UK)
- Φίλτρο cell strainer 70 μm (BD, USA)

Πρωτόκολλο εργασίας

Για την παρασκευή διαλύματος πλήρους θρεπτικού υλικού προσθέτουμε τις απαραίτητες ποσότητες από τα διαλύματα ώστε να προκύψει τελικό διάλυμα θρεπτικού υλικού A-MEM με 5% περιεκτικότητα σε pen-strep και 15% περιεκτικότητα σε FBS.

-Για τη μέθοδο διαβάθμισης συγκέντρωσης:

1. Σε στείρες συνθήκες μεταφέρουμε σε κωνικό σωληνάριο των 15 ml, 3 ml διαλύματος διαχωρισμού λεμφοκυττάρων.
2. Διηθούμε το δείγμα MO από το φίλτρο των 70 μm και αραιώνουμε με θρεπτικό υλικό (A-MEM) μέχρι τελικό όγκο 5 ml σε κωνικό σωληνάριο των 15 ml.
3. Επιστοιβάζουμε αργά 3-5 ml δείγματος επάνω από το διάλυμα διαχωρισμού λεμφοκυττάρων.
4. Φυγοκεντρούμε στα 700xg για 30' με ήπια επιβράδυνση.
5. Με πιπέτα Pasteur συλλέγουμε τη στοιβάδα των μονοπύρηνων σε νέο κωνικό σωληνάριο

6. Προσθέτουμε DPBS έως συνολικό όγκο 15 ml και ξεπλένουμε φυγοκεντρώντας στα 400g για 10'.
7. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 6 δύο φορές.
8. Επαναιωρούμε το κυτταρικό ίζημα σε 5-10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού.
9. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε φιάσκα κυτταροκαλλιέργειας.
10. Στις 48-72 ώρες ελέγχουμε στο ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο για την παρουσία προσκολλημένων κυττάρων. Αρχικά, τα κύτταρα θα είναι σχετικά μικρά με σφαιρική μορφολογία και τα BM-MSCs θα ομοιάζουν με εναπομείναντα λεμφοκύτταρα.

-Για τη μέθοδο με χρήση λυτικού διαλύματος:

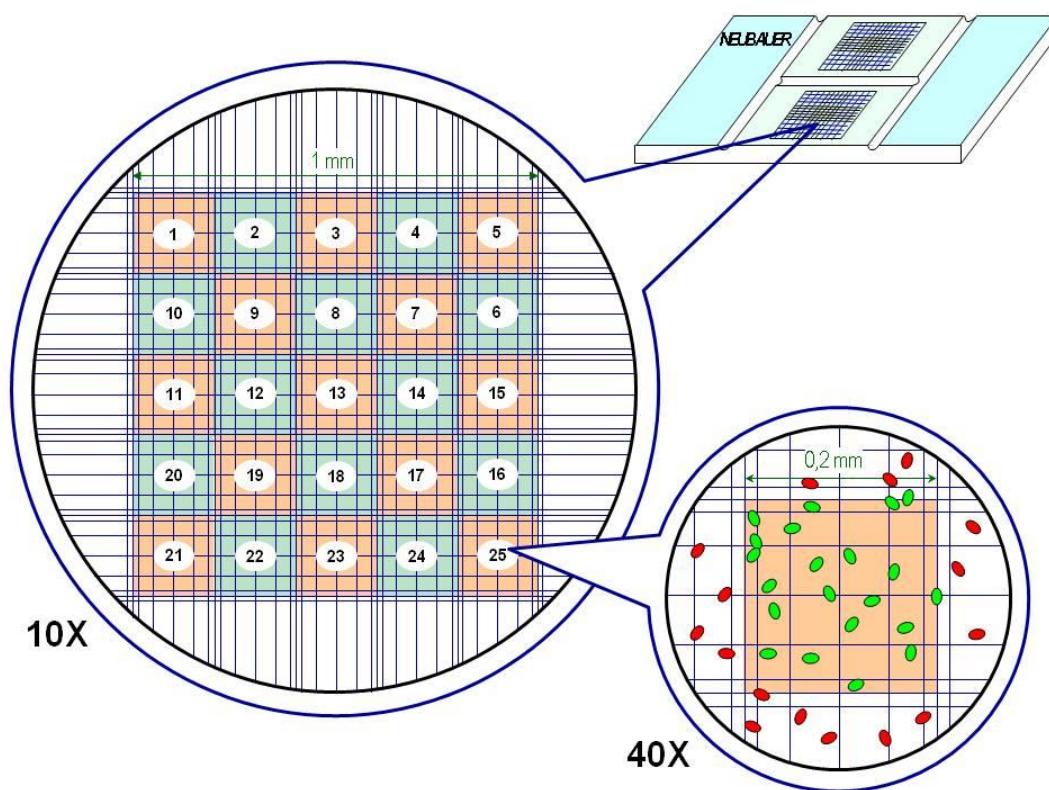
1. Διηθούμε το δείγμα MO από το φίλτρο των 70 μm και αραιώνουμε με θρεπτικό υλικό (A-MEM) μέχρι τελικό όγκο 5 ml σε κωνικό σωληνάριο των 15 ml.
2. Συμπληρώνουμε με 10 ml λυτικού διαλύματος. Επιάζουμε για 10'.
3. Φυγοκεντρούμε στα 400xg για 10'.
4. Επαναιωρούμε σε 5-10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού.
5. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε φιάσκα κυτταροκαλλιέργειας.
6. Στις 48-72 ώρες ελέγχουμε στο ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο για την παρουσία προσκολλημένων κυττάρων.

-Για τη μέθοδο συνεχούς ανανέωσης θρεπτικού υλικού:

1. Διηθούμε το δείγμα MO από το φίλτρο των 70 μm και αραιώνουμε με θρεπτικό υλικό (A-MEM) μέχρι τελικό όγκο 5 ml σε κωνικό σωληνάριο των 15 ml.
2. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε φιάσκα κυτταροκαλλιέργειας.
3. Για τις επόμενες 7-8 ημέρες, κάθε μέρα αναρροφούμε το μισό θρεπτικό υλικό από τη φιάσκα και ανανεώνουμε με καινούριο θρεπτικό υλικό.
4. Μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας, απορρίπτουμε όλο το θρεπτικό υλικό από τη φιάσκα και ξεπλένουμε με DPBS δύο φορές.
5. Ελέγχουμε στο ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο για την παρουσία προσκολλημένων κυττάρων.

2.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και βιωσιμότητας κυτταρικών εναιωρημάτων

Για την άμεση εκτίμηση της κυτταρικής συγκέντρωσης και της βιωσιμότητας σε ένα κυτταρικό εναιώρημα, χρησιμοποιούνται διάφορα πρωτόκολλα χρώσης του προς μέτρηση δείγματος με χρωστικές ουσίες όπως το κυανούν του τρυπανίου (*trypan blue*). Τα ζωντανά κύτταρα έχοντας άθικτη κυτταρική μεμβράνη, εμποδίζουν την είσοδο των χρωστικών στο κυτταρόπλασμα και συνεχίζουν να φαίνονται διαφανή στο μικροσκόπιο. Αντιθέτως, τα νεκρά κύτταρα, λόγω της αυξημένης διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης τους, χρωματίζονται από την είσοδο της χρωστικής (μπλε με το κυανούν του τρυπανίου). Ταυτόχρονα με την εκτίμηση της βιωσιμότητας, η καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε γνωστό όγκο δείγματος (πχ με μια αιμοκυτταρομετρική αντικειμενοφόρο πλάκα τύπου Neubauer, **Εικόνα 2.1**), επιτρέπει την εκτίμηση της συγκέντρωσης των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα.



Εικόνα 2.1. Σχηματική απεικόνιση αιμοκυτταρομέτρου Neubauer. Κατά τη χρήση του, γίνεται εντοπισμός του κεντρικού τετραγώνου της πλάκας, που περικλείεται από τριπλή γραμμή και έχει εμβαδό 1 mm^2 και όγκο $0,1 \text{ mm}^3$. Για την καταμέτρηση εξετάζονται τα 25 μικρότερα τετράγωνα που απαρτίζουν το κεντρικό τετράγωνο (απεικόνιση 10X). Με πράσινο χρώμα σημειώνονται τα κύτταρα που κατά την καταμέτρηση θεωρείται ότι περιλαμβάνονται στο τετράγωνο, ενώ με κόκκινο αυτά που είναι εκτός τετραγώνου (απεικόνιση 40X) (ανατύπωση από <http://insilico.ehu.eus/>).

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Εναιώρημα κυττάρων προς μέτρηση: Κυτταρικές σειρές ΠΜ
 - H929
 - L363
 - JN3
 - U266B1 (U266)
- Διάλυμα κυανού του τρυπανίου (trypan blue) 0,4% (w/v) (Sigma-Aldrich, Germany)
- Μικροπλάκα καλλιέργειας 96 φρεατίων με πυθμένα σε σχήμα U (Greiner Bio-One, UK)
- Αιμοκυτταρομετρική αντικειμενοφόρος πλάκα τύπου Neubauer (Sigma-Aldrich, Germany)
- Οπτικό μικροσκόπιο

Πρωτόκολλο εργασίας

1. Μεταφέρουμε 10-20 μL του αρχικού κυτταρικού εναιωρήματος σε ένα φρεάτιο μικροπλάκας καλλιέργειας 96 φρεατίων.
2. Προσθέτουμε ίσο όγκο κυανού του τρυπανίου (λόγος αραιώσης 2) και αναμειγνύουμε με την πιπέτα.
3. Τοποθετούμε καλυπτρίδα στην πλάκα Neubauer και μεταφέρουμε 10 μL στο θάλαμο μέτρησης.
4. Στο μικροσκόπιο εστιάζουμε στην περιοχή μέτρησης, η οποία περιέχει 5 επί 5 επιμέρους τετράγωνες περιοχές, ίσου εμβαδού και όγκου (1 mm^2 και $0,1 \text{ mm}^3$, αντίστοιχα).
5. Καταμετρούμε όλα τα κύτταρα στις 5 επί 5 τετράγωνες περιοχές και υπολογίζουμε το μέσο όρο. Ταυτόχρονα στις ίδιες περιοχές σημειώνουμε τον αριθμό των νεκρών (μπλε) κυττάρων.

Το ποσοστό βιωσιμότητας υπολογίζεται ως εξής:

$\% \text{ βιωσιμότητα} = (\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων} - \text{Αριθμός νεκρών κυττάρων}) \times 100 / \text{συνολικό αριθμό κυττάρων}$

2.4. Κατασκευή τρισδιάστατων κυτταροκαλλιιεργειών

Στην παρούσα διατριβή έγινε δοκιμή δύο τύπων 3D κυτταροκαλλιιεργειών, με σκοπό την επιλογή της καταλληλότερης ως μοντέλο μελέτης του μικροπεριβάλλοντος του ΜΟ. Οι κυτταροκαλλιιεργειες που βασίζονται σε ικριώματα υδρογέλης εξασφαλίζουν εύκολο χειρισμό και εναπόθεση των κυττάρων,

ενώ μετά το πέρας της καλλιέργειας συνήθως διαλυτοποιούνται εύκολα και τα κύτταρα ανακτώνται με απλή φυγοκέντρηση. Ως υλικό πεπτιδικής υδρογέλης επιλέχθηκε το Corning Puramatrix (BD, USA) λόγω της ευκολίας που μας παρείχε για τη ρύθμιση του ιξώδους της τελικής γέλης. Από την άλλη πλευρά, όπως αναφέρεται και εκτενέστερα στην εισαγωγή, τα στερεά ικρίώματα στην περίπτωση του ΠΜ δημιουργούν ένα πιο ρεαλιστικό περιβάλλον των θυλάκων του ΜΟ. Ο χειρισμός τους όμως είναι πολυπλοκότερος, ανάλογα με την εφαρμογή για την οποία θα χρησιμοποιηθούν, ενώ ειδικά τα προσκολλώμενα κύτταρα είναι αρκετά δύσκολο να αποκολληθούν σε αξιοποιήσιμη μορφή. Σε αυτή τη μεθοδολογία περιγράφουμε την προετοιμασία συγκαλλιέργειας μεσεγχυματικών κυττάρων και κυττάρων μυελωματικής κυτταρικής σειράς.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Εναιώρημα κυττάρων προς μέτρηση
- Διάλυμα κυανού του τρυπανίου (trypan blue) 0,4% (w/v) (Sigma-Aldrich, Germany)
- BD Puramatrix (BD, USA)
- Στερεά ικρίώματα με κατάλληλο μέγεθος για τοποθέτηση σε μικροπλάκα καλλιέργειας 48 ή 96 φρεατίων
- Θρεπτικό υλικό A-MEM (Lonza, Italy)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό 10% FBS
- Διάλυμα τρυψίνης 10x
- Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco's (DPBS), χωρίς Ca^{2+} , Mg^{2+} (Lonza, Italy)
- Μικροπλάκα καλλιέργειας 96 φρεατίων με πυθμένα σε σχήμα U (Greiner Bio-One, UK)
- Αιμοκυτταρομετρική αντικειμενοφόρος πλάκα τύπου Neubauer (Sigma-Aldrich, Germany)
- Αναδευτήρας Vortex
- Οπτικό μικροσκόπιο

Πρωτόκολλο εργασίας

Και με τα δύο πρωτόκολλα που περιγράφονται, καταλήγουμε στην ετοιμασία συγκαλλιέργειας BM-MSCs και μυελωματικής κυτταρικής σειράς. Τα στερεά ικρίώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη κατασκευάστηκαν με 3D εκτύπωση στο Τμήμα Αεροναυπηγικής του Πανεπιστημίου Πατρών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κου Βασίλη Κωστόπουλου και της μεταδιδακτορικής ερευνήτριας Dr Diana Portan. Αποτελούνται από πολυγαλακτικό οξύ (polylactic acid, PLA) δομημένο σε δομή πλέγματος με μέγεθος πόρου που ποικίλει από 60 έως 120 nm.

Για την αναπαράσταση 3D δομής με πεπτιδική υδρογέλη χρησιμοποιήσαμε το Corning PuraMatrix Peptide Hydrogel (BD, USA) το οποίο αποτελείται κατά 1% από αμινοξέα και το υπόλοιπο από νερό. Η μορφοποίηση του υλικού σε γέλη από την αρχική υγρή μορφή γίνεται με την προσθήκη διαλύματος αλάτων συγκέντρωσης $>1\text{mM}$, όπως τα θρεπτικά υλικά. Επειδή η πεπτιδική υδρογέλη που χρησιμοποιήσαμε έχει pH 2-2.5, ο χρόνος επαφής του υλικού πρέπει να είναι ελάχιστος και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούμε ισοοσμωτικό διάλυμα σουκρόζης. Το Corning PuraMatrix Peptide Hydrogel έχει αρχική συγκέντρωση 1% (w/v) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανααίωτο ή σε αραιώση.

-Διαδικασία συγκαλλιέργειών σε ικρίσματα πεπτιδικής υδρογέλης

1. Υπολογίζουμε το συνολικό όγκο Corning PuraMatrix Peptide Hydrogel που θα χρειαστούμε και μόλις πάρουμε την κατάλληλη ποσότητα σε κωνικό σωληνάριο των 15 ml, μειώνουμε το ιξώδες με χρήση Vortex.
2. Αραιώνουμε το αρχικό διάλυμα 1% (w/v) με κατάλληλο όγκο απιονισμένου νερού
3. Προσθέτουμε το Corning PuraMatrix Peptide Hydrogel στα φρεάτια της μικροπλάκας, και από πάνω προσθέτουμε προσεκτικά το θρεπτικό υλικό. Με αυτό τον τρόπο αρχίζει η διαδικασία διαμόρφωσης της γέλης.
4. Τοποθετούμε την πλάκα στον κλίβανο επώασης (37°C , 5% CO_2) για 1 ώρα και σε αυτό το διάστημα αλλάζουμε το θρεπτικό υλικό 2 φορές, έτσι ώστε να επιτευχθεί εξισορρόπηση του pH σε φυσιολογικές τιμές.
5. Κατά τη διάρκεια του βήματος 4) μπορούμε να ετοιμάσουμε τα κύτταρα, αποκολλώντας τα από τη φλάσκα καλλιέργειας και επαναιωρώντας τα σε πλήρες θρεπτικό υλικό κατάλληλης συγκέντρωσης .
6. Μεταφέρουμε προσεκτικά στα φρεάτια, πάνω από τη γέλη που έχει δημιουργηθεί τα κύτταρα. Εάν επιθυμούμε τον εγκλεισμό των κυττάρων σε όλο τον όγκο της γέλης μπορούμε να τα προσθέσουμε στο βήμα 3) μαζί με το Corning PuraMatrix Peptide Hydrogel.

Κατά τη διάρκεια της κυτταροκαλλιέργειας, η αλλαγή του θρεπτικού υλικού γίνεται με ήπια μεταφορά επάνω από τη γέλη. Με το πέρας της καλλιέργειας μπορούμε να ανακτήσουμε τα κύτταρα από τη γέλη με τον εξής τρόπο:

1. Αποδομούμε μηχανικά με ανάδευση με πιπέτα τη γέλη εντός του φρεατίου της μικροπλάκας.

2. Μεταφέρουμε όλη την ποσότητα του φρεατίου σε κωνικό σωληνάριο των 15 ml και προσθέτουμε ίσο όγκο PBS στο φρεάτιο ξεπλένοντάς το, μεταφέροντας και αυτή την ποσότητα στο κωνικό σωληνάριο.
3. Φυγοκεντρούμε στα 400 x g για 10' και απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
4. Επαναιωρούμε σε 2 ml PBS, φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες και συλλέγουμε εκ νέου το ίζημα.
5. Επαναιωρούμε σε 5 ml θρεπτικού υλικού, φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες.
6. Επαναιωρούμε τα κύτταρα που έχουν ανακτηθεί σε διάλυμα της επιλογής μας.

-Για την ετοιμασία συγκαλλιιεργειών σε στερεά ικρίώματα

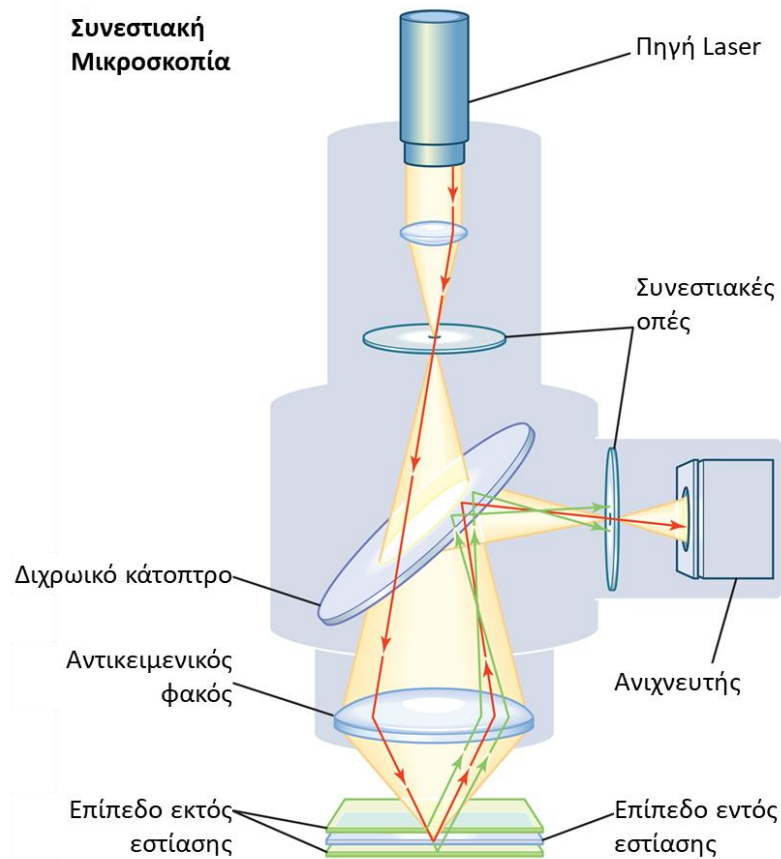
1. Τοποθετούμε το ικρίωμα στον πυθμένα φρεατίου μικροπλάκας καλλιιεργειών 48 ή 96 φρεατίων.
2. Αποστειρώνουμε τα ικρίωματα με προσθήκη 70% αιθανόλης σε ποσότητα αρκετή για την πλήρη βύθισή τους.
3. Μεταφέρουμε τα ικρίωματα σε φρεάτιο που περιέχει 1x DPBS.
4. Αποστειρώνουμε με έκθεση της μικροπλάκας σε ακτινοβολία UV για 4-12 ώρες.
5. Μεταφέρουμε τα ικρίωματα σε φρεάτια με πλήρες θρεπτικό υλικό και τα αφήνουμε στον κλίβανο επώασης (37°C, 5% CO₂) για 24 ώρες.
6. Ετοιμάζουμε τα κύτταρα που θα καλλιιεργήσουμε στην κατάλληλη συγκέντρωση για το πείραμα μας σε εναιώρημα σε πλήρες θρεπτικό υλικό σε μεγάλη συγκέντρωση, δηλ. >1 x 10⁶ κύτταρα / ml.
7. Μεταφέρουμε τα ικρίωματα σε κενό φρεάτιο, ιδανικά σε νέα μικροπλάκα καλλιιεργειών.
8. Τοποθετούμε στο ικρίωμα το πυκνό κυτταρικό εναιώρημα, σταγόνα-σταγόνα στην επιφάνεια του ικρίωματος, ώστε τα κύτταρα να διηθηθούν μέσα από τους πόρους του ικρίωματος.
9. Συμπληρώνουμε με θρεπτικό υλικό μέχρι την πλήρωση του μισού όγκου του φρεατίου.

Κατά τη διάρκεια της κυτταροκαλλιιεργειας η αλλαγή του θρεπτικού υλικού γίνεται με αφαίρεση θρεπτικού υλικού από το φρεάτιο και προσθήκη ίσης ποσότητας νέου θρεπτικού υλικού με ήπια κίνηση. Με το πέρας της καλλιιεργειας μπορούμε να ανακτήσουμε τα μη προσκολλώμενα κύτταρα από τα φρεάτια:

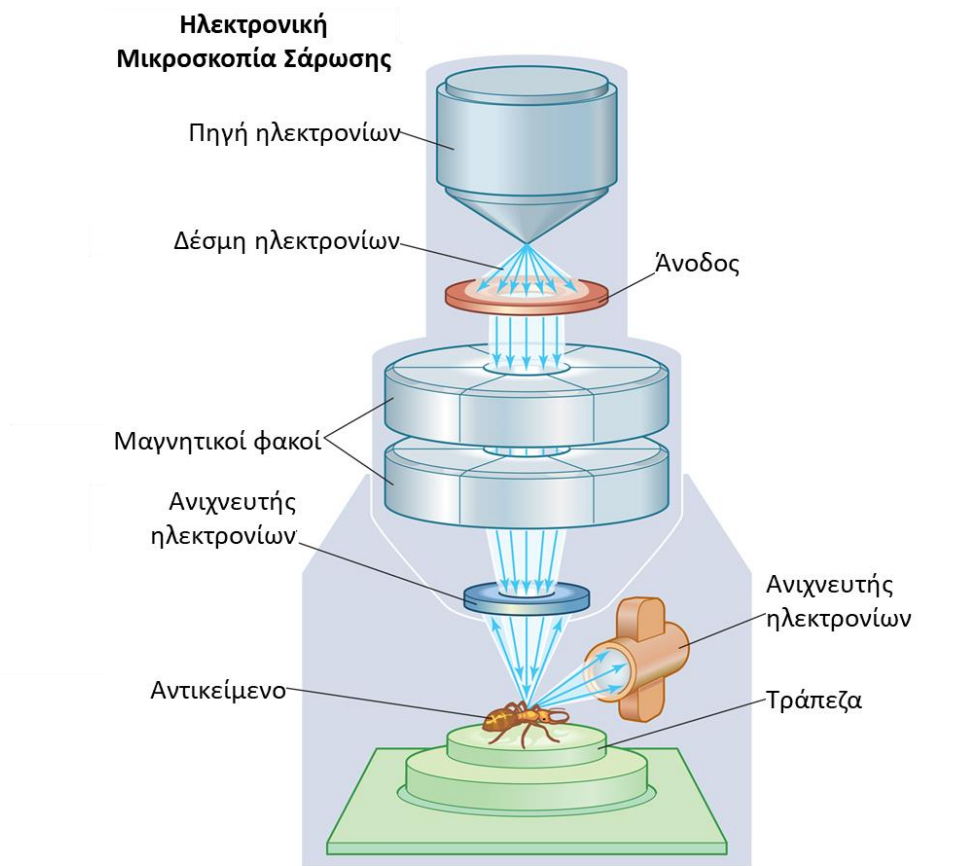
1. Αναδεύουμε ήπια με πιπέτα, χωρίς να ακουμπάμε τα ικρίωματα ώστε να μην προκληθούν φθορές. Τα προσκολλώμενα κύτταρα παραμένουν στον πυθμένα και στα ικρίωματα ενώ τα εναιωρούμενα ακόμη και αν είχαν καθίσει στον πάτο του φρεατίου σηκώνονται με ευκολία.
2. Μεταφέρουμε το κυτταρικό εναιώρημα σε κωνικό σωληνάριο 15 ml και συμπληρώνουμε τον όγκο με θρεπτικό υλικό.
3. Φυγοκεντρούμε στα 400 x g για 10'.
4. Καθαρίζουμε τα ικρίωματα γεμίζοντας τα φρεάτια με πυκνό διάλυμα 10x τρυψίνης και τα επωάζουμε για 20' στον κλίβανο.
5. Ακολουθούμε τα βήματα αποστείρωσης όπως περιγράφουμε προηγουμένως ώστε να ετοιμαστούν για το επόμενο πείραμα.

2.5. Παρατήρηση ικριωμάτων με μικροσκοπία

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων με τα ικρίωματα, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι μικροσκόπησης για την παρατήρηση της προσκόλλησης των μεσεγχυματικών κυττάρων στα ικρίωματα, την καταμέτρηση του αριθμού των μυελωματικών κυτταρικών σειρών και την εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους. Με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού, πραγματοποιήθηκε η αδρή εκτίμηση της εγκαθίδρυσης των μεσεγχυματικών κυττάρων στα στερεά ικρίωματα. Η χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης (**Εικόνα 2.2**) παρείχε τη δυνατότητα της αναλυτικότερης μελέτης του κυτταροσκελετού των μεσεγχυματικών κυττάρων καθώς αυτά εκπτύσσονται στα ικρίωματα ενώ ταυτόχρονα μπορέσαμε να εκτιμήσουμε και τη βιωσιμότητα των μυελωματικών κυττάρων σε συγκαλλιέργεια. Με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (**Εικόνα 2.3**) εκτιμήθηκε η τρισδιάστατη πλήρωση των στερεών ικριωμάτων από τα BM-MSCs. Σε αυτή την ενότητα περιγράφονται οι μέθοδοι προετοιμασίας των κυττάρων για μικροσκόπηση για κάθε τεχνική μικροσκοπίας ξεχωριστά.



Εικόνα 2.2. Σχηματική απεικόνιση της συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης. Η φωτεινή πηγή Laser εστιάζεται σε συγκεκριμένο επίπεδο και σημείο στο αντικείμενο. Με τη χρήση των συνεστιακών οπών ο ανιχνευτής του μικροσκοπίου λαμβάνει μόνο το εστιασμένο σήμα φθορισμού. Η εικόνα δεν είναι ορατή με το μάτι αλλά συντίθεται από λογισμικό.



Εικόνα 2.3. Σχηματική απεικόνιση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης με την οποία εξετάζεται η επιφάνεια αντικειμένων με χρήση δέσμης ηλεκτρονίων. Η δέσμη ηλεκτρονίων δημιουργείται στην άνοδο και η εστίαση γίνεται με τη χρήση μαγνητικών φακών.

2.5.1. Χρώση κυττάρων με χρωστική CFSE και παρατήρηση με μικροσκοπία φθορισμού

Για την παρατήρηση με μικροσκοπία φθορισμού επιλέχθηκε η χρήση μιας ζωτικής χρωστικής που επιτρέπει τη χρώση των ζωντανών κυττάρων χωρίς να υπάρχει η ανάγκη μονιμοποίησής τους. Με αυτό τον τρόπο, είναι δυνατή η κατ' εξακολούθηση παρατήρηση των κυττάρων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Η χρωστική που επιλέχθηκε είναι ο σουκινιμιδυλικός εστέρας της καρβοξυφλουοροσκεΐνης (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE*), καθώς τα κύτταρα που έχουν χρωθεί με CFSE δε χάνουν την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα ενώ παράλληλα η χρωστική μεταβιβάζεται στα κύτταρα-απογόνους που προέρχονται από τη διαίρεση των ήδη χρωσμένων κυττάρων. Ο CFSE είναι μια πράσινη χρωστική η οποία εισέρχεται ανεμπόδιστα στο εσωτερικό του κυττάρου και δεσμεύεται ομοιοπολικά με ενδοκυττάρια μόρια, όπως στα κατάλοιπα λυσίνης πρωτεϊνών.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Εναιώρημα κυττάρων προς χρώση
- Μικροπλάκα κυτταροκαλλιέργειας με την 3D καλλιέργεια που έχουμε αναπτύξει
- CFSE (Sigma Aldrich, USA)
- Διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO, Sigma Aldrich, USA)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf
- BD Puramatrix (BD, USA)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό με 10% FBS
- Ελαστική ταινία σφράγισης (Parafilm M, Sigma Aldrich, USA)
- Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco's (DPBS), χωρίς Ca²⁺, Mg²⁺ (Lonza, Italy)
- Υδατόλουτρο
- Ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού, Nikon TS 100 (Nikon, Japan)
- Κάμερα μικροσκοπίας Nikon PS-Fi2 (Nikon, Japan)

Πρωτόκολλο Εργασίας

-Προετοιμασία χρωστικής και χρώση κυττάρων

1. Στο αρχικό σωληνάριο του CFSE περιέχονται 500 mg χρωστικής, στα οποία προσθέτουμε 90 μL DMSO, ανακινούμε και μοιράζουμε σε 10 σωληνάρια τύπου Eppendorf. Έτσι κατασκευάζουμε τα μητρικά διαλύματα CFSE σε DMSO συγκέντρωσης 10 mM, τα οποία διατηρούνται στους -20 °C.
2. Αποψύχουμε το σωληνάριο με το μητρικό διάλυμα CFSE σε DMSO.
3. Μεταφέρουμε το κυτταρικό εναιώρημα προς χρώση σε κωνικό φιαλίδιο των 15 mL.
4. Ξεπλένουμε τα κύτταρα προσθέτοντας DPBS και φυγοκεντρώντας στα 400 x g, 10'.
5. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 4 και στο τέλος επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 1 mL DPBS.
6. Καταμετρούμε τα κύτταρα με τη μέθοδο καταμέτρησης σε πλάκα Neubauer όπως αναφέραμε σε προηγούμενη ενότητα.
7. Φυγοκεντρούμε και επαναιωρούμε τα κύτταρα σε DPBS ώστε να έρθουν σε συγκέντρωση 1 x 10⁶ / mL.
8. Προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος CFSE σε DMSO ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 100 μM.
9. Ανακινούμε και επωάζουμε το κυτταρικό εναιώρημα σε υδατόλουτρο για 15'.

10. Ξεπλένουμε τα κύτταρα με προσθήκη 1x DPBS σε δεκαπλάσια ποσότητα του αρχικού όγκου και φυγοκεντρούμε στα 400 x g, 10'.
11. Επαναλαμβάνουμε με προσθήκη ίδιας ποσότητας πλήρους θρεπτικού υλικού και κάνουμε ανασύσταση με μικρή ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού ανάλογα με την επόμενη χρήση των κυττάρων.

-Παρακολούθηση πορείας καλλιέργειας προσκολλώμενων κυττάρων με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού

1. Πριν από την παρατήρηση σφραγίζουμε το κάλυμμα της μικροπλάκας καλλιέργειας με Parafilm με σκοπό να ελαχιστοποιήσουμε τον κίνδυνο μόλυνσης των καλλιεργειών.
2. Η χρωστική CFSE έχει μέγιστο απορρόφησης στα 490 nm και μέγιστο εκπομπής στα 520 nm, επομένως φροντίζουμε στο μικροσκόπιο φθορισμού να υπάρχει και να επιλεγθεί το κατάλληλο φίλτρο.
3. Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο με ήπιους χειρισμούς χωρίς τα ικρίσματα να μετακινηθούν από τις θέσεις τους επειδή μπορεί να υπάρχουν BM-MSCs που εκτείνονται μεταξύ της εσωτερικής επιφάνειας της μικροπλάκας και του ικριώματος.
4. Για τη λήψη φωτογραφιών τεκμηρίωσης φροντίζουμε στο λογισμικό της κάμερας μικροσκοπίας να έχουμε επιλέξει προφίλ φωτογράφισης κατάλληλο για σήμα φθορισμού.

2.5.2. Προετοιμασία ικριωμάτων και παρατήρηση με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης

Σε αντίθεση με την οπτική μικροσκοπία, στη συνεστιακή μικροσκοπία ο φωτισμός του δείγματος και αντίστοιχα η προσλαμβανόμενη οπτική πληροφορία είναι περιορισμένος σε ένα μικρό σημείο το οποίο μετακινείται κατά μήκος του παρασκευάσματος. Αυτό επιτυγχάνεται με την τεχνολογία κατασκευής των συνεστιακών μικροσκοπίων σάρωσης, τα οποία παρεμβάλουν ένα πολύ μικρό διάφραγμα στον οπτικό άξονα μεταξύ του αντικειμενικού φακού και της πηγής φωτισμού. Η φωτεινή πηγή που χρησιμοποιείται από το συνεστιακό σύστημα είναι πηγή φωτός LASER, ενώ το μικροσκόπιο μπορεί να έχει ταυτόχρονα και συμβατική οπτική μέθοδο παρατήρησης. Η εικόνα σχηματίζεται με τη σάρωση όλων των σημείων του οπτικού πεδίου και η παρατήρηση γίνεται μέσω λογισμικού ηλεκτρονικού υπολογιστή. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα χρήσης του συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης είναι ότι ελαττώνονται πολύ τα μη ειδικά σήματα από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος, παράγοντας εικόνες υψηλής αντίθεσης και ευκρίνειας.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Μικροπλάκα κυτταροκαλλιέργειας με την 3D καλλιέργεια που έχουμε αναπτύξει
- Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco's (DPBS), χωρίς Ca^{2+} , Mg^{2+} (Lonza, Italy)
- Χρωστική DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Thermo Fischer Scientific, USA)
- Μέσο επικάλυψης με χρωστική DAPI, mounting medium with DAPI (Abcam, UK)
- Χρωστική Φαλλοϊδίνη (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Χρωστική Ροδαμίνη (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Διάλυμα φορμαλδεΐδης 4% (v/w) σε DPBS
- Διάλυμα Triton X-100 0,3% (v/w) σε 1X DPBS
- Κιτ χρώσης Annexin V Αποπτωσης Detection kit I (BD, USA) (περιλαμβάνει το binding buffer)
- Ιωδιούχο προπίδιο (PI, Sigma Aldrich, USA)

Πρωτόκολλο Εργασίας

Στα ικρίωματα γέλης περιγράφεται πρωτόκολλο χρώσης με Αννεξίνη-V/PI, έτσι ώστε να εκτιμηθεί ο αριθμός και η βιωσιμότητα των κυττάρων της συγκαλλιέργειας. Η Αννεξίνη-V είναι μια εξαρτώμενη από το ασβέστιο (Ca) πρωτεΐνη με μεγάλη συγγένεια για την φωσφατιδυλοσερίνη και άρα βοηθά στον εντοπισμό κυττάρων που βρίσκονται σε διαδικασία απόπτωσης. Το ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Το PI είναι μια όξινη χρωστική νουκλεϊκών οξέων η οποία αδυνατεί να εισέλθει σε ζωντανά ή πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα. Τα νεκρά κύτταρα, ωστόσο, έχουν αποδιοργανωμένες μεμβράνες και άρα επιτρέπουν την είσοδο του PI με αποτέλεσμα να φθορίζουν. Στα στερεά ικρίωματα περιγράφεται πρωτόκολλο χρώσης με φαλλοϊδίνη/ροδαμίνη έτσι ώστε να μελετηθεί η μορφολογία των μεσεγχυματικών κυττάρων που είναι προσκολλημένα στα στερεά ικρίωματα. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με φαλλοϊδίνη, η οποία μας αποκαλύπτει τον κυτταροσκελετό καθότι συνδέεται με τα ινίδια ακτίνης, αποκαλύπτοντας έτσι την τοπολογία τους.

-Για την προετοιμασία στερεών ικριωμάτων προς παρατήρηση προσκολλώμενων κυττάρων με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης

1. Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από το φρεάτιο που περιέχει το ικρίωμα.
2. Ξεπλένουμε το ικρίωμα στο φρεάτιο τρεις φορές με 1X DPBS.
3. Μονιμοποιούμε τα ικρίωματα με φορμαλδεΐδη 4% στον κλίβανο για 20'.
4. Κάνουμε πλύση του ικριώματος όπως στο βήμα 2).

5. Προσθέτουμε Triton X-100 0,3% σε όγκο αρκετό για την πλήρωση των φρεατίων, με σκοπό τη διάτρηση των κυτταρικών μεμβρανών.
6. Κάνουμε πλύση του ικρίωματος όπως στο βήμα 2).
7. Προσθέτουμε 1 mL 100 nM Φαλλοϊδίνη/Ροδαμίνη σε 1X DPBS και επωάζουμε για 30' σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Κάνουμε πλύση του ικρίωματος όπως στο βήμα 2.
9. Τοποθετούμε το ικρίωμα σε αντικειμενοφόρο πλάκα, με την επιφάνεια που θέλουμε να παρατηρηθεί προς τα πάνω.
10. Καλύπτουμε την επιφάνεια του ικρίωματος με μέσο επικάλυψης με χρωστική DAPI και το καλύπτουμε με καλυπτρίδα έτσι ώστε το μέσο επικάλυψης να απλωθεί ομοιόμορφα στην καλυπτρίδα χωρίς να σχηματιστούν φυσαλίδες.
11. Επωάζουμε για 15' σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος.
12. Κάνουμε παρατήρηση στο μικροσκόπιο σάρωσης χρησιμοποιώντας τη φωτεινή πηγή Laser 408 nm για τη διέγερση της χρωστικής DAPI και τη Laser 543 nm για τη Φαλλοϊδίνη/Ροδαμίνη.

-Για την προετοιμασία ικριωμάτων γέλης προς παρατήρηση προσκολλημένων κυττάρων με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης

1. Εάν το επιθυμούμε ανακτούμε τα κύτταρα από την υδρογέλη όπως περιγράφηκε προηγουμένως (**παράγραφος 2.4**) αλλιώς συνεχίζουμε τη διαδικασία στα φρεάτια της μικροπλάκας καλλιέργειών.
2. Προσθέτουμε 100 ml Binding Buffer 1X/φρεάτιο.
3. Προσθέτουμε 5 μL Αννεξίνης-V και 5 μL PI.
4. Επωάζουμε για 15' στο σκοτάδι.
5. Παρατηρούμε στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

2.5.3. Προετοιμασία στερεών ικριωμάτων και παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης

Με τη χρήση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης, επιτυγχάνονται μεγεθύνσεις μεγαλύτερες απ'ότι στο ορατό φως, καθότι η οπτική αυτή μέθοδος χρησιμοποιεί εκπομπή ηλεκτρονίων. Η παρατήρηση ικριωμάτων γέλης είναι αδύνατη με αυτή την προσέγγιση, καθώς η καλλιέργεια διαλύεται και δεν διατηρείται η 3D δομή της. Συνεπώς περιγράφεται το πρωτόκολλο προετοιμασίας στερεού ικρίωματος.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Μικροπλάκα κυτταροκαλλιέργειας με την 3D καλλιέργεια που έχουμε αναπτύξει
- Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα Dulbecco's (DPBS), χωρίς Ca^{2+} , Mg^{2+} (Lonza, Italy)
- Αιθανόλη 100%
- Γλουταραλδεΐδη (Sigma Aldrich, USA)
- Υλικό επικάλυψης για ηλεκτρονική μικροσκοπία με κόκκους χρυσού και παλλαδίου (60/40) (Electron Microscopy Sciences, UK)

Πρωτόκολλο Εργασίας

1. Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από το φρεάτιο και πλένουμε το ικρίωμα με 1X DPBS, 3 φορές.
2. Μονιμοποιούμε τα κύτταρα με μεταφορά σε διάλυμα γλουταραλδεΐδης 4% v/v σε 1X DPBS.
3. Ξεπλένουμε τα ικρίωματα 3 φορές με 1X DPBS.
4. Μεταφέρουμε τα ικρίωματα σε καινούριο φρεάτιο με 1 ml αιθανόλη 30% για 10' και συνεχίζουμε διαδοχικά αυξάνοντας τη συγκέντρωση σε 50%, 75%, 95%, 100% αιθανόλη.
5. Αφήνουμε τα ικρίωματα για ξήρανση στον αέρα.
6. Τοποθετούμε τα ικρίωματα σε μεταλλική βάση SEM.
7. Ακολουθούμε τη διαδικασία κάλυψης του ικρίωματος με χρυσό και παλλάδιο.
8. Τοποθετούμε στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης και προχωρούμε με την παρατήρηση.

2.6. Υπολογισμός συγκέντρωσης ημίσειας αναστολής (IC50) θεραπευτικών παραγόντων με χρήση δοκιμασίας MTT

Η δοκιμασία MTT είναι μία χρωματομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων, η οποία είναι ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Βασίζεται στην αναγωγή της κίτρινης χρωστικής MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] προς το σχηματισμό ενός αδιάλυτου προϊόντος φορμαζανίου ιώδους χρώματος, από τη δράση των μιτοχονδριακών αναγωγασών. Η χρήση της δοκιμασίας στην πειραματική μας διαδικασία, έγινε με σκοπό τον υπολογισμό της κυτταροτοξικής δράσης χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε μικροπλάκες 96 φρεατίων. Η βασικότερη μέτρηση αφορά στον

υπολογισμό της συγκέντρωσης ενός θεραπευτικού παράγοντα που δύναται να προκαλέσει νέκρωση στο 50% των κυττάρων, ή αλλιώς συγκέντρωση ημίσειας αναστολής (IC50). Με τον τρόπο αυτό, μπορούμε να εκτιμήσουμε την ανθεκτικότητα διαφόρων κυτταρικών σειρών και πρωτογενών κυττάρων ασθενών.

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Μικροπλάκα κυτταροκαλλιέργειας με την καλλιέργεια που έχουμε αναπτύξει
- Πλήρες θρεπτικό υλικό με 10% FBS
- Διάλυμα γνωστής αρχικής συγκέντρωσης του παράγοντα που θα χρησιμοποιηθεί
- Διάλυμα MTT (Sigma Aldrich, USA)
- Διάλυμα 0,1 N HCl/άνυδρης ισοπροπανόλης (Sigma Aldrich, USA)
- Φωτόμετρο μικροπλάκας (ELISA reader) ρυθμισμένο στα 545 nm

Πρωτόκολλο Εργασίας

1. Φυγοκεντρούμε το κυτταρικό εναιώρημα στα 250 g για 5' και επαναιωρούμε το ίζημα σε πλήρες θρεπτικό υλικό.
2. Προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση των κυττάρων στο κυτταρικό εναιώρημα με τη μέθοδο που περιγράφηκε προηγουμένως και προσθέτουμε κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού, ώστε το τελικό εναιώρημα να έχει πυκνότητα 300.000 κύτταρα/mL.
3. Μεταφέρουμε 100 μL κυτταρικού εναιωρήματος (30.000 κύτταρα) ανά φρεάτιο μικροπλάκας 96 φρεατίων. Συνιστάται κάθε επίδραση να ελέγχεται εις τριπλούν.
4. Στα φρεάτια όπου θα μελετήσουμε την επίδραση παραγόντων προσθέτουμε 100 μL διαλύματος κατάλληλης συγκέντρωσης παράγοντα. Εάν σκοπός είναι να προσδιοριστεί η IC50 τότε θα πρέπει να ετοιμάσουμε μια σειρά διαβαθμίσεων συγκέντρωσης του παράγοντα. Στα φρεάτια που θα χρησιμοποιηθούν σαν μάρτυρες προσθέτουμε ίση ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού ενώ αφήνουμε και κενά φρεάτια, για τη μέτρηση απορρόφησης των τυφλών-μαρτύρων (blanks).
5. Επώαζουμε για 72 ώρες σε κλίβανο επώασης με σταθερές συνθήκες 37° C, 5% CO₂.
6. Φυγοκεντρούμε τη μικροπλάκα στα 250 g για 5'.
7. Προσθέτουμε 100 μL διαλύματος MTT (συγκέντρωσης 1 mg/mL) ανά φρεάτιο και επώαζουμε για 4 ώρες στο σκοτάδι.

8. Αφού φυγοκεντρήσουμε τη μικροπλάκα στα 250 g για 5' αφαιρούμε το συνολικό όγκο υγρού από κάθε φρεάτιο, προσεκτικά ώστε να μην αναρροφηθούν οι αδιάλυτοι κρύσταλλοι φορμαζανίου.
9. Προσθέτουμε 100 μ L διαλύματος 0,1 N HCl/άνυδρης ισοπροπανόλης για λύση των κυττάρων και διαλυτοποιούμε τους κρυστάλλους με πιπετάρισμα.
10. Φωτομετρούμε την πλάκα στο φωτόμετρο, στα 545 nm.

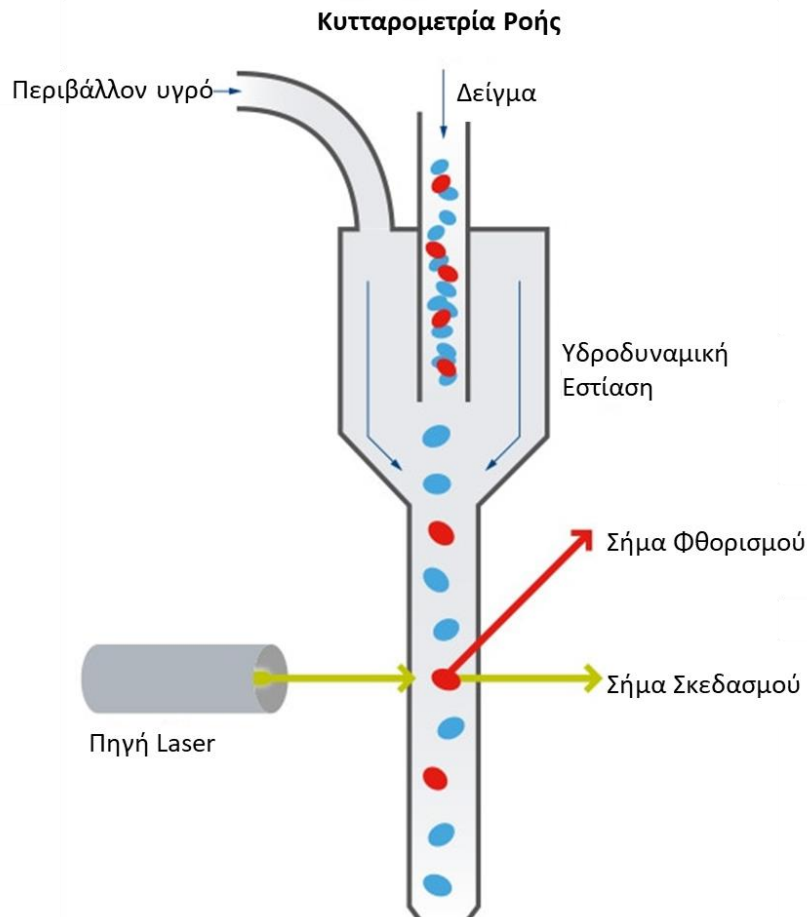
Στη συνέχεια ακολουθεί η επεξεργασία των αποτελεσμάτων :

1. Εξάγουμε το μέσο όρο τιμών απορρόφησης για τα φρεάτια με όμοιες συνθήκες, στην προκειμένη περίπτωση τις τριάδες.
2. Αφαιρούμε από αυτές τις τιμές, τον μέσο όρο των τυφλών.
3. Εισάγουμε τα δεδομένα σε εργαλείο υπολογισμού IC50 (πχ atbio.com) και εξάγεται η σιγμοειδής καμπύλη από την οποία μπορούμε να υπολογίζουμε την IC50 αλλά και οποιαδήποτε άλλη συγκέντρωση αναστολής επιθυμούμε (πχ IC30, IC80)

2.7. Επεξεργασία δειγμάτων για έλεγχο έκφρασης επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής μας βοηθά να αναλύσουμε γρήγορα ένα σύνολο κυττάρων και να συλλέξουμε πολλά δεδομένα έκφρασης κυτταρικών δεικτών σε επίπεδο μοναδιαίου κυττάρου. Οι δυνατότητες της τεχνολογίας μας επιτρέπουν να αναλύσουμε κυτταρικά εναιωρήματα με αρκετά εκατομμύρια κύτταρα / mL και να εντοπίσουμε πολύ μικρούς ξεχωριστούς πληθυσμούς κυττάρων (πχ. 20 κύτταρα σε σύνολο 1×10^6 κυττάρων) με διακριτά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Οι πληροφορίες που συλλέγουμε αφορούν το μέγεθος και την πολυπλοκότητα ενός κυττάρου, καθώς και την έκφραση εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων δεικτών/μορίων. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των επιτόπων-στόχων, τα οποία είναι συζευγμένα με φθοριοχρώματα όπως η φλουορεσκεΐνη (FITC) και η φυκοερυθρίνη (PE). Τα κύτταρα εισέρχονται στον αναλυτή και με χρήση υδροδυναμικής εστίασης διέρχονται ένα-ένα από δέσμη ακτίνας laser κατάλληλου μήκους κύματος που διεγείρει τα φθοριοχρώματα (Εικόνα 2.4). Το φωτεινό σήμα (φάσμα εκπομπής ηλεκτρονίων των φθοριοχρωμάτων) διέρχεται από κατάλληλη διάταξη κάτοπτρων και φίλτρων και τελικώς προσλαμβάνεται από ανιχνευτές, έχοντας αποκλείσει το μη ειδικό σήμα. Στα πλαίσια των πειραμάτων με χρήση κυτταρομετρίας ροής για την παρούσα διατριβή, περιγράφονται τρία πρωτόκολλα προετοιμασίας και χρώσης των κυττάρων για: i)

εκτίμηση απόπτωσης/νέκρωσης κυτταρικών πληθυσμών, ii) μελέτη ανοσολογικού προφίλ λεμφοκυττάρων με χρήση επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών, iii) μελέτη εντοπισμού και καταμέτρησης MDSCs.



Εικόνα 2.4. Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας του κυτταρόμετρου ροής. Τα κύτταρα του δείγματος σημαίνονται με αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες και διέρχονται σε νηματική ροή από τη δέσμη του λέιζερ. Οι φθορίζουσες ουσίες διεγείρονται και εκπέμπουν φως το οποίο είναι το παραγόμενο σήμα φθορισμού, ενώ επίσης αξιοποιείται και το σήμα σκεδασμού της δέσμης λέιζερ.

2.7.1. Πρωτόκολλο εκτίμησης απόπτωσης/νέκρωσης κυτταρικών πληθυσμών με χρήση των χρώσεων Αννεξίνης-V και PI

Σε αυτό το πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν εναιωρήματα κυττάρων προς μέτρηση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων. Εάν το πείραμα αφορά την επίδραση κάποιου παράγοντα,

η χρώση με Αννεξίνη-V και PI θα πρέπει να γίνει άμεσα ώστε να υπάρχει αξιοπιστία ως προς την επίδραση του παράγοντα στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Annexin/PI kit (BD Biosciences, USA)
- Αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα σε ταμπλέτες (Phosphate Buffer Saline tablets, PBS tablets) (Sigma Chemical, USA)
- Πλαστικά σωληνάρια FACS tubes κατάλληλα για χρήση σε κυτταρομετρητή ροής (Corning, USA)
- Κυτταρόμετρο BD FACSCantoII, εξοπλισμένο με 3 laser, 405 nmViolet/ 488 nmBlue/ 633 nmRed (BD Biosciences, USA)

Πρωτόκολλο Εργασίας

1. Πλένουμε τα κύτταρα 2 φορές με κρύο PBS φυγοκεντρώντας στα 250 g για 5' και επαναιωρούμε σε 1X Binding Buffer (μετά από αραίωση με απεσταγμένο νερό του πυκνού διαλύματος των 10X που περιλαμβάνεται στο Annexin/PI kit) σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/ml.
2. Μεταφέρουμε 100 μl διαλύματος (1×10^5 κύτταρα) σε FACS tubes και προσθέτουμε 5 μl Αννεξίνης-V συζευγμένης με FITC (Αννεξίνη-V-FITC) και 5 μl PI.
3. Αναδεύουμε ήπια με vortex και επωάζουμε στους 25°C στο σκοτάδι για 15'.
4. Προσθέτουμε 400 μl 1X Binding Buffer σε κάθε FACS tube και προβαίνουμε στην ανάλυση με κυτταρομετρία ροής το ταχύτερο δυνατό, εντός διαστήματος μιας ώρας μετά τη χρώση.

2.7.2. Πρωτόκολλο μελέτης ανοσολογικού προφίλ λεμφοκυττάρων με χρήση επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών

Στο περιγραφόμενο πρωτόκολλο χρησιμοποιούμε δείγμα ΠΑ και ΜΟ ασθενών με ΠΜ. Η χρώση των κυττάρων γίνεται με τους παρακάτω συνδυασμούς μονοκλωνικών αντισωμάτων και φθορίζουσών χρωστικών (Πίνακας 2.1):

Πίνακας 2.1. Συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων – φθορίζουσων χρωστικών στο πρωτόκολλο μελέτης του ανοσολογικού προφίλ των λεμφοκυττάρων

Μονοκλωνικό Αντίσωμα	Φθορίζουσα χρωστική		Ποσότητα μL	Τύπος δείκτη Επιφανειακός (S) / Ενδοκυττάριος (I)
	Πάνελ 1	Πάνελ 2		
CD3	FITC	FITC	5	S
CD4	APCCy7	APCCy7	2,5	S
CD25	APC	APC	20	S
FoxP3	PE	PE	5	I
Ki67	BV510		2,5	I
CD45RA	PECy7		2,5	S
CD8	PerCPCy5.5		2,5	S
CD39	BV421		5	S
CD45RO		PerCPCy5.5	2,5	S
CTLA4		BV421	5	I
CD127		BV510	2,5	S
HLADR		PECy7	2,5	S

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Human FoxP3 kit (BD, USA), προετοιμάζοντας τα:
 - Human FoxP3 Buffer A 1X: Αραίωση του Human FoxP3 Buffer A 10X σε απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1 μέρος και 9 μέρη (αραίωση 1:10)
 - Human FoxP3 Buffer C: Αραίωση του Human FoxP3 Buffer B 50X σε Human FoxP3 Buffer A 1X σε αναλογία 1 μέρος και 49 μέρη (αραίωση 1:50)
- Διάλυμα λύσης ερυθρών BD Pharmlyse (BD, USA)
- Διάλυμα PBS – 0,5% FBS (FACS washing buffer)
- Πλαστικά σωληνάκια FACS tubes κατάλληλα για χρήση σε κυτταρομετρητή ροής (Corning, USA)
- Φίλτρο cell strainer των 70 μm (BD, USA)
- Κυτταρόμετρο BD FACSCantoII, εξοπλισμένο με 3 laser, 405 nmViolet/ 488 nmBlue/ 633 nmRed (BD, USA)

Πρωτόκολλο Εργασίας

1. Εάν το αρχικό δείγμα είναι MO, τότε διηθούμε με φίλτρο πόρων 70 μm για την απομάκρυνση θραυσμάτων οστών ή λίπους που μπορεί να προκαλέσουν τεχνικό πρόβλημα στον αναλυτή. Μεταφέρουμε το διήθημα σε κωνικό σωληνάριο των 15 mL.
2. Προσθέτουμε διάλυμα λύσης ερυθρών μέχρι τα 15 mL και επωάζουμε για 15'.

3. Ξεπλένουμε δύο φορές με πλήρωση με FACS washing buffer μέχρι τα 15 ml.
Φυγοκεντρούμε στα 800 g για 5', αποχύνουμε το υπερκείμενο και τελικά επανααιωρούμε σε 2 mL FACS washing buffer.
4. Προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση των κυττάρων με πλάκα Neubauer και αξιολογούμε τη βιωσιμότητα των κυττάρων με χρώση με κυανούν του τρυπανίου. Προσαρμόζουμε τη συγκέντρωση σε $1,5 \times 10^7$ κύτταρα/mL.
5. Μεταφέρουμε 100 mL από το εναιώρημα σε ένα FACS tube για κάθε πάνελ που θα αναλύσουμε (στην προκειμένη περίπτωση 2 σωληνάρια/δείγμα).
6. Προσθέτουμε κατάλληλο όγκο μονοκλωνικών αντισωμάτων για επιφανειακούς δείκτες και επωάζουμε για 30' στο σκοτάδι.
7. Ξεπλένουμε με 2ml FACS washing buffer. Φυγοκεντρούμε στα 250 g για 5', αποχύνουμε το υπερκείμενο και στο ίζημα των κυττάρων προσθέτουμε Human FoxP3 Buffer A σε κάθε σωληνάριο, επωάζοντας για 10' στο σκοτάδι.
8. Ξεπλένουμε με 2ml FACS washing buffer. Φυγοκεντρούμε στα 250 g για 5', αποχύνουμε το υπερκείμενο και στο ίζημα των κυττάρων προσθέτουμε 0,5 ml Human FoxP3 Buffer A σε κάθε σωληνάριο επωάζοντας για 30' στο σκοτάδι.
9. Ξεπλένουμε με 2ml FACS washing buffer. Φυγοκεντρούμε στα 250 g για 5', αποχύνουμε το υπερκείμενο και στο ίζημα των κυττάρων προσθέτουμε κατάλληλο όγκο μονοκλωνικών αντισωμάτων για ενδοκυττάρους δείκτες επωάζοντας για 30' στο σκοτάδι.
10. Ξεπλένουμε με 2ml FACS washing buffer. Φυγοκεντρούμε στα 250 g για 5', αποχύνουμε το υπερκείμενο και στο ίζημα των κυττάρων κάνουμε την τελική ανασύσταση με 400 μL FACS washing buffer.
11. Αναλύουμε στον κυτταρομετρητή ροής.

2.7.3. Πρωτόκολλο μελέτης ανοσολογικού προφίλ κατασταλτικών κυττάρων μυελογενούς προέλευσης με χρήση επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών

Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιούμε δείγμα ΠΑ και ΜΟ ασθενών με ΠΜ. Η χρώση των κυττάρων γίνεται με τους συνδυασμούς μονοκλωνικών αντισωμάτων και φθορίζουσων χρωστικών που αναγράφονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2. Συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων – φθορίζουσων χρωστικών για το πρωτόκολλο μελέτης του ανοσολογικού προφίλ των κατασταλατικών κυττάρων μυελογενούς προέλευσης με κυτταρομετρία ροής. Όλοι οι δείκτες είναι επιφανειακοί.

Μονοκλωνικό Αντίσωμα	Φθορίζουσα χρωστική	Ποσότητα
	Πάνελ 1	μL
CD14	FITC	10
CD11b	PE-Cy7	5
CD15	APC	3
CD33	BV510	3
CD124	BV421	5
CD3	APC-Cy7	10
CD19	APC-Cy7	10
CD56	APC-Cy7	10
HLA-DR	PE	10
7-AAD	PerCPy5.5	5

Υλικά, αναλώσιμα και όργανα

- Διάλυμα διαχωρισμού λεμφοκυττάρων Histopaque (Lonza, Germany)
- Θρεπτικό υλικό RPMI (Lonza, Italy)
- Διάλυμα PBS – 0,5% FBS (FACS washing buffer)
- Πλαστικά σωληνάρια FACS tubes κατάλληλα για χρήση σε κυτταρομετρητή ροής (Corning, USA)
- Αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα σε ταμπλέτες (Phosphate Buffer Saline tablets, PBS tablets) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)
- Φίλτρο cell strainer των 70 μm (BD, USA)
- Κυτταρόμετρο BD FACSCantoII, εξοπλισμένο με 3 laser, 405 nmViolet/ 488 nmBlue/ 633 nmRed (BD Biosciences, USA)

Πρωτόκολλο Εργασίας

1. Εάν το αρχικό δείγμα είναι MO, τότε διηθούμε με φίλτρο πόρων 70 μm. Μεταφέρουμε το διήθημα σε κωνικό σωληνάριο των 15 mL συμπληρώνοντας με RPMI μέχρι τα 10 mL.
2. Ακολουθούμε τη διαδικασία διαχωρισμού εμπύρηνων κυττάρων με τη μέθοδο διαβάθμισης συγκέντρωσης όπως περιγράφηκε προηγουμένως.
3. Στο τελικό εναιώρημα που προκύπτει μετά την τελευταία φυγοκέντρηση, προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση των κυττάρων με πλάκα Neubauer και αξιολογούμε τη βιωσιμότητα των

κυττάρων του δείγματος με χρώση με κυανού του τρυπανίου. Προσαρμόζουμε τη συγκέντρωση σε 1×10^7 /mL.

4. Μεταφέρουμε 100 μ L κυττάρων σε ένα σωληνάριο FACS tube.
5. Προσθέτουμε κατάλληλο όγκο μονοκλωνικών αντισωμάτων για επιφανειακούς δείκτες και επωάζουμε για 30' στο σκοτάδι.
6. Ξεπλένουμε με 2 mL FACS washing buffer, φυγοκεντρώντας στα 250g για 5' και προσθέτουμε 5 μ L 7-AAD.
7. Προσθέτουμε 400 μ L FACS washing buffer.
8. Αναλύουμε στον κυτταρομετρητή ροής.

2.8. Ανάλυση δεδομένων κυτταρομετρίας ροής

Τα σήματα που προσλαμβάνονται από το οπτικό σύστημα του κυτταρομετρητή ροής ψηφιοποιούνται με τη βοήθεια ολοκληρωμένων κυκλωμάτων. Η ένταση (αριθμός) των προσλαμβανόμενων φωτονίων μετατρέπεται σε ηλεκτρόνια, στη συνέχεια σε ηλεκτρικούς παλμούς και τελικώς, με την ψηφιοποίηση του αναλογικού σήματος, σε μία ψηφιακή τιμή που αντικατοπτρίζει την ένταση του αρχικού σήματος. Με τη βοήθεια του λογισμικού μπορεί να γίνει εύκολος ο χειρισμός μεγάλης πληροφορίας, καθότι για κάθε κύτταρο που διέρχεται από το σημείο εξέτασης είναι διαθέσιμες όλες οι τιμές έντασης κάθε φθορίζουσας χρωστικής. Η απεικόνιση των δεδομένων κυτταρομετρίας γίνεται σε σύστημα καρτεσιανών αξόνων, όπου οι συντεταγμένες του κάθε σημείου/κυττάρου αντιστοιχούν στην ένταση φθορισμού. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης οι πληθυσμοί σημείων/κυττάρων περιχαρακώνονται και εξετάζονται για την έκφραση περισσότερων δεικτών. Η κάθε ανάλυση που πραγματοποιείται ακολουθεί συγκεκριμένη στρατηγική, η οποία είναι μοναδική για κάθε πρωτόκολλο και αποτυπώνεται στη συνέχεια ξεχωριστά.

2.8.1. Στρατηγική ανάλυσης βιωσιμότητας μυελωματικών κυττάρων

Δομή πρωτοκόλλου

Όπως αναφέρθηκε στην **Παράγραφο 2.5.2**, η Αννεξίνη-V είναι ένας ευαίσθητος δείκτης για την σήμανση των αποπτωτικών κυττάρων και το PI χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Στη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής υπάρχει η δυνατότητα συνδυασμού των

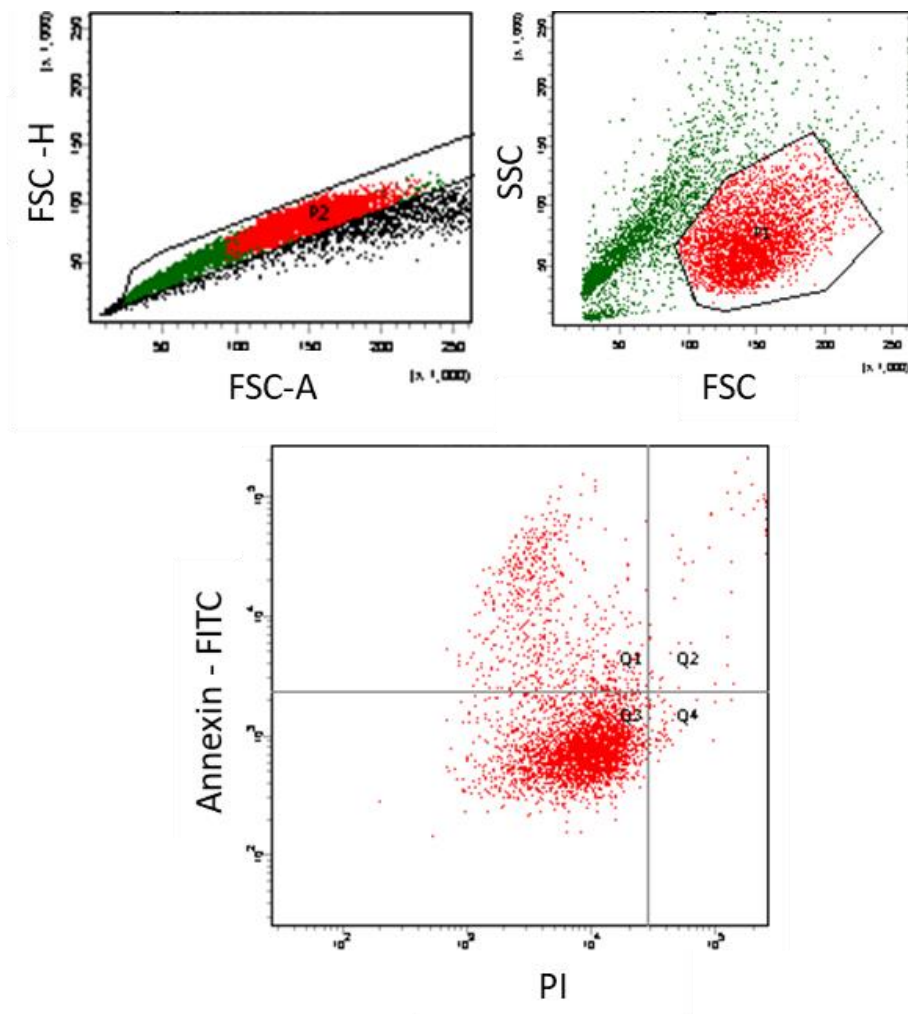
δύο αυτών δεικτών και η συνέκφραση τους χαρακτηρίζει τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα. Συνεπώς οι κυτταρικοί πληθυσμοί διακρίνονται σε:

	<i>Αννεξίνη-V αρνητικοί (-)</i>	<i>Αννεξίνη-V θετικοί (+)</i>
<i>PI θετικοί (+)</i>	Νεκρωτικά κύτταρα	Όψιμα αποπτωτικά κύτταρα
<i>PI αρνητικοί (-)</i>	Ζωντανά κύτταρα	Προ-αποπτωτικά (ή πρώιμα αποπτωτικά) κύτταρα

Στρατηγική ανάλυσης

Ακολουθεί ανάλυση των στικτογραμμάτων που προκύπτουν με το λογισμικό BD FACSDiva, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.5**.

- Η επιλογή των κυτταρικών πληθυσμών ενδιαφέροντος γίνεται με περιχαράκωση (gating) μέσω του λογισμικού. Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να απομονώσουμε για περαιτέρω ανάλυση μόνο τους επιλεγμένους υποπληθυσμούς
- Η αρχική επιλογή αφορά τον αποκλεισμό των πολλαπλών συγκολλημένων κυττάρων (κυρίως διπλετών, doublets) με τη χρήση του πρόσθιου (FSC) σκεδασμού
- Στη συνέχεια με χρήση διαγράμματος FSC/SSC επιλέγουμε τα εμπύρνηνα κύτταρα (πχ λευκά αιμοσφαίρια), αποκλείοντας κυτταρικά θραύσματα, θόρυβο και μικροσωματίδια
- Αφού έχουμε επιλέξει τα κύτταρα ενδιαφέροντος, τα αναλύουμε σε διάγραμμα Αννεξίνης-V/PI, περιχαράκωνουμε σε τεταρτημόρια και υπολογίζουμε το ποσοστό των κυττάρων κάθε τεταρτημόριου προς τον αρχικό αριθμό εμπύρνηνων κυττάρων



Εικόνα 2.5. Στρατηγική περιχαράκωσης κυττάρων για ανάλυση μετά από χρώση Αννεξίνης-V/PI με κυτταρομετρία ροής. Στα επάνω διαγράμματα γίνεται η επιλογή των εμπύρηνων κυττάρων ενώ στο κάτω μέρος η ανάλυση των δεικτών. Στο τεταρτημόριο Q1 εντοπίζονται τα προ-αποπτωτικά κύτταρα, στο Q2 τα όψιμα αποπτωτικά, στο Q3 τα ζωντανά και στο Q4 τα νεκρωτικά.

2.8.2. Στρατηγική ανάλυσης ανοσολογικού προφίλ λεμφοκυττάρων

Δομή πρωτοκόλλου

Η ανάλυση αυτή αποσκοπεί στον εντοπισμό υποπληθυσμών οι οποίοι διαδραματίζουν διαφορετικούς ανοσολογικούς ρόλους στο ΠΜ. Η επιλογή επιφανειακών και ενδοκυττάρων δεικτών έγινε με στόχο την καλύτερη δυνατή εκμετάλλευση των 8 διαθέσιμων καναλιών φθορισμού του κυτταρομετρητή ροής προς την αξιόπιστη ανάδειξη του μεγαλύτερου δυνατού αριθμού υποπληθυσμών. Το πάνελ των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάστηκε προηγουμένως (Πίνακας 2.1) ενώ στον Πίνακα 2.3 που ακολουθεί συνοψίζονται οι βασικοί

υποπληθυσμοί που ανιχνεύονται με τα πάνελ αυτά καθώς και ο ανοσοφαινότυπος διάκρισης του κάθε ενός. Επιπλέον, από την ανοσοφαινοτυπική ανάλυση στο πλαίσιο του πρωτοκόλλου EuroFlow, μετρούνται οι σχετικές συχνότητες των εξής υποπληθυσμών:

- Β και Τ λεμφοκύτταρα μνήμης (CD27+)
- Παρθένα Β λεμφοκύτταρα (CD2-)
- Προγονικά Β λεμφοκύτταρα (CD10+)
- ΝΚ/ΝΚΤ κύτταρα
- Ερυθροβλάστες
- Μακροφάγα σχετιζόμενα με τον όγκο (Tumor associated macrophages, TAMs)
- Ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα και βασεόφιλα
- Μακροκύτταρα

Πίνακας 2.3. Εντοπιζόμενοι υποπληθυσμοί στο πρωτόκολλο του ανοσολογικού προφίλ λεμφοκυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

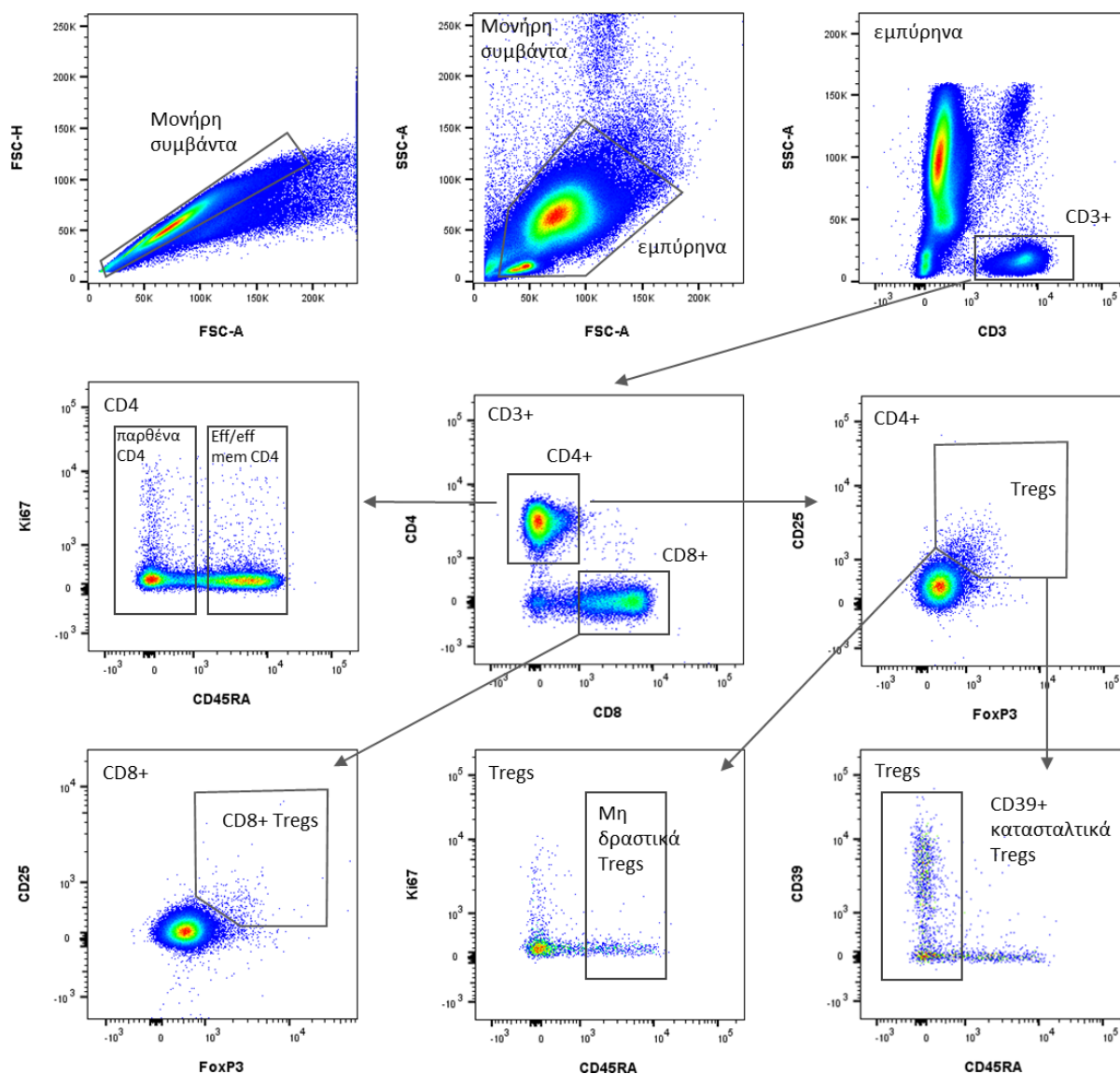
Όνομασία	Έκφραση δεικτών
Ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα (T regulatory cells, Tregs)	CD3+CD4+CD25+CD127 ^{low} FoxP3+
Δραστικά/δραστικά-μνήμης ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα (Effector/effector memory Tregs, eff/eff mem Tregs)	CD3+CD4+CD25+CD127 ^{low} FoxP3+CD45RA-CD45RO+HLA-DR-CTLA4+
Τελικά δραστικά ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα (Terminal effector Tregs, teff Tregs)	CD3+CD4+CD25+CD127 ^{low} FoxP3+CD45RA-CD45RO+HLA-DR+ CTLA4+
Μη δραστικά ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα (Resting Tregs)	CD3+CD4+CD25+CD127 ^{low} FoxP3+CD45RA-CD45RO+HLA-DR-CTLA4-
CD39+ κατασταλτικά ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα (CD39+ suppressor Tregs, CD39+ Tregs)	CD3+CD4+CD25+CD127 ^{low} FoxP3+CD45RA-CD45RO+CD39+
CD4+ Τ λεμφοκύτταρα (CD4+ T cells)	CD3+CD4+
Παρθένα CD4+ Τ λεμφοκύτταρα (Naïve CD4+ T cells)	CD3+CD4+CD45RA+CD45RO-
Δραστικά/δραστικά-μνήμης CD4+ Τ λεμφοκύτταρα (Effector/Effector memory CD4+T cells)	CD3+CD4+CD45RA-CD45RO+
CD8+ Τ λεμφοκύτταρα	CD3+CD8+

Ρυθμιστικά CD8+ T λεμφοκύτταρα (CD8+ Tregs)	CD3+CD8+CD25+FoxP3+
CD8+ T λεμφοκύτταρα μνήμης (Memory CD8+ T cells)	CD3+CD8+CD45RO+
HLA-DR ρυθμιστικά CD8+ λεμφοκύτταρα (HLA-DR regulatory CD8+ T cells, HLA-DR reg CD8+)	CD3+CD8+HLA-DR+
Χαρακτηρισμός υποπληθυσμού ως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (πολ)	Ki67+

Στρατηγική ανάλυσης

Η ανάλυση του ανοσολογικού προφίλ πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Flowjo (Flowjo, USA) που επιτρέπει μία ενοποιημένη και γρήγορη ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων. Η στρατηγική ανάλυσης που ακολουθήθηκε με βάση το πάνελ 1 (**Πίνακας 2.1**) παρουσιάζεται στα σικτογράμματα της **Εικόνας 2.6**. Συγκεκριμένα τα βήματα που ακολουθήθηκαν μπορούν να περιγραφούν ως εξής:

- Αρχικά επιλέγουμε τα εμπύρνηνα κύτταρα όπως και προηγουμένως αφαιρώντας από την ανάλυση κυτταρικά θραύσματα και διπλέττες κυττάρων
- Χρησιμοποιώντας την έκφραση του CD3 ,επιλέγουμε τα T λεμφοκύτταρα και τα χωρίζουμε σε CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα
- Στο βασικό διάγραμμα διαλογής των Tregs, απεικονίζουμε όλα τα CD4+ T λεμφοκύτταρα και επιλέγουμε τα διπλά θετικά για τους δείκτες FoxP3 και CD25
- Με χρήση του CD45RA διαχωρίζουμε τα παρθένα CD4+ από τα δραστικά/δραστικά-μνήμης CD4+ T λεμφοκύτταρα, όπως και τα μη δραστικά Tregs
- Με τη χρήση του δείκτη CD39 μπορούμε να διαχωρίσουμε τα κατασταλτικά Tregs
- Με το δείκτη Ki67 μπορούμε να εκτιμήσουμε το πολλαπλασιαστικό δυναμικό οποιουδήποτε πληθυσμού

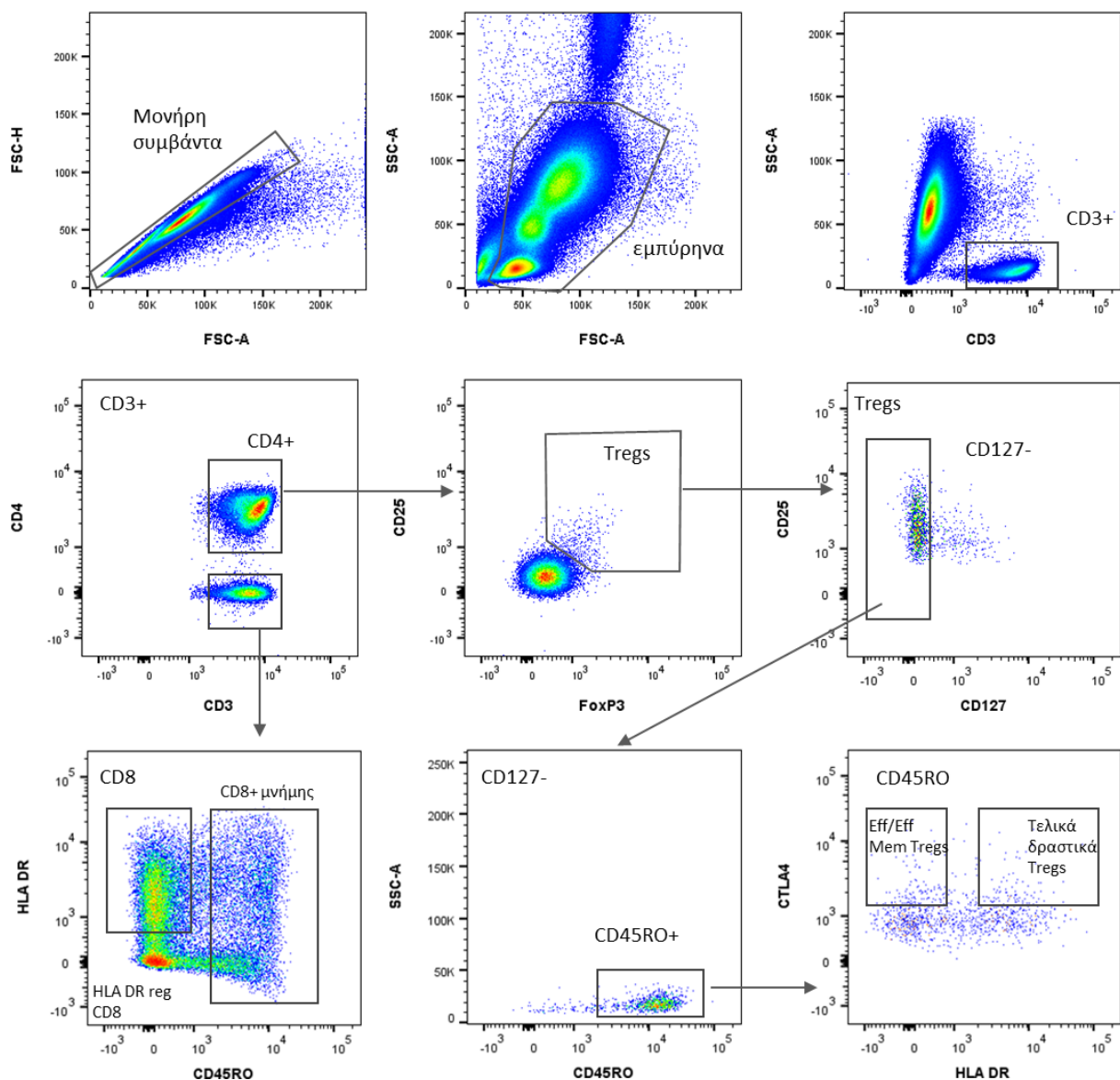


Εικόνα 2.6. Στρατηγική ανάλυσης του πάνελ 1 (Πίνακας 2.3) του ανοσολογικού προφίλ λεμφοκυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

Η στρατηγική ανάλυσης που ακολουθήθηκε με βάση το πάνελ 2 (Πίνακας 2.1) παρουσιάζεται στα στικτογράμματα της **Εικόνας 2.7**. Συγκεκριμένα τα βήματα που ακολουθήθηκαν μπορούν να περιγραφούν ως εξής:

- Αρχικά επιλέγουμε τα εμπύρνη κύτταρα όπως και προηγουμένως
- Χρησιμοποιώντας την έκφραση του CD3 επιλέγουμε τα T λεμφοκύτταρα και τα χωρίζουμε σε CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα

- Στο βασικό διάγραμμα διαλογής των Tregs, απεικονίζουμε όλα τα CD4+ T λεμφοκύτταρα και επιλέγουμε τα διπλά θετικά για τους δείκτες FoxP3 και CD25
- Επιπλέον δείκτης επιλογής των Tregs σε αυτό το πάνελ, είναι το CD127 (CD127^{low})
- Με το συνδυασμό CD45RO/HLA-DR μπορούμε να διαχωρίσουμε τα HLA-DR ρυθμιστικά και τα CD8+ λεμφοκύτταρα μνήμης
- Με το συνδυασμό CTLA-4/HLA-DR μπορούμε να διαχωρίσουμε τα δραστικά/δραστικά-μνήμης και τα τελικά δραστικά Tregs.



Εικόνα 2.7. Στρατηγική ανάλυσης του πάνελ 2 (Πίνακας 2.3) του ανοσολογικού προφίλ λεμφοκυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

2.8.3. Στρατηγική ανάλυσης κατασταλατικών κυττάρων μυελογενούς προέλευσης

Δομή πρωτοκόλλου

Σε αυτό το πρωτόκολλο επιχειρήθηκε ο εντοπισμός των MDSCs, τα οποία εντοπίζονται σε μικρό αριθμό τόσο στο ΜΟ όσο και στο ΠΑ. Βασικό πρόβλημα για τον εντοπισμό και την ανάλυση τους αποτελεί η κοινή ανοσοφαινοτυπική έκφραση μορίων με τα πολυμορφοπύρρηνα και τα μονοκύτταρα. Γι' αυτό, βασικό μέρος της παρασκευαστικής διαδικασίας αποτελεί η φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση συγκέντρωσης, κατά την οποία τα πολυμορφοπύρρηνα απομακρύνονται από την στοιβάδα των υπόλοιπων λευκών αιμοσφαιρίων. Εάν αυτό το στάδιο δεν είναι επιτυχές τότε στην ανάλυση εμπεριέχονται και πολυμορφοπύρρηνα, και συνεπώς, ο μετρούμενος αριθμός των MDSCs είναι ψευδώς υψηλός.

Για το σχεδιασμό του πάνελ επιλέχθηκε και ο δείκτης 7-αμινο-ακτινο-μυκίνη D (7AAD), καθότι στη στρατηγική ανάλυσης μπορεί να συμπεριληφθούν αποπτωτικά-νεκρά κύτταρα που δίνουν μη-ειδικό σήμα φθορισμού. Οι δείκτες CD14, CD15, CD11b επιλέχθηκαν για τον εντοπισμό των PMN-MDSCs. Για τον εντοπισμό των μονοκυτταρικών MDSCs επιλέχθηκαν το CD14 και το HLA-DR, η χαμηλή έκφραση του οποίου είναι χαρακτηριστική των M-MDSCs. Τα άωρα MSDCs χαρακτηρίζονται από την υψηλή έκφραση του CD33. Για την αποφυγή συνεκτίμησης άωρων λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων που εκφράζουν επίσης το CD33, χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός των CD3, CD14, CD15, CD19, CD56 συνδεδεμένων με το ίδιο φθοριόχρωμα. Τέλος, με την συνεκτίμηση του CD124 επιχειρήσαμε το διαχωρισμό των μονοκυττάρων που εντοπίζονται με βάση το δείκτη CD14 σε M1 και M2 μονοκύτταρα. Οι διάφοροι επιμέρους πληθυσμοί που εντοπίστηκαν με το πρωτόκολλο αυτό και ο ανοσοφαινότυπος διάκρισής τους συνοψίζονται στον **Πίνακα 2.4**.

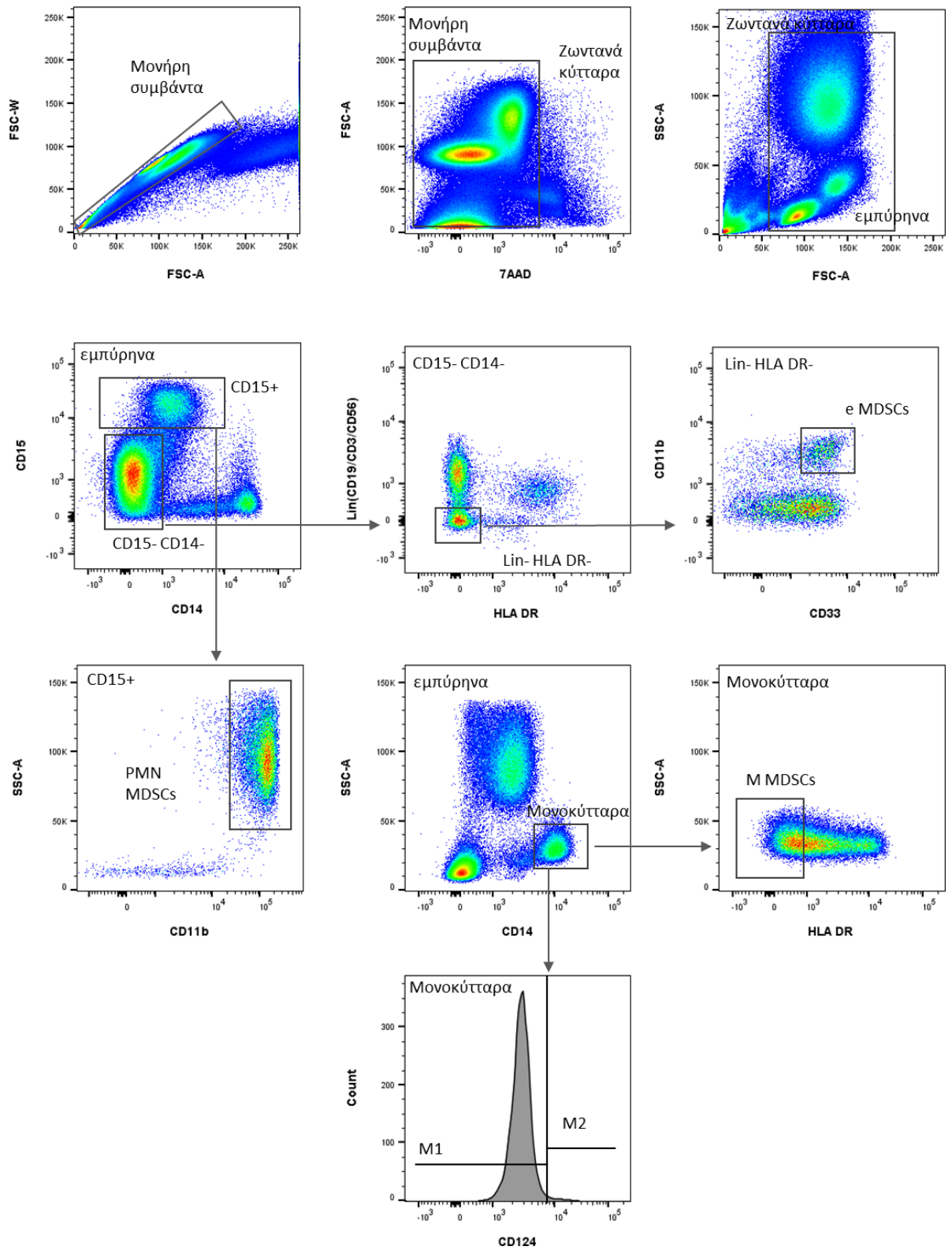
Πίνακας 2.4. Εντοπιζόμενοι υποπληθυσμοί στο πρωτόκολλο ανάλυσης των κατασταλατικών κυττάρων μυελογενούς προέλευσης (MDSCs) με κυτταρομετρία ροής.

Όνομασία	Έκφραση δεικτών
Κατασταλατικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης (Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells, PMN-MDSCs)	CD14-CD11b+CD15+SSC ^{high}
Άωρα κατασταλατικά κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης (Early myeloid-derived suppressor cells, eMDSCs)	Lin (CD3/CD14/CD15/CD19/CD56)-HLA-DR-CD33+

Μονοκυτταρικά κατασταλτικά κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης (Monocytic myeloid-derived suppressor cells, M-MDSCs)	CD11b-CD14+HLA-DR ^{low/-} CD15-
M1 μονοκύτταρα	Lin (CD3/CD14/CD15/CD19/CD56)-CD14+CD124-
M2 μονοκύτταρα	Lin (CD3/CD14/CD15/CD19/CD56)-CD14+CD124+

Στρατηγική ανάλυσης

- Αρχικά όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2.8**, επιλέγουμε τα ζωντανά κύτταρα με το 7AAD και στη συνέχεια ξεχωρίζουμε τα εμπύρνα κύτταρα με τη χρήση του πρόσθιου και του πλάγιου σκεδασμού
- Κεντρικό διάγραμμα αποτελεί το CD15/CD14. Από τον CD15+ πληθυσμό γίνεται η αρχική επιλογή για τη διερεύνηση των PMN-MDSCs και από τον CD14-/CD15- η αρχική επιλογή για τον εντοπισμό των eMDSCs
- Η εύρεση των PMN-MDSCs, εφόσον έχει γίνει σωστά η φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση συγκέντρωσης, βασίζεται στην υψηλή έκφραση του CD11b σε συνδυασμό με ένα σχετικά μέτριο σήμα πλάγιας σκέδασης. Ο εντοπισμός των eMDSCs βασίζεται στην αρνητική έκφραση των CD19, CD3, CD56/HLA-DR και στη θετική έκφραση των CD11b και CD33
- Τα μονοκύτταρα συνολικά μπορούν αρκετά εύκολα να εντοπισθούν με το διάγραμμα SSC/CD14 καθότι έχουν χαρακτηριστικό σήμα πλάγιου σκεδασμού μεταξύ των λεμφοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων, ενώ εκφράζουν το CD14 εντονότερα από όλους τους υπόλοιπους υποπληθυσμούς
- Η ανάλυση των μονοκυττάρων συνεχίζεται με το δείκτη CD124, με τον οποίο διαχωρίζονται τα M1/M2 μονοκύτταρα.



Εικόνα 2.8. Στρατηγική ανάλυσης του πρωτοκόλλου ανάλυσης των κατασταλτικών κυττάρων μυελογενούς προέλευσης (MDSCs) με κυτταρομετρία ροής.

2.9. Κυτταρογενετική ανάλυση

Η κυτταρογενετική ανάλυση διεξήχθη σε συνεργαζόμενο εργαστήριο της Θεραπευτικής Κλινικής. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι ο μεσοφασικός *in situ* υβριδισμός με φθορίζοντες ιχνηθέτες (i-FISH). Το πάνελ ιχνηθετών περιλάμβανε έλεγχο για:

- Αμοιβαία χρωμοσωμική μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 4 και 14, t(4;14)
- Αμοιβαία χρωμοσωμική μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 11 και 14, t(11;14)
- Αμοιβαία χρωμοσωμική μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 14 και 16, t(14;16)
- Έλλειψη del(13q)/μονοσωμία 13
- Έλλειψη del(17p13)
- Προσθήκη add(1q21)

Οι ασθενείς με τουλάχιστον ένα κυτταρογενετικό εύρημα μεταξύ των t(4;14), t(14;16) και del(17p13) ομαδοποιήθηκαν ως προγνωστική ομάδα υψηλού κινδύνου (high-risk, HR), ενώ η απουσία τους, τους κατέταξε στην ομάδα χαμηλού κινδύνου (low-risk, LR).

2.10. Στατιστική ανάλυση

Για τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, USA) καθώς και το SPSS 22.0 (IBM Statistical Package for Social Sciences v.20, USA) σε λογισμικό Windows 10 (Microsoft, USA). Για τις ποσοτικές μεταβλητές υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές, οι διάμεσες τιμές, οι μέγιστες και ελάχιστες τιμές και οι τιμές τυπικής απόκλισης. Στην περίπτωση μονοπαραμετρικής ανάλυσης πραγματοποιήσαμε το Fisher's exact test για κατηγορικές μεταβλητές, ενώ στις ποσοτικές μεταβλητές προχωρήσαμε σε παραμετρικό (t-test/one way ANOVA) ή μη παραμετρικό έλεγχο (Mann Whitney/Kruskal Wallis). Για τον έλεγχο κατανομής εφαρμόστηκε έλεγχος κανονικότητας (Kolmogorov-Smirnov test) και με βάση τα αποτελέσματα του, επιλέχθηκε παραμετρική ή μη παραμετρική δοκιμασία. Στη σύγκριση διαφορών μεταξύ ΠΑ και ΜΟ χρησιμοποιήθηκε μη παραμετρική δοκιμασία (Friedman non-parametric test). Για την εκτίμηση πιθανότητας θετικής EYN χρησιμοποιήσαμε πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση, ενώ η ανάλυση κύριων συνιστωσών (principal component analysis, PCA) διεξήχθη με το Clustvis, ένα διαδικτυακό εργαλείο για την οπτικοποίηση ομαδοποίησης πολυπαραγοντικών δεδομένων (Metsalu and Vilo, 2015). Η τιμή $p < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνήθηκε το μικροπεριβάλλον του ΜΟ στο ΠΜ, τόσο *ex vivo*, όσο και *in vitro*. Μελετήθηκε η ανάπτυξη 3D *ex vivo* μοντέλου προσομοίωσης του ΜΟ στο ΠΜ με τη χρήση ικριωμάτων και παράλληλα, αναλύθηκε ανοσοφαινοτυπικά το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον. Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση με κυτταρομετρία ροής διεξήχθη σε δείγματα ΜΟ, κάνοντας σύγκριση με το ΠΑ σε ασθενείς με ΠΜ κατά την εξέλιξη της νόσου, εντοπίζοντας πληθυσμούς με ιδιαίτερη προγνωστική και προβλεπτική αξία.

3.1. Ανάπτυξη *ex vivo* μοντέλου στο πολλαπλούν μυέλωμα

3.1.1 Μελέτη ανάπτυξης ανθρώπινων μυελωματικών κυτταρικών σειρών

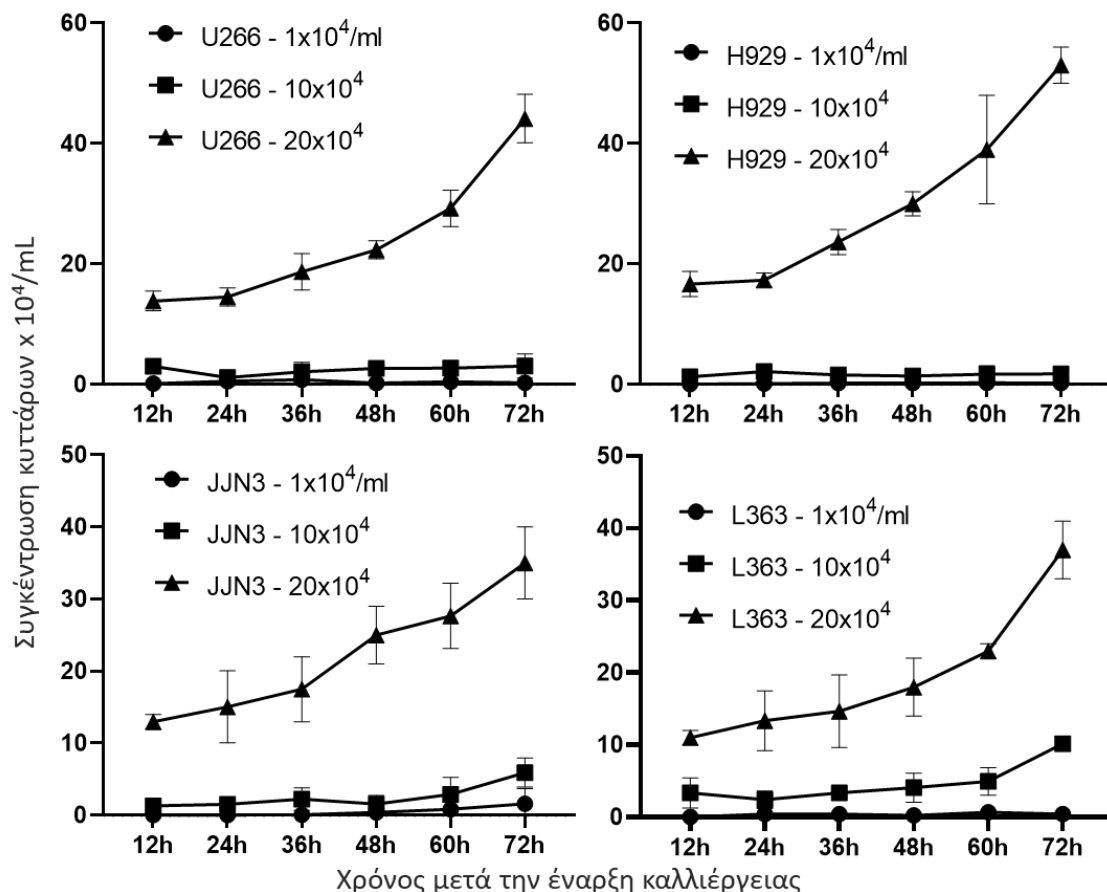
Για κάθε μυελωματική κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε προσδιορίστηκαν ο ανοσοφαινότυπος με βάση τους κύριους δείκτες φαινοτύπησης στο ΠΜ οι οποίοι υπήρχαν διαθέσιμοι από το πρωτόκολλο ανάλυσης του EuroFlow (**Παράγραφος 2.7.2**). Ο φαινότυπος των κυτταρικών σειρών παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.1**.

*Πίνακας 3.1. Ανοσοφαινότυπος των ανθρώπινων μυελωματικών κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη του *ex vivo* μοντέλου.*

Κυτταρική σειρά	Ανοσοφαινότυπος
H929	CD19- CD45- CD117- CD81- CD27dim CD38+ CD138+ CD56+ Kappa
L363	CD19- CD45- CD117dim/- CD81dim/- CD27dim CD38+ CD138+ CD56+/- Lambda
JJN3	CD19- CD45- CD117+ CD81- CD27dim CD38+ CD138+ CD56- Kappa
U266B1 (U266)	CD19- CD45+ CD117- CD81- CD27dim CD38+ CD138+ CD56- Lambda

Στη συνέχεια αναζητήθηκε το σημείο έναρξης της εκθετικής φάσης της καλλιέργειας των μυελωματικών κυτταρικών σειρών σε μικροπλάκες, ώστε να μπορεί να γίνει προγραμματισμός των επόμενων πειραμάτων όπου θα χρησιμοποιηθούν. Για το σκοπό αυτό, οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε μικροπλάκα 96 φρεατίων ξεκινώντας από διαφορετική αρχική συγκέντρωση κυττάρων (1, 10 και 20 x 10⁴ κύτταρα/mL) για 72 h. Κάθε 12 h πραγματοποιήθηκε μέτρηση της

συγκέντρωσης των ζωντανών κυττάρων με χρήση κυανού του τρυπανίου και αιμοκυτταρομέτρου Neubauer. Μέχρι τις 36 ώρες ο ρυθμός ανάπτυξης όλων των κυτταρικών σειρών παρέμεινε μικρότερος του 10% και η εκθετική φάση ξεκίνησε στις 48 ώρες, μόνο για την αρχική συγκέντρωση των $20 \times 10^4/\text{mL}$. Στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις, η πυκνότητα των κυττάρων φάνηκε ότι ήταν πολύ μικρή ώστε η καλλιέργεια να εισέλθει στην εκθετική φάση. Επομένως, η ιδανική αρχική συγκέντρωση για όλες τις κυτταρικές σειρές θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 20×10^4 κύτταρα/mL, όπου διατηρούν και τη βέλτιστη βιωσιμότητα (Εικόνα 3.1) σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Συγκριτικά, οι σειρές οι οποίες ανέπτυξαν τον μεγαλύτερο αριθμό ζωντανών κυττάρων μετά από 72 ώρες ήταν η H929 και η U266 (H929: $53,0 \times 10^4/\text{mL}$ και U266: $44,5 \times 10^4/\text{mL}$, έναντι των L363: $37,0 \times 10^4/\text{mL}$ και JN3 $35,0 \times 10^4/\text{mL}$).



Εικόνα 3.1. Καταγραφή ανάπτυξης των μυελωματικών κυτταρικών σειρών H929, L363, JN3 και U266 σε μικροπλάκες 96 φρεατίων για 72 ώρες σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης έγινε μετά από χρώση με κυανού του τρυπανίου και μέτρηση σε πλάκα Neubauer. Οι μέσες τιμές ± την τυπική απόκλιση υπολογίστηκαν από 3 διαφορετικά πειράματα.

Το τελευταίο πειραματικό τμήμα μελέτης των μυελωματικών κυτταρικών σειρών είναι η *in vitro* δοκιμασία κυτταροτοξικότητας προς προσδιορισμό των συγκεντρώσεων αναστολής έναντι των θεραπευτικών παραγόντων. Επομένως, στη συνέχεια των πειραμάτων, καθορίσαμε τις τιμές IC50, IC30 και IC80 για τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα δοξορουβικίνη και βορτεζομίμπη στις τέσσερις κυτταρικές σειρές μυελώματος H929, L363, JN3 και U266. Οι τιμές IC30, IC50 και IC80 είναι οι συγκεντρώσεις που προκαλούν θανάτωση του 30%, 50% και 80% των κυττάρων, αντίστοιχα. Για κάθε παράγοντα ελέχθησαν 10 διαδοχικές συγκεντρώσεις από 0,01 μM έως 10.000 μM , με 3 επαναλήψεις σε κάθε συγκέντρωση και η επίδραση διήρκησε 72 ώρες. Κάθε έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε φρεάτια μικροπλάκας 96 θέσεων που περιείχαν 5×10^4 κύτταρα και τελικό όγκο αντίδρασης 200 μL . Η βιωσιμότητα εκτιμήθηκε με χρήση της μεθόδου MTT και τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι οι μέσοι όροι των τιμών IC50, IC30 και IC80 από τα επαναληπτικά πειράματα. Συγκεκριμένα, για τη δοξορουβικίνη, η μέση τιμή IC50 για τις κυτταρικές σειρές H929, L363, JN3 και U266 προσδιορίστηκε σε 23,4, 20,1, 82,2 και 58,5 nM, αντίστοιχα. Για τη βορτεζομίμπη, η μέση τιμή για τις ίδιες κυτταρικές σειρές βρέθηκε να είναι 4,2, 8,4, 6,4 και 12,5 nM, αντίστοιχα. Στον **Πίνακα 3.2**, αναφέρονται επιπλέον οι τιμές IC30 και IC80 που χρησιμοποιήθηκαν ως αναφορά στα επόμενα πειράματα.

Βασιζόμενοι στο προφίλ ανθεκτικότητας των κυτταρικών σειρών, για τη δοκιμή δοξορουβικίνης επιλέχθηκε η σειρά U266, καθότι εμφάνισε ενδιάμεση ανθεκτικότητα ενώ έχει αρκετά εύκολο χειρισμό στο εργαστήριο. Επιπλέον, η σειρά U266 όντας CD117- (υποδοχέας τυροσινικής κινάσης) και CD45+ (ο πολλαπλασιασμός της είναι ανεξάρτητος του σηματοδοτικού μονοπατιού Akt), δεν σχετίζεται με στοχευμένες θεραπείες (Harvey and Lonial, 2007; Chen et al., 2018). Για το λόγο αυτό η σειρά U266 δοκιμάσθηκε απέναντι στη μη ειδική/στοχευμένη κυτταροτοξικότητα της δοξορουβικίνης, η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων στη διπλή έλικα του DNA. Επίσης, για τη δοκιμή της βορτεζομίμπης (αναστολέας πρωτεασώματος) επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά με τη μεγαλύτερη ευαισθησία, δηλαδή η H929, με σκοπό την αναζήτηση της προστατευτικής δράσης του μικροπεριβάλλοντος του MO στην πιο ευαίσθητη μυελωματική κυτταρική σειρά, έναντι της μεγαλύτερης δόσης του παράγοντα.

Πίνακας 3.2. Οι τιμές ημίσειας αναστολής IC50, IC30 και IC80 για τη βορτεζομίμη και τη δοξορουβικίνη στις τέσσερις μυελωματικές κυτταρικές σειρές H929, L363, JLN3 και U266.

Κυτταρική Σειρά	H929	L363	JLN3	U266
Βορτεζομίμη IC50 (nM)	4,2 ± 0,9*	8,4 ± 1,3	6,4 ± 0,8	12,5 ± 1,7
Βορτεζομίμη IC30 (nM)	2,9 ± 1,3	5,9 ± 1,7	4,5 ± 1,6	8,7 ± 2,1
Βορτεζομίμη IC80 (nM)	5,5 ± 2,1	10,9 ± 2,3	8,3 ± 2,0	16,3 ± 3,4
Δοξορουβικίνη IC50 (nM)	23,5 ± 2,6	20,0 ± 1,7	82,2 ± 10,5	58,5 ± 3,5
Δοξορουβικίνη IC30 (nM)	16,5 ± 3,1	14,0 ± 1,9	57,5 ± 12,4	40,9 ± 3,9
Δοξορουβικίνη IC80 (nM)	30,5 ± 4,2	26,0 ± 3,8	106,6 ± 18,0	76,1 ± 14,6

* μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD), όπως υπολογίστηκαν από 3 διαφορετικά πειράματα.

3.1.2. Αξιολόγηση αλγόριθμου ανάλυσης εικόνας για τη μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων της μυελωματικής κυτταρικής σειράς U266

Στην επόμενη σειρά πειραμάτων έγινε εκτίμηση των μεθόδων μέτρησης της βιωσιμότητας. Αρχικά επικεντρωθήκαμε στην ανάπτυξη αλγόριθμου ανάλυσης εικόνας μετά από χρώση με κυανού του τρυπανίου, σε εικόνες μικροσκοπίας με χρήση του λογισμικού ImageJ Fiji. Για τις ανάγκες του πειράματος σε μικροπλάκες 96 φρεατίων τοποθετήθηκαν κύτταρα U266 (5×10^4) σε δέκα διαβαθμίσεις συγκέντρωσης δοξορουβικίνης από 0,01 μM έως 10.000 μM και τα κύτταρα επώασθησαν για 72 ώρες. Ως μέθοδος αναφοράς επιλέχθηκε η καταμέτρηση των κυττάρων των ίδιων εικόνων δια γυμνού οφθαλμού, όπου, αν και κοπιώδης, επιτρέπει την ακριβή μέτρηση των συνολικών και των χρωσμένων κυττάρων. Τα βασικά βήματα του αλγόριθμου στο λογισμικό ImageJ Fiji είναι τα εξής (Εικόνα 3.2):

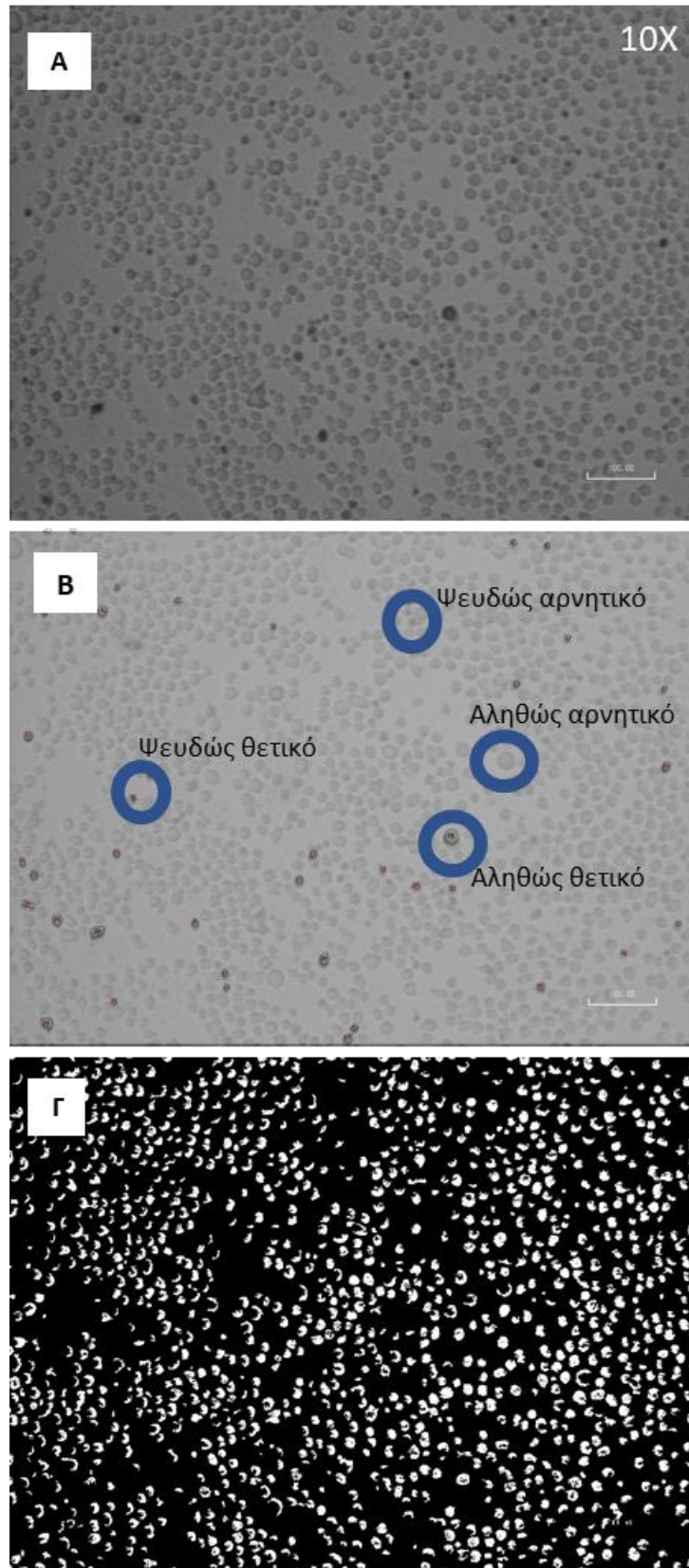
1. Επιλογή εικόνας με ομοιόμορφο χρωματισμό φόντου και με κύτταρα τα οποία δεν αλληλεπικαλύπτονται και δεν δημιουργούν συσσωματώματα.

2. Διαχωρισμός της έγχρωμης φωτογραφίας στις τρεις μονοχρωματικές συνιστώσες: κόκκινο, μπλε και πράσινο και επιλογή του κόκκινου καναλιού, στο οποίο διακρίνεται εντονότερα η χρωματική απόκλιση του κυανού του τρυπανίου στα κύτταρα που έχει γίνει η χρώση.
3. Εκτέλεση εντολής Color Thresholding προς εντοπισμό των σκοτεινών αντικειμένων.
4. Καταμέτρηση (Object count) των εντοπισμένων αντικειμένων, με κριτήριο τη σφαιρικότητα (sphericity>0,8) και το μέγεθος (ανάλογα με τα pixels του μέσου κυττάρου στη μεγέθυνση του μικροσκοπίου). Με αυτόν τον τρόπο αποτρέπεται η καταμέτρηση θραυσμάτων και συσσωματωμάτων και καταμετρούνται τα νεκρά/αποπτωτικά κύτταρα.
5. Εντοπισμός και καταμέτρηση όλων των κυττάρων της εικόνας με την εντολή Find Maxima. Με την εντολή αυτή εντοπίζονται οι περιοχές μέγιστης φωτεινότητας στην εικόνα. Εάν η εικόνα περιέχει μόνο κύτταρα, τα όρια των κυτταροπλασματικών μεμβρανών των κυττάρων εντοπίζονται και καταμετρώνται.

Για τη σύγκριση της μεθόδου του προτεινόμενου αλγορίθμου με την οπτική μέθοδο δια γυμνού οφθαλμού καταμετρήθηκαν συνολικά 20.603 κύτταρα σε 23 οπτικά πεδία. Η καταμέτρηση των ψευδώς θετικών/ψευδώς αρνητικών και ψευδώς αρνητικών/αληθώς αρνητικών σημάτων, μας δίνει τα χαρακτηριστικά της μεθόδου αλγορίθμου ανάλυσης εικόνας, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3.3**. Τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας παρουσιάζονται στο επόμενο πείραμα.

Πίνακας 3.3. Η σύγκριση του αλγορίθμου αναγνώρισης εικόνας, με την οπτική μέτρηση στο ίδιο οπτικό πεδίο για ένα σύνολο 23 οπτικών πεδίων.

N=20.603	Ζωντανά	Νεκρά	
Αλγόριθμος: Ζωντανά N=13.320	Αληθώς Θετικά (ΑΘ) N=10.309	Ψευδώς Θετικά (ΨΘ) N=3.011	Ακρίβεια(AΘ+ΑΑ)/σύνολο = 82%
Αλγόριθμος: Νεκρά N=7.283	Ψευδώς Αρνητικά (ΨΑ) N=784	Αληθώς Αρνητικά (ΑΑ) N=6.499	Πιστότητα ΑΘ/(ΑΘ+ΨΘ) = 77%
Επαναληψιμότητα			
ΑΘ/(ΑΘ+ΨΑ) = 92%			

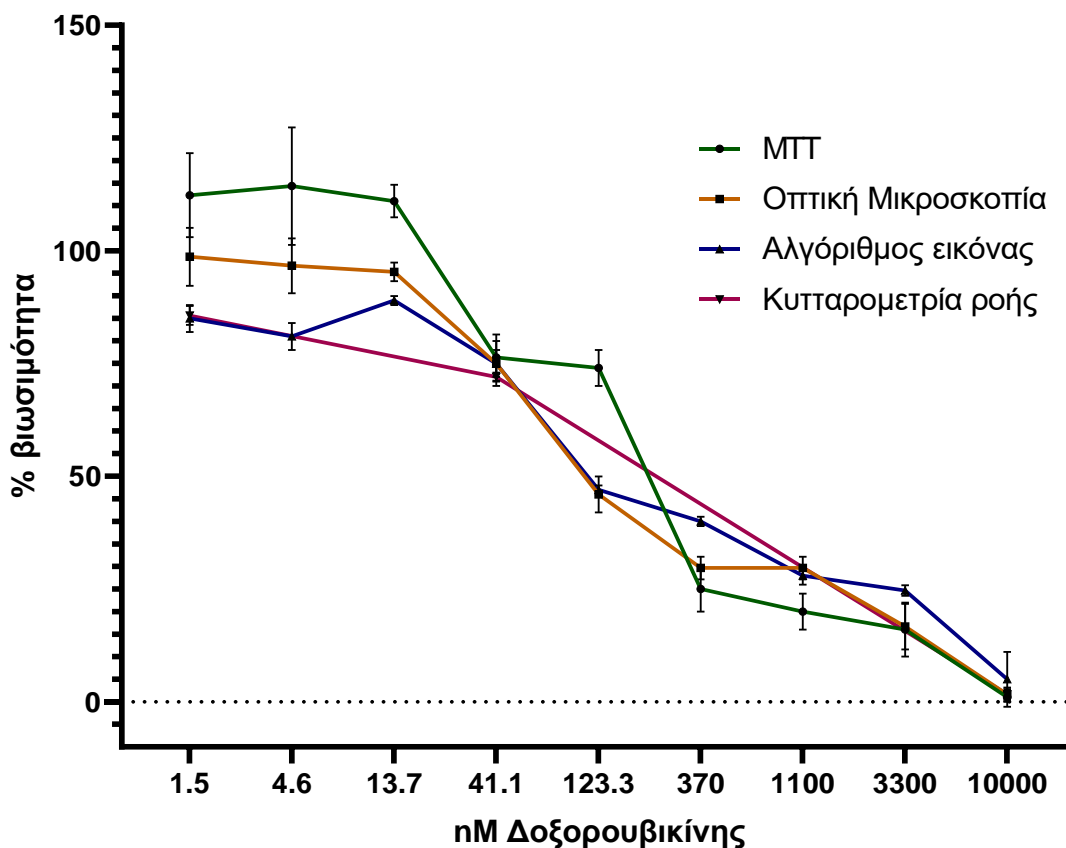


Εικόνα 3.2. Ο αλγόριθμος επεξεργασίας εικόνας επιτρέπει τη μέτρηση της βιωσιμότητας σε κύτταρα U266 στα οποία έχει γίνει χρώση των νεκρών κυττάρων με κυανούν του τρυπανίου. Από την αρχική έγχρωμη εικόνα της κάμερας του μικροσκοπίου επιλέγεται μονοχρωματική συνιστώσα (A) και στη

συνέχεια γίνεται ο εντοπισμός των χρωσμένων κυττάρων (B), με όλες τις πιθανότητες αληθών και ψευδών σημάτων τα οποία αξιολογούνται με τη μέτρηση δια γυμνού οφθαλμού. Στην εικόνα (Γ) γίνεται η καταμέτρηση όλων των κυττάρων της εικόνας. Καταμετρώντας τα νεκρά/συνολικά κύτταρα προκύπτει η βιωσιμότητα του δείγματος.

3.1.3 Σύγκριση μεθόδων μέτρησης της βιωσιμότητας σε δισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων U266: μέθοδος MTT, λογισμικό ανάλυσης εικόνας και κυτταρομετρία ροής

Στο επόμενο πείραμα πραγματοποιήθηκε σύγκριση των διαθέσιμων μεθόδων μέτρησης της βιωσιμότητας, με σκοπό την αξιοποίησή τους στο *ex vivo* μοντέλο. Το πείραμα διεξήχθη σε μικροπλάκες 96 φρεατίων με τις εξής μεθόδους: Α) MTT, Β) κυτταρομετρία ροής, Γ) χρώση με κυανού του τρυπανίου και μέτρηση με το οπτικό μικροσκόπιο, και Δ) χρώση με κυανού του τρυπανίου και μέτρηση με τη μέθοδο ανάλυσης εικόνας. Σε όλες τις μικροπλάκες τοποθετήθηκε ο ίδιος αριθμός κυττάρων (5×10^4) που εκτέθηκε σε δέκα διαβαθμίσεις συγκέντρωσης δοξορουβικίνης και τα κύτταρα επώασθηκαν για 72 ώρες. Η μετρούμενη βιωσιμότητα δεν παρουσίασε σημαντικές διαβαθμίσεις με τις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν ($H^2=0,2$, $p>0,05$). Επομένως, όλες οι μεθοδολογικές προσεγγίσεις επιτρέπουν τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας με αξιόπιστο τρόπο και μπορούν να αξιοποιηθούν ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3. Βιωσιμότητα των κυττάρων της κυτταρικής σειράς U266, υπό την επίδραση δοξορουβικίνης σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 72 h σε μικροπλάκες 96 φρεατίων. Η μέτρηση έγινε με τέσσερις διαφορετικές μεθόδους: μέθοδο ΜΤΤ, οπτική μέτρηση με μικροσκόπιο, με αλγόριθμο ανάλυσης εικόνας και με κυτταρομετρία ροής. Οι μέσες τιμές ± την τυπική απόκλιση υπολογίστηκαν από 3 διαφορετικά πειράματα.

3.1.4. Καταγραφή της ανάπτυξης της καλλιέργειας μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων μυελικής προέλευσης

Τα BM-MSCs διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην αλληλεπίδρασή τους με τα μυελωματικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του ΜΟ. Για το λόγο αυτό αλλά και εξαιτίας της σχετικής ευκολίας στο χειρισμό τους (Gneschi and Melo, 2009) επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν στο υπό ανάπτυξη ex vivo μοντέλο. Η απομόνωση και ανάπτυξη πρωτογενών μεσεγχυματικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε από δείγματα ΜΟ νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με ΠΜ. Όπως αναφέρθηκε στις μεθόδους (**Παράγραφος 2.2**), δοκιμάστηκαν 3 μέθοδοι απομόνωσης μεσεγχυματικών κυττάρων: Α) με διαβάθμιση συγκέντρωσης, Β) με χρήση λυτικού διαλύματος και Γ) με συνεχή ανανέωση θρεπτικού υλικού. Οι καλλιέργειες των BM-MSCs παρακολουθήθηκαν σε καθημερινή βάση με τη

βοήθεια ανάστροφου οπτικού μικροσκοπίου και ανά διαστήματα λαμβάνονταν φωτογραφίες για να εξεταστεί η πρόοδος της καλλιέργειας και η μορφολογία των κυττάρων. Κριτήριο για τη θετική έκβαση της απομόνωσης είναι η παρατήρηση προσκολλημένων κυττάρων στον πυθμένα της φλάσκας 5-7 μέρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας. Σε σύνολο 30 δειγμάτων, η επιτυχία της απομόνωσης με τη μέθοδο διαβάθμισης συγκέντρωσης ήταν στο 80% των δειγμάτων (12/15 δείγματα), με τη μέθοδο ημερήσιας ανανέωσης θρεπτικού υλικού ήταν 40% (4/10 δείγματα) και με τη μέθοδο χρήσης του λυτικού διαλύματος ήταν 20% (1/5 δείγματα), όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.4**.

Πίνακας 3.4. Έκβαση των δοκιμασιών απομόνωσης πρωτογενών ανθρώπινων μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων μυελικής προέλευσης από δείγματα μυελού των οστών, με τις 3 διαφορετικές μεθόδους απομόνωσης

Μέθοδος απομόνωσης	Δείγματα μυελού των οστών (n)	Ποσοστό επιτυχίας % (απόλυτος αριθμός/σύνολο)
Διαβάθμιση συγκέντρωσης	15	80% (12/15)
Ημερήσια ανανέωση θρεπτικού υλικού	10	40% (4/10)
Χρήση λυτικού διαλύματος	5	20% (1/5)

Η εξέλιξη της καλλιέργειας απομονωμένων BM-MSCs με τη μέθοδο διαβάθμισης συγκέντρωσης από την ημέρα 0 έως την ημέρα 27 απεικονίζεται στην **Εικόνα 3.4**. Αξίζει να αναφερθούν τα σημαντικότερα στάδια της ανάπτυξης της καλλιέργειας των BM-MSCs στην πορεία του χρόνου:

- Ημέρα 0: Τα κύτταρα βρίσκονται σε εναιώρημα με πιθανή παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων και δεν παρουσιάζουν κάποιο σαφές μορφολογικό χαρακτηριστικό.
- Ημέρα 4: Μερικά BM-MSCs έχουν προσκολληθεί και έχουν αποκτήσει ατρακτοειδή μορφολογία (spindle-shaped cells). Υπάρχει, επιπλέον, μεγάλος αριθμός κυττάρων τα οποία αιωρούνται. Ορισμένα από αυτά είναι BM-MSCs τα οποία θα προσκολληθούν τις προσεχείς ημέρες, ενώ τα υπόλοιπα ανήκουν σε άλλους πληθυσμούς αιωρούμενων κυττάρων τα οποία θα απομακρυνθούν σταδιακά με τις διαδοχικές πλύσεις της καλλιέργειας.

- Ημέρα 12: Παρατηρείται σταδιακή αύξηση στον αριθμό των προσκολλημένων κυττάρων με εμφάνιση κυττάρων ατρακτοειδούς μορφής. Επιπλέον τα κύτταρα καθώς διαιρούνται σχηματίζουν τις πρώτες νησίδες.
- Ημέρα 15: Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται ενώ παρατηρούνται νησίδες σε αρκετά σημεία της φλάσκας. Τα κύτταρα συστέλλονται κατά τη διαίρεση και στη συνέχεια λαμβάνουν και πάλι ατρακτοειδή μορφή.
- Ημέρα 18: Παράλληλα με τη συνεχή διαίρεση των BM-MSCs εμφανίζονται και προσκολλημένα κύτταρα με στρογγυλή μορφολογία, πιθανώς BM-MSCs τα οποία έχουν αρχίσει να διαφοροποιούνται.
- Ημέρα 20: Σε αρκετές φλάσκες παρατηρούνται πλέον νησίδες διακριτής μορφολογίας από αδιαφοροποίητα BM-MSCs, αλλά και από κύτταρα με στρογγυλή μορφολογία, πιθανώς διαφοροποιημένα BM-MSCs. Τα κύτταρα καταλαμβάνουν πλέον μεγάλο μέρος της επιφάνειας της φλάσκας.
- Ημέρα 27: Παρατηρείται αυξημένος αριθμός διαφοροποιημένων κυττάρων (με στρογγυλή μορφολογία), ενώ οι νησίδες των αδιαφοροποίητων BM-MSCs εξακολουθούν να είναι πυκνές αν και η πλευρική τους ανάπτυξη συντελείται με πιο αργό ρυθμό.

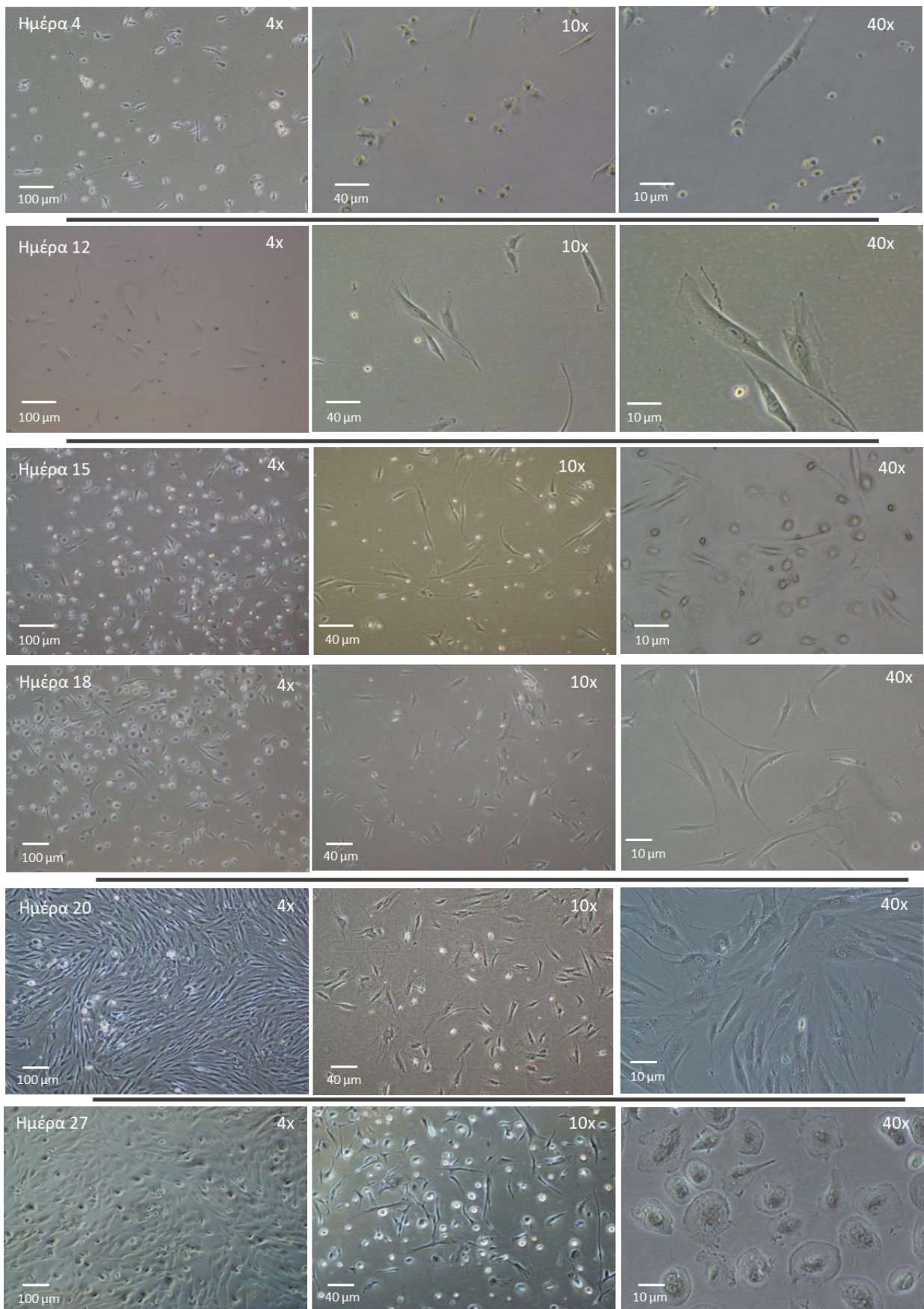
Με σκοπό την εύρεση του κατάλληλου χρονικού παραθύρου όπου τα BM-MSCs δύνανται να αξιοποιηθούν, η πορεία της καλλιέργειας αξιολογήθηκε με κριτήρια:

- Το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων που είναι εμφανές όταν σχηματίζονται νησίδες με νέα BM-MSCs σε κοντινή απόσταση
- Τη συνολική παρουσία περιοχών με BM-MSCs στην επιφάνεια της φλάσκας
- Την παρουσία διαφοροποιημένων κυττάρων τα οποία έχουν διαφορετική μορφολογία από τα BM-MSCs (συνήθως σφαιρικά).

Όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.5**, το πολλαπλασιαστικό δυναμικό και η παρουσία BM-MSCs αυξάνονται μετά την 12-15^η ημέρα, ενώ τα διαφοροποιημένα κύτταρα αναπτύσσονται σε αρκετές φλάσκες μετά την 20^η ημέρα. Συνεπώς όσον αφορά τη μέθοδο απομόνωσης BM-MSCs υπήρχε σαφής υπεροχή της μεθόδου διαβάθμισης συγκέντρωσης, ενώ η ιδανική χρονική στιγμή κατά την οποία τα προσκολλημένα BM-MSCs μπορούν να αξιοποιηθούν είναι μεταξύ του παραθύρου των 15-20 ημερών από την έναρξη της καλλιέργειας.

Πίνακας 3.5. Η αξιολόγηση της εξέλιξης της καλλιέργειας πρωτογενών ανθρώπινων μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων μυελικής προέλευσης (BM-MSCs), τα οποία έχουν απομονωθεί με τη μέθοδο διαβάθμισης συγκέντρωσης (- απουσία έκφρασης, +, ++, +++ διαβάθμιση θετικότητας).

Χρόνος καλλιέργειας/ χαρακτηριστικό	Ημέρα 0	Ημέρα 4	Ημέρα 12	Ημέρα 15	Ημέρα 18	Ημέρα 20	Ημέρα 27
Πολλαπλασιαστικό δυναμικό	-	-	+	++	+++	+++	+++
BM-MSCs (με μορφολογικά κριτήρια)	-	+	+	++	++	+++	+++
Διαφοροποιημένα κύτταρα (με μορφολογικά κριτήρια)	-	-	-	-	+	++	+++



Εικόνα 3.4. Διαδοχικές φωτογραφίες οπτικής μικροσκοπίας από καλλιέργεια μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων μυελικής προέλευσης (BM-MSCs) σε διάστημα 27 ημερών από την έναρξη. Οι εικόνες της ίδιας σειράς λήφθηκαν την ίδια ημέρα. Η μεγέθυνση αναφέρεται ως 4X, 10X και 40X, ενώ οι λευκές γραμμές αντιστοιχούν στην κλίμακα μήκους (100 μm, 40 μm και 10 μm, αντίστοιχα).

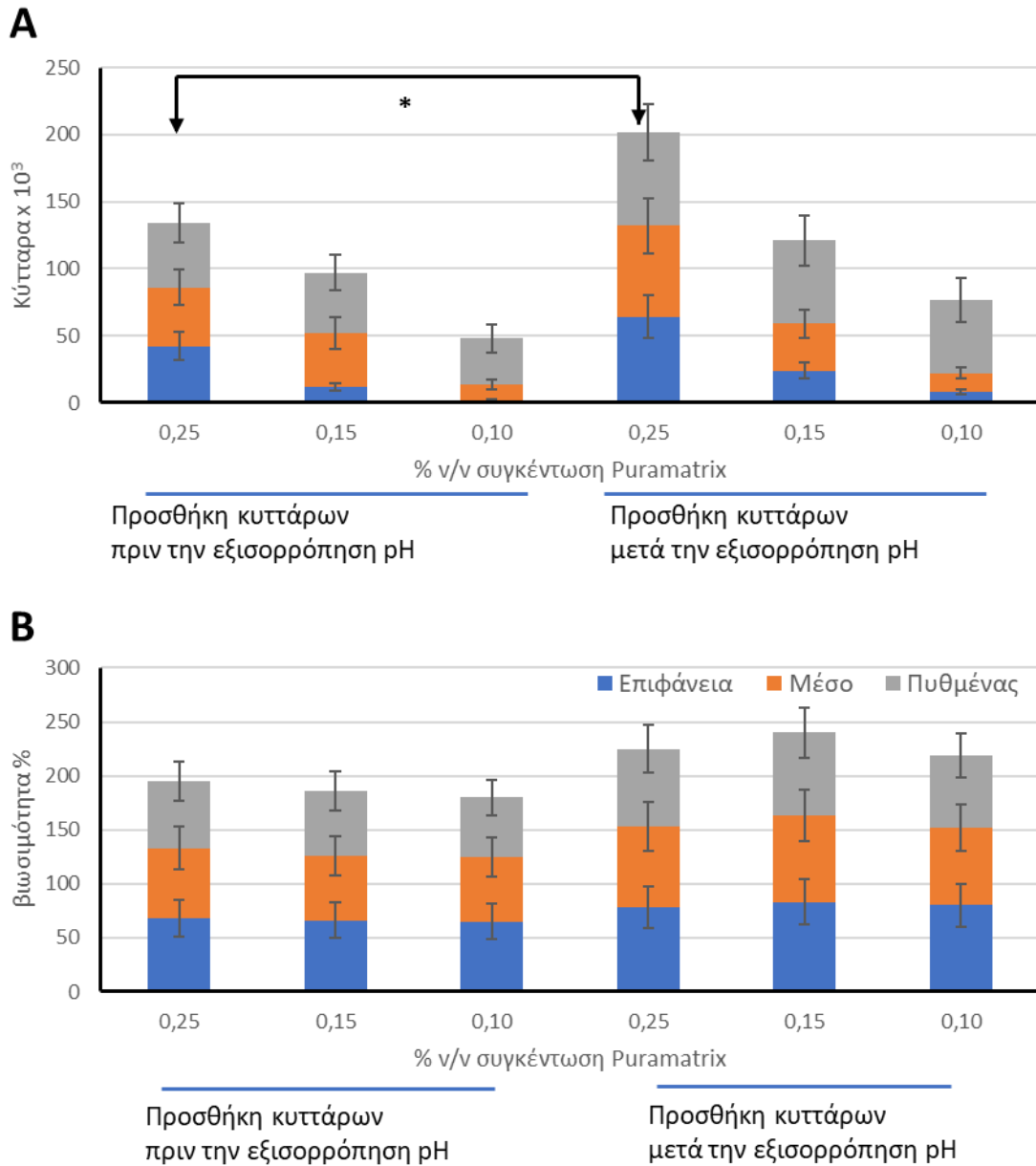
3.1.5 Προσδιορισμός της κατάλληλης σύστασης του ικρίωματος υδρογέλης

Στη συνέχεια, αφού μελετήθηκε ο χειρισμός των μυελωματικών κυτταρικών σειρών και των BM-MSCs έγινε η μετάβαση στο 3D περιβάλλον εξετάζοντας τα ικρίωματα και την ανάπτυξη κυτταροκαλλιιεργειών σε αυτά. Στο επόμενο πείραμα επιχειρήθηκε ο χειρισμός της υδρογέλης Corning PuraMatrix Peptide Hydrogel (BD, USA) αναπτύσσοντας 3D καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς U266. Στόχος του παρόντος πειράματος ήταν, αφού κατασκευαστεί υδρογέλη διαφόρων συγκεντρώσεων, να εξεταστεί η βιωσιμότητα και η κατανομή των κυττάρων U266 όταν αυτά εγκλείονται στην υδρογέλη πριν την εξισορρόπηση του pH ή όταν προστίθενται σε αυτό μετά την εξισορρόπηση του pH. Η εξισορρόπηση του pH μετατρέπει το διάλυμα της υδρογέλης από υδαρές σε ημιστερεό (πήγμα).

Σε μικροπλάκα 96 φρεατίων ετοιμάσθηκαν 3 επαναλήψεις για κάθε πειραματική συνθήκη. Δοκιμάσθηκαν τρεις συγκεντρώσεις υλικού υδρογέλης σε dH₂O (0,25%, 0,15% και 0,10% v/v) για κάθε τρόπο κατασκευής της καλλιέργειας, δηλαδή με εγκλεισμό των κυττάρων πριν ή μετά την εξισορρόπηση του pH. Σε κάθε φρεάτιο τοποθετήθηκαν 4×10^4 κύτταρα από την καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς U266 κατά την εκθετική φάση ανάπτυξής της σε συνολικό όγκο 200 μL και καλλιεργήθηκαν για 5 ημέρες στην υδρογέλη. Για τη μέτρηση και την εκτίμηση της βιωσιμότητας, έγινε χρώση των κυττάρων με κυανούν του τρυπανίου εντός της υδρογέλης και λήφθηκαν εικόνες με ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο εστιάζοντας σε 3 διαφορετικά εστιακά (δηλαδή εις βάθος) επίπεδα, χωρίς να διαταραχθεί η δομή της καλλιέργειας. Η καταμέτρηση των κυττάρων έγινε με απλή μέτρηση των φωτογραφιών, καθώς οι διαφορετικοί χρωματισμοί και τα συσσωματώματα των κυττάρων της καλλιέργειας στην υδρογέλη κατέστησαν απαγορευτική τη χρήση λογισμικού ανάλυσης εικόνας ακόμη και μετά τη διαλυτοποίησή της.

Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.5**, στις καλλιέργειες με εγκλεισμό των κυττάρων πριν την εξισορρόπηση pH, στη συγκέντρωση 0,25% v/v τα κύτταρα ήταν κατανομημένα σε όλο τον όγκο του φρεατίου με μέση βιωσιμότητα 65%. Στη συγκέντρωση 0,15% v/v η κατανομή των κυττάρων ήταν στο μέσον και στον πυθμένα του φρεατίου με μέση βιωσιμότητα 62%, ενώ στη συγκέντρωση 0,10% v/v τα κύτταρα είχαν συγκεντρωθεί στον πυθμένα με μέση βιωσιμότητα 60%. Στις καλλιέργειες με εγκλεισμό των κυττάρων μετά την εξισορρόπηση pH, στη συγκέντρωση 0,25% v/v

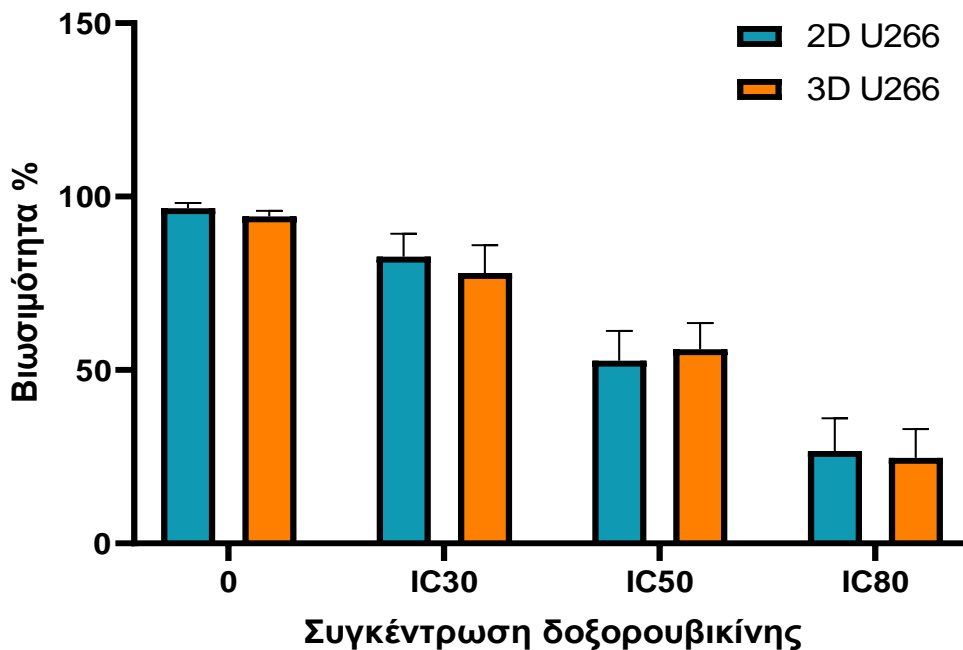
τα κύτταρα ήταν κατανεμημένα σε όλο τον όγκο του φρεατίου με μέση βιωσιμότητα 75%. Στη συγκέντρωση 0,15% η κατανομή των κυττάρων ήταν στο μέσον και στον πυθμένα του φρεατίου, με μέση βιωσιμότητα 80%, ενώ στη συγκέντρωση 0,10% τα κύτταρα εντοπίστηκαν στον πυθμένα με μέση βιωσιμότητα 73%. Η μέση διαφορά του αριθμού των κυττάρων πριν και μετά τον εγκλεισμό των κυττάρων, ήταν στατιστικά σημαντική για τη συγκέντρωση 0,25% v/v ($p < 0,05$). Το γεγονός ότι πριν την εξισορρόπηση του pH τα κύτταρα εκτίθενται έστω και για μικρό χρονικό διάστημα σε όξινο περιβάλλον φαίνεται ότι έχει επίπτωση στη βιωσιμότητά τους. Τελικώς, ως βέλτιστη συγκέντρωση Corning PuraMatrix Peptide Hydrogel επιλέχθηκε η 0,25% v/v και ως βέλτιστη μέθοδος η προσθήκη των κυττάρων μετά την εξισορρόπηση του pH.



Εικόνα 3.5. Εύρεση της κατάλληλης σύστασης της υδρογέλης για τη βέλτιστη ανάπτυξη και κατανομή των μυελωματικών κυττάρων. Η ανάπτυξη των κυττάρων U266 στην υδρογέλη σε μικροπλάκα 96 φρεατίων, μελετήθηκε όταν αυτά εγκλείσθηκαν πριν την εξισορρόπηση του pH ή όταν προστέθηκαν μετά την εξισορρόπηση του pH. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στην υδρογέλη για 5 ημέρες και μετρήθηκαν με οπτική μικροσκοπία τμηματικά, στην επιφάνεια, στο μέσο και στον πυθμένα του φρεατίου. Μέτρηση του αριθμού (A) και της βιωσιμότητας (B) των κυττάρων. * $p < 0,05$.

3.1.6 Σύγκριση βιωσιμότητας της κυτταρικής σειράς U266 μεταξύ 2D και 3D καλλιιεργειών μετά από έκθεση σε δοξορουβικίνη

Έχοντας καθορίσει τον τρόπο χειρισμού της υδρογέλης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος τοξικότητας των κυττάρων U266 στη δοξορουβικίνη, όταν αυτά αναπτύσσονταν σε 2D και 3D καλλιιεργείες στο υλικό υδρογέλης, με σκοπό να μελετηθεί αν το 3D περιβάλλον προσδίδει κάποιο πλεονέκτημα στην επιβίωση των μυελωματικών κυττάρων. Τα κύτταρα U266 καλλιιεργήθηκαν σε πλάκα 96 φρεατίων σε 2D και 3D συνθήκες, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα δοξορουβικίνη (0 nM, IC30, IC50, IC80) με τρεις επαναλήψεις ανά έλεγχο. Στη συνέχεια, ακολούθησε χρώση των κυττάρων εντός των φρεατίων με κυανού του τρυπανίου, λήψη φωτογραφιών και ανάλυση των εικόνων. Η βιωσιμότητα εκτιμήθηκε με οπτική καταμέτρηση, καθότι ο αλγόριθμος αναγνώρισης εικόνας δεν κατέστη δυνατό να χρησιμοποιηθεί με την υδρογέλη, ενώ σε δοκιμή με κυτταρομετρία ροής η παρουσία υπολειμμάτων της υδρογέλης και συσσωματωμάτων κυττάρων δεν κατέστησαν δυνατή την ανάλυση. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης της δοξορουβικίνης, τόσο στην περίπτωση των 2D όσο και στην περίπτωση των 3D καλλιιεργειών (2D: μέση τιμή βιωσιμότητας 95% σε συγκέντρωση 0 μM έναντι 39% σε συγκέντρωση IC80, 3D: μέση τιμή βιωσιμότητας 99% σε συγκέντρωση 0 μM έναντι 40% σε συγκέντρωση IC80, **Εικόνα 3.6**). Μάλιστα, η τάση μείωσης της βιωσιμότητας βρέθηκε παρόμοια στους δύο τύπους καλλιιεργειών. Επομένως, το περιβάλλον των 3D καλλιιεργειών δε φάνηκε να προσδίδει κάποιο πλεονέκτημα στα μυελωματικά κύτταρα όσον αφορά την ανθεκτικότητά τους στη δοξορουβικίνη.



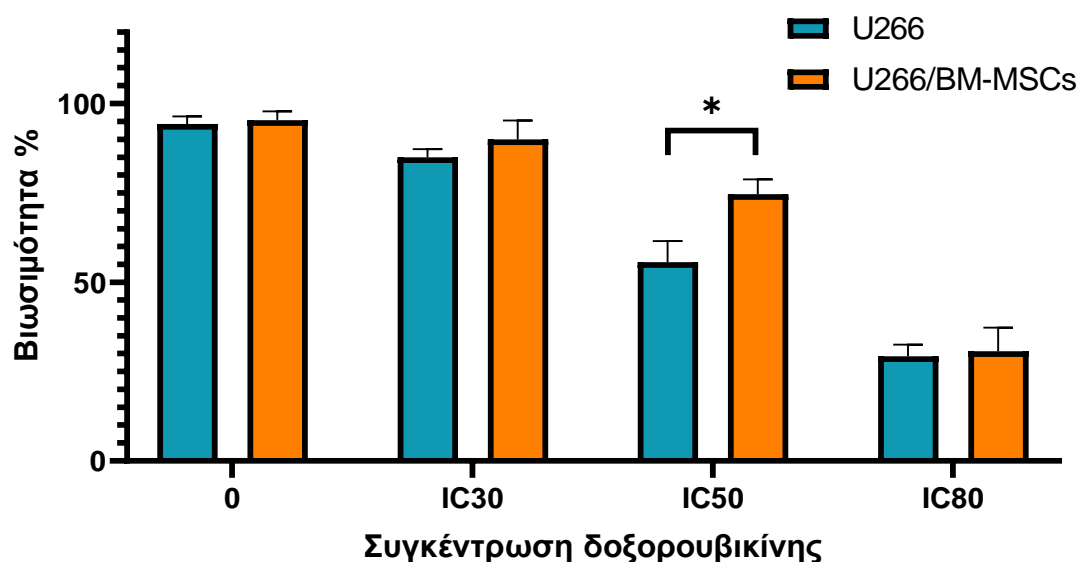
Εικόνα 3.6. Σύγκριση της βιωσιμότητας των U266 μετά από επίδραση δοξορουβικίνης. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια δύο (2D) και τριών (3D) διαστάσεων σε μικροπλάκες 96 φρεατίων. Μετά από επώαση 72 ωρών μετρήθηκαν με χρώση με κυανούν του τρυπανίου με οπτική μικροσκοπία. $IC_{30}=40,9$ nM, $IC_{50}=58,5$ nM, $IC_{80}=76,1$ nM. Οι μέσες τιμές \pm την τυπική απόκλιση υπολογίστηκαν από 3 διαφορετικά πειράματα.

3.1.7 Σύγκριση βιωσιμότητας της κυτταρικής σειράς U266 μεταξύ μονοκαλλιέργειας και συγκαλλιέργειας με μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα μυελικής προέλευσης μετά από έκθεση σε δοξορουβικίνη

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και σε συγκαλλιέργεια μυελωματικών κυττάρων-BM-MSCs με σκοπό να ελεγχθεί εάν η παρουσία των BM-MSCs μπορεί να προσδώσει μεγαλύτερη αντοχή απέναντι στο χημειοθεραπευτικό παράγοντα. Με σκοπό την αποφυγή εισαγωγής δύο διαφορετικών μεταβλητών (3D περιβάλλον, συγκαλλιέργεια με BM-MSCs) επιλέχθηκε να ελέγξουμε τη 2D καλλιέργεια. Εφόσον τα μυελωματικά κύτταρα βρίσκονται σε εναιώρημα, ενώ τα BM-MSCs είναι προσκολλημένα στον πυθμένα των φρεατίων, επιλέχθηκε να αναλυθούν άμεσα με κυτταρομετρία ροής. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα της σειράς U266 καλλιεργήθηκαν σε μικροπλάκες 24 φρεατίων (5×10^4 κύτταρα/φρεάτιο) τόσο παρουσία όσο και απουσία BM-MSCs υπό την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης (0 μ M, IC30, IC50 και IC80) για 72 ώρες. Αρχικά, 1×10^3 BM-MSCs είχαν μεταφερθεί στις μικροπλάκες 5 ημέρες

πριν την έναρξη του πειράματος με σκοπό την προσκόλλησή τους και τη δημιουργία του μικροπεριβάλλοντος στο οποίο θα γινόταν η συγκαλλιέργεια. Για τα πειράματα αυτά επιλέχθηκαν μικροπλάκες 24 φρεατίων και όχι 96 φρεατίων, με σκοπό τη διαθεσιμότητα περισσότερων κυττάρων για τη μέτρηση με κυτταρομετρία ροής. Κάθε πειραματική συνθήκη επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στη συνέχεια, έγινε χρώση με Αννεξίνη-V και PI και ακολούθησε εκτίμηση των ποσοστών βιωσιμότητας και νέκρωσης στο κυτταρόμετρο.

Παρατηρήθηκε ότι στη συγκέντρωση δοξορουβικίνης IC50 υπήρχε σημαντικά μεγαλύτερη βιωσιμότητα στη συγκαλλιέργεια έναντι της μονοκαλλιέργειας (μέση τιμή βιωσιμότητας 55,6% για U266 έναντι 74,7% για U266/BM-MSCs, $p < 0,05$). Ωστόσο η διαφορά αυτή δεν παρατηρήθηκε στη μέγιστη συγκέντρωση (IC80) της δοξορουβικίνης (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7. Βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς U266, σε δισδιάστατη μονοκαλλιέργεια και σε συγκαλλιέργεια με BM-MSCs, υπό την επίδραση δοξορουβικίνης για 72 ώρες. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε μικροπλάκες 96 φρεατίων. IC30=40,9 nM, IC50=58,5 nM, IC80=76,1 nM. Οι μέσες τιμές \pm την τυπική απόκλιση υπολογίστηκαν από 3 διαφορετικά πειράματα. * $p < 0,05$.

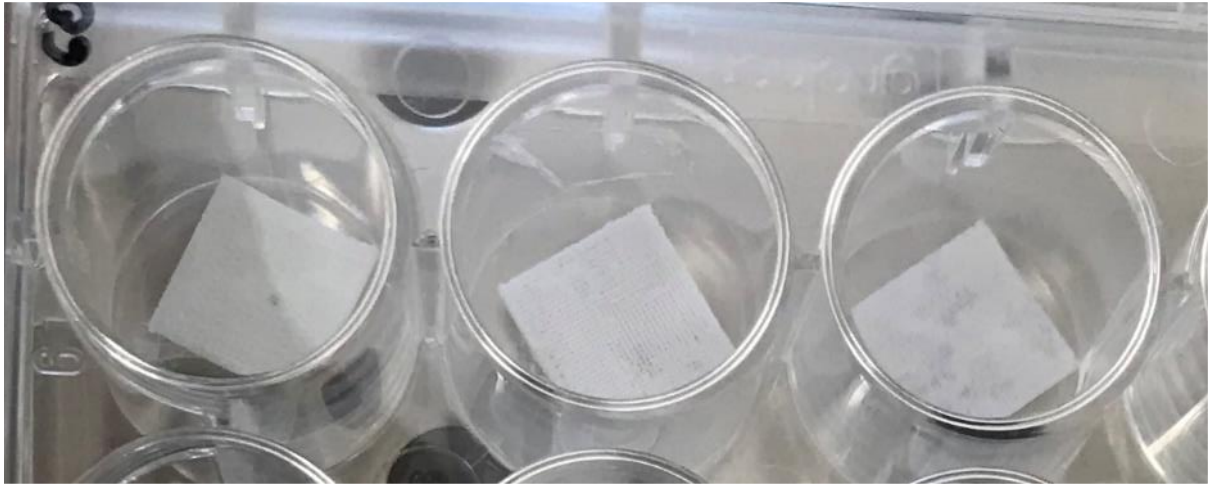
Συμπερασματικά, η χρήση των ικριωμάτων υδρογέλης παρέχει ένα εύκολο μέσο για το χειρισμό και την ανάπτυξη κυττάρων σε 3D καλλιέργειες. Εντούτοις για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας, υπήρξε μεγάλη δυσχέρεια στη χρήση λογισμικού ανάλυσης εικόνας, ενώ ακόμη και με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής τα κύτταρα δεν διακρίνονταν σαφώς από το θόρυβο (κυτταρικά υπολείμματα και συσσωματώματα γέλης). Κατ' επέκταση δεν κατέστη δυνατή η εκτίμηση της

βιωσιμότητας των μυελωματικών κυττάρων σε πείραμα που περιλάμβανε και τις δύο μεταβλητές, δηλαδή συγκαλλιέργεια με BM-MSCs σε υδρογέλη. Για τους προαναφερθέντες λόγους κρίθηκε σκόπιμη η περαιτέρω διερεύνηση του ex vivo μοντέλου με τη χρήση στερεών ικριωμάτων.

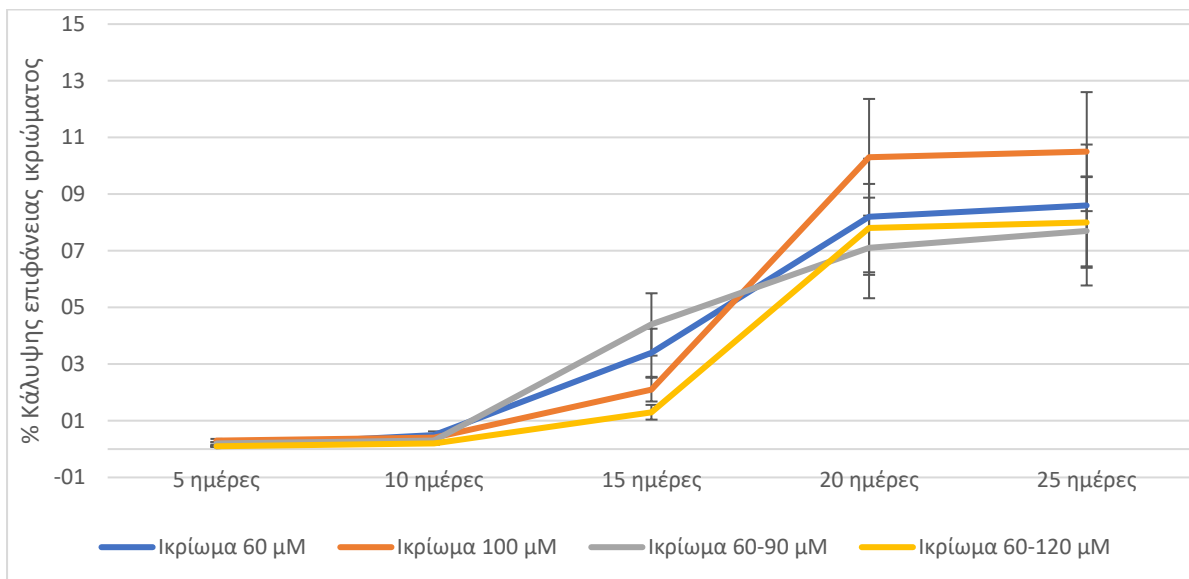
3.1.8 Μελέτη κάλυψης ικριωμάτων πολυγαλακτικού οξέος από μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα μυελικής προέλευσης με τη χρήση μικροσκοπίας

Για τη συνέχεια των πειραμάτων αξιοποιήθηκαν ικριώματα PLA στοχεύοντας στην κατασκευή επαναχρησιμοποιούμενης ex vivo πλατφόρμας για το ΠΜ. Τα ικριώματα που είχαμε διαθέσιμα ήταν δομής πλέγματος, σε μορφή δίσκου ακτίνας 4 mm και διέφεραν στο μέγεθος πόρου που ήταν: i) 60 μM , ii) 100 μM , iii) διαβάθμιση 60-90 μM και iv) διαβάθμιση 60-120 μM (**Εικόνα 3.8**). Ο έλεγχος ανάπτυξης των μεσεγχυματικών κυττάρων στα ικριώματα πραγματοποιήθηκε με τρεις διαφορετικές τεχνικές μικροσκοπίας: Α) μικροσκοπία φθορισμού για την αδρή εκτίμηση της κάλυψης των ικριωμάτων, Β) συνεστιακή μικροσκοπία για τη μελέτη των ζωντανών κυττάρων στα ικριώματα και Γ) ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης για την αποκάλυψη της επιφανειακής δομής και χωροταξικής επέκτασης των κυττάρων.

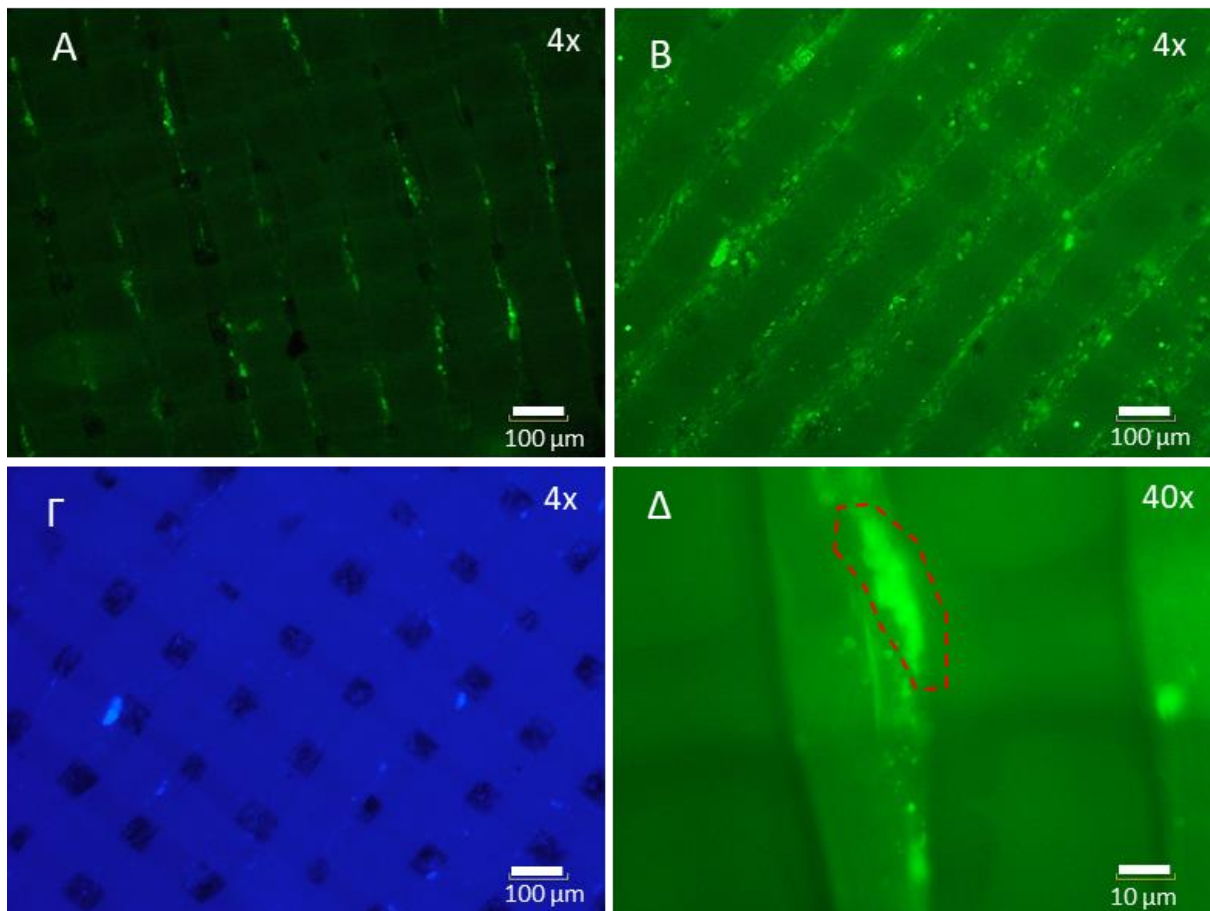
Για την παρακολούθηση της καλλιέργειας και ανάπτυξης BM-MSCs στα ικριώματα PLA με μικροσκοπία φθορισμού, πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων BM-MSC με τη χρωστική CFSE, η οποία δεν θανατώνει τα κύτταρα, παρέχει εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επιπλέον δίνει τη δυνατότητα συνεχούς παρατήρησης της πορείας της κυτταροκαλλιέργειας. Αρχικά έγινε χρώση 1×10^3 MDSCs και καλλιέργεια για 5 ημέρες σε μικροπλάκα 96 φρεατίων. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα ικριώματα και έχοντας την ευχέρεια της τακτικής παρατήρησης, έγινε φωτογραφική καταγραφή της εξέλιξης της καλλιέργειας ανά πέντε ημέρες σε σύνολο 25 ημερών. Η χρωστική CFSE εκπέμπει περί τα 520 nm και ανιχνεύεται από το πράσινο κανάλι του μικροσκοπίου φθορισμού. Το μπλε κανάλι του μικροσκοπίου, εφόσον δεν υπήρχε κάποια σχετική χρωστική, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας αυτοφθορισμού. Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.9**, παρατηρήθηκε ανάπτυξη των BM-MSCs στα ικριώματα. Συνολικά δοκιμάστηκαν και τα τέσσερα μεγέθη ικριωμάτων που υπήρχαν διαθέσιμα και η μέτρηση της κάλυψης έγινε αδρά με φωτογράφιση σε μεγέθυνση 4X σε τρία οπτικά πεδία, με την εκτίμηση του εμβαδού του φθορίζοντος σήματος που προέρχεται από τα κύτταρα προς το συνολικό εμβαδό του οπτικού πεδίου με τη χρήση του λογισμικού ανάλυσης εικόνων ImageJ Fiji. Αρχίζοντας από μηδενικό ποσοστό κάλυψης την 5^η ημέρα κυτταροκαλλιέργειας, ο μέσος όρος ποσοστού κάλυψης που επιτεύχθηκε την 25^η ημέρα ήταν 9% με μέγιστη τιμή κάλυψης 11% στο ικρίωμα μεγέθους πόρων 100 μM (**Εικόνα 3.10**).



Εικόνα 3.8. Τα ικρίωματα πολυγαλακτικού οξέως (PLA) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είχαν δομή πλέγματος και τοποθετήθηκαν στον πυθμένα μικροπλάκας 96 φρεατίων.



Εικόνα 3.9. Παρακολούθηση της κάλυψης των ικριωμάτων από μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα μυελικής προέλευσης (BM-MSCs) κατά τη διάρκεια εξέλιξης της κυτταροκαλλιέργειας. Χρησιμοποιήθηκαν στερεά ικρίωματα πολυγαλακτικού οξέως (PLA) τοποθετημένα σε μικροπλάκες 96 φρεατίων και MDSCs χρωσμένα με τη χρωστική ζωτικότητα CFSE. Ανά 5 ημέρες και σε σύνολο 25 ημερών μετρήθηκαν τρία οπτικά πεδία στη μεγέθυνση 4X. Η μέτρηση της κάλυψης έγινε με μικροσκοπία φθορισμού. Παρουσιάζονται το μέσο ποσοστό κάλυψης των ικριωμάτων ως ποσοστό $\% \pm$ η τυπική απόκλιση (SD) ανά ημέρα από 3 διαφορετικά πειράματα.



Εικόνα 3.10. Ανάπτυξη μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων μυελικής προέλευσης (BM-MSCs) σε στερεά ικρίωματα πολυγαλακτικού οξέως (PLA) με ενδοκυττάρια χρώση ζωτικότητας CFSE. Τα ικρίωματα τοποθετήθηκαν σε μικροπλάκες 96 φρεατίων στα οποία είχαν ήδη καλλιεργηθεί για 5 ημέρες 10^3 BM-MSCs χρωσμένα με CFSE. Η εικόνα (A) προέρχεται από την 10^η μέρα καλλιέργειας, ενώ την 15^η ημέρα (B) η κάλυψη των ικριωμάτων έχει αυξηθεί στους κενούς χώρους μεταξύ των ινών του πλέγματος. Στο ίδιο οπτικό πεδίο την 15^η ημέρα με μπλε φίλτρο (Γ) παρατηρείται ότι το φωτεινό σήμα δεν είναι αυτοφθορισμός. Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (Δ) φαίνεται η προσκόλληση κυττάρου (περιγεγραμμένη στικτή περιοχή) στην ίνα του πλέγματος. Οι εικόνες ελήφθησαν από μικροσκόπιο φθορισμού. Η μεγέθυνση αναφέρεται ως 4X και 40X, ενώ οι λευκές γραμμές αντιστοιχούν στην κλίμακα μήκους (100 μm και 10 μm, αντίστοιχα).

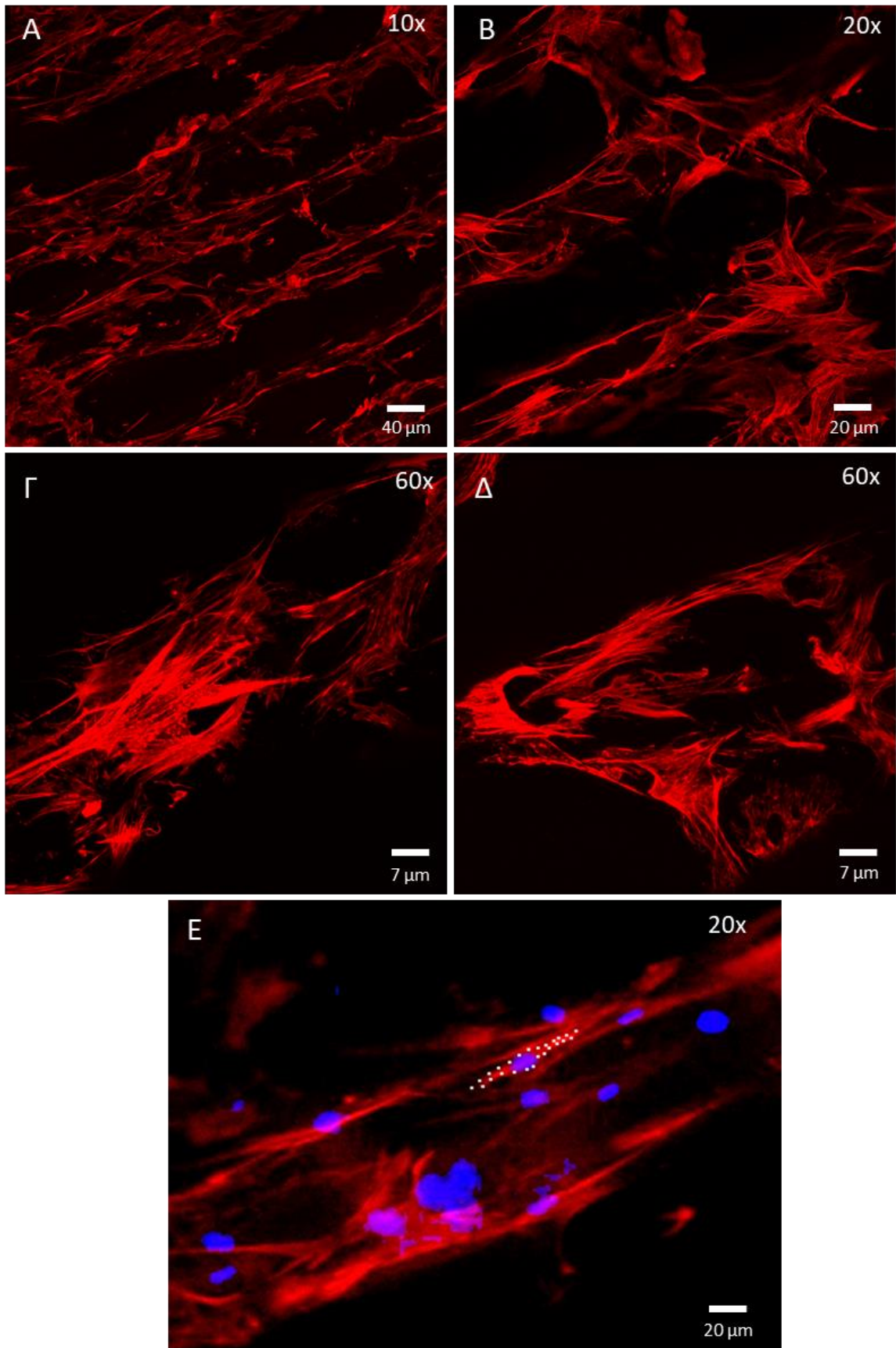
Με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης, έγινε λεπτομερέστερη παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων καθώς και των ορίων τους. Για το σκοπό αυτό έγινε χρώση των κυττάρων με φαλλοϊδίνη, η οποία συνδέεται με τα ινίδια ακτίνης και αποκαλύπτει τον

κυτταροσκελετό των κυττάρων. Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων είναι ποιοτική και όχι ποσοτική, και όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3.11** παρατηρήθηκαν τα εξής μορφολογικά χαρακτηριστικά:

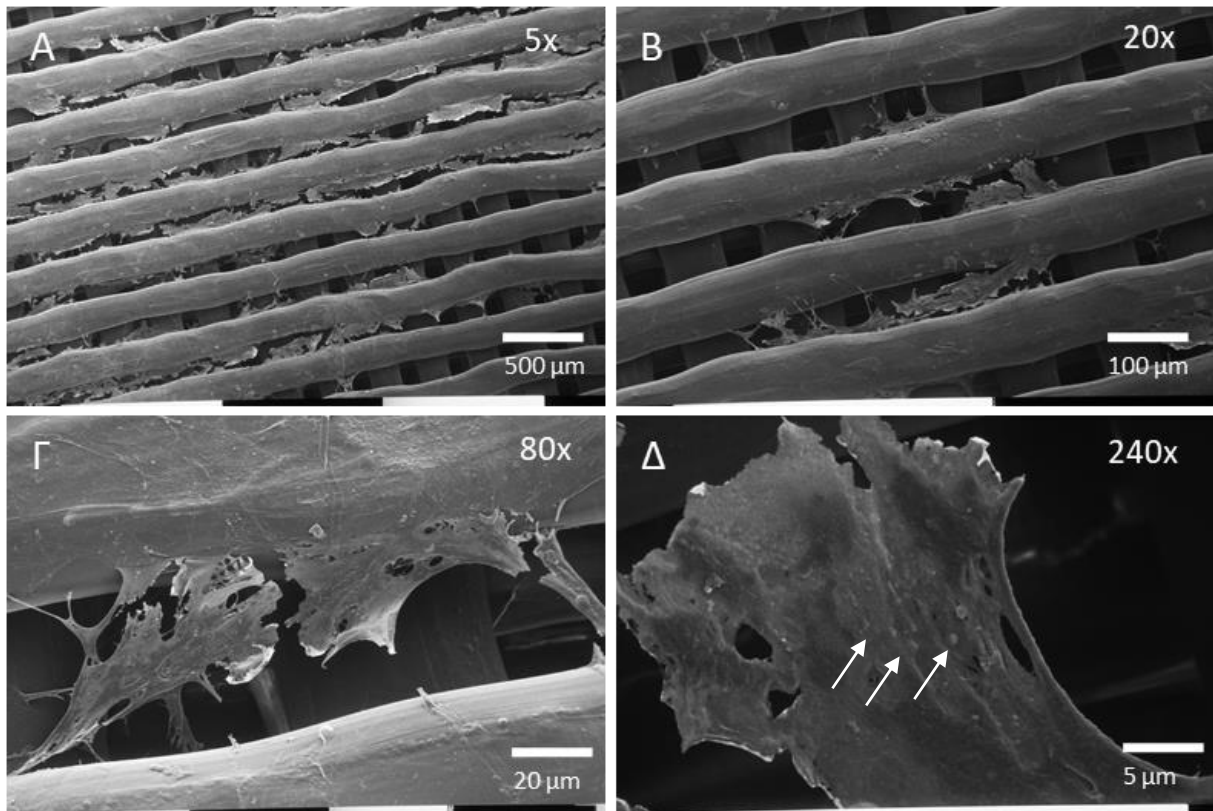
- Τα BM-MSCs αναπτύσσονται προσκολλώμενα ανάμεσα στις ίνες του ικριώματος
- Ο κυτταροσκελετός των κυττάρων επεκτείνεται ανάμεσα στις ίνες του ικριώματος καλύπτοντας το κενό του πλέγματος, προσεγγίζοντας την απέναντι ίνα.

Τέλος, για την αποκάλυψη πλέον αναλυτικών μορφολογικών χαρακτηριστικών των BM-MSCs τα οποία αναπτύσσονται τρισδιάστατα μέσα στα ικριώματα PLA, πραγματοποιήθηκε παρατήρηση των στερεών ικριωμάτων με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης. Όπως και προηγουμένως, η εκτίμηση των αποτελεσμάτων είναι ποιοτική, και όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.12**, παρατηρήθηκαν τα εξής μορφολογικά χαρακτηριστικά:

- Τα BM-MSCs αναπτύσσονται προσκολλημένα στις ίνες του πλέγματος
- Τα κύτταρα έχουν λεπτές προσεκβολές με τις οποίες εκτείνονται και «αναρτώνται» ανάμεσα στις ίνες
- Παρατηρούνται κυστίδια (πιθανά εξωσώματα) στην επιφάνεια των μεσεγχυματικών κυττάρων. Η παρουσία τους μάλιστα υποστηρίζεται και βιβλιογραφικά (Nikfarjam et al., 2020)
- Τα κύτταρα διαμορφώνουν μια δομή «φύλλου» μεταξύ των ινών του ικριώματος.



Εικόνα 3.11. Η ανάπτυξη μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων μυελικής προέλευσης (BM-MSCs) με χρώση φαλλοϊδίνης σε στερεά ικρίωματα πολυγαλακτικού οξέως (PLA) κατά την 25^η ημέρα καλλιέργειας. Τα ικρίωματα τοποθετήθηκαν σε μικροπλάκες 96 φρεατίων στα οποία είχαν ήδη καλλιεργηθεί για 5 ημέρες 1×10^3 BM-MSCs. Τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί ανάμεσα στις ίνες του πλέγματος του ικρίωματος (Α-Β), ενώ σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (Γ-Δ) φαίνεται η έκταση του κυτταροσκελετού. Οι δομές αποτελούνται από κύτταρα, όπως αποδεικνύεται από την πυρηνική χρώση με τη χρωστική DAPI (Ε). Οι εικόνες είναι το αποτέλεσμα σύνθεσης 15-20 σειριακών οπτικών τομών με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης. Η μεγέθυνση αναφέρεται ως 10X, 20X και 60X, ενώ οι λευκές γραμμές αντιστοιχούν στην κλίμακα μήκους (40 μm, 20 μm και 7 μm, αντίστοιχα).



Εικόνα 3.11. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης στις οποίες απεικονίζονται μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα μυελικής προέλευσης (BM-MSCs) σε ικρίωματα πολυγαλακτικού οξέως (PLA) με μέγεθος πόρου 100 μm, ύστερα από 30 ημέρες καλλιέργειας. (Α) εικόνα του ικρίωματος, όπου διακρίνεται η πλέξη των ινών PLA καθώς και τα κύτταρα ανάμεσά τους. (Β) και (Γ) εικόνες του ικρίωματος με κύτταρα όπου φαίνονται οι κυτταρικές προσεκβολές οι οποίες «αναρτούν» τα κύτταρα ανάμεσα στις ίνες. Στην εικόνα (Δ) παρατηρείται ο σχηματισμός χαρακτηριστικής μορφής “φύλλου” από τα κύτταρα, ενώ διακρίνονται και κυστίδια στην επιφάνεια

των κυττάρων (βέλη). Η μεγέθυνση αναφέρεται ως 5X, 20X, 80X και 240X, ενώ οι λευκές γραμμές αντιστοιχούν στην κλίμακα μήκους (500 μm, 100 μm, 20 μm και 5 μm, αντίστοιχα).

3.1.9 Δοκιμή της ex vivo πλατφόρμας: Συγκαλλιέργεια μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων μυελικής προέλευσης και μυελωματικών κυττάρων H929 σε ικρίωματα υπό την επίδραση βορτεζομίμπης

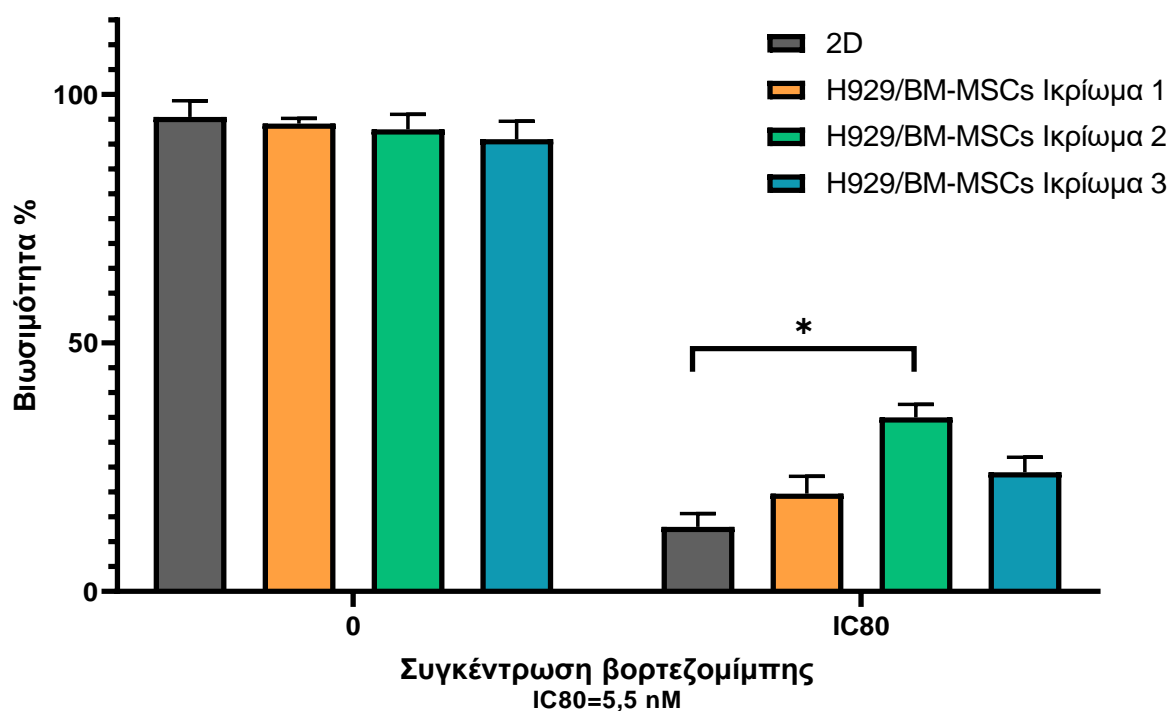
Έχοντας μελετήσει τα επιμέρους συστατικά της ex vivo πλατφόρμας, ακολούθησε η συνολική δοκιμή του μοντέλου για τον έλεγχο της χημειοανθεκτικότητας των μυελωματικών κυττάρων, όταν αυτά αναπτύσσονται σε 3D παρουσία BM-MSCs που αποτελεί τον σημαντικότερο ίσως κυτταρικό τύπο του μικροπεριβάλλοντος του MO στο ΠΜ. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά H929 και ικρίωματα στα οποία είχαν προηγουμένως αναπτυχθεί πρωτογενή BM-MSCs ασθενούς για 15 ημέρες για να πραγματοποιηθεί έλεγχος κυτταροτοξικότητας στη βορτεζομίμπη. Η πειραματική διάταξη ετοιμάσθηκε σε μικροπλάκα 96 βοθρίων και περιείχε κύτταρα H929 χωρίς επίδραση βορτεζομίμπης ως μάρτυρα, κύτταρα H929 σε 2D μονοκαλλιέργεια και τρία ικρίωματα συγκαλλιέργειας (4×10^3 κύτταρα H929 σε κάθε φρεάτιο). Κάθε πειραματική συνθήκη επαναλήφθηκε τρεις φορές. Τα κύτταρα παρέμειναν υπό την επίδραση βορτεζομίμπης σε συγκέντρωση IC80 (5,5 nM) για 72 ώρες. Στο τέλος, τα μυελωματικά κύτταρα απομακρύνθηκαν από τα ικρίωματα, μεταφέρθηκαν σε νέα φρεάτια, έγινε χρώση με κυανούν του τρυπανίου και καταμετρήθηκαν με τον αλγόριθμο οπτικής μικροσκοπίας που αναφέρθηκε προηγουμένως.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν συμπεριλήφθηκαν φρεάτια με 3D μονοκαλλιέργεια κυττάρων H929 στα ικρίωματα, επειδή σε κατάσταση μονοκαλλιέργειας τα μυελωματικά κύτταρα δεν παραμένουν μέσα στο πλέγμα του ικριώματος, σε αντίθεση με τα ικρίωματα που περιέχουν BM-MDSCs (δεδομένα από παρατήρηση χωρίς φωτογράφιση με ανάστροφο μικροσκόπιο). Επίσης, δεν συμπεριλήφθηκαν φρεάτια με 2D συγκαλλιέργεια, καθότι ο αλγόριθμος του λογισμικού ανάλυσης εικόνας είναι αδύνατο να διαχωρίσει τα σφαιρικά κύτταρα H929 (όπως και τις υπόλοιπες μυελωματικές κυτταρικές σειρές) από τα ακανόνιστου σχήματος BM-MSCs. Επιπλέον, η προσκόλληση των H929 στις επίπεδες στρώσεις μεσεγχυματικών κυττάρων αλλοιώνει σημαντικά το αποτέλεσμα της μέτρησης εάν απομακρυνθούν βίαια ώστε να καταμετρηθούν ξεχωριστά.

Διαπιστώθηκε ότι η μέση τιμή βιωσιμότητας των κυττάρων και στους τρεις τύπους ικριωμάτων ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με την 2D καλλιέργεια όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.12**. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα H929 που προήλθαν από τα ικρίωματα με μέγεθος πόρου 60-90 μm φάνηκε ότι είχαν σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό βιωσιμότητας έναντι της 2D συγκαλλιέργειας

(μέση τιμή βιωσιμότητας σε συγκέντρωση IC80: $13,0 \pm 2,5\%$ για 2D έναντι $35,0 \pm 2,6\%$ για συγκαλλιέργεια σε ικρίωμα 60-90 μm , $p=0,01$), ενώ και με τα υπόλοιπα δύο ικρίωματα επιτεύχθηκε μεγαλύτερη βιωσιμότητα αν και όχι στατιστικά σημαντική (μέση τιμή βιωσιμότητας σε συγκέντρωση IC80: $19,6 \pm 3,5\%$ για συγκαλλιέργεια σε ικρίωμα 100 μm και $24 \pm 3,0\%$ για συγκαλλιέργεια σε ικρίωμα 60-120 μm).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η χρήση της προτεινόμενης πλατφόρμας είναι βάσιμη, καθότι δύναται να προσδώσει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα καλλιεργούμενα μυελωματικά κύτταρα. Επομένως προτείνεται ότι το 3D μικροπεριβάλλον παρουσία μεσεγχυματικών κυττάρων αποδίδει ρεαλιστικότερα το μοντέλο της νόσου συγκριτικά με την 2D κυτταροκαλλιέργεια, βασικό μειονέκτημα της οποίας είναι η μη απόδοση ανθεκτικότητας στα μυελωματικά κύτταρα (Dhaliwal, 2015; Karatczyńska et al., 2018). Συμπερασματικά, είναι ιδιαίτερα σημαντικό η ex vivo πλατφόρμα να μπορεί να προσομοιάζει το προστατευτικό μικροπεριβάλλον του ΜΟ ώστε να υπάρχουν πιθανότητες περαιτέρω αξιοποίησής της.



Διάγραμμα 3.12. Δοκιμή της προτεινόμενης ex vivo πλατφόρμας στο ΠΜ. Περιλαμβάνει συγκαλλιέργεια της μυελωματικής κυτταρικής σειράς H929 και πρωτογενών μυελικών μεσεγχυματικών κυττάρων (BM-MSCs) σε στερεά ικρίωματα υπό την επίδραση βορτεζομίμπης. Αρχικά ικρίωματα πολυγαλακτικού οξέως (PLA) τοποθετήθηκαν σε μικροπλάκες 96 φρεατίων και BM-MDSCs καλλιεργήθηκαν σε αυτά για 5 ημέρες. Στη συνέχεια προστέθηκαν τα κύτταρα H929 μαζί

με βορτεζομίμη για 72 ώρες. Η εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων H929 έγινε με αλγόριθμο ανάλυσης εικόνας ο οποίος αναπτύχθηκε για αυτή την εφαρμογή. 2D: κύτταρα H929 σε καλλιέργεια 2D μετά από επίδραση βορτεζομίμης. H929/BM-MSCs ικρίωμα 1: κύτταρα που συγκαλλιεργήθηκαν με BM-MSCs σε ικρίωμα PLA με μέγεθος πόρου 100 μm. H929/BM-MSCs ικρίωμα 2: αντίστοιχη καλλιέργεια σε ικρίωμα με μέγεθος πόρου 60-90 μm. H929/BM-MSCs ικρίωμα 3: αντίστοιχη καλλιέργεια σε ικρίωμα με μέγεθος πόρου 60-120 μm. * $p < 0,05$.

3.2 Μελέτη του ανοσολογικού προφίλ του μυελού των οστών στο πολλαπλούν μυέλωμα

Παρόλο που για την ανάπτυξη μιας ex vivo πλατφόρμας μελέτης του ΠΜ μελετήσαμε τη σύγχρονη παρουσία στις καλλιέργειες μυελωματικών κυττάρων και BM-MSCs, ο ΜΟ περιλαμβάνει πλήθος κυτταρικών τύπων που θα μπορούσαν μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν εμπλουτίζοντας το μοντέλο προσομοίωσης του μικροπεριβάλλοντος του ΠΜ. Προς αυτή την κατεύθυνση, αξιολογήσαμε τη σύσταση του μικροπεριβάλλοντος ως σύνολο στα διάφορα στάδια του ΠΜ.

Στο πλαίσιο αυτό, αναλύθηκαν συνολικά δείγματα από 117 ασθενείς με ΠΜ και άλλες πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες. Πιο συγκεκριμένα, 94 δείγματα αντιστοιχούσαν σε ασθενείς με ΠΜ, 15 δείγματα προήλθαν από άτομα με sMM και 8 δείγματα από ασθενείς με πλασματοκυτταρική λευχαιμία (PCL). Από τους 94 ασθενείς με ΠΜ, τα 53 δείγματα αφορούσαν τη στιγμή της αρχικής διάγνωσης της νόσου και 51 δείγματα τη στιγμή της πρώτης πλήρους ύφεσης μετά από υποβολή σε μεγαθεραπεία και αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Για 10 ασθενείς έγινε λήψη δείγματος και κατά τη διάγνωση και τη στιγμή της πλήρους ύφεσης.

3.2.1 Περιγραφή δημογραφικών, κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων των ασθενών

Τα κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα διατριβή παρουσιάζονται συνοπτικά στον **Πίνακα 3.5**. Η διάμεση ηλικία των ασθενών ήταν τα 66 έτη (εύρος 44–93 έτη), ενώ ο λόγος άνδρες/γυναίκες ήταν 4:5. Η διάμεση τιμή του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν $8,2 \times 10^3/\mu\text{L}$ (εύρος 2,5–28,5) με μια διάμεση τιμή στον αριθμό των λεμφοκυττάρων ίση με $1,9 \times 10^3/\mu\text{L}$. Η διάμεση τιμή στον αριθμό των πολυμορφοπύρηνων βρέθηκε ίση με $5,3 \times 10^3/\mu\text{L}$ και η διάμεση τιμή στον αριθμό των αιμοπεταλίων ίση με $223 \times 10^9/\text{L}$. Όσον αφορά τους βιοχημικούς δείκτες στον ορό, η διάμεση τιμή της κρεατινίνης ήταν 1,63 mg/dL (εύρος 0,5-11,1), η διάμεση τιμή της β2 μικροσφαιρίνης 5,7 mg/L (εύρος 0,5-11,1) και η διάμεση τιμή του ασβεστίου 9,5 mg/dL (εύρος 8,4-14,4). Η πλειοψηφία των

ασθενών (60%) είχε επικράτηση IgG ανοσοσφαιρίνης, με μικρότερο ποσοστό στις IgA και IgD (25% και 2%, αντίστοιχα), ενώ ένα μικρό ποσοστό είχε απουσία βαριών αλυσίδων και επικράτηση μόνο ελαφριών (13%).

Όσον αφορά τη σταδιοποίηση των ασθενών σύμφωνα με το ISS υπήρχε ομοιόμορφη κατανομή στα στάδια I έως III (38%, 34% και 28%, αντίστοιχα). Το 32,5% των ασθενών έφεραν κυτταρογενετικές ατυπίες υψηλού κινδύνου, ενώ το υπόλοιπο 67,5% χαμηλού κινδύνου. Η διήθηση του ΜΟ από τα μυελωματικά κύτταρα, εκτιμήθηκε κατά την οστεομυελική βιοψία των ασθενών και είχε διάμεση τιμή 50,7% (εύρος 0-90%). Σχετικά με τη θεραπευτική αντιμετώπιση των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών, όλοι οι ασθενείς της μελέτης μας ακολούθησαν εισαγωγική θεραπεία αποτελούμενη από τριπλό συνδυασμό βορτεζομίμπης, λεναλιδομίδης και δεξαμεθαζόνης (VRd), ακολουθούμενη από ASCT. Συνολικά τα κλινικά χαρακτηριστικά περιγράφονται στον **Πίνακα 3.6**.

Πίνακας 3.6. Κλινικά χαρακτηριστικά νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη μας

Κλινικές Παράμετροι	Ασθενείς κατά τη διάγνωση (n=53)
Ηλικία σε έτη (εύρος)	66 (44-93)
Άνδρες (%)	26 (39%)
Αιμοσφαιρίνη, g/dL	10,8 (8,0-14,7)*
Αιμοπετάλια, $\times 10^9/L$	243 (56-591)
Λευκά αιμοσφαίρια, $\times 10^3/\mu L$	8,2 (2,5-28,5)
Λεμφοκύτταρα, $\times 10^3/\mu L$	1,9 (0,6-5,1)
Ουδετερόφιλα, $\times 10^3/\mu L$	4,5 (1-13)
Κρεατινίνη ορού, mg/dL	1,63 (0,5-11,1)
$\beta 2$ μικροσφαιρίνη ορού, mg/L	5,7 (0,3-26,4)
LDH ορού, U/L	167 (74-293)
Ασβέστιο ορού, mg/dL	9,6 (8,4-14,4)
Διήθηση μυελού των οστών, %	50,7 (0-90)
Νεφρική ανεπάρκεια, n	3 (6%)
Στάδιο ISS	
I	20/53 (38%)

II	18/53 (34%)
III	15/53 (28%)
Κυτταρογενετικές ατυπίες (μέθοδος FISH)	
Υψηλού κινδύνου	22/53 (42%)
Χαμηλού κινδύνου	31/53 (58%)
Ισότυπος βαριάς αλυσίδας ανοσοσφαιρίνης	
IgA	13/53 (25%)
IgG	32/53 (60%)
IgD	1/53 (2%)
Ελαφριές αλυσίδες	7/53 (13%)

*Όλες οι μετρήσεις των μη-κατηγορικών παραμέτρων αναφέρονται ως διάμεση τιμή, με το εύρος σε παρένθεση.

3.2.2. Σύγκριση του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών στα διάφορα στάδια του πολλαπλού μυελώματος

Σε πρώτο επίπεδο πραγματοποιήθηκε η διερεύνηση της σχετικής συχνότητας των κύριων ανοσολογικών υποπληθυσμών στα διάφορα στάδια της νόσου. Η σύγκριση αφορούσε τις σχετικές συχνότητες των T, NK/NKT, B λεμφοκυττάρων, TAMs και ερυθροβλαστών, στο MO των ασθενών, και τα διάφορα στάδια που μελετήθηκαν αφορούσαν το sMM, το ΠΜ σε δύο διακριτές χρονικές στιγμές (διάγνωση και στο στάδιο της πλήρους ύφεσης μετά από μεγαθεραπεία και ASCT) και την PCL, η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως η εξέλιξη του ΠΜ (Da Vià et al., 2020).

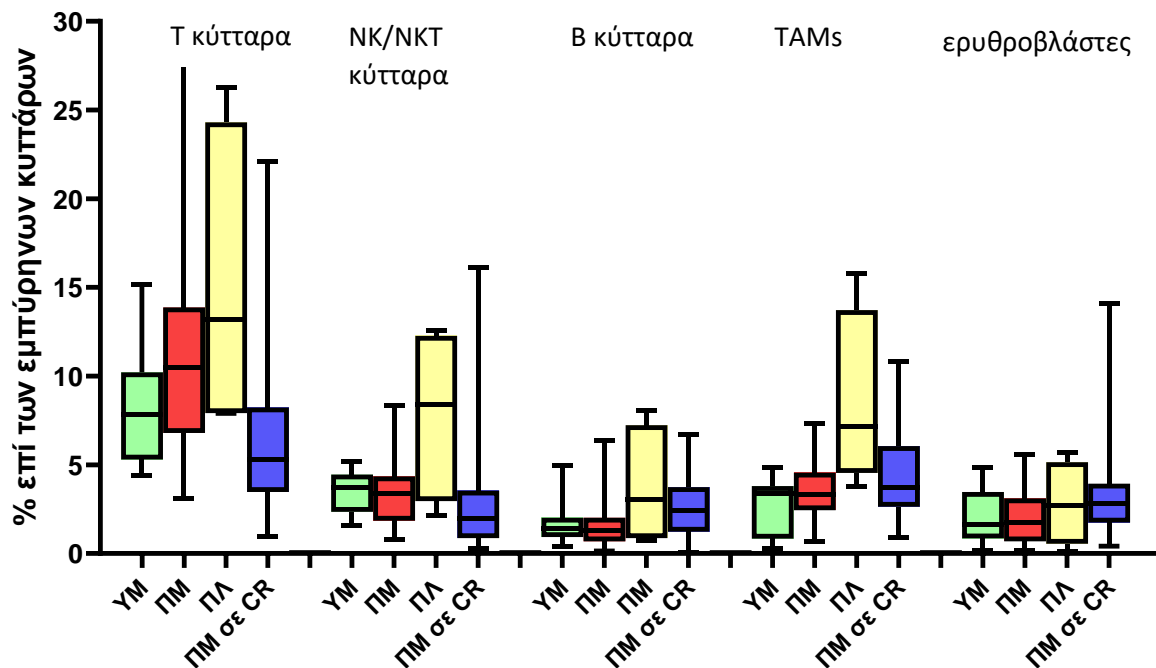
Η σύγκριση των σχετικών συχνοτήτων των παραπάνω υποπληθυσμών δεν ανέδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα διάφορα στάδια της νόσου, κυρίως λόγω της μεγάλης ετερογένειας της κατανομής του κάθε υποπληθυσμού στους ασθενείς εντός του κάθε σταδίου (**Πίνακας 3.7 και Εικόνα 3.13**). Πιο συγκεκριμένα, τα T λεμφοκύτταρα είχαν μεγαλύτερη συχνότητα στην PCL και χαμηλότερα ποσοστά στη φάση της CR (διάμεση τιμή 13,2% στην PCL, έναντι 5,3% κατά την CR επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων). Τα NK/NKT παρομοίως εμφάνισαν τα μεγαλύτερα ποσοστά στην PCL και τα μικρότερα στη CR (διάμεση τιμή 8,4% στην PCL, έναντι 2,0% κατά την CR επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων). Τα B λεμφοκύτταρα βρίσκονταν σε οριακά μεγαλύτερο ποσοστό στην PCL και σε μικρότερο κατά τη CR (διάμεση τιμή 3,1% στην PCL, έναντι 1,3% κατά την CR επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων), ενώ τα TAMs εντοπίστηκαν με τάση

αύξησης στην PCL (διάμεση τιμή 7,2% στην PCL, έναντι μέσου όρου 3,5% των υπόλοιπων κατηγοριών επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων). Τέλος, οι ερυθροβλάστες παρουσίασαν τις μικρότερες διακυμάνσεις εντός του κάθε σταδίου και καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών (μέσος όρος των τεσσάρων σταδίων 2,2% επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων).

Πίνακας 3.7. Σχετικές συχνότητες των κύριων ανοσολογικών υποπληθυσμών του μυελού των οστών στα διάφορα στάδια εξέλιξης του πολλαπλού μυελώματος.

Υποπληθυσμός / Στάδιο νόσου	ΥΜ	ΠΜ (Διάγνωση)	ΠΛ	ΠΜ σε CR
T λεμφοκύτταρα (%)	7,8 (±3,6)*	10,5 (±6,8)	13,2 (±8,9)	5,3 (±4,5)
ΝΚ/ΝΚΤ κύτταρα (%)	3,7 (±1,2)	3,4 (±1,9)	8,4 (±4,9)	2,0 (±2,7)
B λεμφοκύτταρα (%)	1,4 (±1,2)	1,3 (±1,5)	3,1 (±3,4)	2,4 (±1,7)
TAMs (%)	3,4 (±1,7)	3,3 (±1,6)	7,2 (±5,1)	3,7 (±2,4)
Ερυθροβλάστες (%)	1,6 (±1,6)	1,8 (±1,5)	2,7 (±2,4)	2,8 (±2,6)

* Διάμεση τιμή και τυπική απόκλιση. ΥΜ: υφέρπον μύελωμα, ΠΜ: πολλαπλούν μύελωμα, ΠΛ: πλασματοκυτταρική λευχαιμία, CR: πλήρης ύφεση, TAMs: μακροφάγα σχετιζόμενα με καρκίνο.



Εικόνα 3.13. Απεικόνιση των κύριων ανοσολογικών υποπληθυσμών του μυελού των οστών στα διάφορα στάδια εξέλιξης του Πολλαπλού Μυελώματος (ΠΜ). ΥΜ: υφέρπον μυέλωμα, ΠΛ: πλασματοκυτταρική λευχαιμία, CR: πλήρης ύφεση, TAMs: μακροφάγα σχετιζόμενα με τον καρκίνο. Τα επίπεδα εκφράζονται ως % ποσοστό επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων \pm την τυπική απόκλιση (SD) από $n=15$ ασθενείς για ΥΜ, $n=53$ για ΠΜ, $n=8$ για ΠΛ και $n=51$ για ΠΜ σε CR.

3.2.3 Σύγκριση ανοσολογικού προφίλ μυελού των οστών-περιφερικού αίματος

Η μεγάλη ετερογένεια που παρατηρήθηκε στην κατανομή των υποπληθυσμών στα διάφορα στάδια της νόσου, οδηγεί στην υπόθεση ότι συγκεκριμένες ανοσολογικές υπογραφές θα μπορούσαν να ανταποκρίνονται σε διακριτές κλινικές ομάδες αντικατοπτρίζοντας την κλινική ετερογένεια που παρατηρείται στο ΠΜ. Έτσι, στη συνέχεια της ανάλυσής μας στραφήκαμε στη διερεύνηση των κυτταρικών υποπληθυσμών σε επίπεδο ασθενούς και όχι κλινικού σταδίου. Σε πρώτο επίπεδο επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον των ασθενών τόσο στο ΜΟ όσο και στο ΠΑ, με σκοπό να αξιολογήσουμε εάν η ανοσολογική εικόνα που εντοπίζεται εντός του ΜΟ μπορεί να «καθρεπτίζεται» και στο ΠΑ. Εάν η υπόθεση αυτή είναι σωστή, τότε η διακριτή ανάλυση ΜΟ/ΠΑ θα ήταν περιττή. Για να δοθεί απάντηση στο ερώτημα αυτό, αναλύσαμε ζεύγη δειγμάτων

ΠΑ και ΜΟ των ίδιων ασθενών κατά τη διάγνωση (n=26) και κατά την πλήρη ύφεση της νόσου (n=25).

Κατά τη διάγνωση αναδείχθηκε ότι αρκετοί υποπληθυσμοί είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ΠΑ και ΜΟ στα ζεύγη δειγμάτων των ασθενών, όπως απεικονίζεται στα διαγράμματα της **Εικόνας 3.14**. Συγκεκριμένα, η σχετική συχνότητα των CD4+ T λεμφοκυττάρων επί των CD3+ T κυττάρων ήταν σημαντικά αυξημένη στο ΠΑ συγκριτικά με το ΜΟ (διάμεση τιμή 61,4% σε ΠΑ έναντι 51,1 σε ΜΟ, $p<0,001$). Ο βασικότερος λόγος αυτής της διαφοράς έγκειται στη σχετική αύξηση των παρθένων CD4+ T λεμφοκυττάρων επί των CD4+ T λεμφοκυττάρων στο ΠΑ (διάμεση τιμή 34,3% σε ΠΑ έναντι 28,4% σε ΜΟ, $p<0,01$). Παράλληλα, εξετάζοντας τα CD8+ T λεμφοκύτταρα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο ΠΑ συγκριτικά με το ΜΟ (διάμεση τιμή 36,8% σε ΠΑ επί των ολικών CD3+ T κυττάρων έναντι 46,5 σε ΜΟ, $p<0,001$) και όσον αφορά τις υποκατηγορίες των CD8+ T λεμφοκυττάρων υπήρξε αντίστοιχη μείωση των HLA-DR CD8+ ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων (διάμεση τιμή 7,3% επί των ολικών CD8+ T κυττάρων σε ΠΑ έναντι 11,9 σε ΜΟ, $p<0,001$). Όσο αφορά τα NK/NKT κύτταρα, βρέθηκαν σε αυξημένο ποσοστό στην περιφέρεια (διάμεση τιμή 4,4% επί των εμπύρηνων κυττάρων σε ΠΑ έναντι 3,2 σε ΜΟ, $p<0,01$), ενώ αντίστοιχη αύξηση παρατηρήθηκε και στα μονοκύτταρα (διάμεση τιμή 6,6% επί των εμπύρηνων κυττάρων σε ΠΑ έναντι 3,1 σε ΜΟ, $p<0,01$).

Τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (ως ενιαίος πληθυσμός Tregs) δεν φάνηκαν να έχουν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των δύο διαμερισμάτων. Η ανάλυση όμως των υποπληθυσμών τους ανέδειξε σημαντικές πληροφορίες. Στο ΜΟ βρέθηκαν αυξημένα ποσοστά δραστικών/CD4+ Tregs μνήμης (διάμεση τιμή 9,3% επί των ολικών Tregs σε ΠΑ έναντι 14,6 σε ΜΟ, $p<0,05$), αλλά και τελικών δραστικών Tregs (διάμεση τιμή 7,4% επί των ολικών Tregs σε ΠΑ έναντι 16,0% σε ΜΟ, $p<0,01$). Τέλος, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν και στα MDSCs, καθότι η σχετική συχνότητα των PMN-MDSCs και των M-MDSCs εμφανίστηκε αυξημένη στο ΠΑ (διάμεση τιμή 2,4% επί των μονοπύρηνων κυττάρων σε ΠΑ έναντι 9,8% σε ΜΟ, $p=0,03$ και 6,1% σε ΠΑ έναντι 10,1% σε ΜΟ, $p=0,04$, αντίστοιχα).

Στο στάδιο της CR παρατηρήθηκαν λιγότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές στους υποπληθυσμούς μεταξύ του ΠΑ και του ΜΟ. Οι μόνοι υποπληθυσμοί οι οποίοι διατήρησαν την ίδια κατανομή με τη διάγνωση, ήταν οι συνολικοί πληθυσμοί των CD4+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων (διάμεση τιμή 46,3% επί των CD3+ T κυττάρων σε ΠΑ έναντι 40,9% σε ΜΟ, $p<0,001$ και 43,8% σε ΠΑ έναντι 53,1% σε ΜΟ, $p<0,001$, αντίστοιχα).

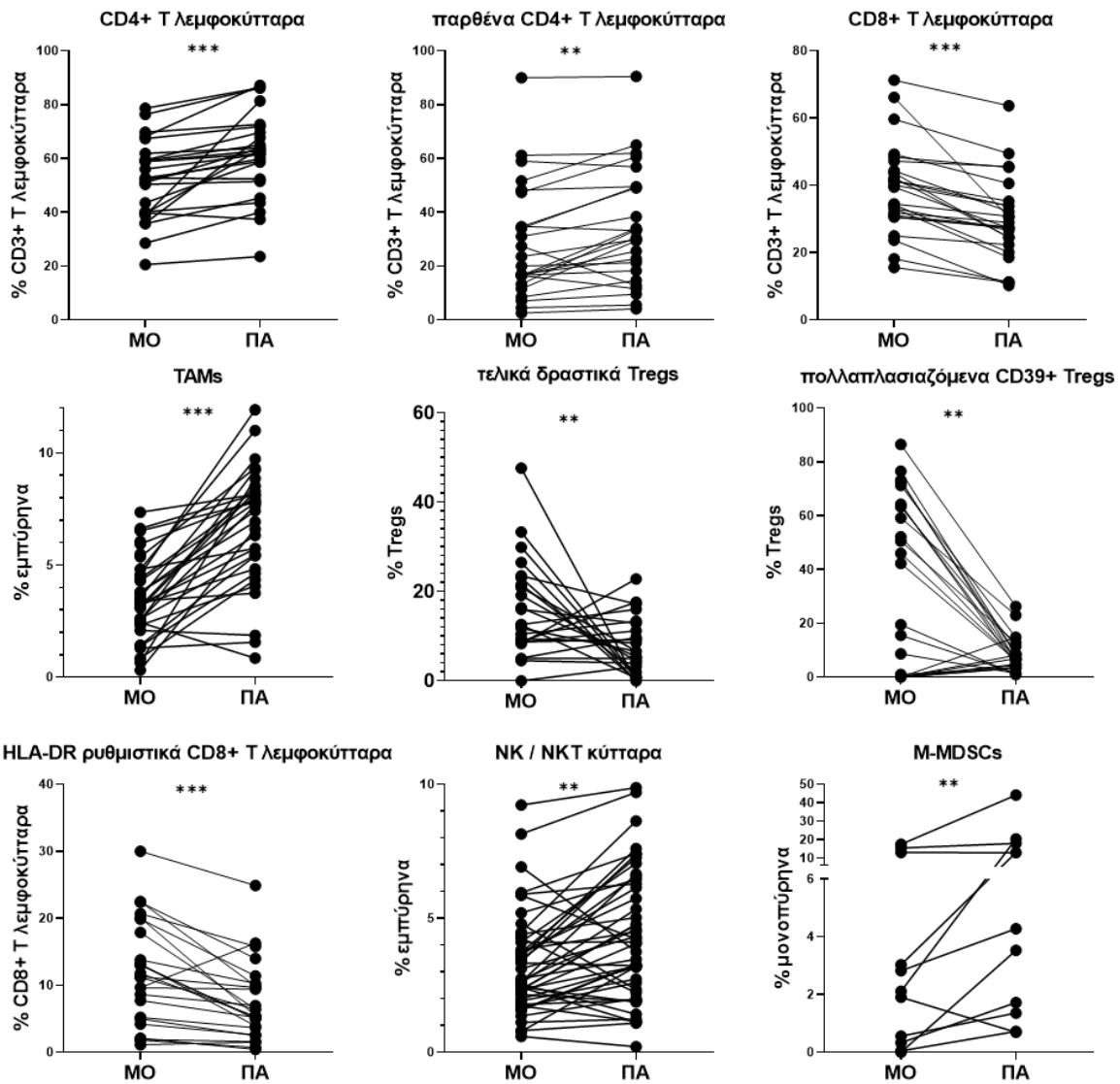
Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι το ποσοστό των πολλαπλασιαζόμενων παρθένων CD4+ T λεμφοκυττάρων επί των CD3+ T κυττάρων κατά την CR ήταν ανάστροφο από τη διάγνωση και

σημαντικά μεγαλύτερο στο ΠΑ συγκριτικά με το ΜΟ (διάγνωση: διάμεση τιμή 0,9% σε ΠΑ έναντι 0,6% σε ΜΟ, $p=0,014$, CR: 0,2% σε ΠΑ έναντι 0,3% σε ΜΟ, $p<0,01$).

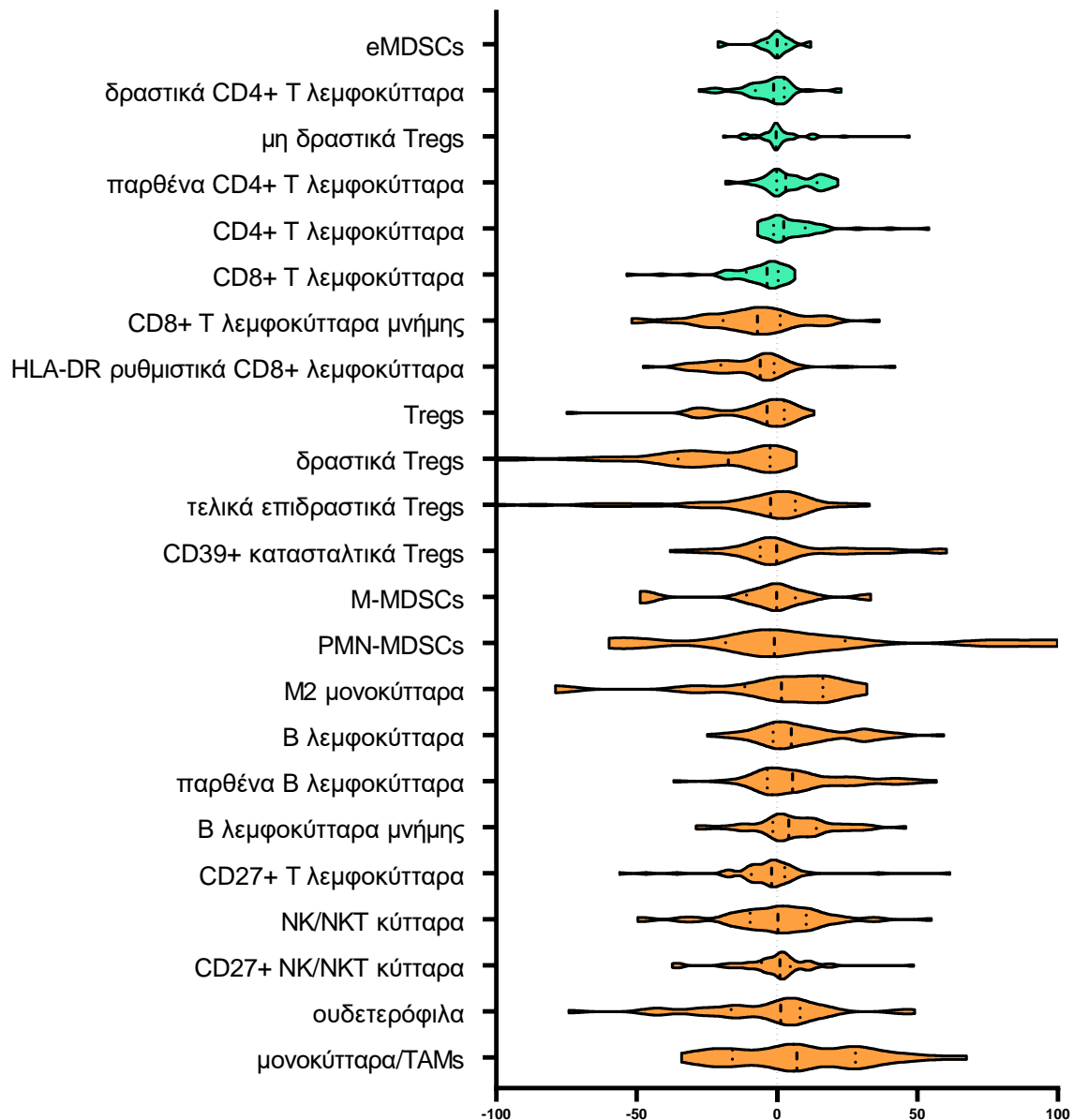
Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε ότι στο σύνολο των υποπληθυσμών δεν υπάρχει «καθρεπτισμός» του μικροπεριβάλλοντος του ΜΟ στο ΠΑ. Εντούτοις, η επιμέρους εξέταση της διαφοράς των σχετικών συχνοτήτων του κάθε υποπληθυσμού σε ΠΑ και ΜΟ μεταξύ των ασθενών, αποκάλυψε αδρά τρία είδη συσχετίσεων όπως περιγράφονται και στην **Εικόνα 3.15**:

- Διαφορές του υποπληθυσμού προς την ίδια κατεύθυνση (πχ μόνο αύξηση ή μόνο μείωση στο ΠΑ ή στο ΜΟ)
- Ελάχιστη διαφορά μεταξύ των δύο διαμερισμάτων και «καθρεπτισμός» του υποπληθυσμού σε ΜΟ και ΠΑ
- Διαφορές του υποπληθυσμού μεταξύ ΠΑ και ΜΟ ανάλογα με τον ασθενή, γεγονός που υποδεικνύει τη φυσική ετερογένεια της νόσου.

Οι σχετικές συχνότητες όλων των υποπληθυσμών σε ΠΑ και ΜΟ κατά τη διάγνωση και την πλήρη ύφεση αναφέρονται αναλυτικά στον **συμπληρωματικό πίνακα 1**.



Εικόνα 3.14. Σύγκριση ανά ζεύγη υποπληθυσμών κατά τη διάγνωση σε μυελό των οστών (MO) και περιφερικό αίμα (ΠΑ) των ίδιων ασθενών. Απεικονίζονται επιλεκτικά οι υποπληθυσμοί με τις εντονότερες διαφορές. Tregs: ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα, MDSCs: κατασταλτικά κύτταρα μυελογενούς προέλευσης, TAMs: μακροφάγα σχετιζόμενα με τον καρκίνο, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



Εικόνα 3.15. Απεικόνιση με ραβδογράμματα τύπου βιολιού (violin plots) της διαφοράς ανά ζεύγη (ΠΑ μείον ΜΟ, οριζόντιος άξονας) της κανονικοποιημένης σχετικής συχνότητας όλων των υποπληθυσμών κατά τη διάγνωση (n=26). Οι υποπληθυσμοί που τείνουν προς «καθρεπτισμό» είναι τοποθετημένοι στην κορυφή του διαγράμματος (πράσινο χρώμα). Tregs: ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα, MDSCs: κατασταλτικά κύτταρα μυελογενούς προέλευσης.

3.2.4. Το ανοσολογικό προφίλ στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα σε ομάδες ασθενών με διαφορετική πρόγνωση

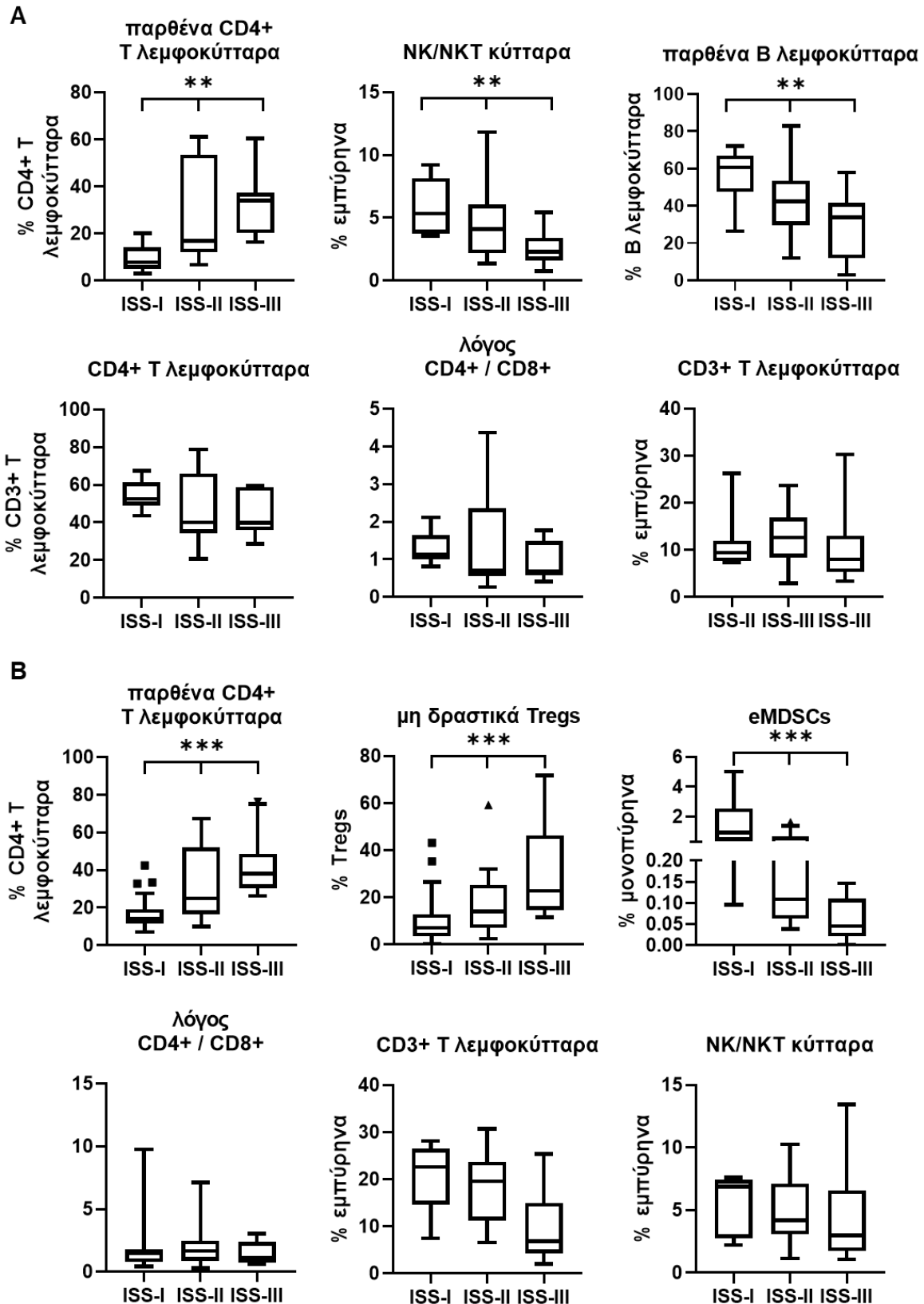
Στη συνέχεια, ακολουθώντας ξεχωριστές αναλύσεις για ΠΑ και ΜΟ διερευνήσαμε το μικροπεριβάλλον κατά τη διάγνωση για την αναζήτηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ διακριτών

κατανομών των κυτταρικών υποπληθυσμών σε ομάδες του ΠΜ με διαφορετική πρόγνωση. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε η κατηγοριοποίηση των ασθενών σύμφωνα με το ISS και τις κυτταρογενετικές πληροφορίες, όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα των κλινικών στοιχείων (**Ενότητα 3.2.1**).

Η ανάλυσή μας ανέδειξε σημαντικές διαφορές στο ανοσολογικό προφίλ των ασθενών που ανήκουν σε διαφορετικά κλινικά στάδια (**Εικόνα 3.16**). Συγκεκριμένα, η πιο εμφανής διαφοροποίηση παρατηρήθηκε στη σχετική συχνότητα των παρθένων CD4+ T λεμφοκυττάρων εμφανίζοντας σταδιακή αύξηση προς τις προγνωστικά πιο δυσμενείς ομάδες κατά ISS, τόσο στο ΠΑ όσο και στο ΜΟ (διάμεση τιμή σε ΜΟ: 7,9% επί των CD3+ T κυττάρων σε ISS-I έναντι 16,8% σε ISS-II έναντι 34,0% σε ISS-III, $p=0,004$, διάμεση τιμή σε ΠΑ: 13,9% σε ISS-I έναντι 24,9% σε ISS-II έναντι 38,1% σε ISS-III, $p<0,001$).

Όσον αφορά το ΜΟ, βρέθηκε σταδιακή ελάττωση του ποσοστού των NK/NKT προς το στάδιο ISS-III (διάμεση τιμή 5,3% επί των ολικών εμπύρηνων κυττάρων σε ISS-I έναντι 4,1% σε ISS-II έναντι 2,1% σε ISS-III, $p=0,006$). Η ίδια κατεύθυνση μεταβολής παρατηρήθηκε και στη σχετική κατανομή των παρθένων Β λεμφοκυττάρων επί του ολικού Β κυτταρικού πληθυσμού (διάμεση τιμή 60,6% σε ISS-I έναντι 42,3% σε ISS-II έναντι 33,7% σε ISS-III, $p=0,004$).

Στο ΠΑ παρατηρήθηκε διαφορετική κατανομή των κατασταλτικών ανοσολογικών υποπληθυσμών στα διάφορα στάδια ISS. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των συνολικών Tregs είχε αυξητική τάση προχωρώντας προς το ISS-III (διάμεση τιμή 0,7% επί των CD4+ λεμφοκυττάρων σε ISS-I έναντι 1,1% σε ISS-II έναντι 1,9% σε ISS-III, $p>0,05$), κάτι που αποδίδεται πιθανότατα στην ενίσχυση της σχετικής συχνότητας των μη δραστικών Tregs επί των συνολικών Tregs (διάμεση τιμή επί ολικών Tregs 7,0% σε ISS-I έναντι 14,1% σε ISS-II έναντι 22,8% σε ISS-III, $p<0,001$). Επίσης, παρά το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκαν διαφορές στη σχετική συχνότητα εμφάνισης των συνολικών MDSCs μεταξύ των διαφορετικών κλινικών σταδίων, τα άωρα κατασταλτικά κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης (eMDSCs) εμφάνισαν αυξημένο ποσοστό στην ομάδα χαμηλού κινδύνου ISS-I (διάμεση τιμή 0,9% επί των μονοπύρηνων κυττάρων σε ISS-I έναντι 0,1% σε ISS-II έναντι 0,04% σε ISS-III, $p<0,001$).

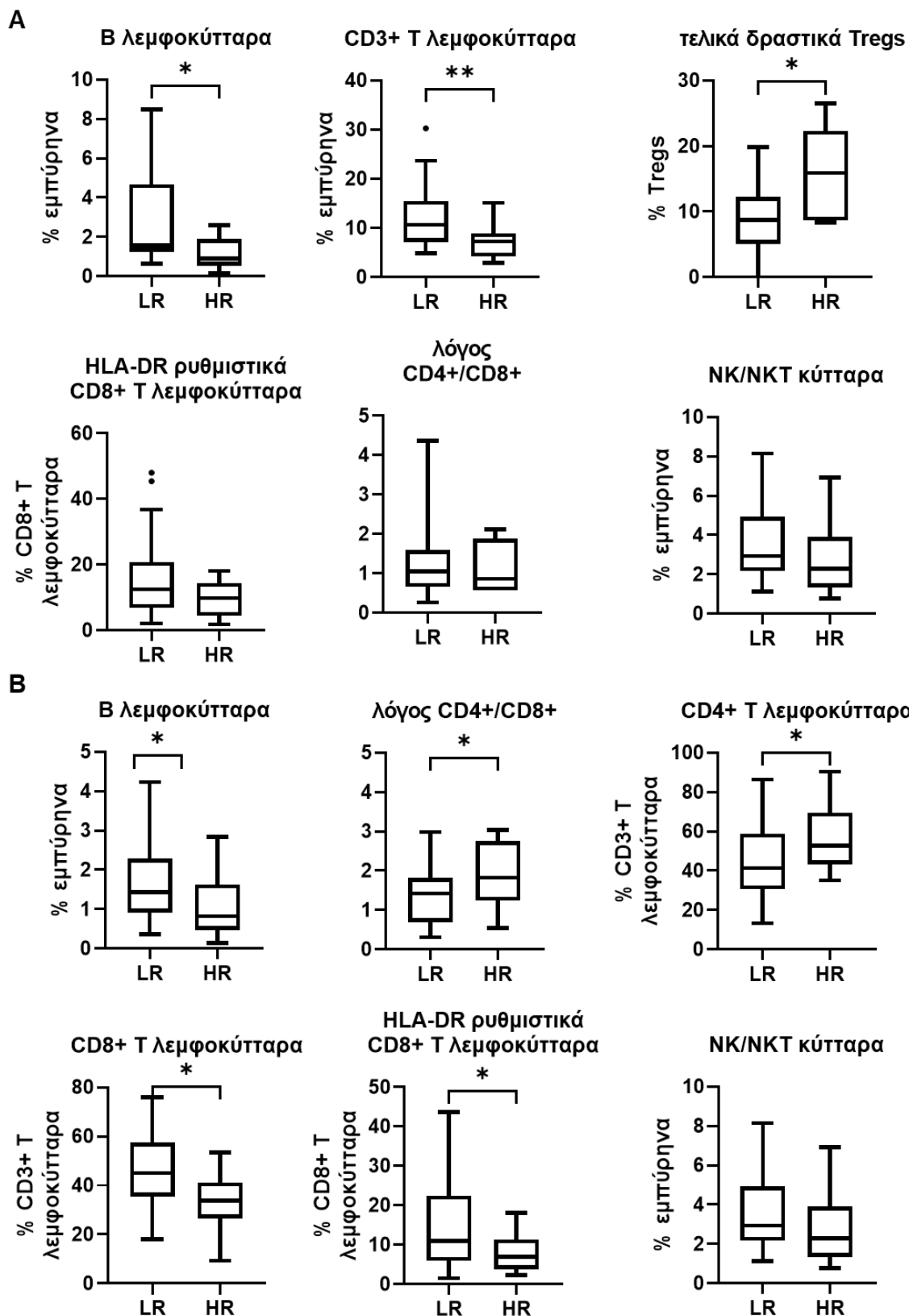


Εικόνα 3.16. Το ανοσολογικό προφίλ βάσει της κατάταξης του Διεθνούς Συστήματος Σταδιοποίησης (ISS) στο πολλαπλούν μυέλωμα (ISS-I έως ISS-III) κατά τη διάγνωση. (A) υποπληθυσμοί του μυελού των οστών και (B) υποπληθυσμοί περιφερικού αίματος. Tregs: ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα, eMDSCs: άωρα κατασταλτικά κύτταρα μυελογενούς προέλευσης. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Κατά την εξέταση του ανοσολογικού προφίλ με βάση την κυτταρογενετική ταξινόμηση, παρατηρήθηκαν συσχετίσεις διαφορετικών υποπληθυσμών συγκριτικά με τα προηγούμενα αποτελέσματα κατά ISS. Από όλους τους υποπληθυσμούς μόνο τα Β λεμφοκύτταρα είχαν κοινό πρότυπο κατανομής τόσο στο ΜΟ όσο και στο ΠΑ μεταξύ των κυτταρογενετικών ομάδων χαμηλού και υψηλού κινδύνου (LR και HR, αντίστοιχα) (ΜΟ: διάμεση τιμή 1,6% επί των εμπύρηνων κυττάρων σε LR έναντι 0,9% σε HR, $p=0,02$, ΠΑ: διάμεση τιμή 1,4% σε LR έναντι 0,8% σε HR, $p=0,04$).

Στην ανάλυση του ΜΟ βρέθηκε ότι η σχετική κατανομή των Τ κυττάρων παρουσίασε σημαντική μείωση στους ασθενείς υψηλού κινδύνου (διάμεση τιμή 10,7% επί των εμπύρηνων κυττάρων σε LR έναντι 7,3% σε HR, $p=0,007$). Αντιθέτως με το μητρικό πληθυσμό, τα τελικά δραστικά Tregs είχαν αυξημένα επίπεδα στους ασθενείς υψηλού κινδύνου (διάμεση τιμή 8,9% επί των ολικών Tregs σε LR έναντι 16,1% σε HR, $p=0,04$).

Εξετάζοντας το ΠΑ παρατηρήθηκε διαφορά στο λόγο CD4/CD8 Τ λεμφοκυττάρων, με αυξημένες τιμές στους ασθενείς υψηλού κινδύνου (διάμεση τιμή 1,4 σε LR έναντι 1,8 σε HR, $p=0,049$). Κάτι που πιθανά να εξηγεί μέρος αυτής της μεταβολής, είναι η σημαντική μείωση των HLA-DR CD8+ Τ λεμφοκυττάρων, σε αυτούς τους ασθενείς (διάμεση τιμή 10,9% επί των CD8+ Τ λεμφοκυττάρων σε LR έναντι 6,7% σε HR, $p=0,01$).



Εικόνα 3.17. Το ανοσολογικό προφίλ με βάση την κυτταρογενετική κατάταξη σε ασθενείς υψηλού (HR) και χαμηλού (LR) κινδύνου κατά τη διάγνωση. (A) υποπληθυσμοί του μυελού των οστών και (B) υποπληθυσμοί περιφερικού αίματος. Tregs: ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.2.5. Η ανοσολογική υπογραφή κατά τη διάγνωση του πολλαπλού μυελώματος επηρεάζει το αποτέλεσμα της θεραπείας

Η ενδογενής ετερογένεια στο ΠΜ καθιστά την κατηγοριοποίηση των ασθενών σε καλά καθορισμένες προγνωστικές ομάδες ιδιαίτερως σημαντική, καθότι αυτό θα μπορεί να κατευθύνει την επιλογή του βέλτιστου θεραπευτικού σχήματος. Τα τρέχοντα προγνωστικά συστήματα βασισμένα κυρίως σε βιοχημικούς (ή και κυτταρογενετικούς) προσδιορισμούς δεν μπορούν να προβλέψουν πλήρως την ανταπόκριση στη θεραπεία. Στην παρούσα διατριβή, έχοντας ως δεδομένο ότι η ομάδα των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών έλαβε όμοια εισαγωγική θεραπεία με VRd, επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσο το ανοσολογικό προφίλ στο στάδιο της διάγνωσης μπορεί να συσχετίζεται με το επίπεδο ανταπόκρισης στη θεραπεία.

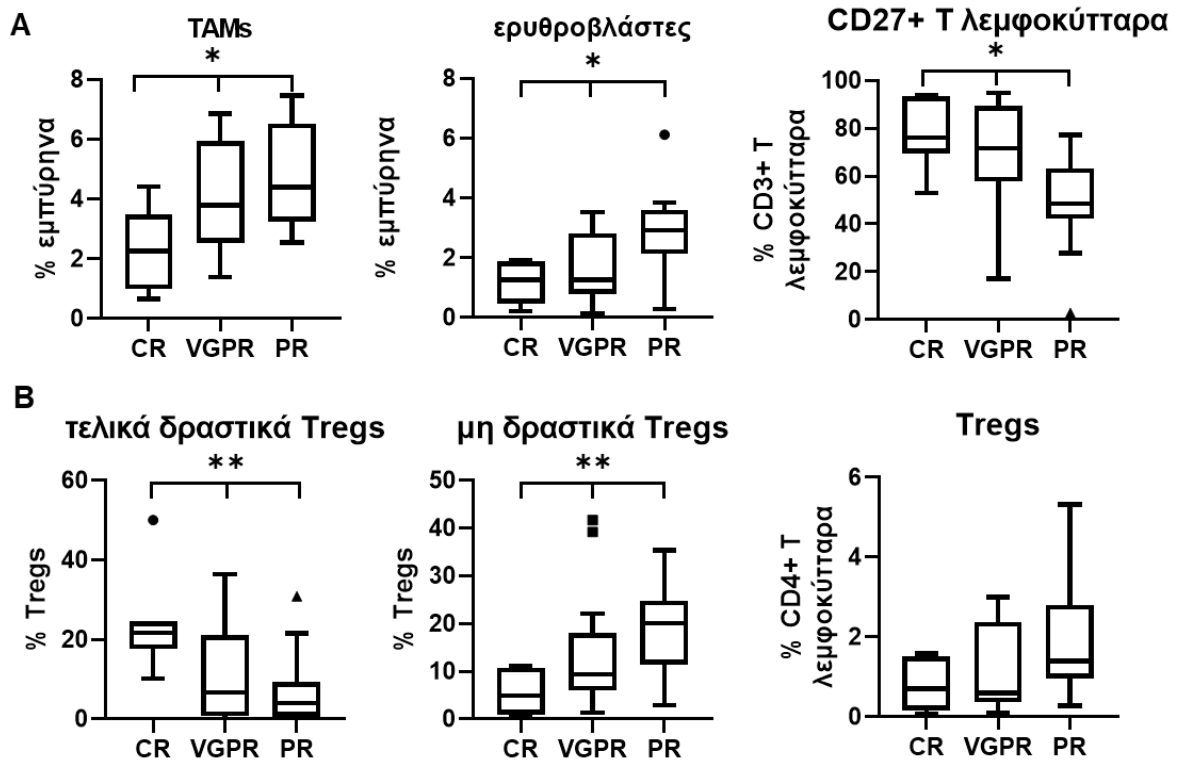
Όσον αφορά το MO, στην ανάλυση συμπεριλήφθησαν 38 νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς από το αρχαικό υλικό για τους οποίους ήταν γνωστό το αποτέλεσμα ανταπόκρισης στην εισαγωγική θεραπεία με VRd: 12 ασθενείς πέτυχαν CR, 15 VGPR και 11 PR. Η ανάλυση των υποπληθυσμών με βάση την απάντηση στη θεραπεία ανέδειξε συσχετισμούς με πιθανή προγνωστική αξία, όπως απεικονίζεται στα διαγράμματα της **Εικόνας 3.18**. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς που πέτυχαν CR, εμφάνισαν στο MO αυξημένα ποσοστά TAMs (διάμεση τιμή 2,3% επί των εμπύρηνων κυττάρων σε CR έναντι 3,8% σε VGPR έναντι 4,4% σε PR, $p=0,04$) και ερυθροβλαστών (διάμεση τιμή 1,3% επί των εμπύρηνων κυττάρων σε CR έναντι 1,3% σε VGPR έναντι 2,9% σε PR, $p=0,02$), αλλά μειωμένα ποσοστά των CD27+ T λεμφοκυττάρων επί των ολικών CD3+ T κυττάρων (διάμεση τιμή 76,0% σε CR έναντι 71,7% σε VGPR έναντι 48,6% σε PR, $p=0,015$).

Στο ΠΑ αναδείχθηκαν συσχετισμοί μεταξύ της κατανομής των υποπληθυσμών των Tregs και το αποτέλεσμα της θεραπείας σε ανάλυση 40 ασθενών, εκ των οποίων 7 πέτυχαν CR, 17 VGPR και 16 PR μετά από εισαγωγική θεραπεία VRd. Οι ασθενείς με τη χειρότερη ανταπόκριση (PR) εμφάνισαν μεγαλύτερα ποσοστά ολικών Tregs, χωρίς ωστόσο οι διαφορές με τις υπόλοιπες ομάδες να είναι στατιστικά σημαντικές (διάμεση τιμή 0,7% επί ολικών CD4+ T κυττάρων σε CR έναντι 0,6% σε VGPR έναντι 1,4% σε PR, $p=0,06$). Η ανάλυση ωστόσο των υποπληθυσμών των Tregs ανέδειξε τους εξής συσχετισμούς: τα τελικά δραστικά Tregs βρέθηκαν σε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά στους ασθενείς με CR (διάμεση τιμή 21,7% επί των ολικών Tregs σε CR έναντι 6,7% σε VGPR έναντι 3,4% σε PR, $p=0,008$). Αυτή η αυξομείωση βέβαια έγινε εις βάρος των μη δραστικών Tregs που βρέθηκαν σε σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό στους ασθενείς σε CR (διάμεση τιμή 4,9% επί των ολικών Tregs σε CR έναντι 9,3% σε VGPR έναντι 20,1% σε PR, $p=0,007$), (**Εικόνα 3.18**).

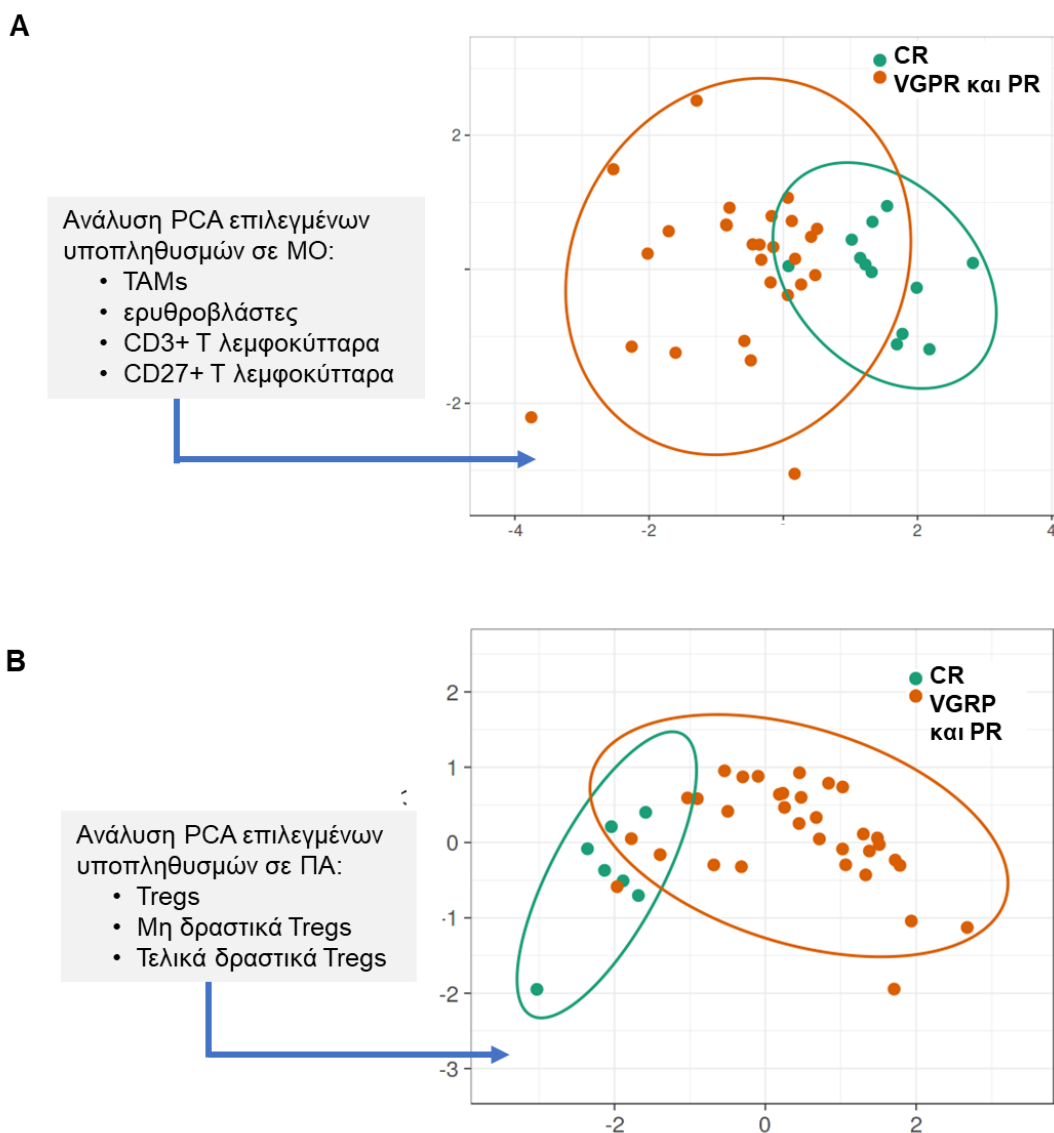
Κατά τη διαδικασία της ανάλυσης, πέρα από τη σύγκριση των σχετικών συχνοτήτων των μεμονωμένων υποπληθυσμών, προχωρήσαμε σε ανάλυση PCA με σκοπό να διερευνήσουμε εάν η ομαδοποίηση των υποπληθυσμών (ως μεταβλητές) μπορεί να προσδώσει μια ανοσολογική υπογραφή, η οποία να διαχωρίζει/προβλέπει τους ασθενείς που επιτυγχάνουν CR. Με την ανάλυση PCA γίνεται αναπαράσταση ενός συνόλου αρχικών μεταβλητών μέσα από ένα διαφορετικό σύνολο νέων μεταβλητών οι οποίες προκύπτουν από το γραμμικό συνδυασμό τους. Έτσι βρίσκεται ένα νέο σύστημα συντεταγμένων που αναπαριστά με πιο συμπαγή τρόπο τα αρχικά δεδομένα και οι νέοι άξονες καθορίζουν τις κατευθύνσεις που παρουσιάζουν τις μέγιστες μεταβολές των δεδομένων. Η μετάβαση στις νέες μεταβλητές πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε, η πρώτη συνιστώσα να εξηγεί τη μέγιστη δυνατή διακύμανση που αναπτύσσεται μεταξύ των αρχικών μεταβλητών, η δεύτερη, μη συσχετιζόμενη με την πρώτη, να εξηγεί ένα σημαντικό μέρος αυτής αλλά πάντα μικρότερο της πρώτη και ούτω καθεξής.

Στο MO επιλέξαμε την ομαδοποίηση με βάση τα TAMs, τους ερυθροβλάστες, τα CD3+ T λεμφοκύτταρα και τα CD27+ T λεμφοκύτταρα, εισάγοντας στην ανάλυση το ποσοστό έκφρασης αυτών των πληθυσμών για όλους τους ασθενείς. Η PCA ανάλυση ανέδειξε την ομαδοποίηση των ασθενών σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την απάντησή τους στη θεραπεία, στην κατηγορία των ασθενών που πέτυχαν CR και στην κατηγορία αυτών που δεν πέτυχαν CR (PR+VGPR σαν ενιαία κατηγορία). Συνεπώς, όπως παρουσιάζεται και στην **Εικόνα 3.19**, με την ανάλυση PCA οι δύο κύριες συνιστώσες διαχώρισαν τις δύο ομάδες ασθενών, CR και VGPR+PR αιτιολογώντας το 48,2% και το 26,1% της διακύμανσης, αντίστοιχα.

Για τα δείγματα ΠΑ ακολουθήθηκε η ίδια κατηγοριοποίηση ασθενών, αλλά οι υποπληθυσμοί που ομαδοποιήθηκαν ήταν τα Tregs, τα μη δραστικά Tregs και τα τελικά δραστικά Tregs. Οι δύο κύριες συνιστώσες διαχώρισαν τις δύο ομάδες ασθενών αιτιολογώντας το 68,9% και το 16,4% της διακύμανσης, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.18. Κατανομή επιλεγμένων κυτταρικών υποπληθυσμών στο μυελό των οστών (A) και το περιφερικό αίμα (B) ως προς την απάντηση στην εισαγωγική θεραπεία. CR: πλήρης ύφεση, VGPR: πολύ καλή μερική απάντηση, PR: μερική απάντηση, Tregs: ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα, TAMs: μακροφάγα σχετιζόμενα με τον καρκίνο, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



Εικόνα 3.19. Με την ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), για επιλεγμένους υποπληθυσμούς σε μυελό των οστών (A) και περιφερικό αίμα (B) γίνεται διαχωρισμός των ασθενών σε ομάδες σύμφωνα με την απάντηση στην εισαγωγική θεραπεία. ΜΟ: μυελός των οστών, ΠΑ: περιφερικό αίμα, Tregs: ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα, TAMs: μακροφάγα σχετιζόμενα με τον καρκίνο, CR: πλήρης ύφεση, VGPR: πολύ καλή μερική απάντηση, PR: μερική απάντηση.

3.2.6 Το ανοσολογικό προφίλ του μυελού των οστών κατά την πλήρη ύφεση συσχετίζεται με την παρουσία ελάχιστης υπολειμματικής νόσου

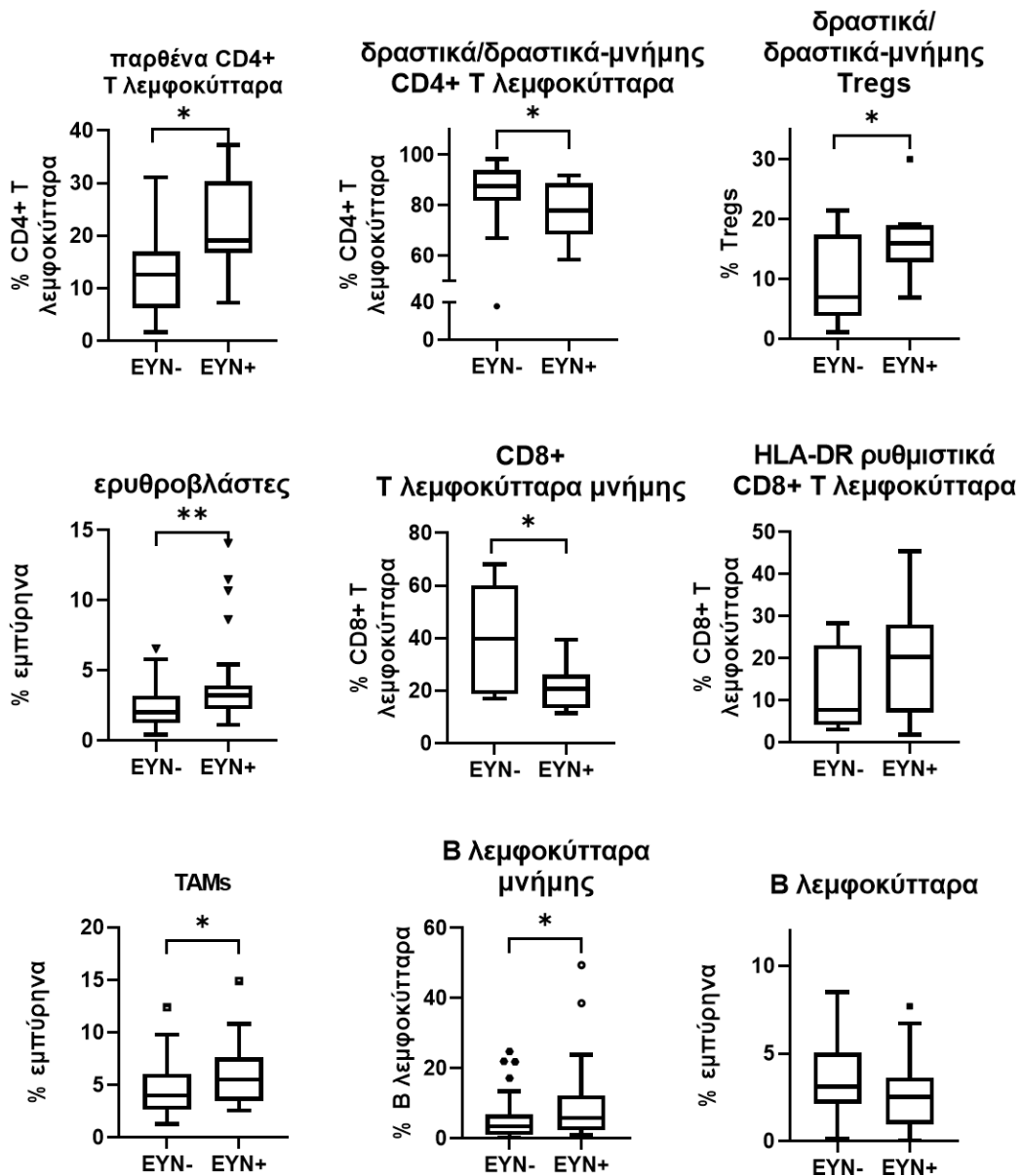
Η εκτίμηση της EYN, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, θεωρείται πλέον ως ο ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας στο ΠΜ, προσφέροντας σημαντική πληροφόρηση σχετικά με το βάθος

της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Η εκτίμηση της EYN αξιοποιείται πλέον ως τελικό σημείο σε κλινικές μελέτες, αλλά και η έγκαιρη ενημέρωση των ιατρών για την παρουσία EYN μπορεί να σηματοδοτήσει εναλλακτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις με στόχο την επίτευξη βαθιάς ανταπόκρισης (Landgren et al., 2018; Kostopoulos et al., 2020). Επομένως, η εκτίμηση της EYN χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη (Landgren et al., 2016; Munshi et al., 2017), ωστόσο, η βιολογία πίσω από την παρουσία ή μη EYN καθώς και το ανοσολογικό προφίλ σε αυτές τις καταστάσεις δεν έχουν μελετηθεί ακόμη επαρκώς. Λαμβάνοντας υπόψιν τη σημαντικότητα της EYN στο ΠΜ, θελήσαμε να διερευνήσουμε το ανοσολογικό προφίλ στο μικροπεριβάλλον του ΜΟ, συνδυάζοντάς το με τα αποτελέσματα της ανάλυσης για την παρουσία EYN, σύμφωνα με το πρότυπο του EuroFlow που εφαρμόζεται στο εργαστήριό μας. Σε ένα σύνολο 36 ασθενών σε πλήρη ύφεση και με διαθέσιμα δείγματα ΜΟ και ΠΑ, ο έλεγχος για EYN κατέδειξε 20 ασθενείς με αρνητική EYN σε επίπεδο κάτω του 2×10^{-6} και 16 ασθενείς με θετική EYN, δηλαδή παρουσία κλωνικών μυελωματικών κυττάρων με επίπεδο θετικότητας $10^{-4} - 3 \times 10^{-6}$. Σε αυτή την ενότητα εξετάσαμε την αξιολόγηση του μικροπεριβάλλοντος του ΜΟ των οστών συναρτήσει της παρουσίας EYN και στην επόμενη, την ανάλυση του μικροπεριβάλλοντος στο ΠΑ.

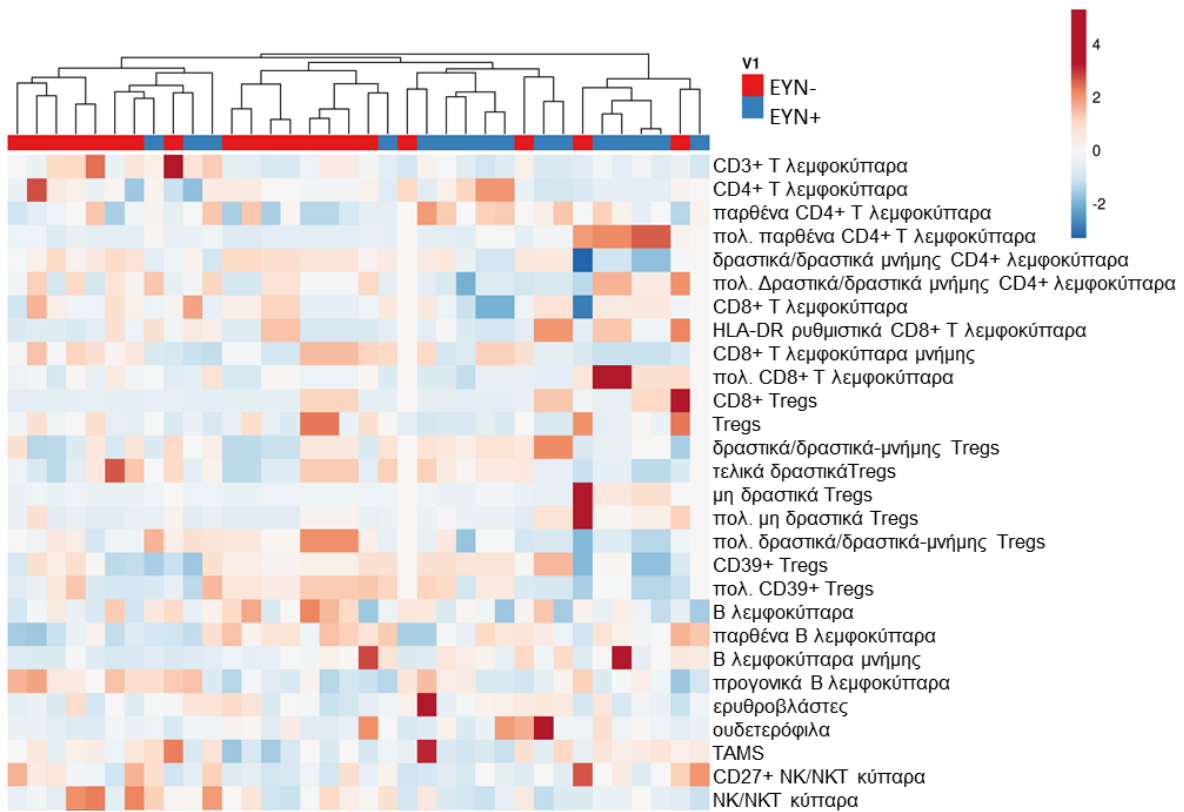
Σε επίπεδο μεμονωμένων υποπληθυσμών παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε υποπληθυσμούς μεταξύ EYN θετικών (EYN+) και αρνητικών (EYN-) ασθενών (**Εικόνα 3.20**). Τα παρθένα CD4+ T λεμφοκύτταρα είχαν τη μεγαλύτερη απόκλιση, με σημαντικά μειωμένη συχνότητα εμφάνισης στους EYN- ασθενείς (διάμεση τιμή 12,6% επί των CD4+ T λεμφοκυττάρων σε EYN- έναντι 19,1% σε EYN+, $p=0,014$). Επίσης, το ποσοστό των B λεμφοκυττάρων μνήμης ήταν σημαντικά μειωμένο στους EYN- ασθενείς (διάμεση τιμή 3,3% επί των B λεμφοκυττάρων σε EYN- έναντι 5,7% σε EYN+, $p=0,04$), όπως και το ποσοστό των δραστικών Tregs (διάμεση τιμή 7,0% επί των Tregs σε EYN- έναντι 16,0% σε EYN+, $p=0,04$), το ποσοστό των TAMs (διάμεση τιμή 4,0% επί των εμπύρηνων κυττάρων σε EYN- έναντι 5,5% σε EYN+, $p=0,03$), αλλά και των ερυθροβλαστών (διάμεση τιμή 2,0% επί των εμπύρηνων κυττάρων σε EYN- έναντι 3,2% σε EYN+, $p=0,006$). Από την άλλη πλευρά, οι EYN+ ασθενείς είχαν μειωμένα ποσοστά δραστικών/CD4+ T κυττάρων μνήμης (διάμεση τιμή 87,6% επί των CD4+ T κυττάρων σε EYN- έναντι 77,9% σε EYN+, $p=0,04$) και CD8+ T κυττάρων μνήμης (διάμεση τιμή 39,8% επί των CD8+ T κυττάρων σε EYN- έναντι 20,7% σε EYN+, $p=0,016$).

Στη συνέχεια, θελήσαμε να μελετήσουμε το κατά πόσο το σύνολο των υποπληθυσμών που ανιχνεύθηκαν μπορούν να συγκροτήσουν διακριτές ανοσολογικές υπογραφές μεταξύ των EYN+ και EYN- ασθενών. Για το σκοπό αυτό, οι τιμές των σχετικών συχνοτήτων όλων των υποπληθυσμών για το σύνολο των 36 ασθενών μαζί με την πληροφορία του αποτελέσματος ελέγχου της EYN εισήχθησαν σε μοντέλο ανεπίβλεπτης ιεραρχικής ταξινόμησης (unsupervised hierarchical clustering) (Metsalu and Vilo, 2015). Οι τιμές της σχετικής έκφρασης για κάθε υποπληθυσμό και για κάθε

ασθενή, συσχετίσθηκαν με την ύπαρξη EYN και τα αποτελέσματα της συσχέτισης απεικονίζονται ως θερμικός χάρτης (heatmap) στην **Εικόνα 3.21**. Ο αλγόριθμος ανεπίβλεπτης ιεραρχικής ταξινόμησης στη συνέχεια, ιεράρχησε τους πιο συγγενικούς ανοσοφαινότυπους, χωρίς να λαμβάνει υπόψιν το αποτέλεσμα EYN. Η ιεράρχηση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την ενιαία ομαδοποίηση της πλειοψηφίας των ασθενών με το ίδιο αποτέλεσμα EYN με ποσοστό επιτυχίας 78% (28/36 ασθενείς).



Εικόνα 3.20. Κατανομή επιλεγμένων υποπληθυσμών στο μυελό των οστών συγκριτικά με την παρουσία ή απουσία ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (EYN). TAMs: μακροφάγα σχετιζόμενα με τον καρκίνο, Tregs: ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



Εικόνα 3.21. Θερμικός χάρτης (*heatmap*) στον οποίο απεικονίζονται οι συσχετίσεις όλων των υποπληθυσμών με την παρουσία ή απουσία ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (EYN). Κάθε στήλη απεικονίζει έναν ασθενή ενώ κάθε σειρά έναν υποπληθυσμό. Το χρώμα υποδεικνύει την τιμή του δείκτη συσχέτισης σύμφωνα με την κλίμακα (άνω δεξιά). Η διάταξη των στηλών (ασθενών) είναι το αποτέλεσμα του αλγόριθμου ανεπίβλεπτης ιεραρχικής ταξινόμησης, ο οποίος ομαδοποιεί τα δείγματα με τη μεγαλύτερη «ανοσοφαινοτυπική συγγένεια».

3.2.7 Το ανοσολογικό προφίλ του περιφερικού αίματος κατά την πλήρη ύφεση και συσχετισμός με παρουσία ελάχιστης υπολειμματικής νόσου

Η αναζήτηση της EYN στο ΠΜ, γίνεται και κατά πάσα πιθανότητα θα εξακολουθεί να γίνεται με λήψη δείγματος ΜΟ. Αυτό συμβαίνει γιατί στο ΠΑ, αντίθετα με το ΜΟ, υπάρχουν ελάχιστα κυκλοφορούντα μυελωματικά κύτταρα. Κατά συνέπεια, παρά την πρόοδο και την αύξηση της ευαισθησίας των τεχνικών και μεθοδολογιών ανάλυσης, η λήψη περιφερικού αίματος, ή αλλιώς η υγρή βιοψία, δεν μπορεί τη δεδομένη στιγμή να αντικαταστήσει την επεμβατική για το νοσηλευτικό προσωπικό και επίπονη για τον ασθενή, λήψη δείγματος ΜΟ. Δεδομένων των περιορισμών αυτών, καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική η αναγνώριση βιοδεικτών οι οποίοι να δύνανται να προβλέψουν την EYN από την υγρή βιοψία, ή αλλιώς να μπορούν να προβλέψουν το κατά πόσο είναι

απαραίτητη η λήψη δείγματος ΜΟ. Υπό το σκεπτικό αυτό, προσπαθήσαμε να αξιολογήσουμε αν το ανοσολογικό προφίλ του περιφερικού αίματος των ασθενών με ΠΜ μετά τη θεραπεία θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει την παρουσία ή απουσία ΕΥΝ στο ΜΟ. Έτσι, στο επόμενο βήμα εξετάσαμε το ανοσολογικό προφίλ του περιφερικού αίματος των ασθενών που περιεγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα, και το συσχετίσαμε με το αποτέλεσμα της ΕΥΝ από τον έλεγχο του ΜΟ.

Σε επίπεδο μεμονωμένων υποπληθυσμών παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ ΕΥΝ θετικών (ΕΥΝ+) και αρνητικών (ΕΥΝ-) ασθενών όπως απεικονίζεται στα διαγράμματα της **Εικόνας 3.22**. Το ποσοστό των παρθένων CD4+ Τ λεμφοκυττάρων βρέθηκε σημαντικά μειωμένο στους ΕΥΝ- ασθενείς (διάμεση τιμή 11,8% επί των CD4+ λεμφοκυττάρων σε ΕΥΝ- έναντι 18,8% σε ΕΥΝ+, $p=0,015$), ενώ αντίστοιχα, στον άξονα ωρίμανσης CD45RA/RO, το ποσοστό των δραστικών/CD4+ Τ λεμφοκυττάρων μνήμης βρέθηκε σημαντικά αυξημένο στους ΕΥΝ- ασθενείς (διάμεση τιμή 90,6% επί των CD4+ Τ λεμφοκυττάρων σε ΕΥΝ- έναντι 78,5% σε ΕΥΝ+, $p=0,015$). Επιπρόσθετα, η σχετική συχνότητα των CD8+ Τ λεμφοκυττάρων μνήμης καθώς και των Tregs βρέθηκαν ενισχυμένες στους ΕΥΝ- ασθενείς, αν και με μη στατιστικά σημαντική διαφορά (CD8+ Τ κύτταρα μνήμης: διάμεση τιμή 42,2% επί των εμπύρηνων σε ΕΥΝ- έναντι 24,1% σε ΕΥΝ+, $p>0,05$, Tregs: διάμεση τιμή 2,0% επί των CD4 Τ κυττάρων σε ΕΥΝ- έναντι 1,3% σε ΕΥΝ+, $p>0,05$, αντίστοιχα).

Σε επίπεδο ομαδοποίησης υποπληθυσμών, πραγματοποιήσαμε ανάλυση PCA με σκοπό να διερευνήσουμε εάν διακριτές ανοσολογικές υπογραφές στο ΠΑ, μπορούν να διαχωρίσουν τους ασθενείς ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι ΕΥΝ. Αρχικά, επιλέξαμε την ομαδοποίηση με βάση όλους τους εντοπιζόμενους υποπληθυσμούς με σκοπό να διερευνήσουμε αν υπάρχει κάποια κοινή συνισταμένη στις ποσοτώσεις των υποπληθυσμών που να σχετίζεται με το αποτέλεσμα της ΕΥΝ. Οι δύο κύριες συνιστώσες διαχώρισαν τις δύο ομάδες ασθενών αιτιολογώντας το 50,4% και το 26,1% της διακύμανσης, αντίστοιχα. Καθότι ένας τέτοιος διαχωρισμός δεν ήταν ικανοποιητικός, επαναλάβαμε την ανάλυση PCA εισάγοντας μόνο τους υποπληθυσμούς που είχαν την πιο διακριτή κατανομή μεταξύ των δύο ομάδων ΕΥΝ και συγκεκριμένα, τα παρθένα CD4+ Τ λεμφοκύτταρα, τα δραστικά/δραστικά-μνήμης CD4+ Τ λεμφοκύτταρα και τα CD8+ Τ λεμφοκύτταρα μνήμης. Κατά τη δεύτερη ανάλυση PCA οι δύο κύριες συνιστώσες διαχώρισαν τις δύο ομάδες ασθενών αιτιολογώντας το 65,8% και το 29,1% της διακύμανσης, αντίστοιχα (**Εικόνα 3.23**).

Η εισαγωγή των τριών αυτών κυτταρικών υποπληθυσμών στο PCA μοντέλο παρέχει μία ένδειξη ανοσολογικής υπογραφής στο ΠΑ σχετιζόμενης με το αποτέλεσμα της ΕΥΝ, ωστόσο επιδιώξαμε τη συνέχιση της ανάλυσης με σκοπό την κατασκευή ενός αλγόριθμου, ο οποίος με στοιχεία εισαγωγής τα ποσοστά έκφρασης συγκεκριμένων υποπληθυσμών του ΠΑ να μπορεί να

προβλέπει πιο αποτελεσματικά την παρουσία EYN στο MO. Η κλινική σημασία αυτού του αλγόριθμου θα μπορούσε να είναι ο καλύτερος προγραμματισμός της επόμενης βιοψίας MO για την εκτίμηση της EYN. Στην προσπάθεια αυτή, επιλέξαμε μόνο τους δύο υποπληθυσμούς με σημαντική διαφορά κατανομής ανάλογα με την ύπαρξη EYN: τα παρθένα CD4+ T λεμφοκύτταρα και τα δραστικά/δραστικά-μνήμης CD4+ T λεμφοκύτταρα. Στη συνέχεια, ορίζοντας ως θετικό αποτέλεσμα την ύπαρξη EYN και ως αρνητικό το αντίθετο, εκτελέστηκε ανάλυση πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης και κατασκευάστηκε καμπύλη ROC (receiver operator curve) (**Εικόνα 3.24 A**). Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (Area under the curve, AUC) ήταν 80%, η θετική προγνωστική αξία (positive predictive value, PPV) 84% και η αρνητική προγνωστική αξία (negative predictive value, NPV) 78%. Τέλος, η εξίσωση πιθανοτήτων από την οποία προκύπτει η πιθανότητα πρόβλεψης της EYN από κάθε δείγμα (**Εικόνα 3.24 B**) ήταν:

$$\text{Logit}[P(Y=1)] = 23,6 - 0,05 \times [\text{παρθένα CD4+ T λεμφοκύτταρα}] - 0,3 \times [\text{δραστικά/δραστικά-μνήμης CD4+ T λεμφοκύτταρα}]$$

(Όπου Logit[P], λογάριθμος της πιθανότητας πρόβλεψης ύπαρξης EYN)

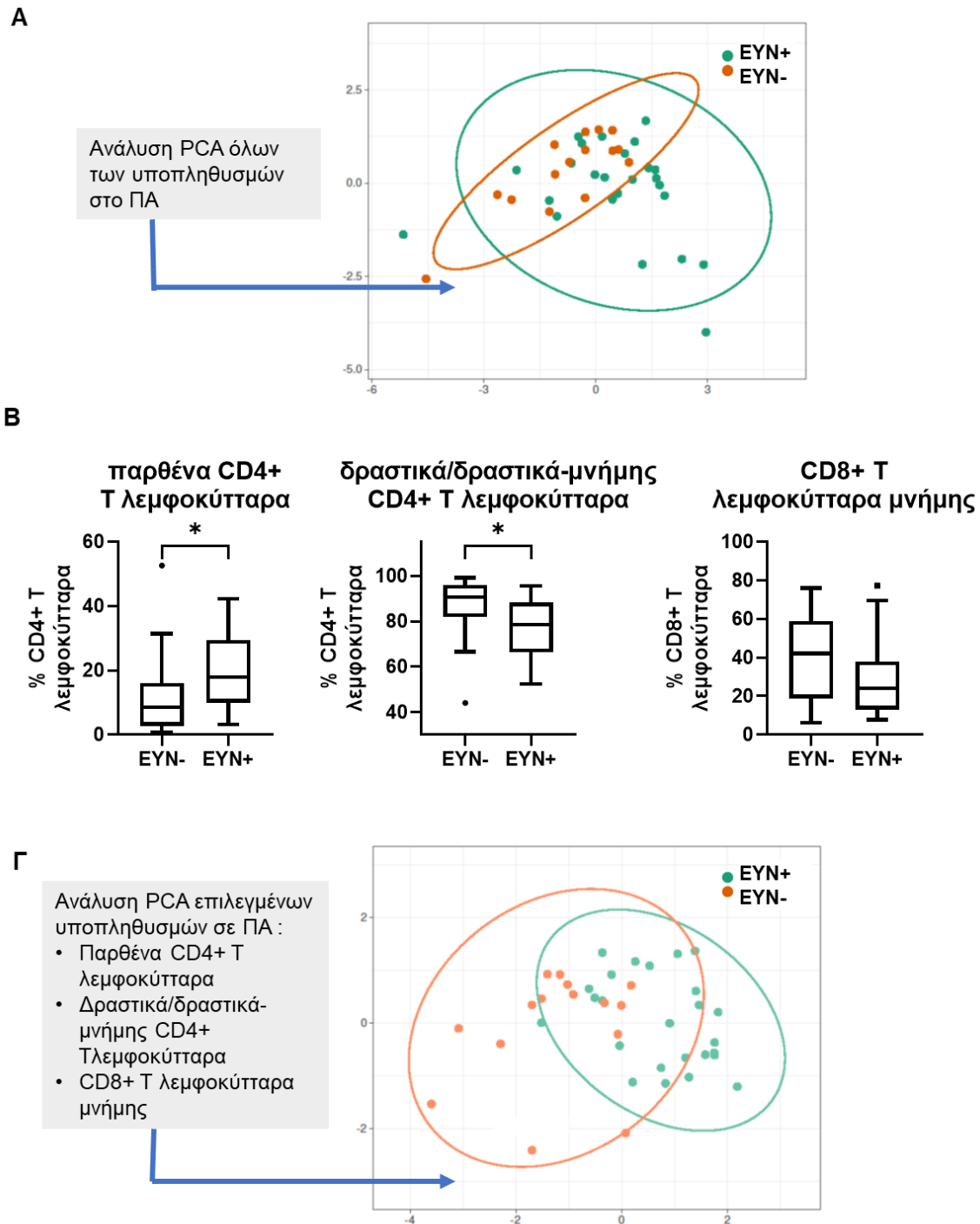
Με βάση τα ζεύγη τιμών των παρθένων CD4+ και δραστικών/δραστικών-μνήμης CD4+ λεμφοκυττάρων και την ευαισθησία και ειδικότητα που επιτυγχάνεται κατά την πρόβλεψη της EYN σύμφωνα με την καμπύλη ROC, επιλέξαμε συγκεκριμένες τιμές ορίων (cut-off) με σκοπό τα βέλτιστα χαρακτηριστικά απόδοσης της πρόβλεψης. Βασικός στόχος στην επιλογή ήταν το μικρότερο ποσοστό ψευδώς αρνητικών προβλέψεων. Ο λόγος που εστιαστήκαμε στην αποφυγή των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, δηλαδή στη μεγαλύτερη δυνατή αρνητική προγνωστική αξία, είναι ότι ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα του αλγόριθμου θα ενημερώνει για τη μη ύπαρξη EYN στο MO και μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή καθυστέρηση της επόμενης βιοψίας MO, κάτι που μπορεί να έχει συνέπειες στην αύξηση του φορτίου της νόσου ενώ θα μπορούσε να έχει αποφευχθεί με την κατάλληλη θεραπευτική παρέμβαση.

Ο προτεινόμενος αλγόριθμος στον οποίο καταλήξαμε αποτελείται από ένα απλό σύστημα αξιολόγησης των σχετικών συχνοτήτων των παρθένων CD4+ T λεμφοκυττάρων και των δραστικών/δραστικών-μνήμης CD4+ T λεμφοκυττάρων.

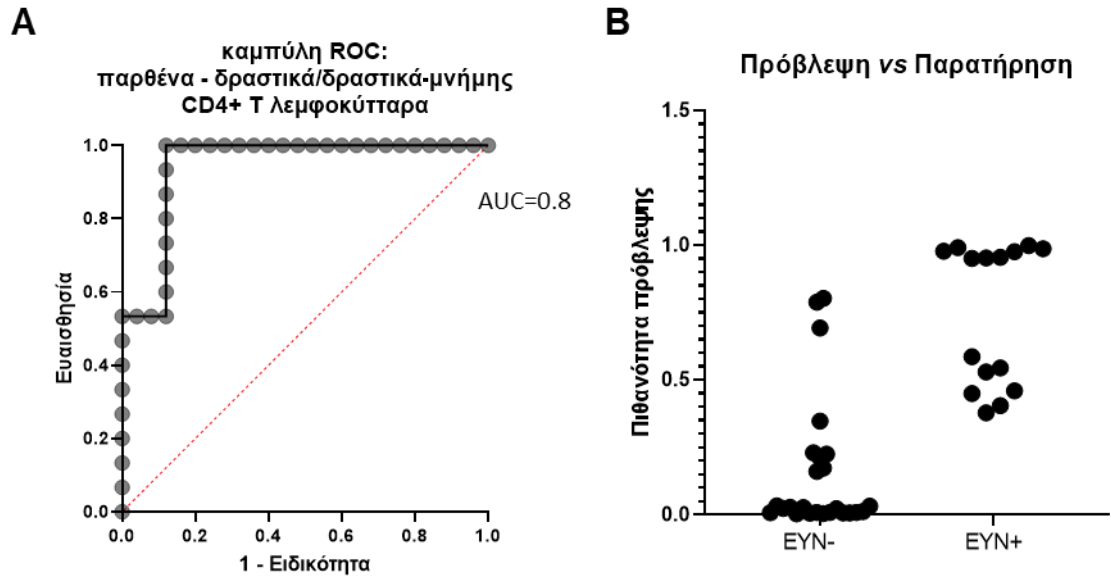
Αλγόριθμος πρόβλεψης EYN:

- Θετικό αποτέλεσμα **εάν** το ποσοστό των παρθένων CD4+ T λεμφοκυττάρων επί των CD4+ T λεμφοκυττάρων στο ΠΑ είναι >8% **και** το ποσοστό των δραστικών/δραστικών-μνήμης CD4+ T λεμφοκυττάρων επί των CD4+ T λεμφοκυττάρων στο ΠΑ είναι <90%
- Αρνητικό αποτέλεσμα σε άλλη περίπτωση

Για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του αλγόριθμου πρόβλεψης της EYN, προχωρήσαμε στην ανάλυση δειγμάτων ΠΑ από 20 επιπλέον ασθενείς, οι οποίοι δεν συμπεριλήφθηκαν στην αρχική μελέτη. Για όλους τους ασθενείς λήφθηκε και δείγμα ΜΟ και έγινε αναζήτηση της παρουσίας EYN με το πρωτόκολλο EuroFlow και βρέθηκε ότι οι 8 ασθενείς ήταν EYN+ ενώ οι υπόλοιποι 12 ήταν αρνητικοί για την παρουσία EYN. Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 3.8**, με τη χρήση του αλγόριθμου πρόβλεψης αναγνωρίστηκαν σωστά οι 6 από τους 8 EYN+ ασθενείς και οι 11 από τους 12 EYN- ασθενείς. Συνεπώς, τα χαρακτηριστικά του αλγόριθμου για τη συγκεκριμένη ασθενών ήταν: PPV 75%, NPV 92%, ευαισθησία 86% και ειδικότητα 85%.



Εικόνα 3.23. Διερεύνηση των υποπληθυσμών στο περιφερικό αίμα για την ανεύρεση ανοσολογικής υπογραφής σχετιζόμενη με την ύπαρξη ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (EYN). (A) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), για όλους τους ανιχνευόμενους πληθυσμούς, (B) Απεικόνιση σχετικών συχνοτήτων επιλεγμένων υποπληθυσμών και (Γ) Διερεύνηση των 3 επιλεγμένων υποπληθυσμών με ανάλυση PCA.



Εικόνα 3.24. Αξιολόγηση της διαγνωστικής αξίας των δύο επιλεγμένων υποπληθυσμών, παρθένων και δραστικών/δραστικών-μνήμης CD4+ T λεμφοκυττάρων στην πρόβλεψη της παρουσίας ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (EYN), μετά από ανάλυση πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης. Με βάση την εξίσωση πιθανοτήτων, η καμπύλη ROC (A) απεικονίζει την αλλαγή της ευαισθησίας και ειδικότητας για την πρόβλεψη της παρουσίας, ενώ το διάγραμμα πρόβλεψης (B) απεικονίζει την πιθανότητα πρόβλεψης έναντι της παρατήρησης για τους EYN+ και EYN- ασθενείς.

Πίνακας 3.8. Η απόδοση του αλγόριθμου πρόβλεψης της παρουσίας ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (EYN) από το περιφερικό αίμα σε ομάδα 20 ασθενών. Σε όλους τους ασθενείς έγινε εκτίμηση της EYN από δείγμα μυελού των οστών

n=20	EYN+	EYN-	
Θετική EYN 8	Αληθώς Θετικά (ΑΘ) 6	Ψευδώς Θετικά (ΨΘ) 2	θετική προγνωστική αξία = $ΑΘ/(ΑΘ+ΨΘ)$ 0,75
Αρνητική EYN 12	Ψευδώς Αρνητικά (ΨΑ) 1	Αληθώς Αρνητικά (ΑΑ) 11	Αρνητική προγνωστική αξία = $ΑΑ/(ΑΑ+ΨΑ)$ 0,92
Ευαισθησία= $ΑΘ/(ΑΘ+ΨΑ)$ 0,86		Ειδικότητα= $ΑΑ/(ΑΑ+ΨΑ)$ 0,85	

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ΠΜ αποτελεί το 10% των συνολικών αιματολογικών κακοηθειών, είναι δηλαδή η δεύτερη πιο συχνή αιματολογική κακοήθεια μετά το λέμφωμα non-Hodgkin. Το ερευνητικό πεδίο μελέτης του ΠΜ είναι ιδιαίτερα ενεργό με περισσότερες από 40.000 δημοσιεύσεις παγκοσμίως την τελευταία πενταετία (2015-2020). Ωστόσο, παρά την εντατική μελέτη, η νόσος παραμένει μέχρι και σήμερα ανίατη. Το ΠΜ χαρακτηρίζεται από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό πλασματοκυττάρων στο ΜΟ που συνοδεύεται, συνήθως, από ταυτόχρονη υπερπαραγωγή μονοκλωνικών παραπρωτεϊνών (άθικτες ανοσοσφαιρίνες ή/και ελεύθερες ελαφριές αλυσίδες). Επίσης, λόγω της μεγάλης ετερογένειας και των σταδιακών εξαλλαγών των μυελωματικών κυττάρων δεν εμφανίζεται ως ένα νόσημα με ενιαία εξέλιξη, αλλά περιλαμβάνει στάδια που κυμαίνονται από την MGUS και το sMM, έως το συμπτωματικό ΠΜ ή την πιο επιθετική μορφή, την πλασματοκυτταρική λευχαιμία.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών, έχει επιτευχθεί αξιοσημείωτη πρόοδος όσον αφορά τις θεραπευτικές προσεγγίσεις στο ΠΜ και την τελική έκβαση των ασθενών. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην εισαγωγή νέων θεραπευτικών πρωτοκόλλων με τη χορήγηση νέων φαρμάκων που περιλαμβάνουν τους αναστολείς πρωτεασώματος, ανοσορρυθμιστικά φάρμακα και μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία ενίσχυσαν σημαντικά το παραδοσιακό «οπλοστάσιο» των χημειοθεραπευτικών ουσιών και των κορτικοστεροειδών. Η εισαγωγή των νέων θεραπευτικών πρωτοκόλλων ενίσχυσε, επιπλέον, την αποτελεσματικότητα της μεταμόσχευσης αυτόλογων αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, με την οποία επιτυγχάνονται ακόμη υψηλότερα ποσοστά πλήρους ύφεσης, ιδιαίτερα στους νεότερους ασθενείς (Willenbacher et al., 2018).

Ωστόσο, παρά την εισαγωγή νέων θεραπευτικών στρατηγικών στην κλινική πράξη, οι περισσότεροι ασθενείς τελικά υποτροπιάζουν και εμφανίζουν αντίσταση στη φαρμακευτική αγωγή. Έχει αποδειχθεί πρόσφατα, ότι η εξέλιξη του ΠΜ, ο πολλαπλασιασμός των παθολογικών πλασματοκυττάρων, αλλά και η ανάπτυξη αντοχής απέναντι σε φαρμακευτικές ουσίες οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στις αλληλεπιδράσεις των μυελωματικών κυττάρων τόσο με κυτταρικούς πληθυσμούς του μικροπεριβάλλοντος του ΜΟ, όσο και με τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας του ΜΟ (Kawano et al., 2017). Μεταξύ άλλων, τα BM-MSCs διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην ανάπτυξη χημειοανθεκτικότητας από τα κύτταρα του ΠΜ. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της παραγωγής διαλυτών ουσιών (όπως η IL-6) από τα BM-MSCs, της σηματοδότησης μέσω κυτταρικής επαφής (Cell Adhesion–Mediated Drug Resistance, CAMDR) και της διακυτταρικής επικοινωνίας μέσω ανταλλαγής μικρών κυστιδίων, των εξωσωμάτων (Robak et al., 2018).

Για το λόγο αυτό, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων μοντέλων *ex vivo* μελέτης της νόσου, αλλά και η περαιτέρω διερεύνηση του ανοσολογικού προφίλ του μικροπεριβάλλοντος

του ΜΟ. Τα ex vivo μοντέλα υπολογίζεται ότι θα προσομοιάζουν εξατομικευμένα και πιο ρεαλιστικά το σύνολο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων του ΠΜ και του μικροπεριβάλλοντος του ΜΟ. Από την άλλη πλευρά, υπάρχει η ανάγκη εκτεταμένης μελέτης του ανοσολογικού προφίλ της νόσου στον κάθε ασθενή, ώστε να διερευνηθούν πιθανές κοινές ανοσολογικές υπογραφές πίσω από τα χαρακτηριστικά και την εξέλιξη της νόσου.

Όπως περιγράφηκε στην εισαγωγή, η παρούσα διατριβή είχε τρεις διακριτούς στόχους:

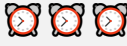










- Τη διεξοδική ανασκόπηση των δημοσιευμένων ex vivo μοντέλων στο ΠΜ
- Την ανάπτυξη τρισδιάστατης ex vivo πλατφόρμας για τη μελέτη του ΠΜ
- Την αξιολόγηση του ανοσολογικού προφίλ στο ΠΜ σε διάφορα στάδια της νόσου.






4.1. Αξιολόγηση των υπαρχόντων τρισδιάστατων μοντέλων στο πολλαπλούν μυέλωμα







Η αναζήτηση της σχετικής βιβλιογραφίας κατέδειξε έναν σημαντικό αριθμό καταγραφής ex vivo μελετών και περιγραφής τρισδιάστατων μοντέλων καλλιέργειών, η πλειοψηφία των οποίων στρέφεται στη διερεύνηση κάποιου μηχανισμού που λαμβάνει χώρα κατά την πορεία εξέλιξης της νόσου (Ham et al., 2019). Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Tai και συνεργατών (Tai et al., 2016), στην οποία αποδείχθηκε ότι η ενεργοποίηση του BCMA από το συνδέτη του, που ονομάζεται συνδέτης επαγωγής του πολλαπλασιασμού (a proliferation-inducing ligand, APRIL), μπορεί να πυροδοτήσει την εξέλιξη του ΠΜ ex vivo. Για τη μελέτη του μηχανισμού, χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο ανθρώπινων οστικών μοσχευμάτων τα οποία εμφυτεύτηκαν σε ποντίκια. Ωστόσο, μια τέτοια μεθοδολογική προσέγγιση θα ήταν πρακτικά αδύνατο να εφαρμοστεί για τη μελέτη δράσης/αποτελεσματικότητας/αντοχής πολλαπλών θεραπευτικών παραγόντων σε μεγάλο αριθμό ασθενών με ΠΜ, καθότι αυτό θα απαιτούσε τη θυσία πολλών πειραματόζωων ανά ασθενή, με σημαντικό κόστος χρόνου και χρημάτων ανά δοκιμή. Συνεπώς, χωρίς να υποβαθμίζεται η αξία και η σημαντικότητα τέτοιων μελετών για την πρόοδο της γνώσης στο ΠΜ, στην παρούσα διατριβή στραφήκαμε προς αναζήτηση μοντέλων τα οποία να έχουν μια σαφή κατεύθυνση προς την εξατομικευμένη πληροφόρηση του ασθενούς, να είναι εργαστηριακά προσιτά, ενώ ταυτόχρονα να προσομοιώνουν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο το μικροπεριβάλλον του ΜΟ. Αναζητήσαμε ex vivo πλατφόρμες που πληρούν καθορισμένα κριτήρια (**Παράγραφος 1.5**) και καταλήξαμε σε 14 μοντέλα. Αυτά τα μοντέλα αξιολογήθηκαν με βάση τη χρονική διάρκεια της διαδικασίας, την ευκολία/πρακτικότητα της μεθόδου (με βάση την εφαρμογή τους από ένα κλασικό εργαστήριο που χειρίζεται κυτταροκαλλιέργειες), και τέλος το συνολικό κόστος. Στον **Πίνακα 1.2** της εισαγωγής

συνοψίστηκαν τα χαρακτηριστικά των επιλεγμένων μοντέλων, ενώ στον **Πίνακα 4.1** που ακολουθεί παρουσιάζεται η συνοπτική αξιολόγησή τους (Paradimitriou et al., 2020a).

Πίνακας 4.1. Η αξιολόγηση των επιλεγμένων ex vivo μοντέλων, τα οποία προσομοιάζουν το περιβάλλον του μυελού των οστών ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα

Έτος και Δημοσίευση	Διάρκεια δοκιμής*	Εφαρμοσιμότητα **	Κόστος***
2008, Kirshner και συν. (Kirshner et al., 2008a)		★★☆	\$\$
2018, Huang και συν. (Huang et al., 2018a)		★★★	\$\$
2015, De la Puente και συν. (de la Puente et al., 2015; de la Puente and Azab, 2016)		★☆☆	\$\$
2016, Jakubikova και συν. (Jakubikova et al., 2016a)		★★★	\$\$
2017, Arhoma και συν. (Arhoma et al., 2017a)		★★☆	\$
2017, Ji και συν. (Ji et al., 2017)		★☆☆	\$
2018, Braham και συν. (Braham et al., 2018a, 2018b)		★★★	\$\$\$
2017, Silva και συν. (Silva et al., 2017)		★★☆	\$
2014, 2015, Reagan και συν. (Reagan et al., 2014, 2015)		★★☆	\$\$
2017 Ferrarini και συν., 2018 Belloni και συν. (Ferrarini et al., 2017; Belloni et al., 2018)	Δεν αναφέρεται	★☆☆	\$\$\$
2017, Bonomi και συν. (Bonomi et al., 2017)		★★☆	\$\$\$
2013, Khin και συν. (Khin et al., 2014)		★★☆	\$\$

2015, Martowicz και συν. (Martowicz et al., 2015)	 	★☆☆	\$
2011, Calimeri και συν. (Calimeri et al., 2011)	  	★☆☆	\$\$\$

* : Έως μία εβδομάδα,  : Έως ένα μήνα,   : Περισσότερο από μήνα. ** ★★*: Εφικτό κάτω από τις συνήθεις εργαστηριακές συνθήκες, ★☆☆: Χρειάζεται κάποιες εξειδικευμένες τεχνικές, ★☆☆: δύσκολη εφαρμογή. *** \$: Υπολογιζόμενο κόστος προετοιμασίας μεθόδου (εξοπλισμός, αντιδραστήρια, αναλώσιμα) ≤ 10 χιλ. ευρώ, \$\$: Υπολογιζόμενο κόστος ≤ 100 χιλ. ευρώ, \$\$\$: Υπολογιζόμενο κόστος > 100 χιλ. ευρώ.

Αρχικά εξετάστηκε η χρονική διάρκεια των πρωτοκόλλων καθότι για πιθανή μελλοντική κλινική αξιοποίηση, η επιλογή της θεραπευτικής προσέγγισης πρέπει να γίνει σε σύντομο χρονικό διάστημα, είτε στη φάση της διάγνωσης είτε στη φάση της υποτροπής. Επίσης, στον παράγοντα χρόνο υπεισέρχεται και η δυνατότητα πολλαπλών παράλληλων δοκιμασιών (υψηλής τροφοδότησης σάρωση, high-throughput screening). Για παράδειγμα, τα μοντέλα μελέτης που βασίζονται στα ποντίκια με ανοσοανεπάρκεια και απαιτούν περίπου 6 εβδομάδες για την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας (Calimeri et al., 2011), ή το μοντέλο ανασυνδυασμένου μυελού των οστών (rEND) που δίνει αποτελέσματα σε περισσότερο από ένα μήνα (Kirshner et al., 2008a), πιθανότατα θα έχουν δυσκολία ως προς την άμεση εφαρμογή τους στην καθημερινή κλινική πρακτική. Απεναντίας, το μοντέλο που βασίζεται σε ικρίσματα γέλης από τους Silva και συνεργάτες (Silva et al., 2017) είναι βασισμένο σε μικροπλάκες πολλαπλών φρεατίων, στις οποίες δύνανται να δοκιμαστούν παράλληλα έως και 1536 θεραπευτικοί παράγοντες με αυτοματοποιημένη ανάλυση εικόνας, δίνοντας αξιόπιστο αποτελέσματα εντός πέντε ημερών.

Η επόμενη παράμετρος που εξετάστηκε είναι το συνολικό κόστος του μοντέλου. Συγκρίνοντας τις διάφορες προσεγγίσεις, τα ικρίσματα γέλης φαίνεται πως αποτελούν το πιο οικονομικό και προσβάσιμο υλικό, τόσο στην κατασκευή/προμήθεια όσο και στο χειρισμό, ενώ η αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με απλή μέθοδο, όπως πχ. χρώση και ανάλυση με συμβατική οπτική μικροσκοπία, μπορούν να διατηρήσουν χαμηλά το συνολικό κόστος. Με αυτά τα δεδομένα, οι μεθοδολογίες που προτάθηκαν από τους Arhoma και συνεργάτες (Arhoma et al., 2017a), Ji και συνεργάτες (Ji et al., 2017) και Silva και συνεργάτες (Silva et al., 2017) χρησιμοποιούν οικονομικά ικρίσματα γέλης και οπτική μικροσκοπία. Από την άλλη πλευρά, η χρήση βιοαντιδραστήρων, ενώ διατηρεί ένα πολύ σταθερό μικροπεριβάλλον, απαιτεί ακριβό και

πολύπλοκο εξοπλισμό, ενώ τα ζωικά μοντέλα καταλήγουν σε θανάτωση των ζώων εγείροντας σημαντικά ηθικά ζητήματα, και η εφαρμογή τους σε μεγάλη κλίμακα απαιτεί ειδικές εγκαταστάσεις.

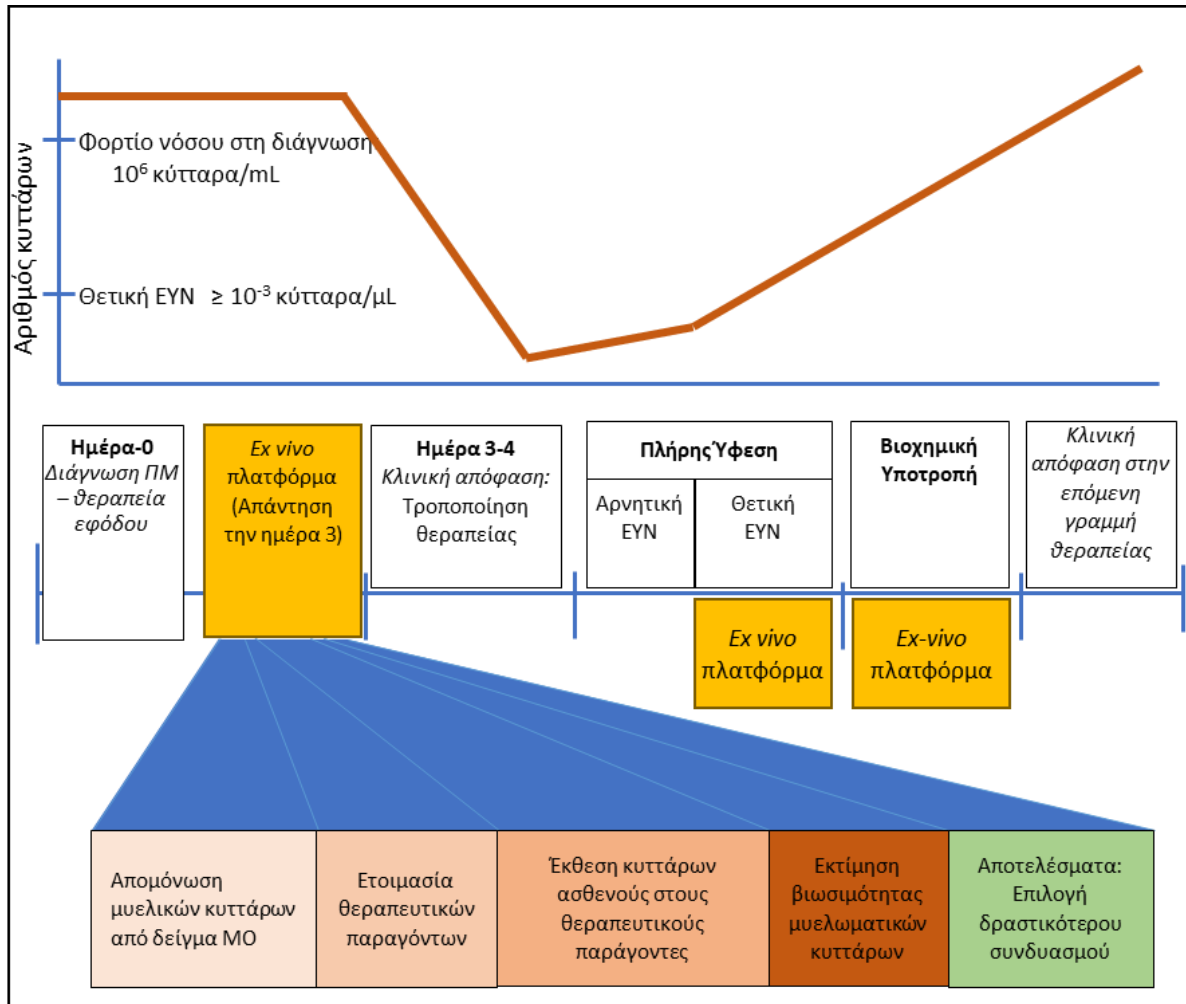
Η τελευταία παράμετρος που εξετάστηκε είναι η ευκολία και η εφαρμοσιμότητα της προτεινόμενης μεθόδου. Η λογική πίσω από αυτό το κριτήριο είναι ότι μια πλατφόρμα με προσανατολισμό την εφαρμογή της στην κλινική πράξη, θα πρέπει να μπορεί να κατασκευασθεί σε κλινικό εργαστήριο εντός νοσοκομείου, ή σε κάποιο κοντινό ερευνητικό εργαστήριο με σκοπό τη γρήγορη μεταφορά των δειγμάτων, και επιπλέον θα πρέπει να είναι εφαρμόσιμη από τα περισσότερα εργαστήρια που χειρίζονται κυτταροκαλλιέργειες. Υπό αυτό το πρίσμα στη μελέτη των Jakubikova και συνεργατών (Jakubikova et al., 2016a), η ex vivo πλατφόρμα στηρίζεται σε εμπορικά διαθέσιμη υδρογέλη και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γίνεται με απλή μέτρηση του ποσοστού απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής, επομένως αποτελεί ένα παράδειγμα εύκολα εφαρμόσιμης μεθόδου από τα περισσότερα εργαστήρια.

4.2 Το χρονικό πλαίσιο αξιοποίησης μιας ex vivo πλατφόρμας κατά την πορεία του πολλαπλού μυελώματος

Για να μπορέσει να αξιοποιηθεί μια ex vivo πλατφόρμα στην πορεία της θεραπείας θα πρέπει να είναι εφαρμόσιμη σε συγκεκριμένα στάδια της πορείας της νόσου (**Εικόνα 4.1**), ώστε η πληροφορία που θα παραχθεί να είναι αξιοποιήσιμη από τον θεράποντα ιατρό. Επομένως, προτείνουμε τρία χρονικά σημεία αξιοποίησης της ex vivo πλατφόρμας κατά την κλινική πορεία του ΠΜ:

- A) **Αμέσως μετά τη διάγνωση**, ώστε να υπάρχει ο χρόνος να σχεδιαστεί ο ιδανικός συνδυασμός θεραπευτικών παραγόντων για την εισαγωγική θεραπεία. Βασικό πλεονέκτημα αυτού του χρονικού σημείου είναι η αφθονία μυελωματικών κυττάρων τα οποία μπορούν να απομονωθούν από μια βιοψία ΜΟ.
- B) **Κατά τον έλεγχο για την παρουσία EYN**, όταν ο ασθενής είναι σε πλήρη ύφεση, ώστε να προγραμματισθεί η επανέναρξη ή/και η τροποποίηση της θεραπείας. Το βασικό πλεονέκτημα είναι ότι εφόσον η νόσος είναι ελεγχόμενη και παραμένει σε χαμηλό επίπεδο φορτίου στο ΜΟ, υπάρχει το χρονικό περιθώριο να δοκιμασθεί και να αξιοποιηθεί μια πειραματική διαδικασία.
- Γ) **Κατά τη βιοχημική υποτροπή**, θεωρητικά είναι η ιδανική χρονική στιγμή για την πλέον χρήσιμη πληροφόρηση στο σχεδιασμό της επόμενης φαρμακευτικής αγωγής, καθώς ο ασθενής έχει φανεί ανθεκτικός σε προηγούμενες γραμμές θεραπείας. Κατά τη βιοχημική υποτροπή η παραπρωτεΐνη είναι πλέον ανιχνεύσιμη, επομένως υπάρχει και αφθονία

μυελωματικών κυττάρων στο ΜΟ. Βασικό μειονέκτημα είναι ότι ο χρόνος «πιέζει» εις βάρος του ασθενούς και η ex vivo πλατφόρμα θα πρέπει να μπορεί να δώσει αποτελέσματα το ταχύτερο δυνατόν.



Εικόνα 4.1. Το χρονοδιάγραμμα της εξέλιξης του πολλαπλού μυελώματος (ΠΜ) σε συνδυασμό με τα κλινικά στάδια και τα προτεινόμενα χρονικά σημεία χρήσης μιας ex vivo πλατφόρμας για την επιλογή των καταλληλότερων θεραπειών. Η επιτυχία της δοκιμής μπορεί να κριθεί από την επιτυχή απομόνωση των μυελωματικών κυττάρων του ασθενούς, επομένως θα πρέπει να ανευρίσκονται σε ικανοποιητικό αριθμό στο μυελό των οστών. Τα χρονικά σημεία αξιοποίησης μιας ex vivo πλατφόρμας μπορεί να είναι άμεσα μετά τη διάγνωση (έως την ημέρα 3), κατά την πλήρη ύφεση της νόσου εάν ο ασθενής είναι θετικός για ελάχιστη υπολειμματική νόσο (EYN) και κατά τη βιοχημική υποτροπή. Τα βήματα που θα πρέπει να ακολουθηθούν στα δεδομένα χρονικά διαστήματα είναι η απομόνωση των μυελωματικών κυττάρων, η προετοιμασία της δοκιμασίας στην πλατφόρμα με επιλογή των θεραπευτικών παραγόντων, η εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά την

επίδραση των φαρμάκων και τέλος, η αναφορά του πλέον αποτελεσματικού συνδυασμού φαρμακευτικών παραγόντων.

4.3 Πρόταση για την υλοποίηση ex vivo μοντέλου στο πολλαπλούν μυέλωμα

Ύστερα από τη βιβλιογραφική αναζήτηση, για το προτεινόμενο ex vivo μοντέλο στην παρούσα διατριβή χρειάζονται:

- Ανθρώπινη μυελωματική κυτταρική σειρά ως ανάλογο των κυττάρων της νόσου
- BM-MSCs που προσομοιάζουν το μικροπεριβάλλον του MO
- Προσομοίωση της τρισδιάστατης κατάστασης ανάπτυξης του ΠΜ στους θύλακες του MO με χρήση ικρωμάτων
- Θεραπευτικοί παράγοντες, για παράδειγμα δοξορουβικίνη και βορτεζομίμη ως δύο ενδεικτικοί παράγοντες στο ΠΜ
- Προτυποποιημένη μέθοδος εκτίμησης της βιωσιμότητας των μυελωματικών κυττάρων μετά την επίδραση των θεραπευτικών παραγόντων

Ως πρώτο βήμα, επιλέχθηκαν μυελωματικές σειρές οι οποίες εμφανίζουν in vitro τα χαρακτηριστικά των μυελωματικών κυττάρων και οι οποίες έχουν αξιοποιηθεί στη μελέτη πολλών θεραπευτικών παραγόντων και συγκεκριμένα οι U266 (Park et al., 2014; Tibullo et al., 2020), JN3 (Sanchez et al., 2013; Maes et al., 2014), H929 (Cheriyath et al., 2011; Yang et al., 2018) και L363 (Abdi et al., 2014; Braham et al., 2018a). Σε αυτές καταγράφηκε η κινητική της ανάπτυξής τους in vitro και υπολογίστηκε η συγκέντρωση IC50 των παραγόντων δοξορουβικίνη και βορτεζομίμη. Στη συνέχεια αναζητήθηκε ο βέλτιστος τρόπος εκτίμησης της βιωσιμότητας των μυελωματικών κυττάρων. Έχοντας στη διάθεσή μας τρεις καθιερωμένες και αξιόπιστες μεθόδους μέτρησης βιωσιμότητας των μυελωματικών κυττάρων, ήτοι τη μέτρηση με αιμοκυτταρόμετρο, την κυτταρομετρία ροής και τη μέθοδο MTT (Cossarizza et al., 2019; Zhang et al., 2020) θελήσαμε να διερευνήσουμε την αξιοποίηση μιας ακόμη τεχνικής βασιζόμενης στη χρωστική με κυανού του τρυπανίου. Η χρήση λογισμικού ανάλυσης μικροσκοπίας σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος και τη μικρή δοσολογία της χρωστικής καθιστά το κόστος της μεθόδου ιδιαίτερα χαμηλό, ενώ μας δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης όλων των κυττάρων στο οπτικό πεδίο (πρακτικά μέχρι 1.000 κύτταρα). Βρέθηκε λοιπόν ότι δεν υπάρχει σημαντική απόκλιση στη μέτρηση της βιωσιμότητας συγκριτικά με τις προηγούμενες μεθόδους. Αυτό είναι σύμφωνο με τη βιβλιογραφία, σε μελέτες όπου έχει αξιοποιηθεί η ανάλυση εικόνας μικροσκοπίας, όπως στη μελέτη των Melzer και συνεργατών (Melzer et al., 2016) όπου έγινε διεξοδική ανάλυση του κυανού του τρυπανίου συγκριτικά με άλλες χρωστικές, με χρήση αυτόματου λογισμικού και βρέθηκε αρκούντως αποτελεσματικό.

Όσον αφορά στην απομόνωση BM-MSCs δοκιμάστηκαν οι μέθοδοι: i) απομόνωση με διαβάθμιση συγκέντρωσης, ii) με τη χρήση λυτικού διαλύματος και iii) με συνεχόμενη αλλαγή θρεπτικού υλικού (Nemeth et al., 2013; Jakubikova et al., 2016a; Silva et al., 2017). Η μέθοδος απομόνωσης με διαβάθμιση συγκέντρωσης ήταν επιτυχής στο 80% των δειγμάτων (12/15 δείγματα) και συνεπώς επιλέχθηκε. Ύστερα από την απομόνωση και καλλιέργεια των BM-MSCs προχωρήσαμε στη δοκιμή της συγκαλλιέργειάς τους με τη μυελωματική κυτταρική σειρά U266. Παρατηρήσαμε υπό την επίδραση δοξορουβικίνης, ότι στη συγκέντρωση IC50 επιτυγχάνεται μεγαλύτερη βιωσιμότητα των μυελωματικών κυττάρων σε συγκαλλιέργεια συγκριτικά με μονοκαλλιέργεια. Αυτό εξάλλου ήταν κάτι αναμενόμενο, καθότι σε πολυάριθμες βιβλιογραφικές αναφορές έχει τονιστεί το πλεονέκτημα που προσφέρουν οι συγκαλλιέργειες (Görgün et al., 2013; Ramachandran et al., 2016; Ai et al., 2019).

Στη συνέχεια μεταβαίνοντας στο 3D περιβάλλον, επιλέξαμε να χειριστούμε ένα εμπορικό διαθέσιμο ικρίωμα γέλης, το οποίο έχει αξιοποιηθεί και στη μελέτη των Jakubikova και συνεργατών (Jakubikova et al., 2016a) και δείχθηκε ότι μπορεί να προσομοιώσει σε ικανοποιητικό βαθμό το λειτουργικό περιβάλλον του MO. Στη μεθοδολογική προσέγγιση της παρούσας διατριβής η υδρογέλη δεν φάνηκε ότι είναι το κατάλληλο υλικό, καθότι δεν επέτρεπε στο λογισμικό ανάλυσης εικόνας να διακρίνει ικανοποιητικά τα διάφορα κύτταρα προς αξιολόγηση. Επιπλέον, όταν δοκιμάστηκαν συγκριτικά δισδιάστατες και τρισδιάστατες μονοκαλλιέργειες της κυτταρικής σειράς U266, δεν βρέθηκε κάποιο σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης, όπως αναμενόταν με βάση παρόμοια δημοσιευμένα αποτελέσματα από τους Braham και συνεργάτες (Braham et al., 2018b) και Jakubikova και συνεργάτες (Jakubikova et al., 2016a).

Με αυτά τα δεδομένα αποφασίσθηκε η δοκιμή άλλων βιοϋλικών πέρα από τις υδρογέλες για την ανάπτυξη της ex vivo πλατφόρμας, όπως τα στερεά ικρίωματα. Στη μελέτη των Monnier και συνεργατών (Monnier et al., 2018), δείχθηκε ότι τα BM-MSCs αναπτύσσονται στο υλικό PLA. Συνεπώς, δοκιμάσαμε ικρίωματα PLA σε μοντέλο ΠΜ καθότι αποτελεί οικονομικό και εύκολα προσβάσιμο υλικό. Χωρίς να προβούμε σε κάποια επιπρόσθετη κατεργασία στα πλέγματα του ικρίωματος, έγινε εμφύτευση με καλλιέργεια BM-MSCs ασθενούς και με χρήση τριών τεχνικών μικροσκοπίας (μικροσκοπία φθορισμού, συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης) αποδείχθηκε ότι τα BM-MSCs αναπτύσσονται προσκολλώμενα ανάμεσα στις ίνες του ικρίωματος σε μορφή φύλλου, εκτείνοντας προσεκβολές οι οποίες αναρτώνται στις ίνες του ικρίωματος.

Συνολικά, έχοντας διερευνήσει τα επιμέρους στοιχεία της ex vivo πλατφόρμας προχωρήσαμε στη συγκαλλιέργεια πρωτογενών BM-MSCs και μυελωματικών H929 κυττάρων στα

προαναφερθέντα ικρίωματα. Η σειρά H929 έδειξε τη μεγαλύτερη ευαισθησία στη βορτεζομίμη σε 2D συνθήκες και επιλέχθηκε για περαιτέρω έλεγχο στο 3D μοντέλο μας, προκειμένου να αξιολογηθεί εάν το μικροπεριβάλλον των BM-MSCs θα προσέδιδε αυξημένη χημειοανθεκτικότητα στα μυελωματικά κύτταρα μετά τη χορήγηση της βορτεζομίμης. Συγκρινόμενα με τη δισδιάστατη καλλιέργεια, τα H929 μυελωματικά κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε συγκαλλιέργεια είχαν μεγαλύτερη βιωσιμότητα μετά την επίδραση βορτεζομίμης, τουλάχιστον στο ένα από τα τρία ικρίωματα που δοκιμάσθηκαν (με μέγεθος πόρου 60-90 μm). Αξίζει να σημειωθεί το χρονικό πλαίσιο του πειράματος: στα ικρίωματα είχαν ήδη εμφυτευθεί τα BM-MSCs, πριν τη χορήγηση του θεραπευτικού παράγοντα και την ημέρα 1 προστέθηκαν τα μυελωματικά κύτταρα. Τις επόμενες 3 ημέρες (ημέρες 2-4) τα κύτταρα επώασθησαν με τη βορτεζομίμη για 72 ώρες και στο τέλος της τρίτης ημέρας επώασης (ημέρα 4), έγινε η μικροσκοπική φωτογράφιση των απομονωμένων μυελωματικών κυττάρων. Τέλος, την ημέρα 5 αναλύθηκαν οι φωτογραφίες, καταμετρήθηκαν τα κύτταρα με τον αλγόριθμο ανάλυσης εικόνας και υπολογίσθηκε η βιωσιμότητα για κάθε πειραματική συνθήκη. Επομένως, δείχθηκε ότι η προτεινόμενη πλατφόρμα είναι εφαρμόσιμη, τουλάχιστον σε δοκιμαστικό στάδιο, και μπορεί να δώσει αποτελέσματα εντός πέντε ημερών. Μια τέτοιου τύπου λειτουργική πλατφόρμα, μελλοντικά, μπορεί να αξιοποιηθεί σε πολλαπλές εφαρμογές, για παράδειγμα σε επίπεδο θεραπευτικό, για τη διερεύνηση βιολογικών μηχανισμών, αλλά και σε επίπεδο μελέτης μεμονωμένων κυττάρων όπως και συνδυασμών περισσότερων υποπληθυσμών κυττάρων (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2. Η αξιοποίηση ενός *ex vivo* μοντέλου στο πολλαπλούν μυέλωμα μπορεί να έχει πολλές εφαρμογές.

4.4 Ανοσολογική μελέτη του μικροπεριβάλλοντος στο πολλαπλούν μυέλωμα

Έχοντας θέσει τη βάση για τη δημιουργία ενός *ex vivo* μοντέλου που θα μπορεί να περιλαμβάνει τόσο μυελωματικά κύτταρα όσο και κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του ΜΟ και συγκεκριμένα τα ΒΜ-ΜSCs, στη συνέχεια έγινε προσπάθεια επέκτασης της διερεύνησης και σε άλλους κυτταρικούς υποπληθυσμούς που πιθανά να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μικροπεριβάλλον. Οι τρέχουσες μελέτες εστιάζονται κατά το μεγαλύτερο βαθμό στα μοριακά χαρακτηριστικά των μυελωματικών κυττάρων με πολύ σημαντικά αποτελέσματα στη διαλεύκανση της βιολογίας τους. Ωστόσο, η πλήρης κατανόηση της παρατηρούμενης ετερογένειας και πολυπλοκότητας της νόσου δεν έχει ακόμα επιτευχθεί. Το μικροπεριβάλλον με τη δυναμική των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα εντός του ΜΟ, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου και την αντίσταση στη θεραπεία (Di Marzo et al., 2016; Kawano et al., 2017; Manier et al., 2017). Δυστυχώς όμως, η πολυπλοκότητα του ΜΟ σε συνδυασμό με την πολύπλευρη και δυναμική φύση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μυελωματικών κυττάρων και πληθώρας κυτταρικών υποπληθυσμών του ΜΟ αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες στην προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών που οδηγούν στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και εν τέλει τη χημειοαντοχή των μυελωματικών πλασματοκυττάρων εντός του ΜΟ (Mithraprabhu et al., 2017). Συνεπώς επιλέξαμε, να μην εστιαστούμε σε συγκεκριμένους υποπληθυσμούς στην παρούσα διατριβή, αλλά να επιδιωχθεί ο ευρύτερος δυνατός ανοσολογικός χαρακτηρισμός του ΜΟ και του ΠΑ σε διάφορα στάδια της νόσου, με σκοπό την ανακάλυψη ανοσολογικών υπογραφών οι οποίες να μπορούν να συσχετισθούν με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΠΜ (Paradimitriou et al., 2020b).

Η κλωνική ετερογένεια έχει αναδειχθεί πλέον ως βασικό χαρακτηριστικό του ΠΜ. Ωστόσο η συσχέτιση της εξέλιξης των υποκλώνων με την πρόοδο της νόσου βρίσκεται ακόμη υπό διερεύνηση. Συγκεκριμένα, τα νεότερα δεδομένα από τη γενετική αλληλούχηση των υποκλώνων ασθενών που εμφάνισαν εξέλιξη από ΜGUS/sMM προς ΠΜ, δείχνουν ότι διατηρείται σχετική κλωνική σταθερότητα, καθότι οι κλώνοι που ανευρίσκονται στο ΠΜ προϋπήρχαν στα προηγούμενα στάδια (Dutta et al., 2019). Επομένως μεγαλύτερη βαρύτητα για την εξέλιξη της νόσου κατέχουν εξωτερικοί παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ισορροπία των κλώνων, όπως το μικροπεριβάλλον του ΠΜ. Στην παρούσα διατριβή, προς αυτή την κατεύθυνση αρχικά διερευνήθηκαν οι κύριοι ανοσολογικοί πληθυσμοί (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, ερυθροβλάστες) του ΜΟ στα διάφορα στάδια του ΠΜ (ΜGUS, sMM, ΠΜ κατά τη διάγνωση και κατά την πλήρη ύφεση μετά από θεραπεία, PCL). Με

εξαίρεση την PCL, όπου η επιθετικότητα της νόσου επιφέρει σημαντικές αλλαγές τόσο στα μοριακά χαρακτηριστικά των μυελωματικών κυττάρων όσο και στους γειτονικούς τους υποπληθυσμούς (Fernández de Larrea et al., 2013; Gundesen et al., 2019), στα υπόλοιπα στάδια που εξετάστηκαν δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των σχετικών συχνοτήτων των επί μέρους υποπληθυσμών και ο βασικός λόγος για αυτό είναι η ενδογενής ετερογένεια του κάθε σταδίου και η μεγάλη απόκλιση μεταξύ των ασθενών. Η εικόνα της ετερογένειας εξάλλου, έρχεται σε συμφωνία με σχετικές μελέτες από τους Brimnes και συνεργάτες (Brimnes et al., 2010) και Foglietta και συνεργάτες (Foglietta et al., 2014).

Επομένως προς τη διερεύνηση αυτής της ετερογένειας, στη συνέχεια της ανάλυσης κρίθηκε χρήσιμο να διευκρινιστεί εάν το μικροπεριβάλλον του ΜΟ θα μπορούσε να αντικατοπτριστεί ή να «καθρεπτιστεί» στο ΠΑ. Σε αντίστοιχης λογικής διερεύνηση υποπληθυσμών Τ λεμφοκυττάρων στο ΠΑ και ΜΟ ασθενών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο από τους Lee και συνεργάτες (Lee et al., 2020) βρέθηκε ότι υπάρχει σημαντική αντιστοιχία των υποπληθυσμών τόσο σε ανοσοφαινοτυπικό όσο και σε γενετικό επίπεδο. Κατά συνέπεια, προτάθηκε ότι το ΠΑ είναι ένας εύκολα προσβάσιμος τρόπος για την επιτήρηση των ασθενών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Η αναζήτηση μεμονωμένων υποπληθυσμών μεταξύ ΜΟ και ΠΑ στη βιβλιογραφία για το ΠΜ συχνά παρέχει αντικρουόμενα αποτελέσματα (Görgün et al., 2013; Favaloro et al., 2014; Zelle-Rieser et al., 2016; Lad et al., 2019), ενώ τουλάχιστον μέχρι τη συγγραφή αυτής της διδακτορικής διατριβής δεν υπάρχει δημοσιευμένη μελέτη στην οποία να γίνεται σύγκριση σε μεγάλο εύρος κυτταρικών υποπληθυσμών σε ζεύγη δειγμάτων ασθενών με ΠΜ. Στη δική μας ανάλυση για το ΠΜ, συμπεριλήφθηκαν ζεύγη δειγμάτων ΠΑ και ΜΟ των ίδιων ασθενών στη διάγνωση και κατά την πλήρη ύφεση. Αυτό που διαπιστώθηκε εξετάζοντας συνολικά όλους τους υποπληθυσμούς είναι ότι η σύγκριση των σχετικών συχνοτήτων τους μεταξύ ΜΟ και ΠΑ ακολουθεί τρία πρότυπα: i) σαφής υπεροχή στην επιμέρους αναλογία ενός υποπληθυσμού στο ΜΟ ή στο ΠΑ, ii) παρόμοια κατανομή ενός κυτταρικού υποπληθυσμού στα δύο διαμερίσματα, iii) κανένα πρότυπο συσχέτισης λόγω της μεγάλης ενδογενούς ετερογένειας στην κατανομή ενός κυτταρικού υποπληθυσμού από ασθενή σε ασθενή.

Αναφορικά με τα Tregs, αξίζει να γίνει ιδιαίτερη αναφορά σχετικά με τη σημασία τους στο ΠΜ και τα ευρήματα αυτής της διατριβής. Σε μελέτες στις οποίες διερευνάται η παρουσία των Tregs στο μικροπεριβάλλον της νόσου υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Στη μελέτη των Favaloro και συνεργατών (Favaloro et al., 2014), το ποσοστό των Tregs βρέθηκε αυξημένο στο ΜΟ συγκριτικά με το ΠΑ των ίδιων ασθενών. Από την άλλη πλευρά, στη μελέτη των Foglietta και συνεργατών (Foglietta et al., 2014) η συχνότητα των Tregs δεν δείχθηκε να αλλάζει μεταξύ ΜΟ και ΠΑ, ενώ και στη μελέτη των Marsh-Wakefield και συνεργατών (Marsh-Wakefield et al., 2019),

βρέθηκαν διαφορές μόνο ως προς την αυξημένη συχνότητα του υποπληθυσμού CD39+ Tregs στο ΜΟ. Συνεισφέροντας σε αυτή τη διερεύνηση, στην παρούσα διατριβή εντοπίστηκαν περισσότερα τελικά δραστικά Tregs και πολλαπλασιαζόμενα CD39+ Tregs στο ΜΟ συγκριτικά με το ΠΑ κατά τη διάγνωση, αναδεικνύοντας την κινητικότητα αυτών των υποπληθυσμών στο μικροπεριβάλλον της νόσου.

Στην ανάλυση κατά την πλήρη ύφεση, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει μεγαλύτερη διακύμανση στους περισσότερους υποπληθυσμούς μεταξύ ΜΟ και ΠΑ, ακολουθώντας το τρίτο πρότυπο σύγκρισης των σχετικών συχνοτήτων, δηλαδή δεν εμφανίστηκε κανένα πρότυπο συσχέτισης. Επομένως ακόμη και στον ίδιο ασθενή, στην πλήρη ύφεση μετά τη θεραπεία υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στην κατανομή των υποπληθυσμών, κάτι που πιθανώς συνηγορεί στο γιατί υπάρχει απουσία προγνωστικών παραγόντων κατά την ύφεση πέραν του φορτίου της νόσου (Moreau and Minvielle, 2013). Τελικώς, ως γενική διαπίστωση μπορεί να αναφερθεί ότι ο ΜΟ έχει διαφορετικό ανοσολογικό προφίλ από το ΠΑ, και ανάλυση του ενός δεν μπορεί να υποκαταστήσει το άλλο. Για τον λόγο αυτό και στη συνέχεια των αναλύσεων εξετάσαμε ξεχωριστά το ΜΟ και το ΠΑ.

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην αξιολόγηση του ανοσολογικού προφίλ των ασθενών σε σχέση με τα πιο επικρατή συστήματα πρόγνωσης και σταδιοποίησης και συγκεκριμένα τη σταδιοποίηση κατά ISS και το κυτταρογενετικό προφίλ (Palumbo et al., 2015; Sonneveld et al., 2016). Οι πιο σημαντικές συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ των προγνωστικών σταδίων και της κατανομής των Τ λεμφοκυττάρων. Οι ασθενείς με κυτταρογενετικές ατυπίες υψηλού κινδύνου αλλά και αυτοί με το δυσμενές στάδιο ISS-III εμφάνισαν χαμηλότερα ποσοστά συνολικών Τ λεμφοκυττάρων και αυξημένο λόγο CD4/CD8, τόσο στο ΜΟ όσο και στο ΠΑ. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με δεδομένα της βιβλιογραφίας που καταδεικνύουν τον αυξημένο λόγο CD4/CD8 ως δυσμενή προγνωστικό δείκτη κατά τη διάγνωση (San Miguel et al., 1992; Koike et al., 2002; Dosani et al., 2015). Ένα άλλο εύρημα της ανάλυσης μας ήταν η σημαντική αύξηση των NK/NKT λεμφοκυττάρων στο ΜΟ ασθενών με καλή πρόγνωση κατά ISS (ISS-I), κάτι το οποίο έχει επίσης αναφερθεί και από τους Pittari και συνεργάτες (Pittari et al., 2017), υποδεικνύοντας πιθανά ότι τα NK κύτταρα με την κυτταροτοξική τους δραστηριότητα σχετίζονται με ένα ευνοϊκό μικροπεριβάλλον στο ΜΟ, το οποίο τροποποιείται κατά την εξέλιξη της νόσου.

Το επόμενο ερώτημα που τέθηκε, ήταν εάν το ανοσολογικό προφίλ κατά τη διάγνωση μπορεί να έχει κλινική αξία και να συσχετισθεί με τη θεραπευτική ανταπόκριση των ασθενών. Το εύρος της ανοσολογικής ανάλυσης με ταυτοποίηση 33 συνολικά υποπληθυσμών, μας επέτρεψε να αναζητήσουμε επιμέρους ανοσολογικά προφίλ για πιθανές συσχετίσεις με το θεραπευτικό αποτέλεσμα πέραν των συσχετίσεων με μεμονωμένους υποπληθυσμούς. Έτσι, οι ασθενείς που

πέτυχαν πλήρη ύφεση μετά από εισαγωγική θεραπεία βορτεζομίμπης, λεναλιδομίδης και δεξαμεθαζόνης (VRd) φάνηκε πως είχαν αυξημένα T λεμφοκύτταρα και ιδιαίτερα το κλάσμα των CD27+ T κυττάρων, μειωμένους ερυθροβλάστες και μειωμένους αριθμούς TAMs. Στη μελέτη των Botta και συνεργατών (Botta et al., 2019) υπήρξαν αντίστοιχα ευρήματα, καθότι ο μειωμένος λόγος CD27-/CD27+ T λεμφοκυττάρων συσχετίστηκε με αυξημένη τριετή επιβίωση μέχρι εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον, ο ρόλος των TAMs είναι γνωστό ότι σχετίζεται με τη δημιουργία συνθηκών φλεγμονής και ενίσχυσης του καρκινικού πολλαπλασιασμού στο περιβάλλον του όγκου (Ostuni et al., 2015), ενώ αντίστοιχα ευρήματα με αύξηση του αριθμού τους υπάρχουν και στο ΠΜ (Ribatti et al., 2014; De Beule et al., 2017), δεδομένα που είναι σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής.

Η σημασία των Tregs στη θεραπευτική ανταπόκριση στο ΠΜ είναι ένα ερευνητικό ερώτημα που δεν έχει διαλευκανθεί μέχρι στιγμής με αντικρουόμενα αποτελέσματα στη βιβλιογραφία. Στη μελέτη των Giannopoulos και συνεργατών (Giannopoulos et al., 2012) αναφέρεται ότι οι ασθενείς με υψηλότερα ποσοστά Tregs στο ΜΟ έχουν σημαντικό ποσοστό γρήγορης επιδείνωσης της νόσου και μείωση της συνολικής επιβίωσης. Επίσης στην μελέτη των Raja και συνεργατών αναφέρεται ότι η ανοσολογική απορρύθμιση στο ΠΜ σχετίζεται με την αύξηση των Tregs στο ΠΑ και ΜΟ επιφέροντας αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης της νόσου (Raja et al., 2013). Σε αντίστοιχη νεότερη μελέτη των Alrasheed και συνεργατών (Alrasheed et al., 2020) ενισχύεται η θεωρία της ανοσολογικής απορρύθμισης, καθότι η παρουσία των Tregs και των δραστικών CD4+ λεμφοκυττάρων στο ΜΟ νεοδιαγνωσθέντων ασθενών, σχετίζεται με δυσμενή εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι στη μελέτη των Kotsakis και συνεργατών (Kotsakis et al., 2016), η οποία αφορούσε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ο μειωμένος αριθμός ολικών κυκλοφορούντων Tregs και ο αυξημένος αριθμός των τελικών δραστικών Tregs συσχετίστηκε με βελτιωμένη επιβίωση χωρίς εξέλιξη νόσου και συνολική επιβίωση. Στο άλλο άκρο αυτής της θεώρησης, βρίσκεται η μελέτη των Foglietta και συνεργατών (Foglietta et al., 2014), στην οποία το βασικό εύρημα είναι ότι ο αριθμός των λειτουργικών Tregs (Foxp3+) στο ΜΟ παραμένει σταθερός ανεξαρτήτως της κατάστασης της νόσου, συμπεριλαμβανομένης της ύφεσης και της υποτροπής. Επιπλέον, προς επιβεβαίωση αυτών των αποτελεσμάτων, στην πρόσφατη μελέτη των Lad και συνεργατών (Lad et al., 2019) δείχθηκε ότι τα Tregs δεν σχετίζονται κλινικά με την εξέλιξη από το MGUS προς ΠΜ, αλλά ούτε και με την επιβίωση μέχρι το στάδιο της επιδείνωσης της νόσου. Τα αποτελέσματα της δικής μας ανάλυσης σχετικά με τα Tregs και την απάντηση στη θεραπεία τάσσονται υπέρ της θεώρησης της ανοσολογικής απορρύθμισης. Στο ΠΑ αναδείχθηκε ότι ασθενείς με υψηλότερα Tregs αλλά και μειωμένα τελικά δραστικά Tregs έναντι των παρθένων Tregs, επιτυγχάνουν σε μικρότερο βαθμό πλήρη ύφεση της νόσου.

Εκτός όμως από τις διάφορες προγνωστικές παραμέτρους και την ανταπόκριση στην εισαγωγική θεραπεία, το ανοσολογικό προφίλ των ασθενών συσχετίσθηκε και με την παρουσία EYN. Η παρουσία EYN αποτελεί τον ισχυρότερο ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα στο ΠΜ που σχετίζεται με μειωμένα διαστήματα χωρίς εξέλιξη της νόσου και μειωμένη συνολική επιβίωση των ασθενών (Raiva et al., 2016; Perrot et al., 2018). Επιπλέον, βρίσκεται υπό εξέλιξη η ανοικτή τυχαίοποιημένη κλινική μελέτη φάσης II/III REMNANT, στην οποία η υποτροπή από αρνητική EYN αποτελεί την ένδειξη έναρξης θεραπείας (Askeland et al., 2020). Παρόλη την αυξανόμενη σημασία της EYN, η διεξοδική ανάλυση του ανοσολογικού προφίλ των ασθενών συναρτήσει της παρουσίας EYN δεν έχει ακόμη ερευνηθεί διεξοδικά. Σε μία σχετική μελέτη από τους Raiva και συνεργάτες (Raiva et al., 2016), βρέθηκε ότι αυξημένος αριθμός ερυθροβλαστών και προγονικών Β λεμφοκυττάρων σχετίζονται με μικρότερη συνολική επιβίωση αλλά και με βραχύτερη εξέλιξη της νόσου, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τα παρθένα και τα Β λεμφοκύτταρα μνήμης. Ωστόσο δεν συσχετίσθηκαν άμεσα με την παρουσία EYN. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη προτάθηκε ότι το ανοσολογικό προφίλ του κάθε ασθενούς μπορεί να συνοδεύει την πληροφορία της παρουσίας ή όχι EYN προς μία καλύτερη ομαδοποίηση των ασθενών, κάτι που αναδεικνύει την ανερχόμενη κλινική αξία του ανοσολογικού προφίλ των ασθενών και μετά τη θεραπεία. Στη δική μας ανάλυση διαπιστώθηκε ένα κοινό ανοσολογικό προφίλ μεταξύ ΜΟ και ΠΑ (αυξημένα ποσοστά δραστικών/δραστικών-μνήμης CD4+ λεμφοκυττάρων και CD8+ T λεμφοκυττάρων μνήμης) που σχετίζονταν με αρνητική EYN μετά από ASCT. Επομένως, αξίζει να αναφερθεί ο πιθανός συσχετισμός της επίκτητης ανοσίας μέσω των CD4+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων με τη διατήρηση της EYN σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, ή αλλιώς την επαναφορά της ανοσολογικής ισορροπίας προς την κατεύθυνση της καταστολής της ανάπτυξης (πιθανότατα μέσω ανοεπιτήρησης) των καρκινικών κυττάρων.

Όσον αφορά τα Tregs, η μειωμένη παρουσία των δραστικών/δραστικών-μνήμης Tregs στο ΜΟ των ασθενών συσχετίσθηκε επίσης με αρνητική EYN. Προς την ίδια κατεύθυνση με αυτά τα ευρήματα, στη μελέτη των Bryant και συνεργατών (Bryant et al., 2013), καταδεικνύεται ότι στους ασθενείς που επιτυγχάνουν μακροχρόνια επιβίωση, εντοπίζονται αυξημένα Th17 κύτταρα και μειωμένα Tregs. Ο λόγος που επιχειρείται αυτή η σύνδεση είναι γιατί σε πρόσφατη μετα-ανάλυση από τους Munshi και συνεργάτες (Munshi et al., 2020), εδραιώνεται η ισχυρή προγνωστική αξία της EYN στη μακροχρόνια επιβίωση στο ΠΜ.

Έχοντας στη διάθεση μας δείγμα ΠΑ κατά τη χρονική στιγμή ελέγχου EYN και την πληροφορία για τη θετικότητα ή αρνητικότητα της EYN, το επόμενο ερώτημα ήταν το κατά πόσο η συχνότητα κάποιων υποπληθυσμών μπορεί να προσδώσει προβλεπτικό αποτέλεσμα επί της παρουσίας EYN. Ο σκοπός μιας τέτοιας πρόβλεψης είναι η πιθανή εκτίμηση της επίσπευσης ή

καθυστέρησης της επόμενης βιοψίας ΜΟ για τον έλεγχο της ΕΥΝ. Στο ΠΑ, οι ασθενείς που μετά τη θεραπεία επιτυγχάνουν αρνητική ΕΥΝ είχαν αυξημένο λόγο δραστικών/παρθένων CD4+ Τ λεμφοκυττάρων αλλά και υψηλότερα ποσοστά CD8+ Τ λεμφοκυττάρων μνήμης και Tregs. Στη συνέχεια, εστιάζοντας στα παρθένα CD4+ Τ λεμφοκύτταρα και τα δραστικά/δραστικά-μνήμης CD4+ Τ λεμφοκύτταρα εκτελέσαμε ανάλυση πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης και στο διάγραμμα ROC επιτεύχθηκε AUC 0.8. Αξιοποιώντας αυτά τα δεδομένα, κατασκευάσαμε έναν υπολογιστικό αλγόριθμο, όπου με βάση την έκφραση αυτών των υποπληθυσμών σε ανεξάρτητη ομάδα 20 ασθενών επιτεύχθηκε η πρόβλεψη της ΕΥΝ με ευαισθησία 86%, ειδικότητα 85% και αρνητική προγνωστική αξία 92%. Αντίστοιχος αλγόριθμος πρόβλεψης δεν φαίνεται ότι υπάρχει στη βιβλιογραφία και ίσως αποτελεί μια πρώτη προσπάθεια για τη δημιουργία αλγορίθμων πρόγνωσης της ΕΥΝ με μη επεμβατική μέθοδο από το ΠΑ.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης του μικροπεριβάλλοντος αναδεικνύουν διακριτές ανοσολογικές υπογραφές στις διάφορες προγνωστικές ομάδες στα διάφορα στάδια του ΠΜ, αλλά και διακριτά προφίλ που σχετίζονται με διαφορετική ανταπόκριση των ασθενών με ΠΜ στην ίδια θεραπεία.

4.5 Τελικά συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Από την παρούσα διδακτορική διατριβή παρήχθησαν τα ακόλουθα αποτελέσματα σχετικά με το ΠΜ:

- Διερευνήθηκαν τα ex vivo μοντέλα μελέτης στο ΠΜ που μπορούν να προσομοιάσουν το μικροπεριβάλλον του ΜΟ
- Κατασκευάστηκε πρότυπη ex vivo πλατφόρμα με βασικά χαρακτηριστικά την ταχεία λήψη αποτελεσμάτων και το χαμηλό κόστος, και η πλατφόρμα δοκιμάστηκε σε περιορισμένη έκταση αλλά με επιτυχία
- Από την ευρεία ανάλυση του ανοσοφαινοτυπικού προφίλ ασθενών με ΠΜ σε διάφορα στάδια της νόσου ταυτοποιήθηκαν διακριτές ανοσολογικές υπογραφές σχετιζόμενες με τα χαρακτηριστικά της νόσου
- Η εξέταση συγκεκριμένων υποπληθυσμών στο ΠΑ των ασθενών με ΠΜ δύναται να ενημερώσει προβλεπτικά σχετικά με την ύπαρξη ΕΥΝ στο ΜΟ.

Μελλοντικά, ως συνέχεια των αποτελεσμάτων αυτής της διατριβής, προτείνουμε τους παρακάτω ερευνητικούς στόχους:

- Την περαιτέρω αξιοποίηση της ex vivo πλατφόρμας προς νέες εφαρμογές, όπως ο έλεγχος περισσότερων θεραπευτικών παραγόντων και ο εμπλουτισμός της με επιπλέον κυτταρικούς τύπους, όπως για παράδειγμα τα Tregs
- Τη διερεύνηση του προτεινόμενου αλγόριθμου πρόβλεψης EYN σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών
- Τη συσχέτιση της ανοσολογικής υπογραφής που καταγράψαμε με πιθανές θεραπευτικές επιλογές, στοχεύοντας στην παράταση της επιβίωσης των ασθενών με ΠΜ.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdi, J., Mutis, T., Garssen, J., and Redegeld, F.A. (2014). Toll-Like Receptor (TLR)-1/2 Triggering of Multiple Myeloma Cells Modulates Their Adhesion to Bone Marrow Stromal Cells and Enhances Bortezomib-Induced Apoptosis. *PLoS ONE* 9: e96608.
- Abramson, H.N. (2018). The Multiple Myeloma Drug Pipeline—2018: A Review of Small Molecules and Their Therapeutic Targets. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 18: 611-627
- Ahmed, S., Chauhan, V.M., Ghaemmaghami, A.M., and Aylott, J.W. (2019). New generation of bioreactors that advance extracellular matrix modelling and tissue engineering. *Biotechnol. Lett.* 41: 1–25.
- Ai, L., Mu, S., Sun, C., Fan, F., Yan, H., Qin, Y., et al. (2019). Myeloid-derived suppressor cells endow stem-like qualities to multiple myeloma cells by inducing piRNA-823 expression and DNMT3B activation. *Mol. Cancer.* 18: 88.
- Aleman-Ribes, M., and Semino, C.E. (2014). Bioengineering 3D environments for cancer models. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 79–80: 40–49.
- Alrasheed, N., Lee, L., Ghorani, E., Henry, J.Y., Conde, L., Chin, M., et al. (2020). Marrow-Infiltrating Regulatory T Cells Correlate with the Presence of Dysfunctional CD4+PD-1+ Cells and Inferior Survival in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* 26: 3443–3454.
- Ansari, S., Chen, C., Hasani-Sadrabadi, M.M., Yu, B., Zadeh, H.H., Wu, B.M., et al. (2017). Hydrogel elasticity and microarchitecture regulate dental-derived mesenchymal stem cell-host immune system cross-talk. *Acta Biomater.* 60: 181–189.
- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., and Noel, G. (2015). Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 5517–5527.
- Arhoma, A., Chantry, A.D., Haywood-Small, S.L., and Cross, N.A. (2017a). SAHA-induced TRAIL-sensitisation of Multiple Myeloma cells is enhanced in 3D cell culture. *Exp. Cell Res.* 360: 226–235.
- Arhoma, A., Chantry, A.D., Haywood-Small, S.L., and Cross, N.A. (2017b). SAHA-induced TRAIL-sensitisation of Multiple Myeloma cells is enhanced in 3D cell culture. *Exp. Cell Res.* 360: 226–235.
- Askeland, F.B., Rasmussen, A.-M., and Schjesvold, F. (2020). Relapse from MRD Negativity As Indication for Treatment in Multiple Myeloma - the Remnant Study. *Blood* 136: 21–22.
- Auclair, D., Lonial, S., Anderson, K.C., and Kumar, S.K. (2019). Precision medicine in multiple myeloma: are we there yet? *Expert Rev. Precis. Med. Drug Dev.* 4: 51–53.
- Avet-Loiseau, H., Ludwig, H., Landgren, O., Paiva, B., Morris, C., Yang, H., et al. (2020). Minimal Residual Disease Status as a Surrogate Endpoint for Progression-free Survival in Newly Diagnosed Multiple Myeloma Studies: A Meta-analysis. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 20: e30–e37.
- Belloni, D., Heltai, S., Ponzoni, M., Villa, A., Vergani, B., Pecciarini, L., et al. (2018). Modeling multiple myeloma-bone marrow interactions and response to drugs in a 3D surrogate microenvironment. *Haematologica* 103: 707–716.

Benson, D.M., Bakan, C.E., Mishra, A., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Becknell, B., et al. (2010). The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* 116: 2286–2294.

Bergsagel, P.L. (2014). Where we were, where we are, where we are going: progress in multiple myeloma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 199–203.

Bianchi, G., and Anderson, K.C. (2014). Understanding biology to tackle the disease: Multiple myeloma from bench to bedside, and back: Clinical Aspects and Biology of Myeloma. *CA: Cancer J. Clin.* 64: 422–444.

Bieghs, L., Brohus, M., Kristensen, I.B., Abildgaard, N., Bøgsted, M., Johnsen, H.E., et al. (2016). Abnormal IGF-Binding Protein Profile in the Bone Marrow of Multiple Myeloma Patients. *PLoS One* 11: e0154256.

Bieghs, L., Lub, S., Fostier, K., Maes, K., Van Valckenborgh, E., Menu, E., et al. (2014). The IGF-1 receptor inhibitor picropodophyllin potentiates the anti-myeloma activity of a BH3-mimetic. *Oncotarget*. 5: 11193–11208.

Bladé, J., Rosiñol, L., Cibeira, M.T., Rovira, M., and Carreras, E. (2010). Hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma beyond 2010. *Blood* 115: 3655–3663.

Bonomi, A., Steimberg, N., Benetti, A., Berenzi, A., Alessandri, G., Pascucci, L., et al. (2017). Paclitaxel-releasing mesenchymal stromal cells inhibit the growth of multiple myeloma cells in a dynamic 3D culture system. *Hematol. Oncol.* 35: 693–702.

Botta, C., Perez, C., Puig, N., Cedena, M.T., Cordon, L., Zabaleta, A., et al. (2019). S121 SINGLE-CELL CHARACTERIZATION OF THE MULTIPLE MYELOMA (MM) IMMUNE MICROENVIRONMENT IDENTIFIES CD27- T CELLS AS POTENTIAL SOURCE OF TUMOR-REACTIVE LYMPHOCYTES. *HemaSphere* 3: 12–13.

Braham, M.V., Deshantri, A.K., Minnema, M.C., Öner, F.C., Schiffelers, R.M., Fens, M.H., et al. (2018a). Liposomal drug delivery in an in vitro 3D bone marrow model for multiple myeloma. *Int. J. Nanomedicine* 13: 8105–8118.

Braham, M.V.J., Minnema, M.C., Aarts, T., Sebestyen, Z., Straetemans, T., Vyborova, A., et al. (2018b). Cellular immunotherapy on primary multiple myeloma expanded in a 3D bone marrow niche model. *Oncoimmunology* 7: e1434465.

Brimnes, M.K., Vangsted, A.J., Knudsen, L.M., Gimsing, P., Gang, A.O., Johnsen, H.E., et al. (2010). Increased Level of both CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells and CD14+HLA-DR-/low Myeloid-Derived Suppressor Cells and Decreased Level of Dendritic Cells in Patients with Multiple Myeloma: Immune Impairment in Patients with Multiple Myeloma. *Scand. J. Immunol.* 72: 540–547.

Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Frey, A.B., Greten, T.F., et al. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.* 7: 12150.

Bryant, C., Suen, H., Brown, R., Yang, S., Favaloro, J., Aklilu, E., et al. (2013). Long-term survival in multiple myeloma is associated with a distinct immunological profile, which includes proliferative cytotoxic T-cell clones and a favourable Treg/Th17 balance. *Blood Cancer J.* 3: e148.

Burger, R. (2013). Impact of interleukin-6 in hematological malignancies. *Transfus. Med. Hemother.* 40: 336–343.

- Bustoros, M., Mouhieddine, T.H., Detappe, A., and Ghobrial, I.M. (2017). Established and Novel Prognostic Biomarkers in Multiple Myeloma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book 37*: 548–560.
- Calimeri, T., Battista, E., Conforti, F., Neri, P., Di Martino, M.T., Rossi, M., et al. (2011). A unique three-dimensional SCID-polymeric scaffold (SCID-synth-hu) model for in vivo expansion of human primary multiple myeloma cells. *Leukemia 25*: 707–711.
- Chaicharoenaudomrung, N., Kunhorm, P., and Noisa, P. (2019). Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World J. Stem Cells 11*: 1065–1083.
- Chauhan, D. (2005). Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma. *Mol. Cancer Ther. 4*: 686–692.
- Chawla, S.S., Kumar, S.K., Dispenzieri, A., Greenberg, A.J., Larson, D.R., Kyle, R.A., et al. (2015). Clinical Course and Prognosis of Non-Secretory Multiple Myeloma. *Eur. J. Haematol. 95*: 57-64
- Chen, F., Hu, Y., Wang, X., Fu, S., Liu, Z., and Zhang, J. (2018). Expression of CD81 and CD117 in plasma cell myeloma and the relationship to prognosis. *Cancer Med. 7*: 5920–5927.
- Chen, X., Chen, J., Zhang, W., Sun, R., Liu, T., Zheng, Y., et al. (2017). Prognostic value of diametrically polarized tumor-associated macrophages in multiple myeloma. *Oncotarget 8*: 112685–112696.
- Cheriyath, V., Kuhns, M.A., Kalaycio, M.E., and Borden, E.C. (2011). Potentiation of apoptosis by histone deacetylase inhibitors and doxorubicin combination: cytoplasmic cathepsin B as a mediator of apoptosis in multiple myeloma. *Br. J. Cancer 104*: 957–967.
- Colombo, M., Galletti, S., Garavelli, S., Platonova, N., Paoli, A., Basile, A., et al. (2015). Notch signaling deregulation in multiple myeloma: A rational molecular target. *Oncotarget 6*: 26826–26840.
- Cossarizza, A., Chang, H.-D., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., et al. (2019). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol. 49*: 1457–1973.
- Crawford, L.J.A., Walker, B., Ovaa, H., Chauhan, D., Anderson, K.C., Morris, T.C.M., et al. (2006). Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLLCOCHO, PS-341, and MG-132. *Cancer Res. 66*: 6379–6386.
- Da Vià, M.C., Ziccheddu, B., Maeda, A., Bagnoli, F., Perrone, G., and Bolli, N. (2020). A Journey Through Myeloma Evolution: From the Normal Plasma Cell to Disease Complexity. *Hemasphere 4*: e502.
- De Beule, N., De Veirman, K., Maes, K., De Bruyne, E., Menu, E., Breckpot, K., et al. (2017). Tumour-associated macrophage-mediated survival of myeloma cells through STAT3 activation: TAM-mediated survival of myeloma cells. *J. Pathol. 241*: 534–546.
- De Veirman, K., Wang, J., Xu, S., Leleu, X., Himpe, E., Maes, K., et al. (2016). Induction of miR-146a by multiple myeloma cells in mesenchymal stromal cells stimulates their pro-tumoral activity. *Cancer Lett. 377*: 17–24.
- Denard, B., Lee, C., and Ye, J. (2012). Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1. *ELife 1*: e00090.

Denard, B., Seemann, J., Chen, Q., Gay, A., Huang, H., Chen, Y., et al. (2011). The Membrane-Bound Transcription Factor CREB3L1 Is Activated in Response to Virus Infection to Inhibit Proliferation of Virus-Infected Cells. *Cell Host Microbe* 10: 65–74.

Dhaliwal, A. (2015). 3D Cell Culture: A Review. *Mater Methods* 2012 2:162.

Di Marzo, L., Desantis, V., Solimando, A.G., Ruggieri, S., Annese, T., Nico, B., et al. (2016). Microenvironment drug resistance in multiple myeloma: emerging new players. *Oncotarget* 7: 60698–60711.

Dimopoulos, M.A., Lonial, S., White, D., Moreau, P., Weisel, K., San-Miguel, J., et al. (2020). Elotuzumab, lenalidomide, and dexamethasone in RRMM: final overall survival results from the phase 3 randomized ELOQUENT-2 study. *Blood Cancer J.* 10: 91.

Dimopoulos, M.A., Oriol, A., Nahi, H., San-Miguel, J., Bahlis, N.J., Usmani, S.Z., et al. (2016). Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 375: 1319–1331.

Dongen, J.J.M. van, Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., Velden, V.H.J. van der, Flores-Montero, J., et al. (2012). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 26: 1908–1975.

Dosani, T., Carlsten, M., Maric, I., and Landgren, O. (2015). The cellular immune system in myelomagenesis: NK cells and T cells in the development of MM and their uses in immunotherapies. *Blood Cancer J.* 5: e306–e306.

Dutta, A.K., Fink, J.L., Grady, J.P., Morgan, G.J., Mullighan, C.G., To, L.B., et al. (2019). Subclonal evolution in disease progression from MGUS/SMM to multiple myeloma is characterised by clonal stability. *Leukemia* 33: 457–468.

Fang, Y., and Eglén, R.M. (2017). Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov.* 22: 456–472.

Favaloro, J., Brown, R., Aklilu, E., Yang, S., Suen, H., Hart, D., et al. (2014). Myeloma skews regulatory T and pro-inflammatory T helper 17 cell balance in favor of a suppressive state. *Leuk Lymphoma* 55: 1090–1098.

Felfly, H., and Haddad, G.G. (2014). Hematopoietic stem cells: potential new applications for translational medicine. *J. Stem Cells* 9: 163–197.

Fernández de Larrea, C., Kyle, R.A., Durie, B.G.M., Ludwig, H., Usmani, S., Vesole, D.H., et al. (2013). Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia* 27: 780–791.

Ferrarini, M., Steimberg, N., Boniotti, J., Berenzi, A., Belloni, D., Mazzoleni, G., et al. (2017). 3D-Dynamic Culture Models of Multiple Myeloma. *Methods Mol. Biol.* 1612: 177–190.

Ferreira, B., Caetano, J., Barahona, F., Lopes, R., Carneiro, E., Costa-Silva, B., et al. (2020). Liquid biopsies for multiple myeloma in a time of precision medicine. *J. Mol. Med.* 4: 513–525

Foglietta, M., Castella, B., Mariani, S., Coscia, M., Godio, L., Ferracini, R., et al. (2014). The bone marrow of myeloma patients is steadily inhabited by a normal-sized pool of functional regulatory T cells irrespective of the disease status. *Haematologica* 99: 1605–1610.

Gandolfi, S., Laubach, Jacob P., Hideshima, T., Chauhan, D., Anderson, Kenneth C., and Richardson, Paul G. (2017a). The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Rev.* 36: 561–584.

Gandolfi, S., Laubach, J.P., Hideshima, T., Chauhan, D., Anderson, K.C., and Richardson, P.G. (2017b). The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Rev.* 36: 561–584.

Gertz, M.A., and Dingli, D. (2014). How we manage autologous stem cell transplantation for patients with multiple myeloma. *Blood* 124: 882–890.

Giannopoulos, K., Kaminska, W., Hus, I., and Dmoszynska, A. (2012). The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: detailed characterisation of immune status in multiple myeloma. *Br J Cancer* 106: 546–552.

Giuliani, N., Bataille, R., Mancini, C., Lazzaretti, M., and Barillé, S. (2001). Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* 98: 3527–3533.

Gkatzamanidou, M., Christoulas, D., Souliotis, V.L., Papatheodorou, A., Dimopoulos, M.A., and Terpos, E. (2013). Angiogenic cytokines profile in smoldering multiple myeloma: no difference compared to MGUS but altered compared to symptomatic myeloma. *Med. Sci. Monit.* 19: 1188–1194.

Gnecchi, M., and Melo, L.G. (2009). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol. Biol.* 482: 281–294.

Golubovskaya, V., and Wu, L. (2016). Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 8: 36.

González-Calle, V., Keane, N., Braggio, E., and Fonseca, R. (2017). Precision Medicine in Myeloma: Challenges in Defining an Actionable Approach. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 17: 621–630.

Görgün, G.T., Whitehill, G., Anderson, J.L., Hideshima, T., Maguire, C., Laubach, J., et al. (2013). Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood* 121: 2975–2987.

Gregor, A., Filová, E., Novák, M., Kronek, J., Chlup, H., Buzgo, M., et al. (2017). Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *J. Med. Biol. Eng.* 11: 31.

Greipp, P.R., San Miguel, J., Durie, B.G.M., Crowley, J.J., Barlogie, B., Bladé, J., et al. (2005). International staging system for multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 23: 3412–3420.

Guerrero-Garcia, T.A., Gandolfi, S., Laubach, J.P., Hideshima, T., Chauhan, D., Mitsiades, C., et al. (2018). The power of proteasome inhibition in multiple myeloma. *Expert Rev Proteomics* 15: 1033–1052.

Guillerey, C., Nakamura, K., Vuckovic, S., Hill, G.R., and Smyth, M.J. (2016). Immune responses in multiple myeloma: role of the natural immune surveillance and potential of immunotherapies. *Cell Mol. Life. Sci.* 73: 1569–1589.

- Gundesen, M.T., Lund, T., Moeller, H.E.H., and Abildgaard, N. (2019). Plasma Cell Leukemia: Definition, Presentation, and Treatment. *Curr. Oncol. Rep.* 21: 8.
- Ham, J., Lever, L., Fox, M., and Reagan, M.R. (2019). In Vitro 3D Cultures to Reproduce the Bone Marrow Niche. *JBMR Plus* 3: e10228.
- Harvey, R.D., and Lonial, S. (2007). PI3 kinase/AKT pathway as a therapeutic target in multiple myeloma. *Future Oncol.* 3: 639–647.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Hayashi, T., Akiyama, M., Mitsiades, N., Mitsiades, C., et al. (2003). Proteasome inhibitor PS-341 abrogates IL-6 triggered signaling cascades via caspase-dependent downregulation of gp130 in multiple myeloma. *Oncogene* 22: 8386–8393.
- Hoarau-Véchet, J., Rafii, A., Touboul, C., and Pasquier, J. (2018). Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *Int. J. Mol. Sci.* 19:181.
- Holstein, S.A., and McCarthy, P.L. (2017). Immunomodulatory drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and clinical experience. *Drugs* 77: 505–520.
- Hou, J., Wei, R., Qian, J., Wang, R., Fan, Z., Gu, C., et al. (2019). The impact of the bone marrow microenvironment on multiple myeloma (Review). *Oncol. Rep.* 42: 1272-1282
- Huang, Y.-H., Molavi, O., Alshareef, A., Haque, M., Wang, Q., Chu, M.P., et al. (2018). Constitutive Activation of STAT3 in Myeloma Cells Cultured in a Three-Dimensional, Reconstructed Bone Marrow Model. *Cancers (Basel)* 10:206.
- International Myeloma Working Group (2003). Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br. J. Haematol.* 121: 749–757.
- Jagannath, S. (2008). Pathophysiological underpinnings of multiple myeloma progression. *J. Manag. Care Spec. Pharm.* 14: 7–11.
- Jagannath, S., Abonour, R., Durie, B.G.M., Gasparetto, C., Hardin, J.W., Narang, M., et al. (2018). Heterogeneity of Second-Line Treatment for Patients With Multiple Myeloma in the Connect MM Registry (2010-2016). *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 18: 480-485.e3.
- Jakubikova, J., Cholujova, D., Hideshima, T., Gronosova, P., Soltysova, A., Harada, T., et al. (2016). A novel 3D mesenchymal stem cell model of the multiple myeloma bone marrow niche: biologic and clinical applications. *Oncotarget* 7: 77326–77341.
- Ji, Z., Su, J., Wu, D., Peng, H., Zhao, W., Nlong Zhao, B., et al. (2017). Predicting the impact of combined therapies on myeloma cell growth using a hybrid multi-scale agent-based model. *Oncotarget* 8: 7647–7665.
- Jovanović, K.K., Roche-Lestienne, C., Ghobrial, I.M., Facon, T., Quesnel, B., and Manier, S. (2018). Targeting MYC in multiple myeloma. *Leukemia* 32: 1295–1306.
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., et al. (2018). 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci* 14: 910–919.

- Katz, B.-Z. (2010). Adhesion molecules--The lifelines of multiple myeloma cells. *Semin. Cancer Biol.* 20: 186–195.
- Kawano, Y., Roccaro, A.M., Ghobrial, I.M., and Azzi, J. (2017). Multiple Myeloma and the Immune Microenvironment. *Curr. Cancer Drug Targets* 17: 806–818.
- Kazandjian, D. (2016). Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin. Oncol.* 43: 676–681.
- Khin, Z.P., Ribeiro, M.L.C., Jacobson, T., Hazlehurst, L., Perez, L., Baz, R., et al. (2014). A preclinical assay for chemosensitivity in multiple myeloma. *Cancer Res.* 74: 56–67.
- Kirshner, J., Thulien, K.J., Martin, L.D., Debes Marun, C., Reiman, T., Belch, A.R., et al. (2008a). A unique three-dimensional model for evaluating the impact of therapy on multiple myeloma. *Blood* 112: 2935–2945.
- Kirshner, J., Thulien, K.J., Martin, L.D., Debes Marun, C., Reiman, T., Belch, A.R., et al. (2008b). A unique three-dimensional model for evaluating the impact of therapy on multiple myeloma. *Blood* 112: 2935–2945.
- Koike, M., Sekigawa, I., Okada, M., Matsumoto, M., Iida, N., Hashimoto, H., et al. (2002). Relationship between CD4(+)/CD8(+) T cell ratio and T cell activation in multiple myeloma: reference to IL-16. *Leuk. Res.* 26: 705–711.
- Kostopoulos, I.V., Ntanasis-Stathopoulos, I., Gavriatopoulou, M., Tsitsilonis, O.E., and Terpos, E. (2020). Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma: Current Landscape and Future Applications With Immunotherapeutic Approaches. *Front. Oncol.* 10: 860.
- Kotsakis, A., Koinis, F., Katsarou, A., Gioulbasani, M., Aggouraki, D., Kentepozidis, N., et al. (2016). Prognostic value of circulating regulatory T cell subsets in untreated non-small cell lung cancer patients. *Sci Rep* 6: 39247.
- Kumar, S., Kaufman, J.L., Gasparetto, C., Mikhael, J., Vij, R., Pegourie, B., et al. (2017a). Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood* 130: 2401–2409.
- Kumar, S., Paiva, B., Anderson, K.C., Durie, B., Landgren, O., Moreau, P., et al. (2016). International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 17: e328–e346.
- Kumar, S., and Rajkumar, S.V. (2005). Thalidomide and dexamethasone: therapy for multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 5: 759–766.
- Kumar, S.K., Rajkumar, V., Kyle, R.A., Duin, M. van, Sonneveld, P., Mateos, M.-V., et al. (2017b). Multiple myeloma. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3: 17046.
- Kyle, R.A., Durie, B.G.M., Rajkumar, S.V., Landgren, O., Blade, J., Merlini, G., et al. (2010). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 24: 1121–1127.
- Kyle, R.A., and Rajkumar, S.V. (2004). Multiple myeloma. *N Engl J Med* 351: 1860–1873.

- Lad, D., Huang, Q., Hoeppli, R., Garcia, R., Xu, L., Levings, M., et al. (2019). Evaluating the role of Tregs in the progression of multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* 60: 2134–2142.
- Lancman, G., Richter, J., and Chari, A. (2020). Bispecifics, trispecifics, and other novel immune treatments in myeloma. *Hematology* 2020: 264–271.
- Landgren, O., Devlin, S., Boulad, M., and Mailankody, S. (2016). Role of MRD status in relation to clinical outcomes in newly diagnosed multiple myeloma patients: a meta-analysis. *Bone Marrow Transplant.* 51: 1565–1568.
- Landgren, O., Lu, S.X., and Hultcrantz, M. (2018). MRD Testing in Multiple Myeloma: The Main Future Driver for Modern Tailored Treatment. *Semin. Hematol.* 55: 44–50.
- Landgren, O., and Rajkumar, S.V. (2016). New Developments in Diagnosis, Prognosis, and Assessment of Response in Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* 22: 5428–5433.
- Ledergor, G., Weiner, A., Zada, M., Wang, S.-Y., Cohen, Y.C., Gatt, M.E., et al. (2018). Single cell dissection of plasma cell heterogeneity in symptomatic and asymptomatic myeloma. *Nat. Med.* 24: 1867–1876.
- Lee, S., Wang, F., Trujillo-Ocampo, A., Ruiz-Vasquez, W., Cho, H., Takahashi, K., et al. (2020). Fidelity of peripheral blood for monitoring genomics and tumor immune-microenvironment in myelodysplastic syndromes. *EJHaem* 1: 552–557.
- Lemaire, M., Deleu, S., De Bruyne, E., Van Valckenborgh, E., Menu, E., and Vanderkerken, K. (2011). The microenvironment and molecular biology of the multiple myeloma tumor. *Adv. Cancer Res.* 110: 19–42.
- Li, L., and Wang, L. (2019). Multiple Myeloma: What Do We Do About Immunodeficiency? *Int. J. Cancer* 10: 1675–1684.
- Lin, X., Patil, S., Gao, Y.-G., and Qian, A. (2020). The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Front. Pharmacol.* 11: 757.
- Lionetti, M., and Neri, A. (2017). Utilizing next-generation sequencing in the management of multiple myeloma. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 17: 653–663.
- Lohr, J.G., Stojanov, P., Carter, S.L., Cruz-Gordillo, P., Lawrence, M.S., Auclair, D., et al. (2014). Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell* 25: 91–101.
- Maes, K., Smedt, E.D., Lemaire, M., Raeve, H.D., Menu, E., Van Valckenborgh, E., et al. (2014). The role of DNA damage and repair in decitabine-mediated apoptosis in multiple myeloma. *Oncotarget* 5: 3115–3129.
- Manier, S., Sacco, A., Leleu, X., Ghobrial, I.M., and Roccaro, A.M. (2012). Bone Marrow Microenvironment in Multiple Myeloma Progression. *J Biomed Biotechnol* 2012:.
- Manier, S., Salem, K.Z., Park, J., Landau, D.A., Getz, G., and Ghobrial, I.M. (2017). Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14: 100–113.

- Marsh-Wakefield, F., Kruzins, A., McGuire, H.M., Yang, S., Bryant, C., Fazekas de St. Groth, B., et al. (2019). Mass Cytometry Discovers Two Discrete Subsets of CD39–Treg Which Discriminate MGUS From Multiple Myeloma. *Front. Immunol.* *10*: 1596.
- Martowicz, A., Kern, J., Gunsilius, E., and Untergasser, G. (2015). Establishment of a human multiple myeloma xenograft model in the chicken to study tumor growth, invasion and angiogenesis. *J. Vis. Exp.* e52665.
- Melzer, S., Nunes, C.S.M., Endringer, D.C., Andrade, T.U. de, Tarnok, A., and Lenz, D. (2016). Trypan blue as an affordable marker for automated live-dead cell analysis in image cytometry: Trypan Blue for automated analysis in image cytometry. *Scanning* *38*: 857–863.
- Metsalu, T., and Vilo, J. (2015). ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* *43*: W566–W570.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., and Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* *56*: 185–229.
- Mithraprabhu, S., Khong, T., Ramachandran, M., Chow, A., Klarica, D., Mai, L., et al. (2017). Circulating tumour DNA analysis demonstrates spatial mutational heterogeneity that coincides with disease relapse in myeloma. *Leukemia* *31*: 1695–1705.
- Mitsiades, C.S., McMillin, D.W., Klippel, S., Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P.G., et al. (2007). The role of the bone marrow microenvironment in the pathophysiology of myeloma and its significance in the development of more effective therapies. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *21*: 1007–1034.
- Moesta, A.K., Li, X.-Y., and Smyth, M.J. (2020). Targeting CD39 in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* *20*: 739–755.
- Moloudizargari, M., Abdollahi, M., Asghari, M.H., Zimta, A.A., Neagoe, I.B., and Nabavi, S.M. (2019). The emerging role of exosomes in multiple myeloma. *Blood Rev* *38*: 100595.
- Monnier, A., Al Tawil, E., Nguyen, Q.T., Valleton, J.-M., Fatyeyeva, K., and Deschrevel, B. (2018). Functionalization of poly(lactic acid) scaffold surface by aminolysis and hyaluronan immobilization: How it affects mesenchymal stem cell proliferation. *Eur. Polym. J.* *107*: 202–217.
- Moreau, P., and Minvielle, S. (2013). Multiple myeloma: so much progress, but so many unsolved questions. *Haematologica* *98*: 487–489.
- Moser-Katz, T., Joseph, N.S., Dhodapkar, M.V., Lee, K.P., and Boise, L.H. (2021). Game of Bones: How Myeloma Manipulates Its Microenvironment. *Front. Oncol.* *10*: 625199.
- Munshi, N.C., Avet-Loiseau, H., Anderson, K.C., Neri, P., Paiva, B., Samur, M., et al. (2020). A large meta-analysis establishes the role of MRD negativity in long-term survival outcomes in patients with multiple myeloma. *Blood Adv.* *4*: 5988–5999.
- Munshi, N.C., Avet-Loiseau, H., Rawstron, A.C., Owen, R.G., Child, J.A., Thakurta, A., et al. (2017). Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. *JAMA Oncol.* *3*: 28.

- Mutlu, P., Kiraz, Y., Gündüz, U., and Baran, Y. (2015). An update on molecular biology and drug resistance mechanisms of multiple myeloma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *96*: 413–424.
- Naymagon, L., and Abdul-Hay, M. (2016). Novel agents in the treatment of multiple myeloma: a review about the future. *J. Hematol. Oncol.* *9*: 52.
- Nemeth, K., Mayer, B., Sworder, B.J., Kuznetsov, S.A., and Mezey, E. (2013). A Practical Guide to Culturing Mouse and Human Bone Marrow Stromal Cells: Culturing Mouse and Human Bone Marrow Stromal Cells. *Curr. Protoc. Immunol.* *102*: 22F.12.1-22F.12.13.
- Nikfarjam, S., Rezaie, J., Zolbanin, N.M., and Jafari, R. (2020). Mesenchymal stem cell derived-exosomes: a modern approach in translational medicine. *J. Transl. Med.* *18*: 449.
- Nikolova, M.P., and Chavali, M.S. (2019). Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioact. Mater.* *4*: 271–292.
- Nishikawa, H., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer.* *759-767*
- Offidani, M., Corvatta, L., Morè, S., and Olivieri, A. (2021). Novel Experimental Drugs for Treatment of Multiple Myeloma. *J. Exp. Pharmacol.* *13*: 245–264.
- Ostuni, R., Kratochvill, F., Murray, P.J., and Natoli, G. (2015). Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol.* *36*: 229–239.
- Paiva, B., Cedena, M.-T., Puig, N., Arana, P., Vidriales, M.-B., Cordon, L., et al. (2016). Minimal residual disease monitoring and immune profiling in multiple myeloma in elderly patients. *Blood* *127*: 3165–3174.
- Palumbo, A., Avet-Loiseau, H., Oliva, S., Lokhorst, H.M., Goldschmidt, H., Rosinol, L., et al. (2015). Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J. Clin. Oncol.* *33*: 2863–2869.
- Papadas, A., and Asimakopoulos, F. (2018). Mechanisms of Resistance in Multiple Myeloma. *Handb. Exp. Pharmacol.* *249*: 251–288.
- Papadimitriou, K., Kostopoulos, I.V., Tsopanidou, A., Orogas-Stavrou, N., Kastritis, E., Tsitsilonis, O., et al. (2020a). Ex Vivo Models Simulating the Bone Marrow Environment and Predicting Response to Therapy in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)* *12*: 2006.
- Papadimitriou, K., Tsakirakis, N., Malandrakis, P., Vitsos, P., Metousis, A., Orogas-Stavrou, N., et al. (2020b). Deep Phenotyping Reveals Distinct Immune Signatures Correlating with Prognostication, Treatment Responses, and MRD Status in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)* *12*: 3245.
- Park, J., Bae, E.-K., Lee, C., Choi, J.-H., Jung, W.J., Ahn, K.-S., et al. (2014). Establishment and characterization of bortezomib-resistant U266 cell line: Constitutive activation of NF-κB-mediated cell signals and/or alterations of ubiquitylation-related genes reduce bortezomib-induced apoptosis. *BMB Reports* *47*: 274–279.
- Patel, A.G., and Kaufmann, S.H. (2012). How does doxorubicin work? *ELife* *1*: e00387.
- Pawlyn, C., and Davies, F.E. (2019). Toward personalized treatment in multiple myeloma based on molecular characteristics. *Blood* *133*: 660–675.

- Perrot, A., Lauwers-Cances, V., Corre, J., Robillard, N., Hulin, C., Chretien, M.-L., et al. (2018). Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 132: 2456–2464.
- Pittari, G., Vago, L., Festuccia, M., Bonini, C., Mudawi, D., Giaccone, L., et al. (2017). Restoring Natural Killer Cell Immunity against Multiple Myeloma in the Era of New Drugs. *Front. Immunol.* 8: 1444.
- Podar, K., and Anderson, K.C. (2005). The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 105: 1383–1395.
- Puente, P. de la, and Azab, A.K. (2016). 3D tissue-engineered bone marrow: what does this mean for the treatment of multiple myeloma? *Future Oncol.* 12: 1545–1547.
- Puente, P. de la, Muz, B., Gilson, R.C., Azab, F., Luderer, M., King, J., et al. (2015). 3D tissue-engineered bone marrow as a novel model to study pathophysiology and drug resistance in multiple myeloma. *Biomaterials* 73: 70–84.
- Raja KR, Hajek R. Contribution of regulatory T cells to immunosuppression and disease progression in multiple myeloma patients. *Oncoimmunology* 2013 2: e25619.
- Rajkumar, S.V., Dimopoulos, M.A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., et al. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 15: e538-548.
- Rajkumar, S.V., Gertz, M.A., Kyle, R.A., and Greipp, P.R. (2002). Current Therapy for Multiple Myeloma. *Mayo Clinic Proceedings* 77: 813–822.
- Rajkumar, V. (2018). Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* 93: 981–1114.
- Ralhan, R., and Kaur, J. (2007). Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 17: 1061–1075.
- Ramachandran, I.R., Condamine, T., Lin, C., Herlihy, S.E., Garfall, A., Vogl, D.T., et al. (2016). Bone marrow PMN-MDSCs and neutrophils are functionally similar in protection of multiple myeloma from chemotherapy. *Cancer Lett.* 371: 117–124.
- Ramakrishnan, A., Torok-Storb, B., and Pillai, M.M. (2013). PRIMARY MARROW DERIVED STROMAL CELLS: ISOLATION AND MANIPULATION. *Methods Mol. Biol.* 1035: 75–101.
- Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S.R., Anuradha, E., and Solomon, F.D.P. (2015). 3D cell culture systems: advantages and applications. *J. Cell. Physiol.* 230: 16–26.
- Reagan, M.R., Liaw, L., Rosen, C.J., and Ghobrial, I.M. (2015). Dynamic interplay between bone and multiple myeloma: emerging roles of the osteoblast. *Bone* 75: 161–169.
- Reagan, M.R., Mishima, Y., Glavey, S.V., Zhang, Y., Manier, S., Lu, Z.N., et al. (2014). Investigating osteogenic differentiation in multiple myeloma using a novel 3D bone marrow niche model. *Blood* 124: 3250–3259.
- Ri, M. (2016). “Mechanism of Action of Bortezomib in Multiple Myeloma Therapy.” *Int. J. Myeloma* 6: 1-6

- Ribatti, D., Moschetta, M., and Vacca, A. (2014). Macrophages in multiple myeloma. *Immunol Lett.* *161*: 241–244.
- Robak, P., Drozd, I., Szemraj, J., and Robak, T. (2018). Drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Treat. Rev.* *70*: 199–208.
- Roccaro, A.M., Sacco, A., Maiso, P., Azab, A.K., Tai, Y.-T., Reagan, M., et al. (2013). BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J. Clin. Invest.* *123*: 1542–1555.
- Rodrigues, N., Benning, M., Ferreira, A.M., Dixon, L., and Dalgarno, K. (2016). Manufacture and Characterisation of Porous PLA Scaffolds. *Procedia CIRP* *49*: 33–38.
- Rüdinger, F., Lavrentieva, A., Blume, C., Pepelanova, I., and Scheper, T. (2014). Hydrogels for 3D mammalian cell culture: A starting guide for laboratory practice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *99*: 623–636.
- San Miguel, J.F., González, M., Gascón, A., Moro, M.J., Hernández, J.M., Ortega, F., et al. (1992). Lymphoid subsets and prognostic factors in multiple myeloma. Cooperative Group for the Study of Monoclonal Gammopathies. *Br. J. Haematol.* *80*: 305–309.
- Sanchez, W.Y., McGee, S.L., Connor, T., Mottram, B., Wilkinson, A., Whitehead, J.P., et al. (2013). Dichloroacetate inhibits aerobic glycolysis in multiple myeloma cells and increases sensitivity to bortezomib. *Br. J. Cancer* *108*: 1624–1633.
- Sekine, L., Ziegelmann, P.K., Manica, D., Fonte Pithan, C. da, Sosnoski, M., Morais, V.D., et al. (2019). Frontline treatment for transplant-eligible multiple myeloma: A 6474 patients network meta-analysis. *Hematol. Oncol.* *37*: 62–74.
- Serafini, P., Mgebroff, S., Noonan, K., and Borrello, I. (2008). Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Cross-Tolerance in B-Cell Lymphoma by Expanding Regulatory T Cells. *Cancer Res.* *68*: 5439–5449.
- Shay, G., Hazlehurst, L., and Lynch, C.C. (2016). Dissecting the multiple myeloma-bone microenvironment reveals new therapeutic opportunities. *J. Mol. Med.* *94*: 21–35.
- Silva, A., Silva, M.C., Sudalagunta, P., Distler, A., Jacobson, T., Collins, A., et al. (2017). An Ex Vivo Platform for the Prediction of Clinical Response in Multiple Myeloma. *Cancer Res.* *77*: 3336–3351.
- Sitarski, A., and Reagan, M. (2017). 3D Tissue Engineered in Vitro Models of Cancer in Bone. *ACS Biomater. Sci. Eng.* *4*: 324–336.
- Sonneveld, P., Avet-Loiseau, H., Lonial, S., Usmani, S., Siegel, D., Anderson, K.C., et al. (2016). Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood* *127*: 2955–2962.
- Stakiw, J., Bosch, M., and Goubran, H. (2017). A closer look at the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Tumor and Microenvironment* *1*: 1–8.
- Szalat, R., and Munshi, N.C. (2015). Genomic heterogeneity in multiple myeloma. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *30*: 56–65.

- Szmania, S., Lapteva, N., Garg, T., Greenway, A., Lingo, J., Nair, B., et al. (2015). Ex vivo-expanded natural killer cells demonstrate robust proliferation in vivo in high-risk relapsed multiple myeloma patients. *J. Immunother.* *38*: 24–36.
- Tai, Y.-T., Acharya, C., An, G., Moschetta, M., Zhong, M.Y., Feng, X., et al. (2016). APRIL and BCMA promote human multiple myeloma growth and immunosuppression in the bone marrow microenvironment. *Blood* *127*: 3225–3236.
- Thorn, C.F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T.E., et al. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genomics* *21*: 440–446.
- Tibbitt, M.W., and Anseth, K.S. (2009). Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture. *Biotechnol. Bioeng.* *103*: 655–663.
- Tibullo, D., Giallongo, C., Romano, A., Vicario, N., Barbato, A., Puglisi, F., et al. (2020). Mitochondrial Functions, Energy Metabolism and Protein Glycosylation are Interconnected Processes Mediating Resistance to Bortezomib in Multiple Myeloma Cells. *Biomolecules* *10*: 696.
- Turnbull, G., Clarke, J., Picard, F., Riches, P., Jia, L., Han, F., et al. (2018). 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact. Mater.* *3*: 278–314.
- Ullah, T.R. (2019). The role of CXCR4 in multiple myeloma: Cells' journey from bone marrow to beyond. *J. Bone Oncol.* *17*: 100253.
- Veglia, F., Perego, M., and Gabrilovich, D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.* *19*: 108–119.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* *8*: 523–532.
- Viswanathan, S., Shi, Y., Galipeau, J., Krampera, M., Leblanc, K., Martin, I., et al. (2019). Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy* *21*: 1019–1024.
- Wang, H., Hu, W.-M., Xia, Z.-J., Liang, Y., Lu, Y., Lin, S.-X., et al. (2019). High numbers of CD163+ tumor-associated macrophages correlate with poor prognosis in multiple myeloma patients receiving bortezomib-based regimens. *J. Cancer* *10*: 3239–3245.
- Willenbacher, W., Seeber, A., Steiner, N., Willenbacher, E., Gatalica, Z., Swensen, J., et al. (2018). Towards Molecular Profiling in Multiple Myeloma: A Literature Review and Early Indications of Its Efficacy for Informing Treatment Strategies. *Int. J. Mol. Sci.* *19*: 2087.
- Wooldridge, J.E., Anderson, C.M., and Perry, M.C. (2001). Corticosteroids in advanced cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. *15*: 225–234.
- Xu, C., Dai, G., and Hong, Y. (2019). Recent advances in high-strength and elastic hydrogels for 3D printing in biomedical applications. *Acta Biomater.* *95*: 50–59.
- Yang, L., Chen, J., Han, X., Zhang, E., Huang, X., Guo, X., et al. (2018). Pirh2 mediates the sensitivity of myeloma cells to bortezomib via canonical NF- κ B signaling pathway. *Protein Cell* *9*: 770–784.

Zelle-Rieser, C., Thangavadivel, S., Biedermann, R., Brunner, A., Stoitzner, P., Willenbacher, E., et al. (2016). T cells in multiple myeloma display features of exhaustion and senescence at the tumor site. *J. Hematol. Oncol.* *9*: 116.

Zhang, M., Gu, L., Zheng, P., Chen, Z., Dou, X., Qin, Q., et al. (2020). Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. *J. Clin. Lab. Anal.* *34*: e23024.

Zhang, W., Gu, Y., Sun, Q., Siegel, D.S., Toliás, P., Yang, Z., et al. (2015). Ex Vivo Maintenance of Primary Human Multiple Myeloma Cells through the Optimization of the Osteoblastic Niche. *PLoS One* *10*: e0125995.

Zhang, W., Lee, W.Y., Siegel, D.S., Toliás, P., and Zilberberg, J. (2013). Patient-Specific 3D Microfluidic Tissue Model for Multiple Myeloma. *Tissue Eng. Part C: Methods* *20*: 663–670.

Zhang, W., Lee, W.Y., and Zilberberg, J. (2017). Tissue Engineering Platforms to Replicate the Tumor Microenvironment of Multiple Myeloma. *Methods Mol. Biol.* *1513*: 171–191.

Zhao, H., Bo, C., Kang, Y., and Li, H. (2017). What Else Can CD39 Tell Us? *Front. Immunol.* *8*: 727.

Zhou, X., Steinhardt, M.J., Grathwohl, D., Meckel, K., Nickel, K., Leicht, H.-B., et al. (2020). Multiagent therapy with pomalidomide, bortezomib, doxorubicin, dexamethasone, and daratumumab ('Pom-PAD-Dara') in relapsed/refractory multiple myeloma. *Cancer Med.* *9*: 5819–5826.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Συμπληρωματικός Πίνακας 1. Οι κατά ζεύγη συγκρίσεις των ανοσολογικών υποπληθυσμών μεταξύ ΠΑ-ΜΟ από τους ίδιους ασθενείς κατά τη διάγνωση του ΠΜ και κατά την πλήρη ύφεση μετά από θεραπεία

Υποπληθυσμός	Διάγνωση		p value	Πλήρης ύφεση		p value
	BM	PB		BM	PB	
T cells (% of nucleated cells)	10.52 ± 6.52	13.57 ± 8.09	0.004	8.64 ± 7.30	11.25 ± 9.85	0.85
CD27+ T cells (% of T cells)	69.80 ± 20.41	67.31 ± 20.29	0.26	50.52 ± 19.12	47.58 ± 26.41	0.74
CD4+ T cells (% of CD3)	51.10 ± 14.70	61.40 ± 15.7	<0.001	40.94 ± 16.06	46.33 ± 18.2	<0.001
Naïve CD4+ T cells (% of CD4)	28.43 ± 21.16	34.3 ± 21.5	0.002	15.48 ± 14.02	14.50 ± 12.81	0.39
Prol Naïve CD4+ T cells (% of CD4)	0.59 ± 0.72	0.90 ± 0.71	0.014	0.34 ± 0.45	0.21 ± 0.33	0.006
Effector/effector memory CD4+ T cells (% of CD4)	68.44 ± 21.47	62.13 ± 21.70	<0.001	82.79 ± 14.84	83.89 ± 13.5	0.36
Prol. Effector/effector memory CD4+ T cells (% of CD4)	1.55 ± 0.85	1.94 ± 0.90	0.06	2.04 ± 0.91	1.9 ± 0.88	0.34
Tregs (% of CD4)	1.19 ± 0.86	1.10 ± 0.80	0.57	1.74 ± 1.48	1.71 ± 1.52	0.88
Resting Tregs (% of Tregs)	15.33 ± 16.44	16.30 ± 19.75	0.92	8.11 ± 19.24	9.03 ± 19.21	0.51
Prol. resting Tregs (% of Tregs)	3.11 ± 4.69	6.25 ± 10.54	0.26	1.16 ± 1.98	0.79 ± 1.79	0.54
Effector/effector memory Tregs (% of Tregs)	14.60 ± 8.23	9.33 ± 8.03	0.03	12.18 ± 7.83	12.06 ± 11.42	0.51
Prol. effector/effector memory Tregs (% of Tregs)	0.15 ± 0.09	1.16 ± 0.62	0.43	1.48 ± 0.43	1.41 ± 1.32	0.74
Terminal effector Tregs (% of Tregs)	16.01 ± 10.9	7.43 ± 6.5	0.01	14.62 ± 12.15	14.06 ± 10.4	0.59
CD39+ suppressor Tregs (% of Tregs)	36.13 ± 31.89	47.2 ± 22.2	0.14	48.12 ± 30	50.94 ± 29.46	0.32
Prol. CD39+ suppressor Tregs (% of Tregs)	4.54 ± 6.28	8.1 ± 6.3	0.003	6.19 ± 4.66	6.89 ± 4.66	0.41
CD8+ T cells (% of T cells)	46.50 ± 15.06	36.8 ± 15.9	<0.001	53.14 ± 15.91	43.82 ± 18.04	<0.001
Prol. CD8+ T cells (% of CD8)	2.17 ± 1.23	2.52 ± 1.73	0.27	1.74 ± 1.19	1.61 ± 1.13	0.39

HLA-DR regulatory CD8+ T cells (% of CD8)	11.93 ± 7.65	7.30 ± 5.74	<0.001	16.72 ± 14.34	17.66 ± 17.65	0.93
Memory CD8+ T cells (% of CD8)	27.48 ± 15.41	27.1 ± 13.8	0.87	34.56 ± 19.97	31.79 ± 20.90	0.22
CD8+ Tregs (% of CD8)	0.75 ± 1.82	0.99 ± 2.02	0.008	1.14 ± 2.39	1.27 ± 2.17	0.07
B cells (% of nucleated cells)	1.49 ± 1.15	1.42 ± 0.93	0.69	3.51 ± 4.34	4.2 ± 5.24	0.54
Memory B cells (% of B cells)	34.21 ± 21.7	36.90 ± 20.73	0.03	9.21 ± 15.28	10.34 ± 12.47	0.67
Naïve B cells (% of B cells)	46.74 ± 21.79	61.61 ± 20.56	<0.001	48.73 ± 25.18	63.47 ± 25.14	0.74
B cell precursors (% of B cells)	19.09 ± 16.54	2.02 ± 2.11	<0.001	37.17 ± 27.07	1.07 ± 1.25	<0.001
PMN-MDSCs (% of mononuclear cells)	2.38 ± 3.53	9.86 ± 11.82	0.03	3.85 ± 5.02	14.18 ± 13.31	0.04
M-MDSCs (% of mononuclear cells)	6.12 ± 4.02	10.11 ± 5.38	0.04	11.92 ± 10.81	7.64 ± 10.21	0.58
eMDSCs (% of mononuclear cells)	0.32 ± 0.49	0.55 ± 1.01	0.32	0.51 ± 0.65	0.85 ± 0.80	0.36
Monocytes PB/TAMs BM (% of nucleated cells)	3.16 ± 1.67	6.63 ± 2.63	<0.001	5.24 ± 2.91	6.87 ± 4.41	0.12
M1 monocytes (% of monocytes)	97.8 ± 0.94	98.26 ± 0.64	0.10	98.11 ± 1.24	97.27 ± 1.49	0.84
M2 monocytes (% of monocytes)	2.20 ± 0.94	1.72 ± 0.64	0.09	1.89 ± 1.24	2.73 ± 1.49	0.06
NK/NKT cells (% nucleated cells)	3.23 ± 1.84	4.43 ± 2.73	0.005	3.02 ± 2.76	3.94 ± 3.14	0.08
CD27 NK/NKT cells (% of NK/NKT cells)	17.01 ± 10.23	14.20 ± 9.91	0.016	13.64 ± 7.15	15.24 ± 8.32	0.12
Neutrophils (% of nucleated cells)	68.11 ± 11.99	65.19 ± 13.04	0.55	60.88 ± 23.66	63.88 ± 19.23	0.24

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικές Πληροφορίες

Όνοματεπώνυμο	Παπαδημητρίου Κωνσταντίνος
Διεύθυνση	Μεταμορφώσεως 72, 17674, Καλλιθέα, Ελλάδα
Τηλέφωνο	+30 2114051067, +30 6939380834
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο	konstantinos.pap@hotmail.com
Ημερομηνία γέννησης	2 Δεκεμβρίου 1983

Εκπαίδευση

- 2017-παρόν Υποψήφιος Διδάκτορας με τίτλο «Μελέτη της Βιολογίας του Πολλαπλού Μυελώματος: Διερεύνηση Κυτταρικών Πληθυσμών και η Προγνωστική Αξιοποίησή τους», Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
- 2015-2016 Μετεκπαίδευση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή, Ελληνική Γυναικολογική και Μαιευτική Εταιρεία
- 2013-2015 Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών με τίτλο «Έρευνα στη γυναικεία αναπαραγωγή», Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
- 2001-2007 Πτυχίο Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ

Εργασιακή εμπειρία

- 2018-παρόν Sales Representative, Roche Diagnostics Hellas
- 2015-2018 Application Specialist, SafeBlood Bioanalytica
- 2011-2015 Product Specialist, aVI Pharma
- 2010-2011 Βιολόγος, Ιδιωτικό διαγνωστικό εργαστήριο Flow Diagnosis
- 2007-2011 Επιστημονικός συνεργάτης, ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς»

Δημοσιευμένες Εργασίες

- 2020 Papadimitriou K, Tsakirakis N, Malandrakis P, Vitsos P, Metousis A, Orologas-Stavrou N, Ntanasis-Stathopoulos I, Kanellias N, Eleutherakis-Papaiakovou E, Pothos P, Fotiou D, Gavriatopoulou M, Kastritis E, Dimopoulos MA, Terpos E, Tsitsilonis OE, Kostopoulos IV. Deep Phenotyping Reveals Distinct Immune Signatures Correlating with Prognostication, Treatment Responses, and MRD Status in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 2020 Nov 4;12(11):3245. doi: 10.3390/cancers12113245. PMID: 33158030; PMCID: PMC7692501.
- 2020 Papadimitriou K, Kostopoulos IV, Tsopanidou A, Orologas-Stavrou N, Kastritis E, Tsitsilonis O, Dimopoulos MA, Terpos E. Ex Vivo Models Simulating the Bone Marrow Environment and Predicting Response to Therapy in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 22;12(8):2006. doi: 10.3390/cancers12082006. PMID: 32707884; PMCID: PMC7463609.
- 2015 Kostopoulos IV, Paterakis G, Papadimitriou K, Pavlidis D, Tsitsilonis OE, Papadimitriou SI. Immunophenotypic analysis reveals heterogeneity and common biologic aspects in monoclonal B-cell lymphocytosis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015 Apr;54(4):210-21. doi: 10.1002/gcc.22234. Epub 2014 Dec 23. PMID: 25533355.
- 2011 Kentrou NA, Tsagarakis NJ, Tzanetou K, Damala M, Papadimitriou KA, Skoumi D, Stratigaki A, Anagnostopoulos NI, Malamou-Lada E, Athanassiadou P, Paterakis G. An improved flow cytometric assay for detection and discrimination between malignant cells and atypical mesothelial cells, in serous cavity effusions. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011 Sep;80(5):324-34. doi: 10.1002/cyto.b.20608. Epub 2011 Jun 21. PMID: 21695775.
- 2011 Tsagarakis NJ, Kentrou NA, Kakiopoulos G, Androutsos G, Galanopoulos A, Michaelidis C, Rontogianni D, Tolis A, Chini S, Gortzolidis G, Papadimitriou KA, Skoumi D, Tzanetou K, Paterakis G. Flow cytometry as a diagnostic tool in the early diagnosis of aggressive lymphomas mimicking life-threatening infection. *Case Rep Med*. 2011;2011:743817. doi: 10.1155/2011/743817. Epub 2011 Jun 5. PMID:

21687548; PMCID: PMC3114563.




- 2010 Tsagarakis NJ, Kentrou NA, Papadimitriou KA, Pagoni M, Kokkini G, Papadaki H, Pappa V, Marinakis T, Anagnostopoulos NI, Vadikolia C, Anagnostopoulos A, Angelopoulou MK, Terpos E, Poziopoulos C, Anargyrou K, Rontogianni D, Papadaki T, Psarra A, Kontopidou FN, Skoumi D, Papadimitriou SI, Paterakis G; Hellenic Dendritic Cell Leukemia Study Group. Acute lymphoplasmacytoid dendritic cell (DC2) leukemia: results from the Hellenic Dendritic Cell Leukemia Study Group. *Leuk Res.* 2010 Apr;34(4):438-46. doi: 10.1016/j.leukres.2009.09.006. Epub 2009 Sep 29. PMID: 19793612.
- 2009 Tsagarakis NJ, Argyrou A, Gortzolidis G, Kentrou N, Papadimitriou SI, Tzanetou K, Kakiopoulos G, Papadimitriou KA, Skoumi D, Paterakis G. Report of an HIV and HHV-8 negative case of primary effusion lymphoma with idiopathic T4 lymphocytopenia. *Int J Hematol.* 2009 Jul;90(1):94-98. doi: 10.1007/s12185-009-0343-0. Epub 2009 May 30. PMID: 19484335.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

1. Papadimitriou K, Kostopoulos IV, Tsopanidou A, Orogas-Stavrou N, Kastritis E, Tsitsilonis O, Dimopoulos MA, Terpos E. Ex Vivo Models Simulating the Bone Marrow Environment and Predicting Response to Therapy in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 22;12(8):2006. doi: 10.3390/cancers12082006. PMID: 32707884.
2. Papadimitriou K, Tsakirakis N, Malandrakis P, Vitsos P, Metousis A, Orogas-Stavrou N, Ntanasis-Stathopoulos I, Kanellias N, Eleutherakis-Papaiakovou E, Pothos P, Fotiou D, Gavriatopoulou M, Kastritis E, Dimopoulos MA, Terpos E, Tsitsilonis OE, Kostopoulos IV. Deep Phenotyping Reveals Distinct Immune Signatures Correlating with Prognostication, Treatment Responses, and MRD Status in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 2020 Nov 4;12(11):3245. doi: 10.3390/cancers12113245. PMID: 33158030.

Review

Ex Vivo Models Simulating the Bone Marrow Environment and Predicting Response to Therapy in Multiple Myeloma

Konstantinos Papadimitriou ¹, Ioannis V. Kostopoulos ^{1,*}, Anastasia Tsopanidou ¹, Nikolaos Orologas-Stavrou ¹, Efstathios Kastritis ², Ourania E. Tsitsilonis ¹, Meletios A. Dimopoulos ² and Evangelos Terpos ^{2,*}

¹ Department of Biology, School of Sciences, National and Kapodistrian University of Athens, 15784 Athens, Greece; konstantinos.pap@hotmail.com (K.P.); anastasia_ts@hotmail.com (A.T.); norologas@biol.uoa.gr (N.O.-S.); rtsitsil@biol.uoa.gr (O.E.T.)

² Department of Clinical Therapeutics, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 11528 Athens, Greece; ekastritis@med.uoa.gr (E.K.); mdimop@med.uoa.gr (M.A.D.)

* Correspondence: gikosto@gmail.com (I.V.K.); eterpos@med.uoa.gr (E.T.); Tel.: +30-210-7274929 (I.V.K.); +30-213-216-2846 (E.T.); Fax: +30-210-7274635 (I.V.K.); +30-213-216-2511 (E.T.)

Received: 8 June 2020; Accepted: 14 July 2020; Published: 22 July 2020



Abstract: Multiple myeloma (MM) remains incurable despite the abundance of novel drugs. As it has been previously shown, preclinical 2D models fail to predict disease progression due to their inability to simulate the microenvironment of the bone marrow. In this review, we focus on 3D models and present all currently available ex vivo MM models that fulfil certain criteria, such as development of complex 3D environments using patients' cells and ability to test different drugs in order to assess personalized MM treatment efficacy of various regimens and combinations. We selected models representing the top-notch ex vivo platforms and evaluated them in terms of cost, time-span, and feasibility of the method. Finally, we propose where such a model can be more informative in a patient's treatment timeline. Overall, advanced 3D preclinical models are very promising as they may eventually offer the opportunity to precisely select the optimal personalized treatment for each MM patient.

Keywords: multiple myeloma; 3D model; bone marrow microenvironment; personalized therapy; precision medicine

1. Introduction

Multiple myeloma (MM) is a haematological malignancy of the plasma cells (PCs), characterized by the accumulation of clonal plasma cells in the bone marrow (BM) and overproduction of monoclonal immunoglobulins (Igs) [1,2]. Interaction of aberrant PCs with osteoclasts, osteoblasts, and several immune subsets in the BM leads to manifestation of MM symptoms, including anaemia, bone fractures, susceptibility to infections, hypercalcaemia, fatigue, and pain, whereas accumulation of Igs might lead to consequences such as renal failure [1–4]. The BM microenvironment is the primary modulator of both malignant transformation and disease progression, where myeloma cells adhere, proliferate, and migrate [5–7]. If MM undergoes clonal evolution and drug resistance, it may progress to plasma cell leukemia, an aggressive BM-independent disease, where aberrant PCs spread into circulation or additionally develop extramedullary plasmacytoma, where MM cells spread in soft-tissues with adverse clinical outcome [8]. To date, and despite the abundance of therapeutic choices, MM remains an incurable cancer, usually with an overall survival (OS) of less than 10 years [9,10].

As for treatment, an impressive progress has been made during the past 20 years, gradually rendering MM from a disease with limited OS to a chronic disease with alternating symptomatic and remission phases. Moving beyond alkylating agents and autologous stem cell transplantation (ASCT), the introduction of immunomodulatory drugs (IMiDs), proteasome inhibitors, histone deacetylase (HDAC) inhibitors, and monoclonal antibodies tremendously shifted the therapeutic approach of MM [11–15]. The plethora of novel agents and therapeutic approaches necessitates precise and effective methodologies for the rapid assessment of the efficacy of these agents for each individual patient separately. Since the traditional preclinical 2D models have failed to predict disease progression due to their inability to simulate the BM microenvironment, 3D platforms are exploited as they likely mimic *ex vivo* the *in vivo* cellular and non-cellular interactions.

2. Study Aim and Design

The aim of this review is to present 3D *ex vivo* platforms specifically developed for MM and to discuss the advantages and limitations of each model for assessing the personalized MM treatment efficacy of various regimens and combinations. After an extensive bibliographical search under the terms “multiple myeloma” and “3D culture” or “*ex vivo* assay” or “3D platform” or “preclinical model”, we selected publications that fulfilled the following criteria: (a) refer to systems that emulate the BM microenvironment, *i.e.*, they use both MM cells and other cell types and/or substances known to participate and regulate cell interactions in the BM microenvironment; (b) apply to MM cells developed in 3D structures; (c) provide results on at least one drug tested; (d) the outcome is evaluated on the basis of MM cell viability following exposure to the drug(s); and (e) the platforms are developed at a personalized patient-specific level. We selected 14 models that, in our opinion, represent the top-notch full range of MM platforms developed to date, classified according to the type of material and methodology used to simulate the BM microenvironment. We also briefly refer to some promising approaches partially fulfilling the aforementioned criteria set. We further explain why 3D cultures are the current model of choice in studying the BM microenvironment in MM.

3. Role of the BM Microenvironment in MM

The pathophysiology of MM consists of both the primary oncogenic events occurring in myeloma cells (*i.e.*, chromosomal translocations, structural abnormalities, gene mutations), as well as of extracellular factors and dynamic interactions between clonal cells and the BM components. Since MM cells grow and proliferate almost exclusively within the BM, it is rational to consider that the BM microenvironment plays the most critical role in the development and expansion of MM cells [16]. The BM microenvironment is subdivided into two major compartments: the cellular and the non-cellular. The former consists of all hematopoietic cells of erythroid, myeloid, and lymphoid lineages as well as non-hematopoietic cells including BM stromal cells (BMSCs), fibroblasts, osteoblasts, osteoclasts, endothelial cells, adipocytes, and cells of the blood vessels. The non-cellular compartment comprises the extracellular matrix (ECM; consisting of collagen, glycoproteins, matrix proteoglycans, and glycosaminoglycans) and the liquid milieu (cytokines, growth factors, and chemokines), which are produced and/or altered by the cellular compartment. The two BM microenvironment compartments interact dynamically with malignant cells and likely work synergistically to support MM cell survival and progression, as shown both *in vitro* and *in vivo* [17–19].

Although MM cells have been reported to interact with almost every BM bystander cell type, BMSCs have the most direct effect on MM cell growth, proliferation, and drug resistance via both cytokine secretion and cell-to-cell adhesion [20,21]. BMSCs primarily secrete interleukin (IL)-6, an important growth and survival factor, which, in turn boosts the secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF), the key angiogenic factor [22,23]. Additionally, BMSCs produce insulin-like growth factor (IGF)-1 and IL-8 that further induce MM cell growth, migration, MM-associated angiogenesis, and osteolysis through distinct molecular pathways [24]. Contact of MM cells with BMSCs and/or ECM components may trigger cell adhesion-mediated drug-resistance mechanisms, through which MM cells escape the

cytotoxic effects of anticancer therapies (e.g., of doxorubicin, melphalan, vincristine, dexamethasone, and mitoxantrone) [25,26]. Interactions between MM cells and BMSCs are also mediated by Notch, which confers resistance to drugs via increased secretion of IL-6, IGF-1, and VEGF [17]. Finally, BMSCs and MM cells also interact through a complex intracellular network of miRNA-bearing exosomes which regulate MM cell gene expression [16].

The BM microenvironment has been the target of many novel agents aiming at the disruption of the mechanisms that support MM cell growth and disease progression. We will focus mostly on the role of BMSCs, as these cells are the most widely used in MM 3D co-cultures to reproduce *ex vivo* the protective/supportive effect of the BM milieu on MM cells against various therapeutic regimens.

4. The Need for Personalized Preclinical BM Models

The therapeutic choice in MM is based on clinical factors such as patients' age, prognostic parameters, and comorbidities. However, MM is highly heterogeneous in terms of phenotype, clinical symptoms, and particularly genomic aberrations, and current *in vitro* molecular modelling may only partially predict therapeutic efficacy [27–31]. Therefore, the development of a rapid and effective methodology for evaluating the efficacy of several therapeutic agents based on the patient-individualized profile would be of utmost significance [32–36]. In the same context, and beyond finding a specific sensitive target, the application of a suitable preclinical model would prevent ineffective therapy of resistant MM cells and unwanted toxicities [37–39].

Clinical studies utilizing novel agents have shown that some molecular subgroups of patients may benefit from administration of specific drugs [40–42]. Although molecular testing might highlight the molecular sensitivity of myeloma cells, the BM microenvironment also plays a key role in disease progression and resistance to therapy [43]. Thus, to better predict which drug or therapeutic scheme will benefit each individual patient, a successful preclinical model should incorporate both the molecular profiling of MM cells and the BM microenvironment as a whole. The outcome of such a platform would form a personalized therapy profile that could ideally apply in daily clinical practice affecting clinical decision-making.

5. Personalized Clinical Assays for MM Patients: From 2D to 3D BM Cell Cultures

A variety of different strategies has been proposed, aiming to create an *ex vivo* platform that will simulate the BM microenvironment and/or test treatment efficacy of various MM agents. In the clinical setting, such an *ex vivo* platform should bear certain characteristics that will permit its eventual use for personalized drug-screening in patients undergoing routine treatment. Given the narrow time-frame for subsequent decision-making, an ideal drug-testing platform should be: (1) time-efficient, (2) easy-to-perform, (3) highly reproducible, (4) able to simultaneously process many samples, and (5) cost-effective.

2D monocultures that use established MM cell lines have been thoroughly tested in the past. Even though this type of culture is suitable for high-throughput drug screening, it cannot reproduce the complexity of the BM microenvironment and does not reflect the heterogeneity of MM patients' cells, generating models that are more generic and less (if at all) personalized [44]. The use of primary patient-derived MM cells in a 2D monoculture maintains the heterogeneity of the sample; however, the microenvironment is still missing in this BM simulation. Moreover, when in culture, primary MM cells may gradually change morphology and phenotype, possibly de-differentiating into immature resilient phenotypes [45]. The next step in the evolution of 2D cultures was the generation of a co-culture system in which primary MM cells were cultured together with autologous BMSCs, mesenchymal stem cells (MSCs), osteoclasts or immature dendritic cells. Depending on the accompanying cell type, primary MM cells could stabilize or even increase their numbers and, in some cases, develop an enhanced drug resistance [46,47]. Nevertheless, cells are still mostly grown on a 2D layer interacting in a spatially limited manner.

3D culture systems have shown their superiority in simulating more realistically the *in vivo* cellular environment, as they quite accurately mimic normal cell morphology, proliferation, differentiation, and migration. This is due to the fact that the cell cytoskeleton is expanded in all directions, while the cell-to-cell and cell-to-surface interactions that occur in a 3D space are very similar to the interactions observed *in vivo* [48,49]. Moreover, the deposition of ECM in 3D cultures promotes cells to form 3D spheroids and plays an important role in cancer progression and invasion [50]. With respect to MM, it has been proven that cytokine production (e.g., IL-11, HGF, and IL-6) is higher in 3D *versus* 2D cultures [51]. Furthermore, 3D models also seem to better recapitulate the effect of anti-myeloma drugs (e.g., melphalan and bortezomib), thus highlighting the existence of drug-resistant MM clonal compartments [52].

6. 3D Ex Vivo Platforms Using Gel Scaffolds

The first effort to build a 3D model for MM was reported in 2008 by Kirshner et al. [52] (Table 1). In this pioneering model termed “rEnd-rBM”, plates were pre-treated with fibronectin/collagen type I, creating the reconstructed endosteum-marrow junction (rEnd) compartment. Patient BM mononuclear cells (BMMCs) were subsequently added in a jellified scaffold of Matrigel/fibronectin, thus creating the recombinant BM (rBM) compartment, and were further cultured in growth medium supplemented with the patient’s blood plasma. After treatment with melphalan or bortezomib, cells were removed from the scaffold to assess apoptosis and reduction in the number of clonal cells. The model was validated by examining the rBM environment with confocal microscopy and immunohistochemistry, showing that the rBM resembled the natural BM niche as it maintained the architecture of the human BM and also supported the expansion of the MM clone. Most importantly, this was the first 3D model to study the effect of agents separately on the different cellular compartments of stromal cells, hematopoietic cells, and myeloma cells, thus providing the ability to investigate the precise cell target(s) of each agent [52].

Some years later, Parikh et al. [53] and then Huang et al. [54] used an optimized protocol of Kirshner’s rBM model, in order to study the activation of the STAT3 pathway in 3D versus conventional 2D cultures. Specifically, the 3D culture was formed in a well with histogel that could be easily fixed, thus allowing for further histologic processing and immunocytochemical studies. Huang et al. [54] showed that the STAT3 pathway was activated when cells were cultured in 3D, while it remained inactive in conventional 2D cultures. Inhibition of the STAT3 pathway using the pharmacological agent Stattic significantly decreased the viability of MM cells and increased their susceptibility to bortezomib. These results were important as MM cells within the BM are also STAT3 active, thus implying that 3D models are superimposing 2D approaches and can better mimic the *in vivo* state [54].

De la Puente et al. [55] developed a patient-derived model, termed “3D tissue-engineered BM culture model” (3DTEBM), consisting of BM supernatant derived from MM patients and autologous BM cells, combined in a gel scaffold prepared from each patient’s plasma fibrinogen. In particular, the 3D matrices were developed via cross-linking of fibrinogen at various CaCl₂ concentrations in the presence of tranexamic acid, in order to formulate a sustaining gel in 96-well plates. 3DTEBM allowed for the detection of drug uptake by MM cells throughout the 3DTEBM depth and was also used to study the effect of hypoxia on the development of drug resistance to various antimyeloma drugs such as carfilzomib and bortezomib. This model could portray the *in vivo* drug concentration gradient for a more representative *ex vivo* drug-effect evaluation, and also proved to support MM cell proliferation more efficiently than standard 2D and 3D cultures [55,56]. However, despite these promising results, the utilization of the 3DTEBM in the frame of a clinical trial has not been reported to date [56].

Table 1. Selected ex vivo 3D models simulating the bone marrow environment of multiple myeloma (MM) patients.

Year	Reference	Type of Model	Drugs Tested	Model Composition	Cell Types Cocultured (BM Cells/MM Cells)	Viability Assessment	Duration of Test	Feasibility	Cost
2008	Krishner et al. [32]	Cell scaffold	MELPH, BTZ	Recombinant bone marrow; culture plates with fibronectin/collagen mixture of Matrigel/fibronectin	primary MSC-epitriary MM cells	Annexin V analysis of CD38+ cells by flow cytometry; treatment efficacy evaluated using RQ-PCR to detect genomic clonotype [qH VD]	□ □ □	★★☆	\$
2018	Huang et al. [54]	Cell scaffold	Statin (a STAT3 inhibitor), BTZ	Fibronectin/Collagen scaffolds in 48-well plates seeded with cells in Matrigel	primary MSC-CD296, RPMI8226	Cell viability measured by CellTiter 96 Assay (i.e., MTT) or trypan blue exclusion assay; apoptosis measured by an Annexin V/Apoptosis Detection Kit	□	★★★	\$
2015	De la Fuente et al. [55,56]	Cell Scaffold	DOXO, BTZ, CFZ	3D Tissue-Engineered BM cultures; scaffold formed by cross-linking plasma fibronectin with CaCl ₂ and transacetic acid	human umbilical vein endothelial cells, primary CD138+ and CD138- (stromal) cells/MM1s, H929, RPMI8226, MM1s-CGP-Luc	Cell survival analyzed by flow cytometry against an internal standard	□ □	★★☆	\$
2016	Jakubkova et al. [57]	Cell Scaffold	POM, LEN, THAL, BTZ, CFZ, DOXO, DEX, MELPH	PureMatrix hydrogel	primary MSC-epitriary MM cells, OPN1, KM151, OCLN15	CFSE and Annexin V/PE apoptosis assays by flow cytometry	□	★★★	\$
2017	Arkona et al. [58]	Cell Scaffold	TRAIL, HDAC inhibitors	3D tumor spheroid cultures on alginate beads	NCI-H929, RPMI 8226, OPN4-2, JN-3, U266/kome primary cell culture generated from a plasma cell leukaemia patient (ADC-1)	Caspase-3 activity measured by flow cytometry; cell viability based on CellTiter-Glo luminescent assay	□ □	★★☆	\$
2017	Ji et al. [59]	Cell Scaffold	BTZ, LEN and THAL combined	Collagen gel; computational model consisting of a hybrid multi-scale agent-based model	primary MSCs, HS-5 MSC cell line/U266/RPMI 8226	Cell viability determined by MTT assay	□ □	★★☆	\$
2018	Brahman et al. [60,61]	Cell Scaffold	TECs (αβT cells engineered to express a defined γδTCR)	3D co-cultures using Matrigel; MM cell lines and patients' cells labelled with a Vybrant Mitochondrial Cell-Labeling Kit (Mito CL, DAPI) co-cultured with MSCs	primary MSCs, embedded endothelial progenitor cells, OPN42, CD66 and L363	Viability assessed with calcein staining by confocal imaging	□ □	★★★	\$\$\$
2017	Silva et al. [62]	Cell Scaffold	31 drugs	384 or 1536 multi-well plates with collagen type I and previously established MSCs	primary MSC-epitriary MM cells, MM1S	Digital Image Analysis algorithm computing differences in sequential images and identifying live cells	□	★★☆	\$

Table 1. Cont.

Year	Reference	Type of Model	Drugs Tested	Model Composition	Cell Type Co-cultured (BM Cell/MSCs)	Viability Assessment	Duration of Test	Feasibility	Cost
2014	Rangan et al. [63]	Solid scaffold	BTZ	Porous, aqueous, silk fibroin scaffolds with pores 500-600 µm cut into cylinders; fibrinogen, fibrin and Matrigel mixed with cells before seeding	primary MSCs (basal) and patient derived primary MM cells; MM1S; OPN2	Calcein on a confocal microscope or LIVE/DEAD Fluorescein Red Dead Cell Stain kit	□□□	★★★	\$
2018	Belloni et al. [64]	Bioreactor	BTZ, MELPH, DEX, anti-VLA-4 mAb, nabilizumab	Dynamic cultures in RCCS Bioreactor	primary MSCs osteoblasts, HS-5 cell line, murine L-fibroblasts, human umbilical vein endothelial cells/primary MM cells, MM1S, U266, RPMI-8226	Annexin V analysis of CD38+ cells by flow cytometry	n/a	★★★	\$\$\$
2017	Bonomi et al. [65]	Bioreactor	PTX, BTZ	Dynamic cultures in RCCS Bioreactor	MSCs (Genex, USA)(CP9AC1 adeno carcinoma cell line, RPMI8226)	MTT assay	□□	★★★	\$\$\$
2013	Khin et al. [66]	Fluidics	MELPH, BTZ	3D cell culture slides (u-slide Chemotaxis 3D) derived from BM, LLC) with bovine collagen type 1	primary MSCs/primary MM cells, RPMI-8226, HS-5, H929, 8226/LR-5	Assessment of cell viability through membrane motion detection with ImageJ	□	★★★	\$
2015	Martovcic et al. [67]	Animal	BTZ	Spheroid grafted on chorioallantoic membrane of chicken embryos	primary MSCs/OPM-2, RPMI-8226	Tumor cell mass measurement of GFP contents with GFP-ELISA	□□	★★★	\$
2011	Callmer et al. [68]	Animal	DEX, BTZ	PCLs scaffold cylinders surgically implanted subcutaneously into SCID mouse flank	primary MSCs (human and mouse derived)/OP9	Detection of paraprotein levels in mouse sera; detection of MM cell apoptosis in retrieved PCLs	□□□	★★★	\$\$\$

BTZ, Bortezomib; CFZ, Carfilzomib; DEX, dexamethasone; DOXO, Doxorubicin; HDAC, histone deacetylase; LEN, Lenalidomide; MELPH, Melphalan; POM, Pomalidomide; PTX, Paclitaxel; THAL, Thalidomide; TRAIL, Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand. □, week; □□, months; □□□, over a month; ★★★, feasible under usual laboratory conditions; ★★, ★, needs some specific techniques; ★★, ★, difficult implementation; \$, estimated cost ≤ 10k euros; \$\$, cost ≤ 100k euros; \$\$\$, cost ≥ 100k euros. Other abbreviations: BM, bone marrow; CFSC, carbonylfuorescein succinimidyl ester; ECM, extracellular matrix; GFP, green fluorescence protein; MSCs, marrow stromal cells; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PCLs, poly-ε-caprolactone polymer; scaffold; PE, phycoerythrin; RCCS, RSS Bioreactor; RQPCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; SCID, severe combined immunodeficient; TCR, T cell receptor.

A report on gel scaffolds using exclusively PuraMatrix hydrogel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) was published by Jakubicova et al. [57]. In this approach, BM mononuclear cells were obtained from BM aspiration by red blood cell lysis, and the adherent fraction containing MSCs was expanded for several days, while the soluble fraction containing the MM cells was frozen. MSCs were seeded on the surface of the gel, and MM cells were added after culture establishment. To assess viability, carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labelled MM cells were stained with Annexin V/7-aminoactinomycin D (7-AAD) to distinguish apoptotic and necrotic cells. Eight therapeutic agents were tested in total, including the IMiDs pomalidomide, lenalidomide, thalidomide. The authors showed a different drug-assessed profile for each patient tested, noting that patients' cells were more resistant to IMiDs in 3D versus 2D cultures. MSCs were confirmed to keep their MSC phenotype as shown by flow cytometry. Analysis of cytokine secretion and ECM molecules revealed high similarity with the *in vivo* MM microenvironment composition, while active osteogenesis and osteoblastic differentiation were also observed. Subsequently, gene expression analysis underlined the differences between 3D versus 2D models and highlighted the importance of the activation of osteogenesis.

In another approach, 3D tumor spheroid cultures were formed on alginate bead culture by suspending MM cells in a medium-viscosity sodium alginate dissolved in saline, which polymerised when CaCl_2 was added. Based on this model, Arhoma et al. [58] reported the effects of Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) and HDAC inhibitors in six human MM cell lines and primary plasma cell leukemia. Using caspase-3 activity assay to confirm apoptotic responses to the agents and CellTiter-Glo viability testing, the researchers showed that combination therapy with TRAIL and HDAC inhibitors induced apoptosis, and MM cells in 3D spheroid cultures were more sensitive to drug treatment compared to suspension cell culture.

Based on computational modelling, Ji et al. [59] introduced the hybrid multi-scale agent-based model (HABM), which combines two mathematical systems, ordinary differentiated equations (ODEs) and an agent-based model (ABM). The purpose of the study was to predict the effect of bortezomib and the IMiDs lenalidomide and thalidomide in an environment that simulates MM cell growth within the BM, taking into consideration the important role of immune cells in this process. In order to validate their mathematical model, the team developed collagen-based 3D co-cultures of patients' MM cells and MSCs, and proved that the proposed model was of high accuracy. Although such models have not been utilized in daily clinical practice, a computational approach that takes into account the dynamic interplay between MM cells, immune cells, and alterations in the BM microenvironment during disease progression would be of great importance for the development of a one-step therapy prediction model at no cost.

In an effort to exploit the advances of cellular immunotherapy against MM, Braham et al. [60] recently investigated the use of a novel class of engineered immune cells, called TEGs (i.e., $\alpha\beta\text{T}$ cells engineered to express a defined tumor-specific $\gamma\delta\text{TCR}$), in targeting and eliminating primary MM cells. Researchers used endothelial progenitor cells and MSCs to form a network inside the Matrigel matrix, thus creating a 3D model that could facilitate the survival of primary MM cells. They then added TEGs that migrated inside the 3D structure finding their targets. The 3D model was highly superior when compared to a similar 2D approach and considered appropriate for clinical testing as it was successfully applied to 13 patients' samples. The same 3D model was also implemented to test liposomal delivery of drugs, such as doxorubicin and bortezomib [61]. This study showed increased cytotoxic effects of loaded liposomes against MM cells compared with free drugs, using either an MM cell line or primary BM-derived cells.

In our opinion, the most elegant work on gel scaffolds has been reported by Silva et al. [62], who published the *ex vivo* mathematical myeloma advisor (EMMA), a tool for predicting the 3-month clinical response within five days by using a digital image analysis algorithm, mathematical models, and pharmacokinetic data. The model was tested using 31 drugs or combinations on BM samples from 52 patients, where primary MM cells were seeded in collagen type I and pre-established human-derived stroma. After the addition of the drug with a robotic pipettor, the plates were placed in a motorized

microscope linked to an incubator, and cultures underwent complete imaging every 3 min for four consecutive days. Viability was calculated by a digital algorithm, which detected live and dead cells from the presence or absence of membrane motion over time. The simulation of different clinical treatments was performed by using the mathematical model of chemosensitivity and the pharmacokinetic properties of the selected therapeutic regimen. Impressively, EMMA was able to predict clinical responses to single agents and regimens in 41 out of 52 patients (79%). It also demonstrated that 66% of MM patients have received at least one ineffective drug, while 33% of the patients could have been treated with more potent drugs.

7. 3D Ex Vivo Platforms Using Solid Scaffolds

The BM is a mineralized environment with structural stiffness and complicated geometry with spatial dimensionality. These characteristics, in conjunction with neighbouring cells and secreted soluble factors, regulate cellular behaviour [69]. Based on this, Reagan et al. [63] attempted to recreate the BM microenvironment by stimulating MSCs to undergo osteogenic differentiation inside porous silk scaffolds. To achieve this, researchers developed tissue-engineered bone (TE-bone) comprising cylinder-shaped aqueous silk fibroin scaffolds with pores of 500–600 µm in diameter. MSCs were seeded and cultured with osteogenic media and shortly after, transduced MM cell lines or Cell-Tracker stained patient-derived MM cells were added. Viability after bortezomib treatment was measured using bioluminescence imaging (BLI) and was imaged with confocal microscopy, showing drug resistance in 3D compared to 2D cultures. Notably, researchers also showed alterations in MSC miRNAs and identified overexpression of miR-199 that enhanced the osteogenic potential of normal BM cells. On the contrary, downregulation of miR-199 in MM caused increased tumor cell accumulation.

8. 3D Ex Vivo Platforms Using Bioreactors

Bioreactors are devices that are able to support a biologically active environment by keeping cells in a reaction vessel, while, in continuous bioreactors, there is a perpetual input of new medium and output of cellular mass. The advantage of bioreactors for cell cultures is the generation of a constant dynamic fluid flow in the culture volume that ensures a continuous balance between culture mass and the renewal of culture medium. Currently, the only bioreactor that has been used in the setting of MM is the RSS Bioreactor (RCCS™, Synthecon Inc., Houston, TX, USA).

In their recent publication, Belloni et al. [64] used patients' myeloma tissue explants, normal skin, and bone, in order to preserve the tissue's architecture inside the bioreactor vessels. MM specimens from vertebroplasty were cultured in the bioreactor with bortezomib, melphalan, dexamethasone, and the anti-VLA-4 monoclonal antibody natalizumab to evaluate viability and cytotoxicity induced by each drug. This model allowed for a long-term maintenance and proliferation of resistant MM clones, while FISH analysis indicated that a 13q14.3 clone preferentially populated the bioreactor. Bonomi et al. [65] used the RCCS bioreactor in another interesting setting; they loaded MSCs with paclitaxel (PTX) and used them as "trojan horses" to deliver the drug in situ. Initially, MSCs were primed with PTX and then transferred to a 3D dynamic culture of the RPMI 8226 cell line. After 72 h of co-culture, cells were harvested and embedded for morphological analysis to assess cellular necrosis. The inhibitory activity of PTX-primed MSCs was comparable to that of PTX alone, showing that the loaded-MSC strategy could be utilised to deliver drugs into the BM.

9. 3D Cultures Using Microfluidics

Microfluidics can be loosely defined as the controllable manipulation of fluids that are geometrically constrained at a small scale in order to control the cellular environment [70]. Khin et al. [66] described a microfluidic dose-response platform for the in vitro screening of drugs, accompanied by a computational model of clinical response. The 3D BM microenvironment consisted of patients' MSCs and MM cells, ECM, and growth factors cultured in a collagen type I/culture media mix, which was developed inside the 3D cell-culture µ-slide (Ibidi, Gräfelfing, Germany). Each slide contained three chambers that

formed a linear chemical gradient via passive diffusion, and slides were placed under a microscope inside a culture chamber. The model was used to test the effect of bortezomib and melphalan, and cell viability was assessed through detection of membrane motion with image analysis. The results of drug testing in four patients' samples were used to parameterize computational models, which by combining the *in vitro* results together with genomic information could make predictions of the clinical response.

10. 3D Cultures Using Animal Models

Animal xenograft models are very important tools in our understanding of the pathogenesis of MM and the mode of action of novel agents [71]. Searching for relevant animal models that fulfil all set criteria, we selected only two publications, mainly due to the fact that the majority of reported models were not developed on the context of a personalized patient approach.

Martowicz et al. [67] used chicken embryos, as these are suitable for xenotransplantation due to a lack of adaptive immune responses until hatching [72]. The model combined the advantage of a 3D culture system with *ex vivo* development of chicken embryos. In this approach, green fluorescence protein (GFP)-transfected MM cell lines were cultured in spheroids along with MSCs using a collagen matrix. The spheroids were treated with bortezomib and subsequently were grafted on the chorioallantoic membrane of chicken embryos, where tumor growth was monitored. According to the authors, this model provides an inexpensive tool that, besides drug screening, can also be useful for the analysis of myeloma-induced angiogenesis.

Aiming to create the most realistic human BM milieu, Calimeri et al. [68] generated a severe combined immunodeficiency (SCID)-synth-hu mouse model. This was the first system for the *in vivo* expansion of human MM cells on a synthetic platform. For this purpose, human BMSCs isolated from MM patients were injected *in vitro* into a 3D bone-like poly- ϵ -caprolactone polymeric scaffold (PCLS) and surgically implanted subcutaneously in SCID mice. After three weeks, patients' MM cells were injected into the implanted PCLSs and their growth was monitored for the next 3–4 weeks by detecting human heavy or light chains in mouse serum. Alternatively, patients' BM mononuclear cells containing both BMSCs and MM cells were injected into PCLSs which were then implanted into SCID mice. Treatment with bortezomib and dexamethasone resulted in inhibition of MM cell growth *in vivo* as demonstrated by the decrease of paraprotein levels in mouse sera together with the detection of apoptotic MM cells in retrieved PCLSs. Overall, the results of these experiments were encouraging and revealed that this model is suitable for large-scale *in vivo* preclinical screening for novel anti-MM drugs.

11. 3D Models Partially Fulfilling the Criteria Set

There are also some models worth mentioning, even though they do not fulfil all criteria we initially set. Fairfield et al. [73] developed the first 3D model based on adipose tissue (BMAT model). In particular, this model consisted of MSCs on silk scaffolds, cultured in adipogenic media driving differentiation of adipocytes. Overall, this approach set the basis for the study of the intricate interactions between BMAT and tumour cells even if no patient-derived cells were used. In another interesting approach, Cetin et al. [74] introduced an innovative functional assay to evaluate *ex vivo* drug sensitivity of single MM cells, based on measuring their mass accumulation rate with a microfluidic device. The model provided a quick and reliable prediction of therapeutic responses in clinical samples; nevertheless, the model referred only to MM cells, without including the BM microenvironment in its *ex vivo* simulation. Recently, an alternative 3D simulation approach was reported by Delgado-Calle et al. [75] to examine the effects of the novel therapeutic agent Aplidin. Using biopsy punches, 3.5 mm mouse bone disks were cut and placed in plates, where 5TGM1 MM cells were added. The study explored the mechanism of action of Aplidin, showing that it has anti-myeloma activity *per se*, and that it enhances the activity of proteasome inhibitors to hinder MM cell growth and bone destruction.

12. Classification and Evaluation of the 3D MM Models

All these models may have particular pros and cons with respect to each other. To give a better overview of these approaches, Table 1 summarizes the most important 3D simulation models based on three major parameters: duration of experiment, cost, and feasibility of the methodology used.

Time-to-treatment decision is critical in the clinical setting of MM; hence, an ideal 3D simulation model should deliver results as soon as possible. High-throughput drug screening is also desirable: if many drugs are tested on the same platform at a given time, the results provided are more clinically relevant. Under this context, the SCID animal model [68] that requires a minimum of six weeks, or the rEND model [52] that requires more than 30 days are probably too long. On the contrary, the gel scaffold model of Silva et al. [62] seems advantageous as it allows the parallel testing of many drugs (up to 1536 in multi-well plates on a single run), provides automated image analysis of every well with no need of staining, and, most importantly, the results can be available in less than five days.

The total cost of a preclinical model is also an important aspect, especially when intended for large-scale screening processes. When comparing the different scaffold categories, it is evident that gel scaffolds combine high-throughput screening with low-cost materials and instrumentation. Moreover, costs can be kept low when cell viability or apoptosis is assessed by methods that do not require complex instrumentation (i.e., flow cytometry, confocal microscopy, computer-based image analysis). In this context, the methods of Arhoma et al. [58], Ji et al. [59], and Silva et al. [62] are the most cost-effective. On the contrary, bioreactors require sophisticated devices and are costly due to expensive consumables and maintenance. Concerning animal models, the need of one SCID mouse for every drug tested translates into approximately a dozen of mice euthanized for every patient, thus increasing the cost, but also raising ethical issues; on the other hand, the egg model might reduce cost, but the implementation of the methodology described by Martowicz et al. [67] for many patients and drugs requires specifically organized facilities.

As for feasibility, the benefits of easy-to-handle materials and method simplicity favor gel scaffolds. Specifically, the approach of Jakubikova et al. [57] seems to be the most applicable, as it uses Puramatrix, a simple commercially available material, and assesses apoptosis by a commonly used flow cytometric assay.

In MM patients, blood plasma profiling for markers beyond monoclonal M-protein and free light chain ratio include, among others, VEGF, transforming growth factor (TGF), epidermal growth factor (EGF)-2, and monocyte chemoattractant protein-3, which in principle aim at patient stratification into distinct prognostic groups. However, evaluation of the efficacy of MM models using surrogate markers has been implemented in a very limited number of studies. Puente et al. [55] performed the most thorough cytokine profiling in 3D culture supernatants (38 cytokines including VEGF, TGF, and EGF), supporting the utility of 3D versus 2D cultures. Ferrarini et al. [76] showed differences in VEGF levels and matrix metalloproteinase (MMP)-2/MMP-9 activity in 3D cultures exposed or not to bortezomib. Therefore, selected surrogate markers, likely including cytokines, chemokines, growth factors, and possibly also extracellular vesicles secreted by MM cells in the 3D culture milieu, could assist the evaluation of the efficacy of 3D models and facilitate their utility for drug screening.

13. Time-Frame for the Application of an Ex Vivo 3D Platform in MM Patient Treatment

According to the most recent European Society of Medical Oncology guidelines for MM diagnosis, treatment, and follow-up [77], patients that have been diagnosed with MM and are eligible for ASCT undergo the following standard treatment: induction therapy consisting of 3-drug regimens (which almost always contain a proteasome inhibitor such as bortezomib and steroids), followed by high-dose melphalan therapy (HDT) and ASCT, and finally maintenance therapy with lenalidomide. For patients not eligible for ASCT, there are two or three different drug options, using bortezomib, lenalidomide, melphalan, cyclophosphamide, thalidomide, and steroids. At relapse, therapeutic options may be based on numerous drug combinations of doublets or triplets of several different drugs such as bortezomib, carfilzomib, ixazomib, daratumumab, lenalidomide, pomalidomide, and elotuzumab.

The choice of therapy depends on several factors, including prior exposure to a drug class, prior response and duration of response, residual toxicity, patient's frailty, etc. There is currently no prognostic or predictive factor or staging system to routinely use in order to define a risk-adapted strategy, and more research in this field is needed [77].

After a holistic examination of the treatment course of MM, we believe that there are three time points where an ex vivo drug-testing platform could be helpful for MM patients to provide clinically-relevant information that could assist oncologists' decision-making (Figure 1):

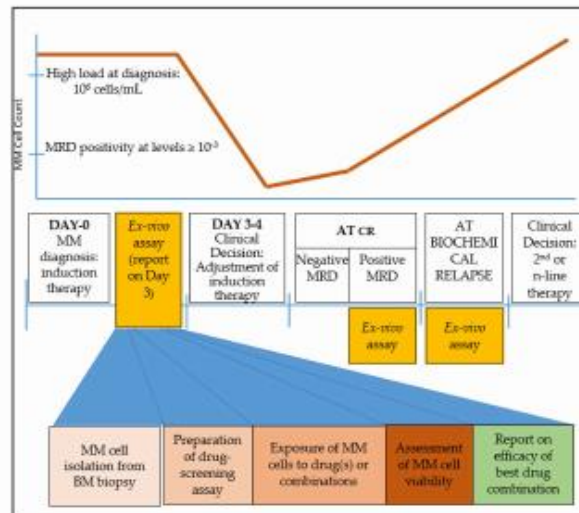


Figure 1. Clinical timeline of multiple myeloma (MM) treatment and suggested timing for ex vivo drug-screening assay. An abundance of MM cells is critical for the successful performance of the assay. Such windows appear immediately after diagnosis, at complete response (CR) when minimal residual disease (MRD) contains sufficient tumor burden, and at biochemical relapse. The steps for a clinically relevant ex vivo screening assay are sample collection and MM cell isolation in adequate numbers; exposure of cells to the drug(s); assessment of cell viability; and finally a report on the most effective drug(s) or drug combinations.

(A) immediately after MM diagnosis, to adjust the ideal drug combination for induction therapy. The strength of this time point is the abundance of MM cells that can be isolated and used for drug screening.

(B) at minimal residual disease (MRD) evaluation, if the clone is detected at levels $\geq 10^{-3}$. At this point, the model may be informative of the presence of a residual resistant clone that may eventually lead to relapse. The disadvantage stands in cases where the MRD myeloma burden is low and therefore an inadequate number of cells would be isolated for drug screening. Moreover, since MRD+ cells would probably be a minority of the total plasma cell population, an FACS-sorting approach would be essential to phenotypically discriminate aberrant plasma cells from their normal plasma cell counterpart.

(C) upon biochemical relapse. This is probably the ideal time-point where a drug assay would provide essential information for drug selection or drug combination. MM cells are abundant, while available clinical information based on previous exposure to various drugs can be used to cross-validate the results. Mathematical models that incorporate earlier response(s) to therapy may also help improve prediction.

14. Conclusions—The Way for an Effective Ex Vivo BM Model for MM Patients

After reviewing all relevant models, the question that arises is whether we need to combine various elements in order to establish and clinically validate a feasible drug-screening model simulating the BM microenvironment. Having thoroughly examined research data available to date, we show that each platform demonstrates particular advantages either as an overall approach or in specific aspects of BM simulation.

We propose a model (Figure 2) with the following desired characteristics: (a) low cost, including consumables and equipment required; (b) high-throughput option for parallel screening of many drugs and drug combinations in a single run; and (c) easy workflow. Based on our experience, MSCs can efficiently populate poly(lactic acid) (PLA) scaffolds of ca. 100 nm pore size within 3–4 weeks. The use of biocompatible PLA scaffolds pre-seeded with pooled BM MSCs in a 96-well plate format meets the aforementioned characteristics and has potential for the development of an optimized short-term (1–3 days) ex vivo drug-screening assay. Primary MM cells seeded to the wells are let home to the scaffolds, exposed to drugs or drug-combinations for 24–72 h, and finally are washed out for viability assessment (Supplementary Figure S1; unpublished data).



Figure 2. Proposed ex vivo 3D assay simulating the bone marrow (BM) microenvironment of multiple myeloma (MM) patients. Workflow shown from top left to bottom left. The report contains information on patient-specific effectiveness of tested therapeutic agent(s) selected by clinicians. In the example shown, the best response of patient X is to Drugs 1 + 2 (green tick mark).

Recent developments and intense research have brought to light numerous novel regimens for the clinical management of MM; however, a simple, cost-effective, and reliable ex vivo model that applies in the clinical practice, eventually expanding beyond therapy selection to disease state prediction (e.g., discriminating between MGUS and smoldering myeloma or more importantly between high-risk smoldering MM and active myeloma) is still lacking. Translating a preclinical model from bench to bedside requires intensive research, vigorous development, immense validation, and funding. We expect that research in this field will be more intense in the years to come.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/8/2006/s1>, Figure S1: Experimental setup of a 3D BM culture simulation.

Author Contributions: K.P., I.V.K. and A.T. performed the literature review and drafted the manuscript. N.O.-S., E.K., O.E.T., M.A.D., E.T. edited the manuscript. All authors critically reviewed the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Rajkumar, S.V.; Dimopoulos, M.A.; Palumbo, A.; Blade, J.; Merlini, G.; Mateos, M.-V.; Kumar, S.; Hillengass, J.; Kastritis, E.; Richardson, P.; et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, e538–e548. [[CrossRef](#)]
- Rajkumar, S.V. Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2016**, *35*, e418–e423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ramsenthaler, C.; Kane, P.; Gao, W.; Siegert, R.J.; Edmonds, P.M.; Schey, S.A.; Higginson, I.J. Prevalence of symptoms in patients with multiple myeloma: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Haematol.* **2016**, *97*, 416–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Offidani, M.; Corvatta, L. Renal failure in multiple myeloma: Something new on the horizon. *Br. J. Haematol.* **2017**, *176*, 845–846. [[CrossRef](#)]
- Kawano, Y.; Roccaro, A.M.; Ghobrial, I.M.; Azzi, J. Multiple Myeloma and the Immune Microenvironment. *Curr. Cancer Drug Targets* **2017**, *17*, 806–818. [[CrossRef](#)]
- Reagan, M.R.; Liaw, L.; Rosen, C.J.; Ghobrial, I.M. Dynamic interplay between bone and multiple myeloma: Emerging roles of the osteoblast. *Bone* **2015**, *75*, 161–169. [[CrossRef](#)]
- Gupta, V.A.; Matulis, S.M.; Conage-Pough, J.E.; Nooka, A.K.; Kaufman, J.L.; Lonial, S.; Boise, L.H. Bone marrow microenvironment-derived signals induce Mcl-1 dependence in multiple myeloma. *Blood* **2017**, *129*, 1969–1979. [[CrossRef](#)]
- Fernández de Larrea, C.; Kyle, R.A.; Durie, B.G.M.; Ludwig, H.; Usmani, S.; Vesole, D.H.; Hajek, R.; San Miguel, J.F.; Sezer, O.; Sonneveld, P.; et al. Plasma cell leukemia: Consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia* **2013**, *27*, 780–791. [[CrossRef](#)]
- Kumar, S.K.; Rajkumar, V.; Kyle, R.A.; van Duin, M.; Sonneveld, P.; Mateos, M.-V.; Gay, F.; Anderson, K.C. Multiple myeloma. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2017**, *3*, 17046. [[CrossRef](#)]
- Kazandjian, D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin. Oncol.* **2016**, *43*, 676–681. [[CrossRef](#)]
- Röllig, C.; Knop, S.; Bornhäuser, M. Multiple myeloma. *Lancet* **2015**, *385*, 2197–2208. [[CrossRef](#)]
- Baker, H. Daratumumab improves survival in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, e480. [[CrossRef](#)]
- Mateos, M.-V.; Ocio, E.M.; Paiva, B.; Rosiñol, L.; Martínez-López, J.; Bladé, J.; Lahuerta, J.-J.; García-Sanz, R.; San Miguel, J.F. Treatment for patients with newly diagnosed multiple myeloma in 2015. *Blood Rev.* **2015**, *29*, 387–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kumar, S.K.; Anderson, K.C. Immune Therapies in Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 5453–5460. [[CrossRef](#)]

15. Siegel, D.S.; Dimopoulos, M.A.; Ludwig, H.; Facon, T.; Goldschmidt, H.; Jakubowiak, A.; San-Miguel, J.; Obreja, M.; Blaedel, J.; Stewart, A.K. Improvement in Overall Survival With Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 728–734. [\[CrossRef\]](#)
16. Di Marzo, L.; Desantis, V.; Solimando, A.G.; Ruggieri, S.; Annese, T.; Nico, B.; Fumarulo, R.; Vacca, A.; Frassanito, M.A. Microenvironment drug resistance in multiple myeloma: Emerging new players. *Oncotarget* **2016**, *7*, 60698–60711. [\[CrossRef\]](#)
17. Kawano, Y.; Moschetta, M.; Manier, S.; Glavey, S.; Görgün, G.T.; Roccaro, A.M.; Anderson, K.C.; Ghobrial, I.M. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunol. Rev.* **2015**, *263*, 160–172. [\[CrossRef\]](#)
18. Hynes, R.O.; Naba, A. Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a004903. [\[CrossRef\]](#)
19. Iriuchishima, H.; Takubo, K.; Miyakawa, Y.; Nakamura-Ishizu, A.; Miyauchi, Y.; Fujita, N.; Miyamoto, K.; Miyamoto, T.; Ikeda, E.; Kizaki, M.; et al. Neovascular niche for human myeloma cells in immunodeficient mouse bone. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30557. [\[CrossRef\]](#)
20. Wang, J.; Hendrix, A.; Hemot, S.; Lemaire, M.; De Bruyne, E.; Van Valckenborgh, E.; Lahoutte, T.; De Wever, O.; Vanderkerken, K.; Menu, E. Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells. *Blood* **2014**, *124*, 555–566. [\[CrossRef\]](#)
21. Morgan, J.J.; McAvera, R.M.; Crawford, L.J. TRAF6 Silencing Attenuates Multiple Myeloma Cell Adhesion to Bone Marrow Stromal Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 702. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Uchiyama, H.; Barut, B.A.; Mohrbacher, A.F.; Chauhan, D.; Anderson, K.C. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* **1993**, *82*, 3712–3720. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Yu, J.; Jiang, L.; Gao, Y.; Sun, Q.; Liu, B.; Hu, Y.; Han, X. Interaction between BMSCs and EPCs promotes IUA angiogenesis via modulating PI3K/Akt/Cox2 axis. *Am. J. Transl. Res.* **2018**, *10*, 4280–4289. [\[PubMed\]](#)
24. Hsiao, S.T.-F.; Asgari, A.; Lokmic, Z.; Sinclair, R.; Dusting, G.J.; Lim, S.Y.; Dilley, R.J. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. *Stem Cells Dev.* **2012**, *21*, 2189–2203. [\[CrossRef\]](#)
25. Furukawa, Y.; Kikuchi, J. Epigenetic mechanisms of cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma. *Int. J. Hematol.* **2016**, *104*, 281–292. [\[CrossRef\]](#)
26. Abdi, J.; Chen, G.; Chang, H. Drug resistance in multiple myeloma: Latest findings and new concepts on molecular mechanisms. *Oncotarget* **2013**, *4*, 2186–2207. [\[CrossRef\]](#)
27. Lohr, J.G.; Stojanov, P.; Carter, S.L.; Cruz-Gordillo, P.; Lawrence, M.S.; Auclair, D.; Sougnez, C.; Knoechel, B.; Gould, J.; Saksena, G.; et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: Implications for targeted therapy. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 91–101. [\[CrossRef\]](#)
28. Ledergor, G.; Weiner, A.; Zada, M.; Wang, S.-Y.; Cohen, Y.C.; Gatt, M.E.; Snir, N.; Magen, H.; Koren-Michowitz, M.; Herzog-Tzarfati, K.; et al. Single cell dissection of plasma cell heterogeneity in symptomatic and asymptomatic myeloma. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1867–1876. [\[CrossRef\]](#)
29. Manier, S.; Salem, K.Z.; Park, J.; Landau, D.A.; Getz, G.; Ghobrial, I.M. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 100–113. [\[CrossRef\]](#)
30. Jagannath, S.; Abonour, R.; Durie, B.G.M.; Gasparetto, C.; Hardin, J.W.; Narang, M.; Terebello, H.R.; Toomey, K.; Wagner, L.; Srinivasan, S.; et al. Heterogeneity of Second-Line Treatment for Patients With Multiple Myeloma in the Connect MM Registry (2010–2016). *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2018**, *18*, 480–485.e3. [\[CrossRef\]](#)
31. Szalat, R.; Munshi, N.C. Genomic heterogeneity in multiple myeloma. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2015**, *30*, 56–65. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Pawlyn, C.; Davies, F.E. Toward personalized treatment in multiple myeloma based on molecular characteristics. *Blood* **2019**, *133*, 660–675. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Ferreira, B.; Caetano, J.; Barahona, F.; Lopes, R.; Carneiro, E.; Costa-Silva, B.; João, C. Liquid biopsies for multiple myeloma in a time of precision medicine. *J. Mol. Med.* **2020**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Bustoros, M.; Mouhieddine, T.H.; Detappe, A.; Ghobrial, I.M. Established and Novel Prognostic Biomarkers in Multiple Myeloma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2017**, *37*, 548–560. [\[CrossRef\]](#)
35. Lionetti, M.; Neri, A. Utilizing next-generation sequencing in the management of multiple myeloma. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2017**, *17*, 653–663. [\[CrossRef\]](#)

36. González-Calle, V.; Keane, N.; Braggio, E.; Fonseca, R. Precision Medicine in Myeloma: Challenges in Defining an Actionable Approach. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2017**, *17*, 621–630. [[CrossRef](#)]
37. Bringhen, S.; Milan, A.; Ferri, C.; Wäsch, R.; Gay, F.; Larocca, A.; Salvini, M.; Terpos, E.; Goldschmidt, H.; Cavo, M.; et al. Cardiovascular adverse events in modern myeloma therapy - Incidence and risks. A review from the European Myeloma Network (EMN) and Italian Society of Arterial Hypertension (SIIA). *Haematologica* **2018**, *103*, 1422–1432. [[CrossRef](#)]
38. Tarkun, P.; Atalay, F.; Atesoglu, E.B.; Mehtap, O.; Simsek, M.; Terzi, E.; Geduk, A.; Balli, F.; Batman, A.; Baydemir, C.; et al. Treatment of patients with multiple myeloma over 65 yr: More tolerability or better response? *Eur. J. Haematol.* **2015**, *94*, 424–430. [[CrossRef](#)]
39. Bringhen, S.; De Wit, E.; Dimopoulos, M.-A. New Agents in Multiple Myeloma: An Examination of Safety Profiles. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2017**, *17*, 391–407.e5. [[CrossRef](#)]
40. Auclair, D.; Lonial, S.; Anderson, K.C.; Kumar, S.K. Precision medicine in multiple myeloma: Are we there yet? *Expert Rev. Precis. Med. Drug Dev.* **2019**, *4*, 51–53. [[CrossRef](#)]
41. Kumar, S.; Kaufman, J.L.; Gasparetto, C.; Mikhael, J.; Vij, R.; Pegourie, B.; Benboubker, L.; Facon, T.; Amiot, M.; Moreau, P.; et al. Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood* **2017**, *130*, 2401–2409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Jovanović, K.K.; Roche-Lestienne, C.; Ghobrial, I.M.; Facon, T.; Quesnel, B.; Manier, S. Targeting MYC in multiple myeloma. *Leukemia* **2018**, *32*, 1295–1306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hou, J.; Wei, R.; Qian, J.; Wang, R.; Fan, Z.; Gu, C.; Yang, Y. The impact of the bone marrow microenvironment on multiple myeloma (Review). *Oncol. Rep.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Pampaloni, F.; Reynaud, E.G.; Stelzer, E.H.K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 839–845. [[CrossRef](#)]
45. Jakubikova, J.; Adamia, S.; Kost-Alimova, M.; Klippel, S.; Cervi, D.; Daley, J.F.; Cholujova, D.; Kong, S.-Y.; Leiba, M.; Blotta, S.; et al. Lenalidomide targets clonogenic side population in multiple myeloma: Pathophysiologic and clinical implications. *Blood* **2011**, *117*, 4409–4419. [[CrossRef](#)]
46. Azab, A.K.; Runnels, J.M.; Pitsillides, C.; Moreau, A.-S.; Azab, F.; Leleu, X.; Jia, X.; Wright, R.; Ospina, B.; Carlson, A.L.; et al. CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy. *Blood* **2009**, *113*, 4341–4351. [[CrossRef](#)]
47. Giuliani, N.; Colla, S.; Morandi, F.; Lazzaretti, M.; Sala, R.; Bonomini, S.; Grano, M.; Colucci, S.; Svaldi, M.; Rizzoli, V. Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. *Blood* **2005**, *106*, 2472–2483. [[CrossRef](#)]
48. Edmondson, R.; Broglie, J.J.; Adcock, A.F.; Yang, L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* **2014**, *12*, 207–218. [[CrossRef](#)]
49. Thippabhotla, S.; Zhong, C.; He, M. 3D cell culture stimulates the secretion of in vivo like extracellular vesicles. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13012. [[CrossRef](#)]
50. Asimakopoulos, F.; Hope, C.; Johnson, M.G.; Pagenkopf, A.; Gromek, K.; Nagel, B. Extracellular matrix and the myeloid-in-myeloma compartment: Balancing tolerogenic and immunogenic inflammation in the myeloma niche. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, *102*, 265–275. [[CrossRef](#)]
51. Zdzisińska, B.; Roliński, J.; Piersiak, T.; Kandefer-Szerszeń, M. A comparison of cytokine production in 2-dimensional and 3-dimensional cultures of bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients in response to RPMI8226 myeloma cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2009**, *47*, 69–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kirshner, J.; Thulien, K.J.; Martin, L.D.; Debes Marun, C.; Reiman, T.; Belch, A.R.; Pilarski, L.M. A unique three-dimensional model for evaluating the impact of therapy on multiple myeloma. *Blood* **2008**, *112*, 2935–2945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Parikh, M.R.; Belch, A.R.; Pilarski, L.M.; Kirshner, J. A three-dimensional tissue culture model to study primary human bone marrow and its malignancies. *J. Vis. Exp.* **2014**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Huang, Y.-H.; Molavi, O.; Alshareef, A.; Haque, M.; Wang, Q.; Chu, M.P.; Venner, C.P.; Sandhu, L.; Peters, A.C.; Lavasanifar, A.; et al. Constitutive Activation of STAT3 in Myeloma Cells Cultured in a Three-Dimensional, Reconstructed Bone Marrow Model. *Cancers* **2018**, *10*, 206. [[CrossRef](#)]

55. De la Puente, P.; Muz, B.; Gilson, R.C.; Azab, F.; Luderer, M.; King, J.; Achilefu, S.; Vij, R.; Azab, A.K. 3D tissue-engineered bone marrow as a novel model to study pathophysiology and drug resistance in multiple myeloma. *Biomaterials* **2015**, *73*, 70–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. De la Puente, P.; Azab, A.K. 3D tissue-engineered bone marrow: What does this mean for the treatment of multiple myeloma? *Future Oncol.* **2016**, *12*, 1545–1547. [[CrossRef](#)]
57. Jakubikova, J.; Cholujova, D.; Hideshima, T.; Gronesova, P.; Soltysova, A.; Harada, T.; Joo, J.; Kong, S.-Y.; Szalat, R.E.; Richardson, P.G.; et al. A novel 3D mesenchymal stem cell model of the multiple myeloma bone marrow niche: Biologic and clinical applications. *Oncotarget* **2016**, *7*, 77326–77341. [[CrossRef](#)]
58. Arhoma, A.; Chantry, A.D.; Haywood-Small, S.L.; Cross, N.A. SAHA-induced TRAIL-sensitisation of Multiple Myeloma cells is enhanced in 3D cell culture. *Exp. Cell Res.* **2017**, *360*, 226–235. [[CrossRef](#)]
59. Ji, Z.; Su, J.; Wu, D.; Peng, H.; Zhao, W.; Nlong Zhao, B.; Zhou, X. Predicting the impact of combined therapies on myeloma cell growth using a hybrid multi-scale agent-based model. *Oncotarget* **2017**, *8*, 7647–7665. [[CrossRef](#)]
60. Braham, M.V.J.; Minnema, M.C.; Aarts, T.; Sebestyen, Z.; Straetmans, T.; Vyborova, A.; Kuball, J.; Öner, F.C.; Robin, C.; Alblas, J. Cellular immunotherapy on primary multiple myeloma expanded in a 3D bone marrow niche model. *Oncimmunology* **2018**, *7*, e1434465. [[CrossRef](#)]
61. Braham, M.V.; Deshantri, A.K.; Minnema, M.C.; Öner, F.C.; Schiffelers, R.M.; Fens, M.H.; Alblas, J. Liposomal drug delivery in an in vitro 3D bone marrow model for multiple myeloma. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 8105–8118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Silva, A.; Silva, M.C.; Sudalagunta, P.; Distler, A.; Jacobson, T.; Collins, A.; Nguyen, T.; Song, J.; Chen, D.-T.; Chen, L.; et al. An Ex Vivo Platform for the Prediction of Clinical Response in Multiple Myeloma. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 3336–3351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Reagan, M.R.; Mishima, Y.; Glavey, S.V.; Zhang, Y.; Manier, S.; Lu, Z.N.; Memarzadeh, M.; Zhang, Y.; Sacco, A.; Aljawai, Y.; et al. Investigating osteogenic differentiation in multiple myeloma using a novel 3D bone marrow niche model. *Blood* **2014**, *124*, 3250–3259. [[CrossRef](#)]
64. Belloni, D.; Heltai, S.; Ponzoni, M.; Villa, A.; Vergani, B.; Pecciarini, L.; Marcatti, M.; Girlanda, S.; Tonon, G.; Ciceri, F.; et al. Modeling multiple myeloma–bone marrow interactions and response to drugs in a 3D surrogate microenvironment. *Haematologica* **2018**, *103*, 707–716. [[CrossRef](#)]
65. Bonomi, A.; Steimberg, N.; Benetti, A.; Berenzi, A.; Alessandri, G.; Pascucci, L.; Boniotti, J.; Coccè, V.; Sordi, V.; Pessina, A.; et al. Paclitaxel-releasing mesenchymal stromal cells inhibit the growth of multiple myeloma cells in a dynamic 3D culture system. *Hematol. Oncol.* **2017**, *35*, 693–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Khin, Z.P.; Ribeiro, M.L.C.; Jacobson, T.; Hazlehurst, L.; Perez, L.; Baz, R.; Shain, K.; Silva, A.S. A preclinical assay for chemosensitivity in multiple myeloma. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 56–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Martowicz, A.; Kern, J.; Gunsilius, E.; Untergasser, G. Establishment of a human multiple myeloma xenograft model in the chicken to study tumor growth, invasion and angiogenesis. *J. Vis. Exp.* **2015**, e52665. [[CrossRef](#)]
68. Calimeri, T.; Battista, E.; Conforti, F.; Neri, P.; Di Martino, M.T.; Rossi, M.; Foresta, U.; Piro, E.; Ferrara, F.; Amorosi, A.; et al. A unique three-dimensional SCID-polymeric scaffold (SCID-synth-hu) model for in vivo expansion of human primary multiple myeloma cells. *Leukemia* **2011**, *25*, 707–711. [[CrossRef](#)]
69. Baker, B.M.; Chen, C.S. Deconstructing the third dimension: How 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 3015–3024. [[CrossRef](#)]
70. Whitesides, G.M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **2006**, *442*, 368–373. [[CrossRef](#)]
71. Lwin, S.T.; Edwards, C.M.; Silbermann, R. Preclinical animal models of multiple myeloma. *Bonekey Rep.* **2016**, *5*, 772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Boulland, J.-L.; Halasi, G.; Kasumacic, N.; Glover, J.C. Xenotransplantation of human stem cells into the chicken embryo. *J. Vis. Exp.* **2010**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Fairfield, H.; Falank, C.; Farrell, M.; Vary, C.; Boucher, J.M.; Driscoll, H.; Liaw, L.; Rosen, C.J.; Reagan, M.R. Development of a 3D bone marrow adipose tissue model. *Bone* **2019**, *118*, 77–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Cetin, A.E.; Stevens, M.M.; Calistri, N.L.; Fulcinitti, M.; Olcum, S.; Kimmerling, R.J.; Munshi, N.C.; Manalis, S.R. Determining therapeutic susceptibility in multiple myeloma by single-cell mass accumulation. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1613. [[CrossRef](#)]
75. Delgado-Calle, J.; Kurihara, N.; Atkinson, E.G.; Nelson, J.; Miyagawa, K.; Galmarini, C.M.; Roodman, G.D.; Bellido, T. Aplidin (plitidepsin) is a novel anti-myeloma agent with potent anti-resorptive activity mediated by direct effects on osteoclasts. *Oncotarget* **2019**, *10*, 2709–2721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]







76. Ferrarini, M.; Steimberg, N.; Ponzoni, M.; Belloni, D.; Berenzi, A.; Girlanda, S.; Caligaris-Cappio, F.; Mazzoleni, G.; Ferrero, E. Ex-vivo dynamic 3-D culture of human tissues in the RCCS™ bioreactor allows the study of Multiple Myeloma biology and response to therapy. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71613. [[CrossRef](#)]
77. Moreau, P.; San Miguel, J.; Sonneveld, P.; Mateos, M.V.; Zamagni, E.; Avet-Loiseau, H.; Hajek, R.; Dimopoulos, M.A.; Ludwig, H.; Einsele, H.; et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, iv52–iv61. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Deep Phenotyping Reveals Distinct Immune Signatures Correlating with Prognostication, Treatment Responses, and MRD Status in Multiple Myeloma

Konstantinos Papadimitriou ¹, Nikolaos Tsakirakis ¹, Panagiotis Malandrakis ², Panagiotis Vitsos ¹, Andreas Metousis ¹ , Nikolaos Orologas-Stavrou ¹, Ioannis Ntanasis-Stathopoulos ², Nikolaos Kanellias ², Evangelos Eleutherakis-Papaiaikovou ², Panagiotis Pothos ¹, Despina Fotiou ², Maria Gavriatopoulou ², Efstathios Kastritis ² , Meletios-Athanasios Dimopoulos ² , Evangelos Terpos ² , Ourania E. Tsitsilonis ^{1,*}  and Ioannis V. Kostopoulos ^{1,*} 

¹ Department of Biology, School of Sciences, National and Kapodistrian University of Athens, 15784 Athens, Greece; kostpap@med.uoa.gr (K.P.); nicktsak@biol.uoa.gr (N.T.); pvitsos@biol.uoa.gr (P.V.); andreas.metousis@stud.ki.se (A.M.); norologas@med.uoa.gr (N.O.-S.); ppothos@biol.uoi.gr (P.P.)

² Department of Clinical Therapeutics, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 11528 Athens, Greece; panosmalan@med.uoa.gr (P.M.); johnntanasis@med.uoa.gr (I.N.-S.); nkanellias@med.uoa.gr (N.K.); evelepapa@med.uoa.gr (E.E.-P.); desfotiou@med.uoa.gr (D.F.); mgavria@med.uoa.gr (M.G.); ekastritis@med.uoa.gr (E.K.); mdimop@med.uoa.gr (M.-A.D.); eterpos@med.uoa.gr (E.T.)

* Correspondence: rtsitsil@biol.uoa.gr (O.E.T.); ivkostop@biol.uoa.gr (I.V.K.);

Tel.: +30-210-727-4215 (O.E.T.); +30-210-727-4929 (I.V.K.); Fax: +30-210-727-4635 (O.E.T. & I.V.K.)

Received: 16 September 2020; Accepted: 29 October 2020; Published: 4 November 2020



Simple Summary: In Multiple Myeloma (MM) malignant cells accumulate in the bone marrow (BM), where they interact with various cell populations. These complex interactions impose mechanisms of tumor growth and proliferation, immune surveillance and immune evasion. The aim of the present study was a detailed immune characterization of MM during the course of the disease, in order to highlight signatures which are clinically relevant. Analyses of both BM and peripheral blood (PB) in matched patients' samples, we showed that PB cannot representatively reflect the BM microenvironment. Particular immune signatures in BM and PB significantly correlated with established prognostic features and could independently associate with distinct responses to the same induction therapy. Moreover, our data provide evidence of a diverse immune profile according to patients' MRD status post treatment. Finally, we provide insights that unique PB immune profiles may be used for the prediction of MRD status through a simple non-invasive approach.

Abstract: Despite recent advances, Multiple Myeloma (MM) remains an incurable disease with apparent heterogeneity that may explain patients' variable clinical outcomes. While the phenotypic, (epi)genetic, and molecular characteristics of myeloma cells have been thoroughly examined, there is limited information regarding the role of the bone marrow (BM) microenvironment in the natural history of the disease. In the present study, we performed deep phenotyping of 32 distinct immune cell subsets in a cohort of 94 MM patients to reveal unique immune profiles in both BM and peripheral blood (PB) that characterize distinct prognostic groups, responses to induction treatment, and minimal residual disease (MRD) status. Our data show that PB cells do not reflect the BM microenvironment and that the two sites should be studied independently. Adverse ISS stage and high-risk cytogenetics were correlated with distinct immune profiles; most importantly, BM signatures comprised decreased tumor-associated macrophages (TAMs) and erythroblasts, whereas the unique Treg signatures in PB could discriminate those patients achieving complete remission after VRd induction therapy.

Moreover, MRD negative status was correlated with a more experienced CD4- and CD8-mediated immunity phenotype in both BM and PB, thus highlighting a critical role of by-stander cells linked to MRD biology.

Keywords: multiple myeloma; bone marrow microenvironment; immune profiling; immune signatures; minimal residual disease

1. Introduction

Multiple Myeloma (MM) is a heterogeneous neoplastic disorder characterized by a multi-level variety of clinical symptoms, cell phenotypes, (cyto)genetic and epigenetic background, and clonal evolutionary patterns. Much effort has been made for the identification of well-defined criteria to stratify patients into distinct prognostic groups. Current stratification criteria have been proven useful in the daily clinical practice; however, they still have specific limitations, evidenced by the fact that even among patients within the same prognostic group there is significant heterogeneity in outcomes even with the same therapeutic approach [1,2].

MM is an incurable hematological malignancy as, despite temporary achievement of deep responses, the majority of patients will eventually relapse. Research efforts have mainly focused on illustrating the biologic features of clonal plasma cells and therapies have traditionally aimed to directly target the malignant population and/or deregulate functions or pathways crucial for clonal cell survival and expansion [3,4]. However, the effective utilization of immunomodulatory drugs (IMiDs) in the clinical setting coincided the beginning of a major shift in understanding the underlying mechanisms of effective anti-cancer treatments, which comprise a three-pronged approach: (i) induction of direct tumor cell apoptosis; (ii) interference in tumor cell–microenvironment interactions; and (iii) enhancement of the anti-tumor immune response [5,6]. IMiDs act pleiotropically, exhibiting immunomodulatory, anti-angiogenic, anti-inflammatory, and anti-proliferative properties, and likely alter the bone marrow (BM) microenvironment. However, the relative contribution of each parameter in IMiDs anti-myeloma activity is still unclear, and further complicated by the highly heterogeneous IMiDs' efficacy in MM patients [5–10].

Myeloma cells grow and proliferate in the BM, a niche comprising numerous and diverge cell subsets. There is now sufficient evidence of a constant and dynamic interplay between myeloma cells and by-stander BM cell subsets, applying both on the supportive role of the latter in the survival and proliferation of malignant cells, but also on the balance between the host's anti-tumor immune responses and the immune-escape mechanisms developed by myeloma cells [11–13]. This complicated matrix of interactions constitutes a real challenge in unveiling the involvement of the BM microenvironment in the natural history of the disease [14,15]. In the present study, we applied deep phenotype analysis to characterize the immune profile of peripheral blood (PB) and BM cells at different disease stages, and correlated PB and BM niche signatures with the clinical course of MM.

2. Patients and Methods

2.1. Patients

The cohort analyzed comprised 15 smoldering MM (sMM), 8 plasma cell leukemias (PCL), and 94 MM patients ($n = 53$ at the time of diagnosis; $n = 51$ at minimal residual disease (MRD) evaluation, including 10 patients evaluated at both time-points), who were treated and followed at the Department of Clinical Therapeutics of the National and Kapodistrian University of Athens. The protocol was approved by the local ethics committee (Prot. No 116/28 February 2018). Prior to sampling, all patients were informed of the purposes of the study and signed an informed consent according to the Declaration of Helsinki.

To eliminate treatment effect alterations in immune profiling and evaluate the clear effect of immune cell distribution during the clinical course of the disease, the cohort of newly-diagnosed MM patients (NDMM; $n = 53$) was homogeneously treated receiving bortezomib, lenalidomide, and dexamethasone (VRd) as induction therapy. Accordingly, all patients evaluated for MRD ($n = 51$), achieved complete remission (CR) after receiving VRd followed by high-dose therapy and autologous stem cell transplantation (ASCT). BM aspirates and/or PB samples were drawn from all patients, including 51 patients (26 NDMM and 25 patients at the time of MRD evaluation) who provided both BM and PB matched samples. The clinical characteristics of patients are presented in Table 1. All samples were assessed with Next-generation flow cytometry (NGF) panels for MRD detection [16]; 155 samples were analyzed for T cells and their subpopulations; 84 samples were analyzed for myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and their subsets.

Table 1. Clinical characteristics of newly diagnosed Multiple Myeloma (MM) patients included in our study.

Clinical Parameters	Patients at Diagnosis ($n = 53$)
Age (years)	66 (44–93)
Male sex (%)	26 (39%)
Hemoglobin (g/dL)	10.8 (8.0–14.7) *
Platelet counts ($\times 10^9/L$)	243 (56–591)
Neutrophil counts/ μL	4513 (1000–13,000)
Serum Creatinine (mg/dL)	1.63 (0.5–11.1)
Serum B2MG (mg/L)	5.7 (0.3–26.4)
Serum LDH (U/L)	167 (74–293)
Serum Calcium (mg/dL)	9.6 (8.4–14.4)
BM infiltration (%)	50.7 (0–90)
ISS stage	
I	20/53 (38%)
II	18/53 (34%)
III	15/53 (28%)
FISH aberrations	
High risk	22/53 (42%)
Low risk	31/53 (58%)
Heavy chain	
IgA	13/53 (25%)
IgG	32/53 (60%)
IgD	1/53 (2%)
Light chain only	7/53 (13%)

* All measures in non-categorical parameters show median values with range in parentheses.

2.2. Next-Generation Flow Cytometry

Diagnostic and MRD samples were analyzed with the NGF protocol according to the EuroFlow guidelines [16]. The NGF 8-color antibody panels applied in lysed PB and BM samples consisted of tube 1: CD38-FITC, CD56-PE, CD45-PerCPCy5.5, CD138-BV421, CD27-BV510, CD19-PC7, CD117-APC, CD81-APCC750; and tube 2: CD38-FITC, CD56-PE, CD45-PerCPCy5.5, CD138-BV421, CD27-BV510, CD19-PC7, Kappa-APC, Lambda-APCC750. Samples were analyzed for aberrant plasma cell (APC) discrimination from their normal plasma cell counterpart and for subset distribution (Table 2). MRD positivity was defined when more than 20 clonal APCs were detected at minimum number of 10×10^6 events recorded per patient sample. BD FACSCantoII (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) was used for sample acquisition and analysis was conducted with the Infinicyt software (Cytognos S.L., Salamanca, Spain).

Table 2. Immune subsets and their corresponding phenotypes analyzed in bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) samples.

Immune Subset	Expression of Markers
NCF MRD panel	
Plasma cells	CD38 ^{br} CD138 ⁺
B cells	CD19 ⁺ CD45 ⁺
Naive B cells	CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ^{dim} CD45 ⁺ SSC ^{low}
B cell precursors	CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ^{br} CD45 ^{dim} SSC ^{low}
Memory B cells	CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ^{dim} CD45 ⁺ SSC ^{low}
T cells	CD19 ⁻ CD45 ⁺ CD56 ⁻ SSC ^{low}
CD27 ⁺ T cells	CD19 ⁻ CD45 ⁺ CD56 ⁻ CD27 ⁺ SSC ^{low}
NK/NKT cells	CD19 ⁻ CD45 ⁺ CD56 ⁻ SSC ^{low}
CD27 ⁺ NK/NKT cells	CD19 ⁻ CD45 ⁺ CD56 ⁻ CD27 ⁺ SSC ^{low}
Neutrophils	CD45 ^{dim} SSC ^{high}
Myeloid progenitors	CD38 ⁺ CD45 ^{dim} CD117 ⁺ SSC ^{high}
Monocytes—TAMs	CD38 ⁺ CD45 ⁺ CD81 ⁺ SSC ^{int}
Mast cells	CD45 ^{dim} CD117 ^{br}
Erythroblasts	CD38 ⁻ CD45 ⁻ SSC ^{low}
Erythroid progenitors	CD38 ^{dim} CD45 ^{dim} CD117 ⁺ SSC ^{low}
T cell panel	
T regulatory cells (Tregs)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} FoxP3 ⁺
Effector/effector memory Tregs (ef/eff mem Tregs)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} FoxP3 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺ HLA-DR ⁻ CTLA4 ⁺
Terminal effector Tregs (terf Tregs)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} FoxP3 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺ HLA-DR ⁺ CTLA4 ⁺
Resting Tregs	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} FoxP3 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺ HLA-DR ⁻ CTLA4 ⁻
CD39 ⁺ suppressor Tregs (CD39 Tregs)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} FoxP3 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺ CD39 ⁺
CD4 ⁺ T cells	CD3 ⁺ CD4 ⁺
Naive CD4 ⁺ T cells	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻
Effector/effector memory CD4 ⁺ T cells (ef/eff mem CD4 ⁺)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺
CD8 ⁺ T cells	CD3 ⁺ CD8 ⁺
CD8 ⁺ Tregs	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺
Memory CD8 ⁺ T cells	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RO ⁺
HLA-DR regulatory CD8 ⁺ T cells (HLA-DR reg CD8 ⁺)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺
MIDSC panel	
Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSC)	CD14 ⁺ CD11b ⁺ CD15 ⁺ SSC ^{high}
Early myeloid-derived suppressor cells (eMDSC)	Lin(CD3/CD14/CD15/CD19/CD56)-HLA-DR ⁻ CD33 ⁺
Monocytic myeloid-derived suppressor cells (M-MDSC)	CD11b ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR ^{int/br} CD15 ⁺
M1 monocytes	Lin(CD3/CD14/CD15/CD19/CD56)-CD14 ⁺ CD124 ⁺
M2 monocytes	Lin(CD3/CD14/CD15/CD19/CD56)-CD14 ⁺ CD124 ⁺

Abbreviations: br: bright expression; int: intermediate expression; SSC: side scatter.

2.3. Immune Profiling

Immune profiling was performed utilizing three 8-color antibody combinations, designed to characterize T cell and MDSC subsets. For T cell characterization, the two panels comprised the markers: CD3-FITC, CD4-APC-Cy7, CD8-PerCPCy5.5, CD25-APC, FoxP3-PE, CD127-BV510, CD39-BV421, Ki67-BV510, CD45RA-PC7, CD45RO-PerCPCy5.5, CTLA4-BV421, HLA-DR-PC7. The MDSC panel was designed for discriminating the various MDSC subsets and M1/M2 monocytes and comprised the markers: CD14-FITC, CD11b-PE, 7-AAD, CD124-BV421, CD33-BV510, HLA-DR-PC7, CD15-APC, lin (CD3, CD19, CD56)-APC-Cy7. Antibody clones and providers are listed in Table S1. Both T cell panels were applied on whole lysed PB and BM samples; for the MDSC panel, mononuclear cells were isolated after Ficoll density gradient centrifugation. Acquisition was performed on BD FACSCantoII and FlowJo (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) was used for data analysis (gating strategy presented in Figure S1A–C). The detailed list of immune subsets analyzed and their phenotypes is presented in Table 2.

2.4. Cytogenetics

Cytogenetic analysis was performed by interphase fluorescence in-situ hybridization (i-FISH) for the most common aberrations detected in MM and particularly for t(4;14), t(11;14), t(14;16), del(13q)/monosomy 13, del(17p13), and add(1q21). Patients with at least one aberration of t(4;14), t(14;16), del(17p13), or add(1q21) were considered as high-risk (HR), whereas absence of these abnormalities was a sign of low-risk (LR) prognostication. Commercially available probes (Abbott Molecular, III, USA) were applied on the purified plasma cell population following an established protocol described in detail elsewhere [17,18].

2.5. Statistical Analysis

Quantitative variables were described by measures of central tendency (mean, median) and dispersion (SD) and were analyzed with the appropriate parametric and non-parametric models (*t*-test/Mann–Whitney U test for two group comparisons, one-way Anova/Kruskal Wallis for three group comparisons) to examine for differences among groups. The distribution of measures in each group was tested with Kolmogorov–Smirnov normality test; paired *t*-test or Wilcoxon test were used to compare parametric and nonparametric data from matched BM/PB samples, accordingly. To evaluate the differences between BM and PB for the whole immune pattern, we used the Friedman non-parametric test. Multiple logistic regression was used for the prediction of positive MRD probability. Principal component analysis (PCA) was performed with Clustvis, a web tool for visualizing clustering of multivariate data [19]. Statistical analysis was performed with SPSS V25.0 (IBM, Armonk, NY, USA). A *p* value of <0.05 was considered statistically significant (* *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001).

3. Results

3.1. Composition of the BM Microenvironment at Different Stages of MM Progression

The comparison of the relative frequencies of the major immune subsets (T, NK/NKT, B cells, tumor-associated macrophages (TAMs), and erythroblasts) in the BM of patients at different, although related, plasma cell dyscrasias (sMM, MM, PCL) and at the time of CR after treatment did not show any statistically significant differences, mainly due to the apparent heterogeneity of each subset's distribution among patients' samples (Figure 1). The prevalence of T cells showed a gradual increase during progression, but this was not observed for the other subsets. In patients with PCL, we observed a unique profile with higher percentages of all analyzed subsets compared to sMM and MM, as circulating APCs in PCL are less dependent from the BM niche [20]. The variability of the BM microenvironmental composition among patients indicates the apparent heterogeneity of MM beyond the molecular level, thus importing an additional challenge for efficient patients' stratification.

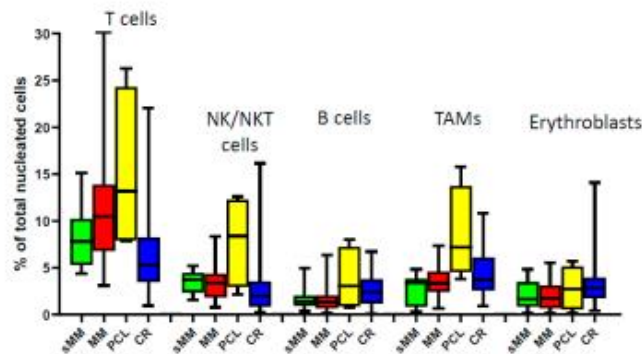


Figure 1. Bone marrow composition of major immune subsets at different stages during MM progression. sMM: smoldering myeloma; MM: multiple myeloma; PCL: plasma cell leukemia; CR: complete remission; NK/NKT: natural killer cells/natural killer T cells; TAMs: tumor-associated macrophages.

3.2. Peripheral Blood Cannot Reflect the Bone Marrow Microenvironment

We further investigated whether analysis of PB could resonate the BM microenvironment, thus reducing the need for invasive sampling. Therefore, we performed paired analysis of different immune subsets from matched BM and PB samples of MM patients both at diagnosis ($n = 26$) and at CR ($n = 25$).

At diagnosis, certain populations showed statistically significant differences between BM and PB (Figure 2). In particular, the mean prevalence of CD4+ T cells among CD3+ T cells was more abundant in PB (61.4%) than in the BM (51.1%; $p < 0.001$), mainly due to the relative increase of the naïve CD4+ T subset (34.3% in PB vs. 28.4% in BM; $p < 0.01$). The CD8+ T cell compartment was higher in the BM (36.8% in PB vs. 46.5% in BM; $p < 0.001$), due to the apparent increase of the HLA-DR regulatory CD8+ T subset (7.3% in PB vs. 11.9% in BM; $p < 0.001$). The prevalence of NK/NKT cells and monocytes/TAMs was higher in PB (NK/NKT cells: 4.4% in PB vs. 3.2% in BM; $p < 0.01$; monocytes/TAMs: 6.6% in PB vs. 3.1% in BM; $p < 0.001$), whereas no specific differences were observed regarding the total percentages of Tregs and MDSCs (Table S2). Nevertheless, subset analysis of Tregs and MDSCs revealed higher frequencies of effector/effector memory Tregs in the BM (9.3% in PB vs. 14.6% in BM; $p < 0.05$), as well as terminal effector Tregs (7.4% in PB vs. 16.0% in BM; $p = 0.01$) and proliferating CD39+ suppressor Tregs (8.1% in PB vs. 4.5% in BM; $p < 0.01$). Lastly, PMN-MDSCs and M-MDSCs were increased in PB vs. BM ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively), when evaluated in the total number of MDSCs (Figure 2A).

These discrepancies between the different compartments (PB vs. BM) were seen only at the time of MM diagnosis; the only differences maintained at CR were those of total CD4+ and CD8+ T cell compartments among CD3+ T cells (for CD4: 46.3% in PB vs. 40.9% in BM; $p < 0.001$; for CD8: 43.8% in PB vs. 53.1% in BM; $p < 0.001$). Interestingly, the prevalence of proliferating naïve CD4+ T cells showed a significant increase in PB vs. BM at diagnosis (0.9% in PB vs. 0.6% in BM; $p = 0.014$), but the opposite divergence at CR (0.2% in PB vs. 0.3% in BM; $p = 0.006$). The immune pattern for all subsets in BM vs. PB at both diagnosis and CR is depicted in detail in Table S2.

in the low-risk ISS-I group (median: 0.9% in ISS-I vs. 0.1% in ISS-II vs. 0.04% in ISS-III; $p < 0.001$), both contributing to differential immune-suppressive signatures between the three stages (Figure 4A).

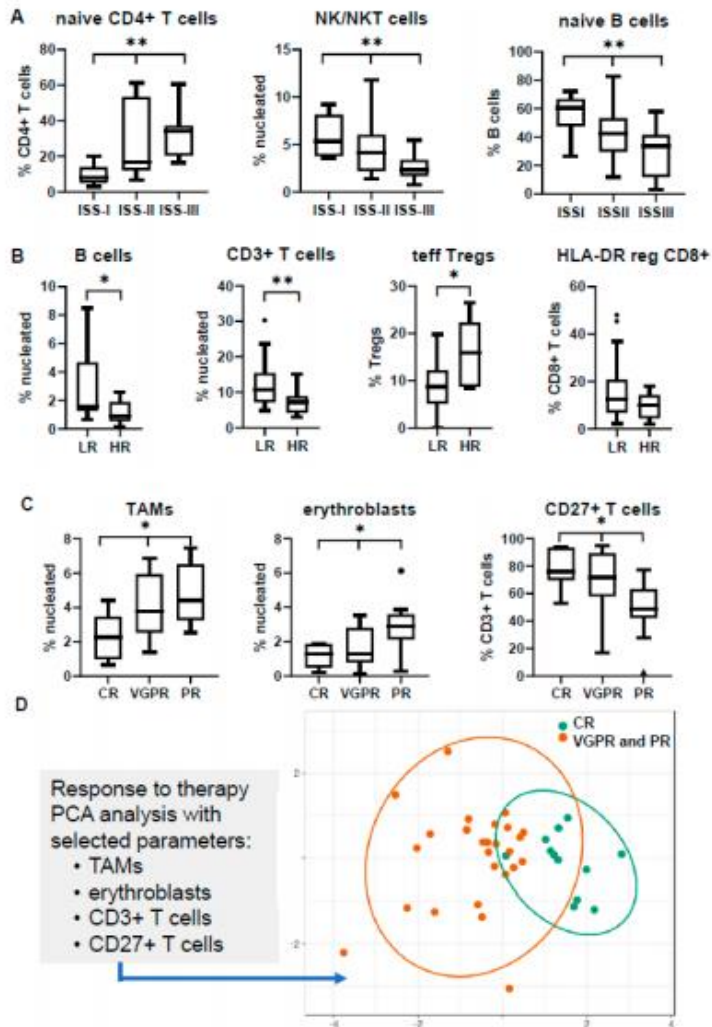


Figure 3. Distribution of bone marrow (BM) subsets in different clinical and prognostic groups at the time of diagnosis. Comparisons refer to (A) the International Staging System (ISS); (B) cytogenetics; (C) response to therapy; (D) PCA analysis of selected BM subsets according to therapeutic response. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; HR: high-risk; LR: low-risk; CR: complete response; VGPR: very good partial response; PR: partial response; TAMs: tumor-associated macrophages; PCA: principal component analysis.

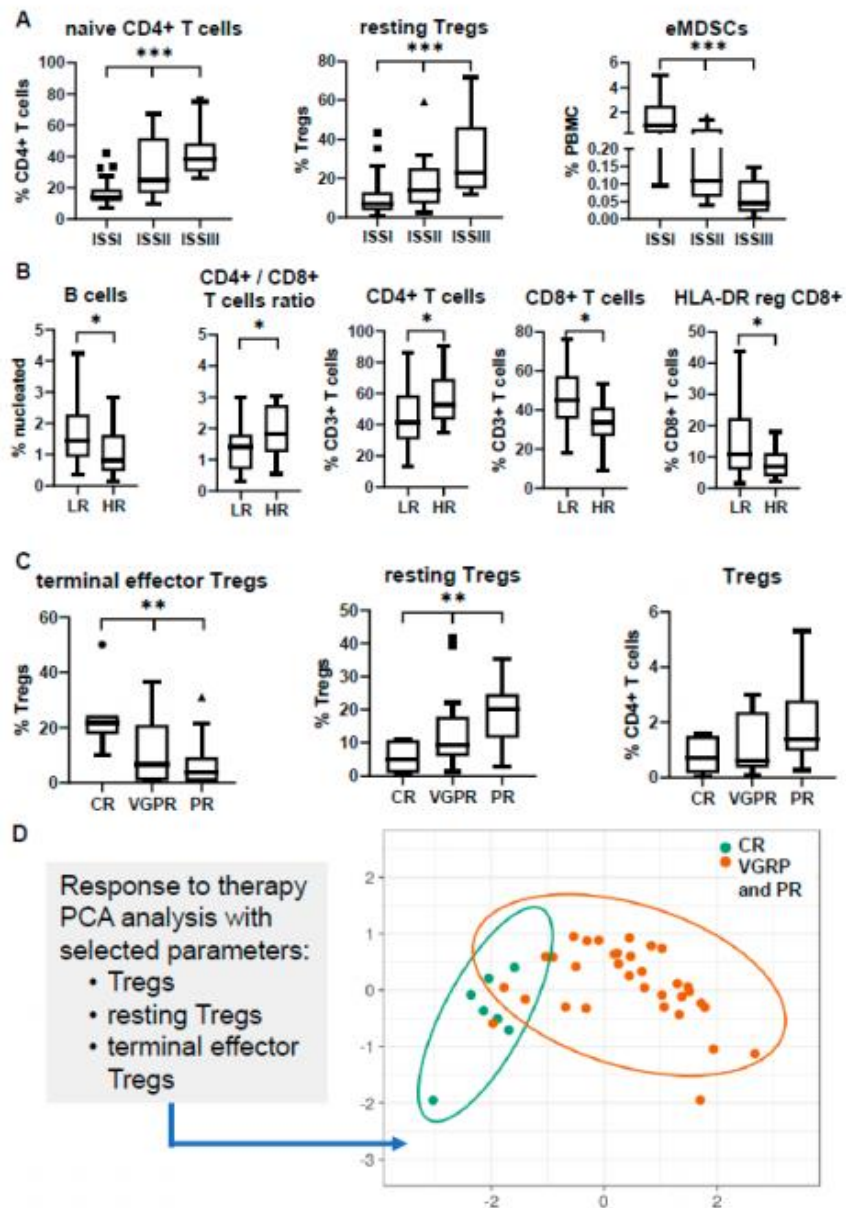


Figure 4. Peripheral blood (PB) profiling of different clinical and prognostic groups at the time of diagnosis. Comparisons refer to (A) International Staging System (ISS); (B) cytogenetics; (C) response to therapy; (D) PCA analysis of selected PB subsets according to therapeutic response. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; MDSCs: myeloid-derived suppressor cells; HR: high-risk; LR: low-risk; CR: complete response; VGPR: very good partial response; PR: partial response; PCA: principal component analysis.

Similarly, the comparison between the distinct cytogenetic groups revealed an uneven distribution for some subsets. Firstly, despite the relative high variance of values among patients, the percentage of B cells was found significantly decreased in the HR group both in the BM and PB (median values in BM: 1.6% in LR vs. 0.9% in HR; $p = 0.02$; median values in PB: 1.4% in LR vs. 0.8% in HR; $p = 0.04$). The total percentage of T cells was also decreased in the BM niche of HR patients (median: 10.7% in LR vs. 7.3% in HR; $p = 0.007$), whereas the prevalence of terminal effector Tregs was 1.6-fold higher in the BM of the HR group ($p = 0.04$) (Figure 3B). PB profiling highlighted differences in the relative frequency of the CD4/CD8 T cell ratio among the CD3+ T cell population, which was partially explained by the significant decrease of the HLA-DR reg CD8+ T cell subset in the HR group (median: 10.9% in LR vs. 6.7% in HR; $p = 0.01$) (Figure 4B).

3.4. Immune Signatures May Predict Response to Induction Therapy

Patients' stratification in well-defined prognostic groups is of utmost need in the clinical practice and especially for highly heterogeneous diseases as MM. The current prognostication systems, based on biochemical measures and the genetic background of APCs, are essential for the clinical management of MM patients; however, they cannot fully predict responses to anti-myeloma treatments. As our cohort was homogeneously treated, we evaluated whether distinct basal immune profiling could be of predictive value.

The differential distribution of several BM subsets in 38 NDMM patients with known responses to VRd induction treatment (12 in CR, 15 in very good partial response (VGPR), 11 in partial response (PR)) revealed significant associations of predictive value. In particular, the most informative markers correlating with therapeutic response were TAMs, erythroblasts, and T cells, especially their CD27+ counterpart. Patients not achieving CR tended to have elevated basal levels of TAMs in their BM (median: 2.3% in CR vs. 3.8% in VGPR vs. 4.4% in PR; $p = 0.04$) and erythroblasts (median: 1.3% in CR vs. 1.3% in VGPR vs. 2.9% in PR; $p = 0.02$), but lower frequencies of CD27+ T cells (median: 76% in CR vs. 71.7% in VGPR vs. 48.6% in PR; $p = 0.015$) (Figure 3C). Of note, the PCA diagram considering the basal levels of these markers could point out a distinct immune signature for those patients achieving CR compared with the pooled profiles of patients' achieving PR or VGPR (Figure 3D).

The same process was applied in PB in an effort to highlight unique signatures in liquid biopsies that could predict therapeutic outcome. Our analysis revealed distinct Treg profiles among patients with different responses (7 in CR, 17 in VGPR, 16 in PR). In specific, patients who achieved a CR appeared with lower (although not statistically significant) levels of total Tregs, but had significantly higher levels of terminal effector Tregs (median: 21.7% in CR vs. 6.7% in VGPR vs. 3.4% in PR; $p = 0.008$) at the expense of the resting Treg counterpart (median: 4.9% in CR vs. 9.3% in VGPR vs. 20.1% in PR; $p = 0.007$) (Figure 4C). Again, PCA clustering on these variables grouped together patients achieving PR and VGPR, highlighting a clearly unique Treg signature for patients achieving CR (Figure 4D). As mentioned above, the relative frequencies of resting Tregs were noticeably different among the three ISS stages, implying that the effect of this immunosuppressive subset in CR prediction may come from the favorable ISS prognostication. Nevertheless, only 50% of patients achieving CR were of ISS-I stage, thus supporting the independent predictive value of this immune profile in the therapeutic response to induction therapy.

3.5. MRD Positivity Is Associated with a Distinct Immune Profile

The evaluation of MRD has emerged as the strongest prognostic factor in MM informing for the depth of response to treatment and has been recently considered as a valuable endpoint to clinical trials and in some cases a critical point for tailored therapeutic strategies [21,22]. Although there are numerous studies highlighting the favorable prognostication of patients achieving MRD negativity [23,24], there is limited information regarding the underlying biology and immune profiling of MRD status. Taking into consideration the pattern of immune distribution revealed by the various multiparametric panels

shown herein, we tested for differences in the BM architecture between 20 MRD-negative (MRD-) and 16 MRD-positive (MRD+) patients.

The distribution of the various immune subsets was quite heterogeneous among patients, forming a unique individualized microenvironmental signature for each one of them. Despite the apparent variability, the unsupervised hierarchical model clustered together patients of the same MRD status, highlighting particular differences between MRD- and MRD+ BM cell content (Figure 5). At the unit level, the subsets showing the highest divergence were naïve CD4+ T cells (median: 12.6% in MRD- vs. 19.1% in MRD+ patients; $p = 0.014$), memory B cells (median: 3.3% in MRD- vs. 5.7% in MRD+ patients; $p = 0.04$), effector/effector memory Tregs (median: 7% in MRD- vs. 16% in MRD+; $p = 0.04$), TAMs (median: 4% in MRD- vs. 5.5% in MRD+ patients; $p = 0.03$), and erythroblasts (median: 2% in MRD- vs. 3.2% in MRD+ patients; $p = 0.006$). All the above subpopulations were more abundant in the MRD+ state. On the contrary, the subsets of effector/effector memory CD4+ T cells (median: 87.6% in MRD- vs. 77.9% in MRD+ patients; $p = 0.04$) and memory CD8+ T cells (median: 39.8% in MRD- vs. 20.7% in MRD+ patients; $p = 0.016$) were increased in the MRD-BM microenvironment.

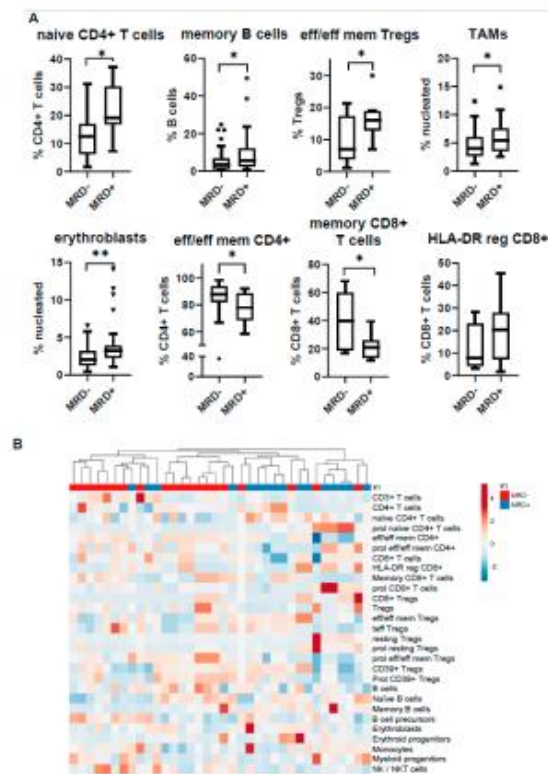


Figure 5. Bone marrow profiling of minimal residual disease (MRD)-positive (MRD+) vs. MRD-negative (MRD-) patients. (A) Comparison of subset distribution according to MRD status; (B) heatmap displaying the unsupervised hierarchical clustering of MRD patients based on their entire immune composition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.6. PB Signatures as Indicators for MRD Status

Despite the tremendous advances in current methodologies and their increasing sensitivity levels, at present, liquid biopsy cannot replace BM aspiration for an efficient MRD assessment, due to the minimal—if any—number of circulating clonal cells. Therefore, one of the major challenges in the daily clinical practice is the identification of biomarkers that could accurately depict MRD status via simple and non-invasive testing. We thus tried to examine if any particular immune profile of the various subsets tested could be indicative of the BM-based MRD result.

As expected, PCA analysis of all tested subsets could not show any significant discrimination between MRD- and MRD+ patients based on PB signature as a whole. Nevertheless, when PCA was performed only with those subsets which individually showed differential distribution between the two groups, the discrimination was quite clear (Figure 6A,B). The most informative immune subsets were naïve CD4+ T cells and effector/effector memory CD4+ T cells, the combination of which conferred an AUC value of 0.8 for a relatively efficient and reliable prediction of the MRD status (Figure 6C). This prediction could be further improved by applying specific cut-off values; a simple MRD scoring system defined by the presence of naïve CD4+ T cells at values higher than 8% and effector/effector memory CD4+ T cells at values lower than 90% could predict MRD-positivity with a satisfactory accuracy, 86% sensitivity, and 85% specificity, when assessed in a separate MM patient cohort (Figure 6D).

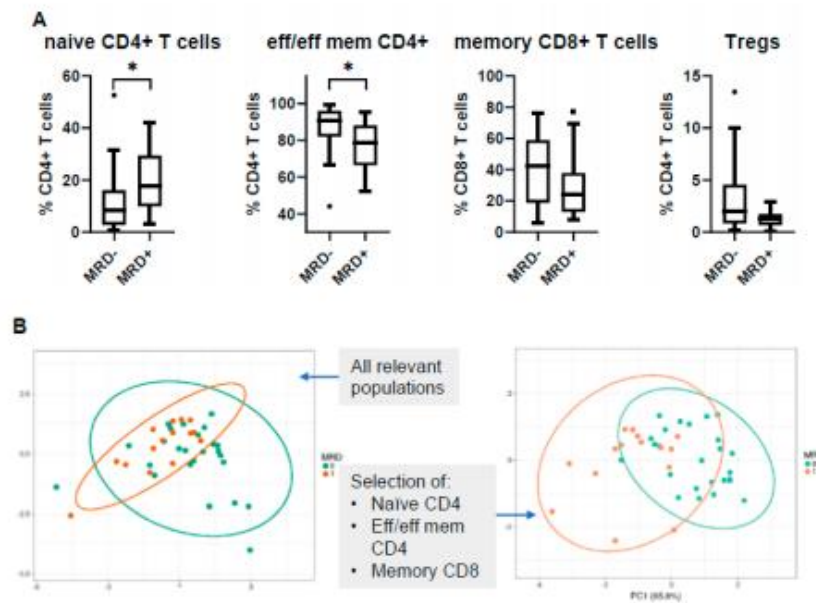


Figure 6. Cont.

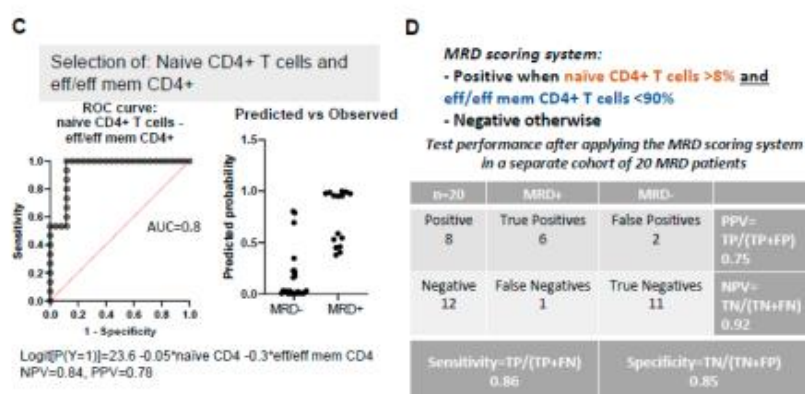


Figure 6. Peripheral blood (PB) profiling of MRD-positive (MRD+) vs. MRD-negative (MRD-) patients. (A) Relative frequencies of selected subpopulations according to MRD status; (B) PCA analysis including the whole immune pattern as input variables (left); PCA analysis including only selected subsets with significant differences among MRD groups (right); (C) selection of naïve CD4+ and effector/effector memory CD4+ T cells allowed the prediction of MRD status with an AUC = 0.8; (D) MRD scoring system based on selected cut-off values for naïve CD4+ and effector/effector memory CD4+ T cells, tested on a different patient cohort ($n = 20$). The negative predictive value (NPV) of the scoring system was improved to 0.92. * $p < 0.05$; AUC: area under the curve; TP: true positive; TN: true negative; FP: false positive; FN: false negative; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

4. Discussion

Current therapeutic advances together with the emergence of several efficient therapeutic regimens have led to substantial improvement in the clinical management of MM patients, who may now experience extended progression-free periods and prolonged survival [25,26]. Intense research efforts focusing mostly on the molecular features of myeloma cells have shed light in the underlying biology of MM, although thorough understanding of this highly heterogeneous and complex disease remains scanty. The BM microenvironment plays a crucial role during the natural history of MM, and various niche-dynamics have been recognized as an important aspect for disease progression and resistance to therapy [14,15,27]. However, the complexity of the BM composition together with the spatiotemporal altered interplay with myeloma cells [28] restrict the deep comprehension of the mechanisms involved. Contrarily to the majority of relevant reported studies which focus on one immune subset, in the present report, using specifically designed antibody panels, we performed detailed immune profiling of both BM and PB at different disease stages, including at MRD evaluation, in an effort to reveal immune signatures associated with distinct clinical features.

We first looked at differences in the relative frequencies of the major immune subsets into the BM microenvironment of patients at different MM stages. PCL, a rare and aggressive form of plasma cell dyscrasia, showed a unique immune profile, supporting the notion of a distinct entity, which seems to differ not only clinically and genetically from MM [20,29], but also in its relative microenvironmental composition. This notwithstanding, and in agreement with previous reports, our analysis did not highlight any significant differences in the prevalence of lymphocytes, TAMs, or erythroblasts between sMM, newly diagnosed, or treated patients at CR, due to the significant variance of respective measures in each category [30,31]. This divergence among samples highly reflects the dynamic nature of the BM niche, while it also necessitates the identification of clinically relevant immune signatures for more efficient stratification of patients.

In parallel with the BM profiling, we also applied the same phenotypic analysis in PB-paired samples of the same patients to investigate whether BM microenvironmental features could be echoed

in blood circulation. Available studies comparing the relative distribution of individual immune subsets (e.g., Tregs, MDSCs) between BM and PB often lead to contradicting results [31–34]. However, to the best of our knowledge, this is the first holistic approach comparing the distribution of numerous immune subsets at both sites and at different time-points. Each particular subset identified followed one of the three patterns in BM vs. PB: (i) clear increase/decrease in one site; (ii) similar prevalence in both sites; (iii) no association between sites due to high variability. At diagnosis, significant differences were observed for particular CD4+ and CD8+ T cell subsets, possibly implying different activation or exhaustion levels in PB compared to BM [35]. The relative comparison of monocytes/TAMs showed a higher prevalence in PB, but it is possible that a different selection of phenotypic markers could narrow down these alterations [36]. In line with previous reports, our study did not show any significant differences in the distribution of total Tregs between PB and BM [31,37], although specific subsets with enhanced suppressive functions (i.e., effector/effector memory Tregs, terminal effector Tregs, CD39+ Tregs) prevailed in the BM tumor site. Marsh-Wakefield et al. [37] showed a relative increase of the CD39- Treg compartment in the BM of MM patients, but these findings do not contradict our results, as in our study, only the proliferating CD39+ compartment was substantially higher in the BM and not total CD39+ Tregs. Contrarily to Tregs, MDSCs and particularly the M- and PMN-MDSC compartments tended to have a higher frequency in PB. Nevertheless, besides these phenotypes and the few subsets with similar distribution between BM and PB, the whole immune spectrum analyzed revealed that each site has a unique profile and liquid biopsy could not reflect the BM composition. Moreover, it could be argued that the two sites could be more similar at CR, when tumor burden is decreased. Statistically, fewer subsets revealed significant differences at the CR status, but that was due to the apparent variance of each site, supporting that BM and PB have unique profiles irrespective of disease stage.

The identification of prognostic biomarkers in the NDMM setting is very important for patients' stratification and subsequent therapeutic management with the most appropriate regimens. The relative distribution of several subsets showed some significant differences among the distinct prognostic groups, probably reflecting a divergent immune status in each category. The most apparent differences between the groups were associated to their respective distribution of T cells and their major CD4+ and CD8+ T cell compartments. Patients with HR aberrations and/or adverse ISS-III stage had relatively lower percentages of total T cells with a skewed increased of CD4/CD8 ratio, which was obvious at both BM and PB (Figure S2). The CD4/CD8 ratio in PB has been reported to decrease during disease progression, and has been considered as an independent unfavorable marker related to advanced disease and increased tumor burden [38–40]. Our data verify previous studies and also highlight that the same events take place within the BM. Another difference, apparent in both sites, was the significant decrease of the total B cell compartment in the adverse prognostic groups, finding similar with those of a previous study by Všíanská et al. [41]. Finally, a notable finding was the significant increase of NK/NKT cells in the favorable ISS-I stage, probably indicating an advanced innate NK cell-mediated cytotoxicity; besides, previous reports have described numerical and functional impairment of NK effector functions alongside disease continuum [42].

Apart from clinical correlations with established prognostic factors, our findings exceeded the importance of patients' immune profiling to a clinically relevant level, since unique signatures could significantly relate to different therapeutic responses. Within the BM, a unique profile of NDMM patients characterized by elevated T cells and the CD27+ T cell subset, together with decreased erythroblasts and TAMs could discriminate patients eventually achieving CR to VRd induction treatment. TAMs have lately emerged as a crucial member of the BM microenvironment in MM [43,44], and their elevated numbers—especially of the M2 subtype—have been related to inferior outcomes [45]. We should note that our analysis revealed a skewed ratio towards M2 phenotype in patients with worse responses (statistically non-significant), but the inclusion of this parameter in our PCA models did not improve discrimination compared with the actual total percentage of TAMs. Additionally, the CD27+ T cell

compartment comprises cells with unique functions (e.g., immune suppression) and the CD27⁻/CD27⁺ ratio has been recently proposed as a marker with independent prognostic value [46].

Similarly, a unique Treg-signature strongly associating with CR was identified in PB. Patients presented with lower percentages of Tregs, but, most importantly, with an increased ratio of terminal effector/resting Tregs responded better to VRd. The clinical impact of Tregs in MM progression has not been validated and reported data may often provide opposing results [31,34,47,48]. Even more uncertain is the role of specific Treg subsets in MM outcome, where available data is sparse. Nevertheless, in a recent study by Kotsakis et al., the authors concluded that higher proportion of circulating terminal effector Tregs with concurrent elimination of the resting Treg subset correlated with an improved clinical response in small and non-small cell lung cancer patients [49].

Following the same strategy described for NDMM, we examined if a specific immune profiling could correlate with MRD status. MRD negativity detected by utilizing highly sensitive techniques (i.e., NGS) has emerged as the strongest independent prognostic factor, correlating with prolonged progression-free periods and overall survival of MM patients [50,51]. However, the identification of particular immune dissimilarities according to MRD status has not been adequately explored. In a previous study by Paiva et al., the authors proposed unique BM signatures correlating with distinct outcomes [52]. In particular, a profile by elevated erythroblasts and B cell precursors and decreased levels of naïve and memory B cells conferred the most inferior outcome, which was independent from patients' MRD status, thus implying that immune profiling could supplement MRD status for improved risk stratification [22]. Our analysis revealed a distinct immune profile between MRD⁺ and MRD⁻ patients, with the latter showing a more experienced adaptive immunity (i.e., CD4⁺ and CD8⁺ T cells) phenotype, probably indicative of competent immune surveillance keeping myeloma burden in repression. On the contrary, MRD⁺ patients were characterized by increased levels of naïve T cells, TAMs and erythroblasts, verifying similar findings from our previous analysis on an independent cohort [53].

Similarly, PB profiling revealed some particular differences between the two MRD states. Though the differences were not as clear as in the BM, instead, MRD-negativity was associated with a shift towards an effector phenotype of CD4⁺ T cells in concordance with the BM findings. Notably, when applying a simple scoring system based on the levels of naïve CD4⁺ and effector/effector memory CD4⁺ T cells, the prediction of a MRD⁻ status in BM was of 92% accuracy. In a relevant approach, Bhutani et al. reported significantly lower numbers of NK cells and an exhausted T cell signature in the PB of MRD⁺ patients [54].

In conclusion, our results indicate that the immune microenvironment of MM is dynamic and displays unique immune signatures in distinct prognostic groups and disease stages. Most importantly, our findings highlight predictive immune profiles towards both therapeutic response and MRD status. Even though more data is needed to empower these findings, it seems that the analysis of an individualized/personalized immune profiling has strong potential to actively guide therapeutic interventions.

5. Conclusions

There is a constant and dynamic interplay between myeloma cells and their microenvironmental cell subsets which plays a crucial role during the course of the disease. Each patient has a unique immune status and particular immune signatures (in both BM and PB) show strong correlations with distinct responses to administered therapy and MRD status. Therefore, the evaluation of each patient's characteristic and unique immune profile is of clinical relevance and could provide essential information for the more effective individual-based clinical management of MM patients.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/11/3245/s1>, Figure S1: (A) Gating strategy of panel 1 for T cell and regulatory T cell analysis (B) Gating strategy of panel 2 for T cell and regulatory T cell analysis. (C) Gating strategy of panel 3 for MDSC analysis, Figure S2: Distribution of total T cells, their CD4+ and CD8+ counterparts, the CD4/CD8 ratio, and NK/NKT frequency in the bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) of MM patients at the time of diagnosis, Table S1: Clones and relative providers of antibodies used in the study, Table S2: Relative distribution of various immune subsets in paired bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) samples.

Author Contributions: Conceptualization, I.V.K., O.E.T.; methodology, I.V.K., O.E.T.; software, K.P., N.O.-S., I.V.K.; validation, I.V.K., O.E.T.; formal analysis, K.P., N.T., I.V.K.; investigation, K.P., P.V., P.P., A.M.; resources, P.M., I.N.-S., N.K., E.E.-P., D.F., M.G., E.K., E.T., M.-A.D.; data curation, I.V.K.; writing—original draft preparation, K.P., I.V.K.; writing—review and editing, O.E.T., E.K., E.T.; visualization, K.P., I.V.K.; supervision, O.E.T., I.V.K.; project administration, O.E.T.; funding acquisition, E.K., E.T., M.-A.D., O.E.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partly funded by the GSRT Operational program “Competitiveness, Entrepreneurship, & Innovation (EPAnEK) 2014–2020 (acronym: My-BIOtag; T1EDK-01837) to EK and MAD.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- De Mel, S.; Lim, S.H.; Tung, M.L.; Chng, W.-J. Implications of Heterogeneity in Multiple Myeloma. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 232546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kumar, S.K.; Rajkumar, V.; Kyle, R.A.; Van Duin, M.; Sonneveld, P.; Mateos, M.-V.; Gay, F.; Anderson, K.C. Multiple myeloma. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pawlyn, C.; Davies, F.E. Toward personalized treatment in multiple myeloma based on molecular characteristics. *Blood* **2019**, *133*, 660–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mimura, N.; Hideshima, T.; Anderson, K.C. Novel therapeutic strategies for multiple myeloma. *Exp. Hematol.* **2015**, *43*, 732–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Quach, H.; Ritchie, D.; Stewart, A.K.; Neeson, P.; Harrison, S.; Smyth, M.J.; Prince, H.M. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma. *Leukemia* **2010**, *24*, 22–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Holstein, S.A.; McCarthy, P.L. Immunomodulatory Drugs in Multiple Myeloma: Mechanisms of action and clinical experience. *Drugs* **2017**, *77*, 505–520. [[CrossRef](#)]
- Madan, S.; Lacy, M.Q.; Dispenzieri, A.; Gertz, M.A.; Buadi, F.; Hayman, S.R.; Detweiler-Short, K.; Dingli, D.; Zeldenzust, S.; Lust, J.; et al. Efficacy of retreatment with immunomodulatory drugs (IMiDs) in patients receiving IMiDs for initial therapy of newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* **2011**, *118*, 1763–1765. [[CrossRef](#)]
- Siegel, D.S.; Dimopoulos, M.A.; Ludwig, H.; Facon, T.; Goldschmidt, H.; Jakubowiak, A.; San-Miguel, J.; Obreja, M.; Blaedel, J.; Stewart, A.K. Improvement in overall survival with carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 728–734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gavriatopoulou, M.; Kastritis, E.; Ntanasis-Stathopoulos, I.; Fotiou, D.; Roussou, M.; Migkou, M.; Ziogas, D.C.; Kanellias, N.; Terpos, E.; Dimopoulos, M.A. The addition of IMiDs for patients with daratumumab-refractory multiple myeloma can overcome refractoriness to both agents. *Blood* **2018**, *131*, 464–467. [[CrossRef](#)]
- Mogollón, P.; Díaz-Tejedor, A.; Algarin, E.M.; Páino, T.; Garayoa, M.; Ocio, E.M. Biological background of resistance to current standards of care in multiple myeloma. *Cells* **2019**, *8*, 1432. [[CrossRef](#)]
- Podar, K.; Chauhan, D.; Anderson, K.C. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia* **2019**, *23*, 10–24. [[CrossRef](#)]
- Abe, M. Targeting the interplay between myeloma cells and the bone marrow microenvironment in myeloma. *Int. J. Hematol.* **2011**, *94*, 334–343. [[CrossRef](#)]
- Andrews, S.W.; Kabrah, S.; May, J.E.; Donaldson, C.; Morse, H.R. Multiple myeloma: The bone marrow microenvironment and its relation to treatment. *Br. J. Biomed. Sci.* **2013**, *70*, 110–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Manier, S.; Sacco, A.; Leleu, X.; Ghobrial, I.M.; Roccaro, A.M. Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 157496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kawano, Y.; Moschetta, M.; Manier, S.; Glavey, S.; Görgün, G.T.; Roccaro, A.M.; Anderson, K.C.; Ghobrial, I.M. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunol. Rev.* **2015**, *263*, 160–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Flores-Montero, J.; Sanoja-Flores, L.; Paiva, B.; Puig, N.; García-Sánchez, O.; Böttcher, S.; van der Velden, V.H.J.; Pérez-Morán, J.-J.; Vidriales, M.-B.; García-Sanz, R.; et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* **2017**, *31*, 2094–2103. [[CrossRef](#)]
17. Kostopoulos, I.V.; Paterakis, G.; Papadimitriou, K.; Pavlidis, D.; Tsitsilonis, O.E.; Papadimitriou, S.I. Immunophenotypic analysis reveals heterogeneity and common biologic aspects in monoclonal B-cell lymphocytosis. *Genes Chromosomes Cancer* **2015**, *54*, 210–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Sergeantanis, T.N.; Kastritis, E.; Terpos, E.; Dimopoulos, M.A.; Psaltopoulou, T. Cytogenetics and Survival of Multiple Myeloma: Isolated and Combined Effects. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2016**, *16*, 335–340. [[CrossRef](#)]
19. Metsalu, T.; Vilo, J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W566–W570. [[CrossRef](#)]
20. Gundesen, M.T.; Lund, T.; Moeller, H.E.H.; Abildgaard, N. Plasma cell leukemia: Definition, presentation, and treatment. *Curr. Oncol. Rep.* **2019**, *21*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Landgren, O.; Lu, S.X.; Hultcrantz, M. MRD Testing in Multiple Myeloma: The Main Future Driver for Modern Tailored Treatment. *Semin. Hematol.* **2018**, *55*, 44–50. [[CrossRef](#)]
22. Kostopoulos, I.V.; Ntanasis-Stathopoulos, I.; Gavriatopoulou, M.; Tsitsilonis, O.E.; Terpos, E. Minimal residual disease in multiple myeloma: Current landscape and future applications with immunotherapeutic approaches. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 860. [[CrossRef](#)]
23. Landgren, O.; Devlin, S.; Boulad, M.; Mailankody, S. Role of MRD status in relation to clinical outcomes in newly diagnosed multiple myeloma patients: A meta-analysis. *Bone Marrow Transplant.* **2016**, *51*, 1565–1568. [[CrossRef](#)]
24. Munshi, N.C.; Avet-Loiseau, H.; Rawstron, A.C.; Owen, R.G.; Child, J.A.; Thakurta, A.; Sherrington, P.; Samur, M.K.; Georgieva, A.; Anderson, K.C.; et al. Association of minimal residual disease with superior survival outcomes in patients with multiple myeloma: A meta-analysis. *JAMA Oncol.* **2017**, *3*, 28. [[CrossRef](#)]
25. Kumar, S.K.; Rajkumar, S.V.; Dispenzieri, A.; Lacy, M.Q.; Hayman, S.R.; Buadi, F.K.; Zeldenrust, S.R.; Dingli, D.; Russell, S.J.; Lust, J.A.; et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* **2008**, *111*, 2516–2520. [[CrossRef](#)]
26. Costa, L.J.; Brill, I.K.; Omel, J.; Godby, K.; Kumar, S.K.; Brown, E.E. Recent trends in multiple myeloma incidence and survival by age, race, and ethnicity in the United States. *Blood Adv.* **2017**, *1*, 282–287. [[CrossRef](#)]
27. Di Marzo, L.; Desantis, V.; Solimando, A.G.; Ruggieri, S.; Annese, T.; Nico, B.; Fumarulo, R.; Vacca, A.; Frassanito, M.A. Microenvironment drug resistance in multiple myeloma: Emerging new players. *Oncotarget* **2016**, *7*, 60698–60711. [[CrossRef](#)]
28. Mithraprabhu, S.; Khong, T.; Ramachandran, M.; Chow, A.; Klarica, D.; Mai, L.; Walsh, S.; Broemeling, D.; Marziali, A.; Wiggan, M.; et al. Circulating tumour DNA analysis demonstrates spatial mutational heterogeneity that coincides with disease relapse in myeloma. *Leukemia* **2017**, *31*, 1695–1705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. de Larrea, C.F.; Kyle, R.A.; Durie, B.G.M.; Ludwig, H.; Usmani, S.; Vesole, D.H.; Hajek, R.; San Miguel, J.F.; Sezer, O.; Sonneveld, P.; et al. Plasma cell leukemia: Consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia* **2013**, *27*, 780–791. [[CrossRef](#)]
30. Brimnes, M.K.; Vangsted, A.J.; Knudsen, L.M.; Gimsing, P.; Gang, A.O.; Johnsen, H.E.; Svane, I.M. Increased level of both CD4+FOXP3+ regulatory T cells and CD14+HLA-DR^{low} Myeloid-Derived Suppressor Cells and decreased level of dendritic cells in patients with multiple myeloma: Immune impairment in patients with multiple myeloma. *Scand. J. Immunol.* **2010**, *72*, 540–547. [[CrossRef](#)]
31. Foglietta, M.; Castella, B.; Mariani, S.; Coscia, M.; Godio, L.; Ferracini, R.; Ruggieri, M.; Muccio, V.; Omede, P.; Palumbo, A.; et al. The bone marrow of myeloma patients is steadily inhabited by a normal-sized pool of functional regulatory T cells irrespective of the disease status. *Haematologica* **2014**, *99*, 1605–1610. [[CrossRef](#)]
32. Görgün, G.T.; Whitehill, G.; Anderson, J.L.; Hideshima, T.; Maguire, C.; Laubach, J.; Raje, N.; Munshi, N.C.; Richardson, P.G.; Anderson, K.C. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood* **2013**, *121*, 2975–2987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Favaloro, J.; Brown, R.; Aklilu, E.; Yang, S.; Suen, H.; Hart, D.; Fromm, P.; Gibson, J.; Khoo, L.; Ho, P.J.; et al. Myeloma skews regulatory T and pro-inflammatory T helper 17 cell balance in favor of a suppressive state. *Leuk. Lymphoma* **2014**, *55*, 1090–1098. [[CrossRef](#)]
34. Lad, D.; Huang, Q.; Hoeppli, R.; Garcia, R.; Xu, L.; Levings, M.; Song, K.; Broady, R. Evaluating the role of Tregs in the progression of multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* **2019**, *60*, 2134–2142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zelle-Rieser, C.; Thangavadivel, S.; Biedermann, R.; Brunner, A.; Stoitzner, P.; Willenbacher, E.; Greil, R.; Jöhner, K. T cells in multiple myeloma display features of exhaustion and senescence at the tumor site. *J. Hematol. Oncol.* **2016**, *9*, 116. [[CrossRef](#)]
36. Pessoa de Magalhães, R.J.; Vidriales, M.-B.; Paiva, B.; Fernandez-Gimenez, C.; García-Sanz, R.; Mateos, M.-V.; Gutierrez, N.C.; Lecrevisse, Q.; Blanco, J.F.; Hernández, J.; et al. Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica* **2013**, *98*, 79–86. [[CrossRef](#)]
37. Marsh-Wakefield, F.; Kruzins, A.; McGuire, H.M.; Yang, S.; Bryant, C.; St. Groth, B.F.; Nassif, N.; Byrne, S.N.; Gibson, J.; Brown, C.; et al. Mass cytometry discovers two discrete subsets of CD39–Treg which discriminate MGUS from multiple myeloma. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1596. [[CrossRef](#)]
38. San Miguel, J.F.; González, M.; Gascón, A.; Moro, M.J.; Hernández, J.M.; Ortega, F.; Jiménez, R.; Guerras, L.; Romero, M.; Casanova, F. Lymphoid subsets and prognostic factors in multiple myeloma. Cooperative Group for the Study of Monoclonal Gammopathies. *Br. J. Haematol.* **1992**, *80*, 305–309. [[CrossRef](#)]
39. Koike, M.; Sekigawa, I.; Okada, M.; Matsumoto, M.; Iida, N.; Hashimoto, H.; Oshimi, K. Relationship between CD4(+)/CD8(+) T cell ratio and T cell activation in multiple myeloma: Reference to IL-16. *Leuk. Res.* **2002**, *26*, 705–711. [[CrossRef](#)]
40. Dosani, T.; Carlisten, M.; Maric, I.; Landgren, O. The cellular immune system in myelomagenesis: NK cells and T cells in the development of MM and their uses in immunotherapies. *Blood Cancer J.* **2015**, *5*, e306. [[CrossRef](#)]
41. Všianská, P.; Řihová, L.; Varmužová, T.; Suská, R.; Kryukov, F.; Mikulášová, A.; Kupská, R.; Penka, M.; Pour, L.; Adam, Z.; et al. Analysis of B-Cell subpopulations in monoclonal gammopathies. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2015**, *15*, e61–e71. [[CrossRef](#)]
42. Pittari, G.; Vago, L.; Festuccia, M.; Bonini, C.; Mudawi, D.; Giaccone, L.; Bruno, B. Restoring natural killer cell immunity against multiple myeloma in the era of new drugs. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1444. [[CrossRef](#)]
43. Berardi, S.; Ria, R.; Reale, A.; De Luisi, A.; Catacchio, I.; Moschetta, M.; Vacca, A. Multiple myeloma macrophages: Pivotal players in the tumor microenvironment. *J. Oncol.* **2013**, *2013*, 1–6. [[CrossRef](#)]
44. De Beule, N.; De Veirman, K.; Maes, K.; De Bruyne, E.; Menu, E.; Breckpot, K.; De Raeve, H.; Van Rempelbergh, R.; Van Ginderachter, J.A.; Schots, R.; et al. Tumour-associated macrophage-mediated survival of myeloma cells through STAT3 activation: TAM-mediated survival of myeloma cells. *J. Pathol.* **2017**, *241*, 534–546. [[CrossRef](#)]
45. Panchabhai, S.; Kelemen, K.; Ahmann, G.; Sebastian, S.; Mantei, J.; Fonseca, R. Tumor-associated macrophages and extracellular matrix metalloproteinase inducer in prognosis of multiple myeloma. *Leukemia* **2016**, *30*, 951–954. [[CrossRef](#)]
46. Botta, C.; Perez, C.; Puig, N.; Cedena, M.; Cordon, L.; Zabaleta, A.; Burgos, L.; Maia, C.; Goicoechea, I.; Rodriguez, S.; et al. Single-cell characterization of the multiple myeloma (MM) immune microenvironment identifies CD27-negative T cells as potential source of tumor-reactive lymphocytes. *Blood* **2019**, *134*, 506. [[CrossRef](#)]
47. Bryant, C.; Suen, H.; Brown, R.; Yang, S.; Favaloro, J.; Aklilu, E.; Gibson, J.; Ho, P.J.; Iland, H.; Fromm, P.; et al. Long-term survival in multiple myeloma is associated with a distinct immunological profile, which includes proliferative cytotoxic T-cell clones and a favourable Treg/Th17 balance. *Blood Cancer J.* **2013**, *3*, e148. [[CrossRef](#)]
48. Giannopoulos, K.; Kaminska, W.; Hus, I.; Dmoszynska, A. The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: Detailed characterisation of immune status in multiple myeloma. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 546–552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Kotsakis, A.; Koinis, F.; Katsarou, A.; Gioulbasani, M.; Aggouraki, D.; Kentepozidis, N.; Georgoulas, V.; Vetsika, E.-K. Prognostic value of circulating regulatory T cell subsets in untreated non-small cell lung cancer patients. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 39247. [[CrossRef](#)]

50. Perrot, A.; Lauwers-Cances, V.; Corre, J.; Robillard, N.; Hulin, C.; Chretien, M.-L.; Dejoie, T.; Maheo, S.; Stoppa, A.-M.; Pegourie, B.; et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* **2018**, *132*, 2456–2464. [[CrossRef](#)]
51. Paiva, B.; Puig, N.; Cedena, M.-T.; Rosiñol, L.; Cordon, L.; Vidriales, M.-B.; Burgos, L.; Flores-Montero, J.; Sanoja-Flores, L.; Lopez-Anglada, L.; et al. Measurable residual disease by Next-Generation flow cytometry in multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 784–792. [[CrossRef](#)]
52. Paiva, B.; Cedena, M.-T.; Puig, N.; Arana, P.; Vidriales, M.-B.; Cordon, L.; Flores-Montero, J.; Gutierrez, N.C.; Martin-Ramos, M.-L.; Martinez-Lopez, J.; et al. Minimal residual disease monitoring and immune profiling in multiple myeloma in elderly patients. *Blood* **2016**, *127*, 3165–3174. [[CrossRef](#)]
53. Terpos, E.; Kostopoulos, I.V.; Kastritis, E.; Ntanasis-Stathopoulos, I.; Migkou, M.; Rousakis, P.; Argyriou, A.T.; Kanellias, N.; Fotiou, D.; Eleutherakis-Papaiakovou, E.; et al. Impact of minimal residual disease detection by next-generation flow cytometry in multiple myeloma patients with sustained complete remission after frontline therapy. *HemaSphere* **2019**, *3*, e300. [[CrossRef](#)]
54. Bhutani, M.; Foureau, D.; Zhang, Q.; Robinson, M.; Wynn, A.S.; Steuerwald, N.M.; Druhan, L.J.; Guo, F.; Rigby, K.; Turner, M.; et al. Peripheral immunotype correlates with minimal residual disease status and is modulated by immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2019**, *25*, 459–465. [[CrossRef](#)]

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



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).