

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΠΑ

Γ.Ν.Α. «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΜΕΛΕΤΙΟΣ-ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

**Ο ρόλος των μη κωδικών RNA σε ασθενείς με πλασματοκυτταρικά
νεοπλάσματα**

ΑΡΙΣΤΕΑ-ΜΑΡΙΑ ΠΑΠΑΝΩΤΑ

ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ, 2023

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΠΑ

Γ.Ν.Α. «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΜΕΛΕΤΙΟΣ-ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

**Ο ρόλος των μη κωδικών RNA σε ασθενείς με πλασματοκυτταρικά
νεοπλάσματα**

ΑΡΙΣΤΕΑ-ΜΑΡΙΑ ΠΑΠΑΝΩΤΑ

ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ, 2023

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ημερομηνία αιτήσεως για ορισμό τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

13/10/2017

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 30/11/2017

Ημερομηνία καθορισμού θέματος διδακτορικής διατριβής: 15/01/2018

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 13/03/2023

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων: Καθηγητής Μελέτιος-Αθανάσιος Δημόπουλος

Μέλος: Καθηγητής Ευάγγελος Τέρπος

Μέλος: Καθηγητής Ανδρέας Σκορίλας

Μέλη επταμελούς εξεταστικής επιτροπής

Μελέτιος-Αθανάσιος Δημόπουλος, Καθηγητής

Ευάγγελος Τέρπος, Καθηγητής

Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής

Φλώρα Ζαγουρή, Καθηγήτρια

Χρήστος Κοντός, Επίκουρος καθηγητής

Μιχαήλ Λιόντος, Επίκουρος καθηγητής

Γαβριατοπούλου Μαρία, Αναπληρώτρια καθηγήτρια

Υποστήριξη ενώπιον επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: 1/6/2023

Βαθμός διδακτορικής διατριβής: Άριστα (10)

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής Γεράσιμος Σιάσος

Ιπποκράτειος Όρκος

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΟΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ. ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΙΑ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΖΟΜΑΙ ΕΠ'ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝ ΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ'ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗΠΟΤΕ ΕΓΚΑΛΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ, ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Απόδοση στα Νέα Ελληνικά

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και τον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και σε όλους τους Θεούς επικαλούμενος τη μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτήν την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί του τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας, να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τα αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελιές, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου που με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σε αυτούς που έχουν ορκιστεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και κατά την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω και αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή, ομοίως, να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για να αποβάλει. να διατηρήσω δε τη ζωή μου καθαρή και αγνή, και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους, αλλά να αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς και σε όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το κρατήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είθε να απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικά στοιχεία

Όνοματεπώνυμο: Αριστέα-Μαρία Παπανώτα του Κωνσταντίνου

Ημερομηνία/τόπος γέννησης: 30-08-1991/Αθήνα, Αττικής

Διεύθυνση: Αεροπόρου Παπαναστασίου 15, 11527 Αθήνα

Επικοινωνία: ampapanota@yahoo.gr

Σπουδές

Απολυτήριο Λυκείου (2009): 3^ο Γενικό Λύκειο Τρικάλων με βαθμό απολυτηρίου λυκείου «Άριστα» (19,9)

Πτυχίο Ιατρικής (2015): Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό «Άριστα» (8,89)

11/2017 έως σήμερα: Υποψήφια διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με αντικείμενο μελέτης τις πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες.

Επαγγελματική δραστηριότητα

26/04/2016 – 06/08/2017: Ιατρός υπηρεσίας υπαίθρου στο άγονο Π.Ε.Δ.Υ. – Π.Ι. Χρυσομηλιάς του Π.Ε.Δ.Υ. - Κ.Υ. Καλαμπάκας.

17/08/2017 – 02/10/2017: Ειδικευόμενη Παθολογίας στην Α Παθολογική κλινική ΓΝΑ Σισμανόγλειο.

03/10/2017 – 01/03/2019: Επιστημονική συνεργάτης Ογκολογικής μονάδας Θεραπευτικής Κλινικής ΕΚΠΑ (Γενικό Νοσοκομείο Αλεξάνδρα).

04/03/2019 – 29/03/2022: Ειδικευόμενη Παθολογίας στη Θεραπευτική Κλινική του ΕΚΠΑ (Γενικό Νοσοκομείο Αλεξάνδρα), συμπεριλαμβανομένης της 6μηνης εκπαίδευσης στην αιματολογία.

29/03/2022 έως σήμερα: Ειδικευόμενη Παθολογικής Ογκολογίας στο Ογκολογικό τμήμα της Θεραπευτικής Κλινικής του ΕΚΠΑ (Γενικό Νοσοκομείο Αλεξάνδρα).

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά

18 δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά, σε 7 εξ αυτών, οι οποίες παρατίθενται παρακάτω, πρώτος ή ισότιμος συγγραφέας στη θέση του πρώτου:

Papanota AM, Ntanasis-Stathopoulos I, Kastritis E, Dimopoulos MA, Gavriatopoulou M. Evaluating ibrutinib in the treatment of symptomatic Waldenstrom's macroglobulinemia. J Blood Med. 2019 Aug 27;10:291-300

Papanota AM, Karousi P, Kontos CK, Ntanasis-Stathopoulos I, Scorilas A, Terpos E. Multiple Myeloma Bone Disease: Implication of MicroRNAs in Its Molecular Background. Int J Mol Sci. 2021 Feb 27;22(5):2375

Papanota AM, Karousi P, Kontos CK, Artemaki PI, Liacos CI, Papadimitriou MA, Bagratuni T, Eleutherakis-Papaiakovou E, Malandrakis P, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Kastritis E, Avgeris M, Dimopoulos MA, Scorilas A, Terpos E. A Cancer-Related microRNA Signature Shows Biomarker Utility in Multiple Myeloma. Int J Mol Sci. 2021 Dec 5;22(23):13144

Papanota AM, Ntanasis-Stathopoulos I, Liakea A, Kastritis E, Terpos E, Dimopoulos MA, Gavriatopoulou M. Primary plasma cell leukemia presenting as secondary pulmonary alveolar proteinosis. Leuk Lymphoma. 2020 Sep;61(9):2246-2249.

Papanota AM, Tsiakanikas P, Kontos CK, Malandrakis P, Liacos CI, Ntanasis-Stathopoulos I, Kanellias N, Gavriatopoulou M, Kastritis E, Avgeris M, Dimopoulos MA, Scorilas A, Terpos E. A Molecular Signature of Circulating MicroRNA Can Predict Osteolytic Bone Disease in Multiple Myeloma. Cancers (Basel). 2021 Jul 31;13(15):3877

Karousi P, Papanota AM, Artemaki PI, Liacos CI, Patseas D, Mavrianou-Koutsoukou N, Liosi AA, Kalioraki MA, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Kastritis E, Dimopoulos MA, Scorilas A, Terpos E, Kontos CK. tRNA Derivatives in Multiple

Myeloma: Investigation of the Potential Value of a tRNA-Derived Molecular Signature. Biomedicines. 2021 Dec 1;9(12):1811.

Papadimitriou MA, Papanota AM, Adamopoulos PG, Pilala KM, Liacos CI, Malandrakis P, Mavrianou-Koutsoukou N, Patseas D, Eleutherakis-Papaiakovou E, Gavriatopoulou M, Kastritis E, Avgeris M, Dimopoulos MA, Terpos E, Scorilas A. miRNA-seq and clinical evaluation in multiple myeloma: miR-181a overexpression predicts short-term disease progression and poor post-treatment outcome. Br J Cancer. 2022 Jan;126(1):79-90

Συμμετοχή σε συνέδρια

Έχω συμμετάσχει σε διεθνή και εθνικά συνέδρια με τη μορφή προφορικών και αναρτημένων ανακοινώσεων. 3 εξ αυτών έχουν βραβευθεί στα πλαίσια των εν λόγω συνεδρίων και παρατίθενται

Βραβείο «Αρκάγαθος Γούττας» /29^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο (Θεσσαλονίκη, 4 Νοεμβρίου 2018) : Αξιολόγηση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου με πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής νέας γενιάς σε ασθενείς με Πολλαπλούν Μυέλωμα σε παρατεταμένη πλήρη ύφεση μετά από θεραπεία πρώτης γραμμής, Ι. Κωστόπουλος, Ε. Καστρίτης, Π. Μιχελή, Ι. Ντάνασης-Σταθόπουλος, Μ. Μήγκου, Ν. Κανέλλιας, Δ. Φωτίου, Ε. Ελευθεράκης-Παπαϊακώβου, Μ. Γαβριατοπούλου, Α-Μ Παπανώτα, Μ. Σπυροπούλου-Βλάχου, Ι. Τρουγκάκος, Ο. Τσιτσιλώνη, Β. Ραίνα, Μ-Α Δημόπουλος, Ευάγγελος Τέρπος

Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης/30^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο (Αθήνα, 10 Νοεμβρίου 2019): Τρία νέα θραύσματα tRNA μπορούν να διακρίνουν το ασυμπτωματικό από το συμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα, Α-Μ Παπανώτα, Π. Καρούση, Χ. Κοντός, Χ. Λιάκου, Π-Ι Αρτεμάκη, Δ. Πατσέας, Α-Α Λιόση, Ν. Μαυριανού-Κουτσούκου, Μ-Α Καλιωράκη, Δ. Φωτίου, Ι Ντάνασης-Σταθόπουλος, Μ. Μήγκου, Π. Μαλανδράκης, Μ. Γαβριατοπούλου, Ε. Καστρίτης, Α. Σκορίλας, Μ-Α Δημόπουλος, Ε. Τέρπος

Βραβείο Eliezer Rachmilewitz (καλύτερη προφορική ανακοίνωση στην αιματολογία ενηλίκων)/Xlth Eurasian Hematology Oncology Congress (21-24 Οκτωβρίου 2020): A novel microrna signature with clinical significance in multiple myeloma, Α. Papanota,

P.Artemaki, P. Karousi, C. Liacos, M. Gavriatopoulou, E. Kastritis, C. Kontos, M. Dimopoulos, A. Scorilas, E. Terpos

Κλινικές μελέτες

Έχω συμμετάσχει ως υπο-ερευνητής σε 18 ενεργείς και 1 ολοκληρωμένη κλινικές μελέτες.

Στους γονείς μου,

Κώστα και Ρένα

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έλαβε χώρα από το 2018 ως το 2023 στην Ογκολογική Μονάδα της Θεραπευτικής Κλινικής του ΕΚΠΑ σε συνεργασία με τον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Βιολογικού Τμήματος του ΕΚΠΑ. Το ταξίδι αυτό ξεκίνησε στα πρώτα μου βήματα ως ιατρός πριν την έναρξη της ειδίκευσής μου και ολοκληρώθηκε στη διάρκεια της ειδικότητάς μου ως Παθολόγος Ογκολόγος. Πρόκειται για ένα κεφάλαιο της επαγγελματικής μου ζωής που μου έδωσε νέα ερεθίσματα και με έφερε πιο κοντά στο θαυμαστό κόσμο της βασικής έρευνας. Ολοκληρώνοντας το απαιτητικό, αλλά και ενδιαφέρον αυτό ταξίδι, δε θα μπορούσα παρά να ευχαριστήσω του οδηγούς και συνοδοιπόρους μου.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή και επιβλέποντά μου, τον Πρύτανη του ΕΚΠΑ καθηγητή Μελέτιο-Αθανάσιο Δημόπουλο, που πίστεψε σε εμένα από την πρώτη στιγμή και με καθοδήγησε στα ερευνητικά και κλινικά βήματά μου. Τον ευχαριστώ για όλες τις ευκαιρίες, τη γνώση και την έμπνευση που μου έδωσε και συνεχίζει να μου δίνει.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου και μέλος της τριμελούς επιτροπής, κύριο Ευάγγελο Τέρπο που ήταν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια στηρίζοντάς με και κατευθύνοντάς με σε κάθε βήμα του έργου αυτού. Χωρίς τη συμβολή του η παρούσα διδακτορική διατριβή δε θα μπορούσε να είχε ολοκληρωθεί.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστώ και στον καθηγητή μου και μέλος της τριμελούς επιτροπής, κύριο Ανδρέα Σκορίλα που με βοήθησε να κατανοήσω και να εργαστώ πάνω σε έννοιες της μοριακής βιολογίας και ήταν πάντα δίπλα μου σε όλη αυτή την πορεία για να ενορχηστρώνει το πειραματικό μας έργο.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλους μου τους συναδέλφους στην Ογκολογική Μονάδα της Θεραπευτικής Κλινικής, γιατρούς και βιολόγους, που στήριζαν ένθερμα το πόνημα αυτό από την πρώτη μέρα και συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωσή του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ πρέπει να αποδώσω ακόμη σε όλους τους εργαζόμενους του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής βιολογίας που με καθοδήγησαν για την ολοκλήρωση

του ερευνητικού αυτού έργου. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ αξίζει εδώ στον επίκουρο καθηγητή κύριο Χρήστο Κοντό, που όλο αυτό το διάστημα ήταν δίπλα μου. Χωρίς την καθοδήγησή του και τη διαρκή ενθάρρυνση και υποστήριξη δε θα μπορούσα να είχα φτάσει ως εδώ. Ευχαριστώ ακόμη τον αναπληρωτή καθηγητή κύριο Αυγέρη Μαργαρίτη για τη βοήθειά του και την καθοδήγησή του στην πορεία αυτή. Ένα από καρδιάς ευχαριστώ στους διδακτορικούς φοιτητές με τους οποίους εργαστήκαμε μαζί όλα αυτό το διάστημα, και ιδιαίτερα στην Παρασκευή Καρούση, τον Παναγιώτη Τσιακανίκα και τη Μαρία-Αλεξάνδρα Παπαδημητρίου.

Ευχαριστώ τους ασθενείς μου, γιατί χωρίς αυτούς όλα αυτά δε θα είχαν κανένα νόημα και για αυτούς συνεχίζουμε την έρευνα που στοχεύει να κάνει τον καρκίνο χρόνια νόσο.

Ευχαριστώ πολύ τους δικούς μου ανθρώπους, τους φίλους μου και τον σύντροφό μου που ήταν πάντα δίπλα μου και με στήριζαν ηθικά και συναισθηματικά στην πορεία αυτή.

Τέλος, ευχαριστώ και αφιερώνω τη διδακτορική αυτή διατριβή στους γονείς μου Κώστα και Ρένα που είναι πάντα δίπλα μου και στηρίζουν τα όνειρα και τις αναζητήσεις μου. Είναι οι άνθρωποι που με ενέπνευσαν από την παιδική μου ηλικία να μοχθώ και να είμαι πιστή στα θέλω μου και τις επιστημονικές μου αναζητήσεις.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- ADAM: A Disintegrin and Metalloproteinase
- ADCC: Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity
- ADCP: Antibody-dependent Cellular Phagocytosis
- AGO proteins: Argonaute Proteins
- Akt: Protein Kinase B
- ANG: Αγγειογενίνη
- ATF4: Activating Transcription Factor 4
- ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated
- ATR: Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related Protein
- AUC: Area under the curve
- BCMA: B-cell Maturation Antigen
- BMP: Bone Morphogenetic Protein
- BRAF: V-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
- CAR T-cells: Chimeric Antigen Receptor T-cells
- CCL3: Chemokine (C-C motif) ligand 3
- CCND1: Cyclin D1
- CCND2: Cyclin D2
- CCND3: Cyclin D3
- CDC: Complement-dependent Cytotoxicity
- CDKN2A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
- CDKN2C: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2C
- CKS1B: Cyclin Dependent Kinase Regulatory Subunit 1B

CR: Complete Response

CT: Computed Tomography

CXCR4: C-X-C Chemokine Receptor Type 4

CYLD: CYLD Lysine 63 Deubiquitinase

DGCR8: DiGeorge Syndrome Critical Region 8

DIS3: DIS3 Homolog, exosome endoribonuclease and 3'-5' exoribonuclease

DKK1: Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1

DLL1: Delta-like Protein 1

DLL3: Delta-like Protein 3

DLL4: Delta-like Protein 4

DNA: Deoxyribonucleic Acid

dNTP: Deoxyribonucleotide Triphosphate

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EMA: European Medicines Agency

EMN: European Myeloma Network

ESMO: European Society for Medical Oncology

FAF1: Fas Associated Factor 1

FBXW7: F-Box And WD Repeat Domain Containing 7

FGF: Fibroblast growth factor

FGFR1: fibroblast growth factor 1

FGFR3: Fibroblast Growth Factor Receptor 3

FISH: Fluorescent In Situ Hybridization

FOXP3: Forkhead Box P3

FRZB: Frizzled Related Protein

GSK3B: Glycogen Synthase Kinase 3 Beta

GWAS: Genome Wide Association Studies

HES: Hes Family BHLH Transcription Factor

HEY: Hes Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 1

HOXA11: Homeobox A11

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

ICN: Intracellular Domain of Notch

IGF1R: Insulin Like Growth Factor 1 Receptor

IKZF1: IKAROS Family Zinc Finger 1

IKZF3: IKAROS Family Zinc Finger 3

IL: Interleukin

IMWG: International Myeloma Working Group

ISS: International Staging System

IRF4: Interferon Regulatory Factor 4

JAG1: Jagged1

JAG2: Jagged2

KRAS: Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog

KREMEN1: Kringle Containing Transmembrane Protein 1

KREMEN2: Kringle Containing Transmembrane Protein 2

LRP5: Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5

LRP6: Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 6

LTB: Lymphotoxin Beta

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MDE: Myeloma Defining Event

MDSCs: Myeloid-Derived Suppressor Cells

MGUS: Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance

MIDD: Renal Monoclonal Immunoglobulin Deposition Disease

MMP-9: Matrix Metalloproteinase 9

MR: Minimal Response

MRD: Minimal Residual Disease

MRI: Magnetic Resonance Imaging

NF- κ B: Nuclear Factor kappa B

NGF: Next Generation Flow

NGS: Next Generation Sequencing

NRAS: Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog

NSD2: Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 2

OPG: Osteoprotegerin

OS: Overall Survival

PACT: Protein Activator of the Interferon-induced Protein

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PD : Progressive Disease

PET-CT: Positron Emission Tomography and Computed Tomography

PFS: Progression Free Survival

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase

POEMS: Polyneuropathy Organomegaly Endocrinopathy Myeloma Protein Skin Changes

PR: Partial Response

PTEN: Phosphatase And Tensin Homolog

RANK: Receptor Activator of Nuclear Factor κ B

RANKL: Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL)

RB1: RB Transcriptional Corepressor 1

RISC: RNA Induced Silencing Complex

R-ISS: Revised International Staging System

RNA: Ribonucleic Acid

ROC: Receiver Operating Characteristic

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

RUNX2: RUNX Family Transcription Factor 2

sCR: Stringent Complete Response

SD: Stable Disease

SDF-1: Stromal Cell-Derived Factor 1

SE: Standard Error

SFRP2: Secreted Frizzled Related Protein 2

SLAMF7: Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 7

sMM: Smoldering Multiple Myeloma

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SREs: Skeletal Related Events

TARBP: TAR RNA-binding Protein

TENT5C: Terminal Nucleotidyltransferase 5C

TGFBR1: Transforming Growth Factor Beta Receptor 1

TNFa: Tumor Necrosis Factor alpha

TRAF3: TNF Receptor-Associated Factor 3

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VGPR: Very Good Partial Response

WBLDCT: Whole Body Low Dose Computed Tomography

WBMRI: Whole Body Magnetic Resonance Imaging

ΧΡΟ1: εξορτίνη 1

ΑΠΜ: Ασυμπτωματικό πολλαπλό μύλωμα

ΜΓΑΣ: Μονοκλωνική Γαμμαπάθεια Αδιευκρίνιστης Σημασίας

ΠΜ: Πολλαπλό Μύλωμα

Περίληψη στα ελληνικά

Εισαγωγή: Το πολλαπλό μύελωμα (ΠΜ) είναι η δεύτερη συχνότερη αιματολογική κακοήθεια που προέρχεται από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό κακοήθων πλασματοκυττάρων. Η οστική νόσος του ΠΜ αποτελεί μια συχνή και σοβαρή επιπλοκή. Τα miRNAs είναι μικρά μη κωδικά RNAs που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Τα tRFs (tRNA-derived RNA fragments) αποτελούν μια ομάδα μικρών μη κωδικών RNAs που προέρχονται από τα tRNAs. Στην παρούσα διατριβή μελετάται η κλινική αξία των μορίων αυτών στο ΠΜ, καθώς και ο ρόλος τους ως βιοδείκτες που δύνανται να προβλέψουν την παρουσία οστικής νόσου.

Υλικά και Μέθοδοι: Η παρούσα μελέτη διεξήχθη σε τρία στάδια. Για το πρώτο στάδιο, CD138+ πλασματοκύτταρα απομονώθηκαν από το μυελό των οστών ασθενών με ΠΜ (n=76) και ασυμπτωματικό ΠΜ (n=18). Το ολικό RNA απομονώθηκε και πολυαδενυλιώθηκε *in vitro*. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη χρήση ενός oligo-dT εκκινητή. Για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μελετούμενων tRFs και miRNAs χρησιμοποιήθηκε PCR σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR). Κατά το δεύτερο στάδιο, miRNA-seq πραγματοποιήθηκε στα CD138+ πλασματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ, ασυμπτωματικό ΠΜ και μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (ΜΓΑΣ). 138 ασθενείς υπερλήφθησαν στην κόρρη του ΠΜ και η ποσοτικοποίηση έγινε με RT-qPCR. Στο τρίτο στάδιο, miRNAs απομονώθηκαν από το πλάσμα 62 ασθενών με ΠΜ με ή χωρίς οστική νόσο. Πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA και ποσοτικοποίηση της έκφρασης με RT-qPCR. Τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Αποτελέσματα: Η έκφραση των miR-16-5p (p=0.036), miR-155-5p (p=0.045) και 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} (p = 0.041) ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα CD138+ πλασματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ σε σύγκριση με αυτών με ασυμπτωματικό ΠΜ. Ακόμη, χαμηλότερη έκφραση των miR-15a-5p, miR-16-5p, miR-222-3p, και i-tRF-Gly^{GCC} (p=0.037, p=0.035, p=0.037 και p = 0.047 αντίστοιχα) παρατηρήθηκε στα CD138+ πλασματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ και οστική νόσο συγκριτικά με αυτά ασθενών χωρίς. Τα επίπεδα του miR-125b-5p ήταν υψηλότερα στα πλασματοκύτταρα ασθενών με σκελετικά

συμβάματα (SREs) ($p = 0.005$). Υψηλά επίπεδα των i tRF-Pro^{TGG}, i -tRF-Glu^{CTC}, i -tRF-His^{GTG}, i -tRF-Phe^{GAA}, 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG}, και miR-223-3p είναι ενδεικτικά μεγαλύτερων διαστημάτων ολικής επιβίωσης (OS) συγκριτικά με τα χαμηλότερα επίπεδα αυτών ($p = 0.024, 0.014, 0.003, 0.040, 0.039$, και $p=0.046$ αντίστοιχα). Η υπερέκφραση των i -tRF-Gly^{GCC} και 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} σχετίζεται με μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερης προόδου νόσου επιβίωσης (PFS) μετά την πρώτη γραμμή θεραπείας ($p = 0.016$ και 0.013 αντίστοιχα). Μέσω miRNA-seq βρέθηκε ότι το miR-181a υπερεκφράζεται στο ΠΜ σε σχέση με το ασυμπτωματικό ΠΜ και το ΜΓΑΣ, καθώς και στο R-ISS III σε σχέση με το R-ISS I. Η υπερέκφραση του miR-181a συσχετίζεται με σημαντικά μεγαλύτερο κίνδυνο πρώιμης υποτροπής ($p= 0.001$) και χειρότερη επιβίωση ($p < 0.001$). Πολυπαραγοντικά μοντέλα που ενσωμάτωσαν το miR-181a με καθιερωμένους προγνωστικούς παράγοντες οδήγησαν σε ακριβέστερη σταδιοποίηση κινδύνου και καλύτερη εκτίμηση της πρόγνωσης. Τα επίπεδα στο πλάσμα των let-7b-5p ($p = 0.034$), miR-143-3p ($p = 0.021$), miR-17-5p ($p = 0.025$), miR-214-3p 3p ($p = 0.004$), και miR-335-5p ($p = 0.022$), ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με οστική νόσο. Η ανάλυση ROC και λογιστικής παλινδρόμησης έδειξε ότι τα μόρια αυτά μπορούν να προβλέψουν την παρουσία οστικής νόσου ανεξάρτητα ή ως μεταβλητές ενός πολυπαραγοντικού μοντέλου.

Συμπεράσματα: Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη προτείνει μια «υπογραφή» miRNA και tRF με πιθανή κλινική αξία στο ΠΜ. Επίσης, προτείνεται το miR-181a ως βιοδείκτης που σχετίζεται με δυσμενή έκβαση της νόσου και χειρότερη επιβίωση, ο οποίος είναι ανεξάρτητος των εδραιωμένων παραγόντων κινδύνου και μπορεί να ενισχύσει την προγνωστική τους ικανότητα. Τέλος, η μελέτη μας προτείνει μια υπογραφή κυκλοφορούντων miRNAs που συμβάλλει στη διάγνωση της οστικής νόσου.

Περίληψη στα αγγλικά (Summary)

Background: Multiple myeloma (MM) is the second most common hematologic malignancy arising from the clonal proliferation of malignant plasma cells. Multiple myeloma bone disease (MMBD) constitutes a common and severe complication of MM. miRNAs are small non-coding RNAs that participate in the post-transcriptional regulation of gene expression. tRNA-derived RNA fragments (tRFs) constitute a class of small non-coding RNAs, deriving from tRNAs. Herein, we have studied the clinical utility of miRNAs and tRFs in improving patients' risk stratification and prognosis, as well as their role as biomarkers able to predict the presence of MMBD.

Materials and Methods: The study was conducted in three stages. For the first stage, CD138+ plasma cells were selected from bone marrow aspirates from MM (n=76) and smoldering MM (sMM) patients (n=18). Total RNA was extracted and in vitro polyadenylated. First-strand cDNA synthesis was performed, using an oligo-dT-adaptor primer. For the relative quantification of the investigated miRNAs and tRFs, an in-house real-time quantitative PCR (qPCR) assay was developed. During the second stage, miRNA-seq was performed in CD138+ plasma cells of MM, sMM, and monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) patients. The MM cohort consisted of 138 patients. Quantification was performed by RT-qPCR. Regarding the third stage, miRNAs were isolated from the plasma of 62 MM patients with or without MMBD. First-strand cDNA was synthesized, and relative quantification was performed using qPCR. Lastly, we carried out extensive biostatistical analysis.

Results: miR-16-5p (p=0.036), miR-155-5p (p=0.045) and 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} (p = 0.041) expression was significantly lower in the CD138+ plasma cells of MM patients compared to sMM patients. Furthermore, lower levels of miR-15a-5p, miR-16-5p, miR-222-3p, and i-tRF-Gly^{GCC} (p=0.037, p=0.035, p=0.037 and p = 0.047 respectively) were observed in the CD138+ plasma cells of MM patients with MMBD, compared to those without. miR-125b-5p levels were higher in the CD138+ plasma cells of MM patients presenting with skeletal-related events (SREs) (p = 0.005). Our results showed that elevated levels of i-tRF-Pro^{TGG}, i-tRF-Glu^{CTC}, i-tRF-His^{GTG}, i-tRF-Phe^{GAA}, 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG},

and miR-223-3p are indicators of prolonged overall survival (OS) compared to lower levels of these molecules ($p = 0.024, 0.014, 0.003, 0.040, 0.039,$ and $p=0.046$ respectively). i-tRF-Gly^{GCC} and 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} overexpression is associated with significantly longer progression-free survival intervals (PFS) regarding first-line treatment ($p = 0.016$ and 0.013 respectively). miRNA-seq highlighted miR-181a to be upregulated in MM vs. sMM/MGUS, and R-ISS III vs. I patients. miR-181a overexpression was associated with significantly higher risk for short-term progression ($p= 0.001$) and worse survival ($p < 0.001$). Multivariate models integrating miR-181a with disease established markers led to superior risk stratification and clinical benefit for MM prognosis. Circulating levels of let-7b-5p ($p = 0.034$), miR-143-3p ($p = 0.021$), miR-17-5p ($p = 0.025$), miR-214-3p 3p ($p = 0.004$), and miR-335-5p ($p = 0.022$), were significantly higher in the plasma of MM patients with MMBD compared to those without. Receiver operating characteristic curve and logistic regression analyses showed that these miRNAs could accurately predict MMBD, either standalone or in a multi-miRNA-based logistic regression model.

Conclusions: In conclusion, we propose a miRNA and tRF signature with putative clinical utility in MM. We also propose miR-181a as a biomarker strongly correlated with inferior disease outcome and survival, which is independent of the established prognostic biomarkers and can enhance their prognostic ability. Lastly, our study proposes a circulating miRNA signature to facilitate MMBD diagnosis.

Περιεχόμενα

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	28
1. Το πολλαπλό μύελωμα (ΠΜ).....	29
1.1 Επιδημιολογία.....	29
1.2 Αιτιολογία του ΠΜ.....	29
1.3 Παθοφυσιολογία του ΠΜ.....	30
1.3.1 Χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις.....	31
1.3.2 Υπερδιπλοειδία.....	33
1.3.3 Δευτερεύουσες χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις και μεταβολές του αριθμού των αντιγράφων.....	33
1.3.4 Επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις.....	35
1.3.5 Ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών.....	36
1.3.6 Παθοφυσιολογία της οστικής νόσου του ΠΜ.....	38
1.4 Κλινικές εκδηλώσεις του ΠΜ.....	41
1.5 Διάγνωση του ΠΜ – Νέα διαγνωστικά κριτήρια.....	43
1.6 Σταδιοποίηση και εκτίμηση κινδύνου στο ΠΜ.....	48
1.7 Προσδιορισμός της ανταπόκρισης στη θεραπεία και παρακολούθηση ασθενών με ΠΜ.....	50
1.8 Θεραπεία του ΠΜ.....	57
1.8.1 Κατηγορίες φαρμάκων που έχουν ένδειξη για τη θεραπεία του ΠΜ.....	57
i. Κλασικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα.....	57
ii. Κορτικοστεροειδή.....	58

iii.Ανοσοτροποποιητικά φάρμακα (IMiDs).....	58
iv.Αναστολείς πρωτεασώματος	60
v. Μονοκλωνικά αντισώματα.....	62
vi.Αναστολείς ιστονικών αποακετυλασών.....	63
vii.Αναστολέας της εξπορτίνης.....	64
viii.Φάρμακα συζευγμένα με αντισώματα.....	64
ix. CAR T-cells (Chimeric Antigen Receptor T-cells).....	65
1.8.2 Ασυμπτωματικό ΠΜ.....	66
1.8.3 Νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς που πληρούν τα κριτήρια για αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.....	66
1.8.4 Ηλικιωμένοι ασθενείς ή ασθενείς με νεοδιαγνωσθέν ΠΜ που δεν πληρούν τα κριτήρια για αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων..	69
1.8.5 Θεραπεία ασθενών με υποτροπιάζον και ανθεκτικό ΠΜ.....	70
1.9 Τα μη κωδικά RNAs.....	71
1.10 Τα miRNAs.....	72
1.10.1 Βιογένεση των miRNAs.....	73
1.10.2 Λειτουργία και μηχανισμός δράσης των miRNAs.....	74
1.10.3 Ο ρόλος των miRNAs στις ανθρώπινες νεοπλασίες.....	77
1.11 Τα tRFs.....	78
1.11.1 Τα μεταφορικά RNAs (tRNAs).....	78
1.11.2 Βιογένεση θραυσμάτων των tRNA (tRNA fragments; tRFs).....	79
1.11.3 Ρόλος των tRFs.....	80
1.11.4 tRFs και κακοήθειες.....	81

1.12 MiRNAs και tRFs στο ΠΜ.....	82
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	85
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	86
2.1 Σκοπός και σχεδιασμός της μελέτης.....	86
2.2 Ασθενείς και βιολογικό υλικό.....	89
2.3 Επεξεργασία δειγμάτων μυελού των οστών.....	89
2.3.1 Τεχνική Ficoll-Paque (φυγοκέντρηση βαθμίδωσης).....	89
2.3.2 Επιλογή των CD138+ πλασματοκυττάρων.....	91
2.3.3 Απομόνωση ολικού RNA από τα CD138+ κύτταρα.....	92
2.3.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ολικού απομονωμένου RNA με τη χρήση φθορισμόμετρου.....	93
2.3.5 In vitro πολυαδενυλίωση.....	94
2.3.6 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με αντίστροφη μεταγραφή του RNA (reverse transcription, RT).....	94
2.3.6.1 Αρχή της μεθόδου.....	94
2.3.6.2 Συνθήκες αντίστροφης μεταγραφής για τη σύνθεση cDNA.....	95
2.3.7 Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Real-Time qPCR).....	97
2.3.7.1 Αρχή της μεθόδου.....	97
2.3.7.2 Συνθήκες PCR πραγματικού χρόνου για την ενίσχυση των μελετούμενων μικρών μη κωδικών RNA και των γονιδίων αναφοράς.....	100
2.3.7.3 Ανάλυση και ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της PCR σε πραγματικό χρόνο.....	103
2.4 Επεξεργασία δειγμάτων περιφερικού αίματος.....	104

2.4.1 Απομόνωση miRNAs από πλάσμα περιφερικού αίματος.....	105
2.4.2 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με αντίστροφη μεταγραφή του RNA (reverse transcription, RT).....	106
2.4.3 Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Real-Time qPCR).....	107
2.5 miRNA sequencing.....	108
2.6 Στατιστική ανάλυση.....	109
3. Αποτελέσματα.....	111
3.1 Μελέτη έκφρασης μικρών μη κωδικών RNA στα CD138+ κύτταρα ασθενών με ΠΜ.....	111
3.1.1 MiRNAs και tRFs των οποίων η έκφραση διαφέρει μεταξύ των CD138+ κυττάρων ασθενών με ΠΜ και ασυμπτωματικό ΠΜ.....	113
3.1.2 MiRNAs και tRFs των οποίων η έκφραση σχετίζεται με χαρακτηριστικά που αφορούν την οστική νόσο του πολλαπλού μυελώματος.....	115
3.1.3 MiRNAs και tRFs των οποίων η έκφραση στα CD138+ κύτταρα ασθενών με ΠΜ έχει προγνωστική αξία.....	118
3.2 Μελέτη miRNA-seq για την έκφραση miRNA στα CD138+ κύτταρα του μυελού ασθενών με πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες.....	125
3.2.1 Χρήση miRNA sequencing για τον προσδιορισμό του προφίλ έκφρασης miRNA στα CD138+ κύτταρα του μυελού των οστών ασθενών με πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες.....	128
3.2.2 Η υπερέκφραση του miR-181a στα CD138+ κύτταρα του μυελού ασθενών με ΠΜ σχετίζεται με βραχύ διάστημα μέχρι την υποτροπή μετά την πρώτης γραμμής θεραπεία και με δυσμενή αποτελέσματα ως προς την επιβίωση.....	131

3.2.3. Η υπερέκφραση του miR-181a ενισχύει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό την προγνωστική ικανότητα των κλινικά εδραιωμένων προγνωστικών δεικτών για το ΠΜ όταν συνδυαστεί με αυτούς.....	136
3.3 Μελέτη κυκλοφορούντων miRNA βιοδεικτών με κλινική-διαγνωστική και προγνωστική αξία στην οστική νόσο του ΠΜ.....	139
3.3.1 Κυκλοφορούντα miRNAs που μπορούν να διακρίνουν ασθενείς με οστική νόσο του ΠΜ από αυτούς χωρίς.....	141
3.3.2 Δημιουργία και αξιολόγηση ενός προβλεπτικού μοντέλου για την οστική νόσο του ΠΜ βασιζόμενου στα κυκλοφορούντα miRNAs.....	145
3.3.3 Αξιολόγηση της προγνωστικής αξίας των κυκλοφορούντων miRNA που μελετήθηκαν.....	148
4. Συζήτηση.....	152
Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	166

Α.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Το πολλαπλό μύελωμα

1.1 Επιδημιολογία

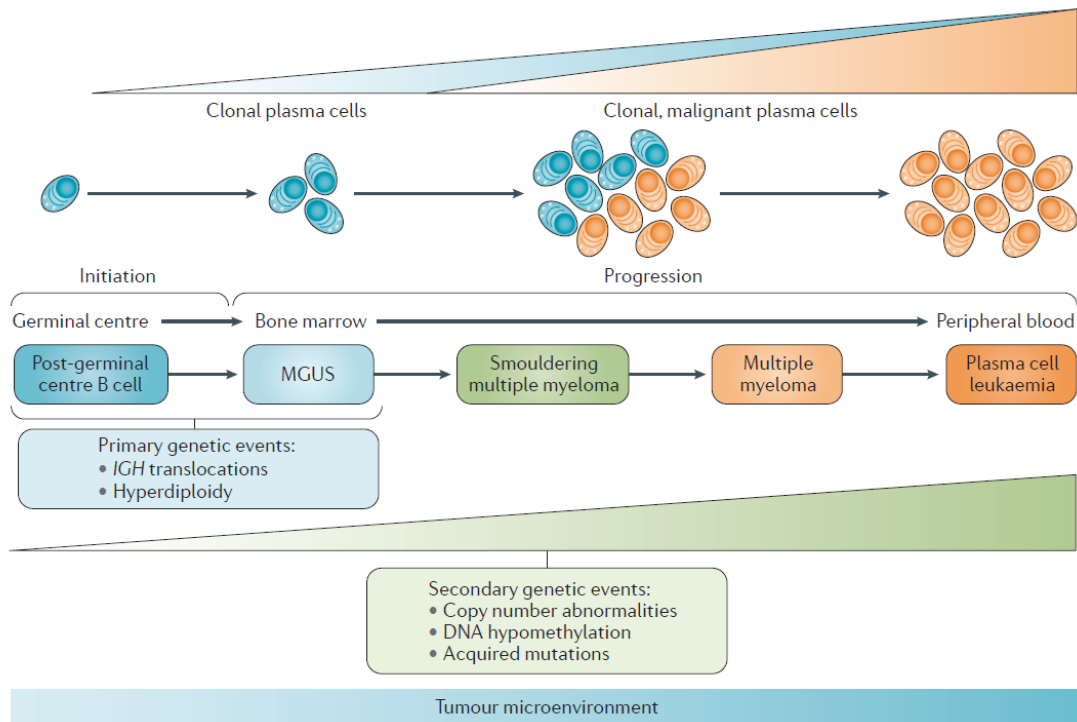
Το πολλαπλό μύελωμα (ΠΜ) αντιστοιχεί στο 1% του συνόλου των κακοηθειών και αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη αιματολογική κακοήθεια στον αναπτυγμένο κόσμο. Η επίπτωση του ΠΜ στο δυτικό κόσμο είναι 4,5-6/100000 ετησίως. Είναι δε μεγαλύτερη στην Ευρώπη, τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και την Αυστραλία σε σχέση με την Ασία και την υποσαχάρια Αφρική, γεγονός που αποδίδεται κυρίως στη διαφορετική διαθεσιμότητα διαγνωστικών μέσων. (1) Πρόκειται για νόσο της τρίτης ηλικίας, με διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση τα 69-70 χρόνια. (2) Επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν αυξημένη επίπτωση της νόσου στους Έγχρωμους συγκριτικά με τους Καυκάσιους, και μειωμένη σε Ασιάτες και Ισπανούς. (3, 4) Τα τελευταία χρόνια έχει διαπιστωθεί αύξηση στον επιπολασμό του ΠΜ, η οποία οφείλεται τόσο στη βελτίωση των διαγνωστικών μέσων που κάνουν πιο εύκολη τη διάγνωση της νόσου, όσο και στη βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών ως αποτέλεσμα της ραγδαίας εξέλιξης στις θεραπευτικές επιλογές της νόσου. (5)

1.2 Αιτιολογία του ΠΜ

Η αιτιολογία της νόσου δεν είναι γνωστή. Μελέτες έχουν συσχετίσει περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισής της. Σύμφωνα με μια πρόσφατη ανασκόπηση αναφορικά με την επαγγελματική έκθεση, διαπιστώθηκε αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης ΠΜ για τους πυροσβέστες, τις κομμώτριες και τους εργαζόμενους που εκτίθενται σε αναθυμιάσεις εξατμίσεων. Στην παρούσα ανασκόπηση δε διαπιστώθηκε αυξημένος κίνδυνος για ανθρώπους που ασχολούνται με γεωργικές εργασίες, όπως είχε αναφερθεί στο παρελθόν. (6, 7) Γενετικοί παράγοντες φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου, καθώς μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS) ανακάλυψαν συγκεκριμένους γενετικούς τόπους, καθώς και μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΠΜ. (8)

1.3 Παθοφυσιολογία του πολλαπλού μυελώματος

Το ΠΜ ανήκει σε ένα φάσμα διαταραχών, οι οποίες είναι γνωστές ως μονοκλωνικές γαμμαπάθειες, και εξελίσσεται, μέσω μιας πολυεπίπεδης διαδικασίας, ξεκινώντας από τις πρόδρομες ασυμπτωματικές μορφές του, τη μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (ΜΓΑΣ, Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance; MGUS) και το ασυμπτωματικό ΠΜ (ΑΠΜ, smoldering Multiple Myeloma; sMM). (9, 10) Η γενετική αστάθεια με τη μορφή χρωμοσωμικών διαμεταθέσεων, αλλαγής του αριθμού των χρωμοσωμάτων και σωματικών μεταλλάξεων, καθώς και η αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον του όγκου, αποτελούν τη βάση της παθογένεσης της νόσου. Τα εναρκτήρια γενετικά συμβάντα που μπορούν να οδηγήσουν στην εξέλιξη του ΠΜ μπορούν αδρά να διακριθούν σε διαμεταθέσεις που αφορούν το γονίδιο της βαριάς αλυσού των ανοσοσφαιρινών (IgH) και στην υπερδιπλοειδία. Τα γενετικά αυτά συμβάντα φαίνεται όμως πως δεν είναι αρκετά για την εξέλιξη σε συμπτωματική νόσο, καθώς εμφανίζονται ήδη από το στάδιο της ΜΓΑΣ. (11) Τα δευτερεύοντα γενετικά συμβάντα που σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου σε συμπτωματική μορφή περιλαμβάνουν μεταβολές στον αριθμό των αντιγράφων χρωμοσωμάτων, σωματικές μεταλλάξεις και επιγενετικές τροποποιήσεις και συσσωρεύονται καθώς προχωρούμε από τις πρόδρομες ασυμπτωματικές μορφές στο ΠΜ (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Η εξέλιξη των μονοκλωνικών γαμμαπαθειών. Το πολλαπλό μύλωμα (ΠΜ) εξελίσσεται σε διαδοχικά στάδια ξεκινώντας από τις πρόδρομες ασυμπτωματικές μορφές του, τη μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (ΜΓΑΣ) και το ασυμπτωματικό ΠΜ (ΑΠΜ). Τα εναρκτήρια γενετικά συμβάντα για την ανάπτυξη των ΜΓΑΣ, ΑΠΜ και κατ'επέκταση του ΠΜ είναι οι διαμεταθέσεις που αφορούν το γονίδιο της βαριάς αλυσού των ανοσοσφαιρινών (IgH) και η υπερδιπλοειδία. Τα δευτερεύοντα γενετικά συμβάντα αθροίζονται με την εξέλιξη της νόσου από στάδιο σε στάδιο και περιλαμβάνουν μεταβολές στον αριθμό των αντιγράφων χρωμοσωμάτων, σωματικές μεταλλάξεις και επιγενετικές τροποποιήσεις. *Εικόνα από Kumar et al. 2017 (12)*

1.3.1 Χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις

Τα πλασματοκύτταρα είναι τελικώς διαφοροποιημένα Β-λεμφοκύτταρα. Προέρχονται από το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο και ωριμάζουν μέσω μιας σύνθετης και πολυεπίπεδης διαδικασίας που λαμβάνει χώρα στο μυελό των οστών και τα δευτερογενή λεμφικά όργανα (π.χ. λεμφαδένες, σπλήνας) σε Β-λεμφοκύτταρα και τελικώς σε πλασματοκύτταρα. Το γονίδιο των βαρέων αλύσεων των ανοσοσφαιρινών βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14. Στα αρχέγονα κύτταρα, στο γονίδιο της βαριάς αλυσού υπάρχουν διακριτές περιοχές γνωστές ως V (μεταβλητή περιοχή),

D (περιοχή ετερογένειας), J (συνδετική περιοχή) και C (σταθερή περιοχή). Στο μυελό των οστών, κατά τα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης των B-κυττάρων, και με σκοπό τη δημιουργία ετερογένειας ως προς τη διαθέσιμη φαρέτρα ανοσοσφαιρινών στον οργανισμό, πραγματοποιούνται V(D)J αναδιατάξεις. Αρχικά, ένα από τα τμήματα D του γονιδίου των ανοσοσφαιρινών συνδέεται με ένα τμήμα J και ένα C. Εν συνεχεία, ένα τμήμα V συνδέεται με ένα τμήμα D και τα αντίστοιχα τμήματα J και C με τα οποία είναι συνδεδεμένο. (13) Ακολούθως, τα B-κύτταρα μεταναστεύουν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, όπου υποβάλλονται σε μια σειρά διεργασιών, όπως η σωματική υπερμετάλλαξη ή η μετάπτωση τάξης, με σκοπό την παραγωγή αντισωμάτων με τη βέλτιστη συγγένεια προς ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. (14) Και οι δύο διεργασίες επάγουν τη θραύση του δίκλωνου DNA στον γενετικό τόπο των βαρέων αλύσεων. Αυτή η διεργασία υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο, εντούτοις κατά τη διάσπαση του δίκλωνου DNA μπορεί να προκύψει σύνδεση αυτού με άλλο διεσπασμένο τμήμα DNA, σε άλλη περιοχή του γονιδιώματος, οδηγώντας σε μια μη φυσιολογική σύνδεση. Πολλά από τα κύτταρα που προκύπτουν σε αυτές τις περιπτώσεις αποπίπτουν ως αποτέλεσμα μίας χρωμοσωμικής αναδιάταξης χωρίς σημασία. Παρ' όλα αυτά, μια αντίστοιχη διαμετάθεση, η οποία περιλαμβάνει ένα ογκογονίδιο, θα προσδώσει πλεονέκτημα επιβίωσης στο συγκεκριμένο κύτταρο οδηγώντας πιθανά στην εμφάνιση μιας εκ των πρόδρομων μορφών του ΠΜ. (15) Η πλειοψηφία των χρωμοσωμικών διαμεταθέσεων στο γονίδιο της βαριάς αλύσου συμβαίνει κατά τη διαδικασία της μετάπτωσης τάξης κατά την ωρίμανση των πλαματοκυττάρων, αλλά διαμεταθέσεις μπορούν να συμβούν σε οποιοδήποτε στάδιο της εξέλιξης των B-κυττάρων. (16)

Η πιο συχνή χρωμοσωμική διαμετάθεση είναι η t(11;14) που συμβαίνει μεταξύ του χρωμοσώματος 11q13 και του 14q32. Συναντάται στο 15-20 % ασθενών με ΠΜ και το αποτέλεσμά της είναι η υπερέκφραση του γονιδίου CCND1, του οποίου το προϊόν είναι η κυκλίνη D1, μόριο που σχετίζεται με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. (11) Ως προς την πρόγνωση, η διαμετάθεση αυτή θεωρείται εν γένει ουδέτερη, αν και η προγνωστική της αξία αποτελεί αντικείμενο αντιπαράθεσης. (17, 18) Η διαμετάθεση t(4;14) βρίσκεται στο 11% των ασθενών με ΠΜ και έχει ως αποτέλεσμα εναπόθεση των γονιδίων NSD2 και FGFR3, τα οποία βρίσκονται στο χρωμόσωμα 4, δίπλα στους

ενισχυτές του γονιδίου IgH, οδηγώντας σε υπερέκφραση αυτών. Το γονίδιο NSD2 που σχετίζεται με επιγενετική ρύθμιση μέσω τροποποίησης των ιστονών υπερεκφράζεται στο 100% των περιπτώσεων που φέρουν την εν λόγω διαμετάθεση, ενώ το FGFR3, το οποίο αποτελεί υποδοχέα τυροσινικής κινάσης, υπερεκφράζεται στο 75% αυτών. (19, 20) Η διαμετάθεση t(4;14) αποτελεί κυτταρογενετική ανωμαλία υψηλού ρίσκου και σχετίζεται με κακή έκβαση τόσο σε επίπεδο επιβίωσης ελεύθερης προόδου νόσου, όσο και συνολικής επιβίωσης. (21) Σπανιότερες διαμεταθέσεις που αφορούν το γονίδιο IgH και σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση είναι οι t(14;16) και t(14;20), παρούσες στο 3% και 1.5% των ασθενών με ΠΜ αντίστοιχα. Οι διαμεταθέσεις αυτές επηρεάζουν το πρωτοογκογονίδιο MAF και το ογκογονίδιο MAFB αντίστοιχα, τα οποία οδηγούν σε υπερέκφραση του γονιδίου της κυκλίνης D2 με αποτέλεσμα την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. (20, 21) Σπανιότερες διαμεταθέσεις του γονιδίου IgH είναι η t(6;14) και t(12;14), που οδηγούν σε υπερέκφραση των γονιδίων CCND3 και CCND2 επηρεάζοντας την προαγωγή του κυτταρικού κύκλου. (20)

1.3.2 Υπερδιπλοειδία

Η υπερδιπλοειδία είναι η συνηθέστερη μορφή ανευπλοειδίας στο ΠΜ. Οι ασθενείς με υπερδιπλοειδία εμφανίζουν συνήθως τρισωμίες σε κάποια από τα χρωμοσώματα 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21 και αριθμό χρωμοσωμάτων μεταξύ 48 και 75. Φαίνεται ότι οι ασθενείς με υπερδιπλοειδία έχουν καλύτερη πρόγνωση από τους ασθενείς που εμφανίζουν χρωμοσωμική διαμετάθεση ως πρωτεύον γενετικό συμβάν. (20) Η επικρατούσα θεωρία πίσω από την υπερδιπλοειδία στο ΠΜ είναι ότι το σύνολο των επιπλέον χρωμοσωμάτων αποκτάται κατά τη διάρκεια μιας αποτυχημένης μίτωσης και όχι ως αποτέλεσμα πολλαπλών διαδοχικών αυξήσεων στον αριθμό των χρωμοσωμάτων. (11) Αναφορικά με την πρόγνωση, οι τρισωμίες 3 και 5 σχετίζονται με καλή πρόγνωση, ενώ η τρισωμία 21 σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση. (22)

1.3.3 Δευτερεύουσες χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις και μεταβολές του αριθμού των αντιγράφων

Στο ΠΜ συχνά παρατηρούνται μεταβολές στον αριθμό των αντιγράφων των χρωμοσωμάτων που οδηγούν σε απώλεια γενετικών τόπων ή σε απόκτηση επιπλέον αντιγράφων συγκεκριμένων γενετικών τόπων.

Ο διπλασιασμός του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 1 [gain(1q)] είναι μια γενετική ανωμαλία που διαπιστώνεται στο 40% περίπου των ασθενών με ΠΜ και σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση, ενώ παρατηρείται συχνότερα στην υποτροπή. Έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της έκφρασης μιας γενετικής περιοχής που περιέχει ογκογονίδια όπως το CKS1B, του οποίου το προϊόν είναι μια πρωτεΐνη που συνδέεται στην καταλυτική περιοχή των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών και ρυθμίζει με τον τρόπο αυτό τον κυτταρικό κύκλο. (20, 23)

Η διαγραφή του βραχέος άξονα του χρωμοσώματος 1 [del(1p)] παρατηρείται στο 30% των ασθενών με ΠΜ και αποτελεί κυτταρογενετική αλλοίωση σχετιζόμενη με δυσμενή πρόγνωση. Ειδικότερα, η διαγραφή αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη διαγραφή ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως τα TERT5C, CDKN2C και FAF1, τα οποία εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την προαγωγή της απόπτωσης. (20, 24) Το γονίδιο p53 εδράζεται στο χρωμόσωμα 17p13 και είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο με εδραιωμένο ρόλο στην ογκογένεση. Η διαγραφή λοιπόν του βραχέος άξονα του χρωμοσώματος 17 [del(17p)] είναι μια από τις σημαντικότερες κυτταρογενετικές βλάβες στο ΠΜ σχετιζόμενη με κακή πρόγνωση. Η εν λόγω αλλοίωση συναντάται στο 10% των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών, ενώ η συχνότητα εμφάνισής της σε μεταγενέστερα στάδια της νόσου φτάνει το 80%. (11) Συχνά παρατηρείται απώλεια και των δύο αλληλίων του γονιδίου ή μετάλλαξη στο εναπομείναν αλληλίο, εύρημα σχετιζόμενο με δυσμενή έκβαση της νόσου. (25) Αναφορικά με τις δευτερογενείς διαμεταθέσεις, η διαμετάθεση t(8;14) διαπιστώνεται σε αυξημένη συχνότητα στην υποτροπή και επάγει την υπερέκφραση του MYC. (16) Έχει διαπιστωθεί συχνά συνύπαρξη της διαμετάθεσης αυτή με τη διαγραφή του 17p και σχετίζεται με την εμφάνιση ανθεκτικής νόσου και την εξέλιξη σε πλασμαβλαστική λευχαιμία. (26) Η διαγραφή του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 13 [del(13q)] παρατηρείται στις μισές περίπου περιπτώσεις ασθενών με μυέλωμα, και ενώ στο παρελθόν θεωρούταν ενδεικτική κακής πρόγνωσης, πλέον αυτό αμφισβητείται λόγω της συχνής συνύπαρξής της με τη διαμετάθεση t(4;14), η οποία αποτελεί δυσμενή κυτταρογενετική αλλοίωση στο ΠΜ. (24) Η del(13q) σχετίζεται με διαγραφή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων RB1 και DIS3. (11, 23)

1.3.4 Επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις

Τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) αποδεικνύουν την απουσία μιας καθολικής οδηγού μετάλλαξης στο ΠΜ, και την παρουσία υποκλώνων με συχνά αλληλοεπικαλυπτόμενες μεταλλάξεις. (16) Όπως ήδη έχει αναφερθεί παραπάνω, οι χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις είναι αναγκαίες, αλλά συχνά όχι επαρκείς για την εξέλιξη του πολλαπλού μυελώματος. Οι διαμεταθέσεις είναι παρούσες στις πρόδρομες μορφές της νόσου, αλλά το συμπτωματικό ΠΜ χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερο φορτίο μεταλλάξεων που εμφανίζεται σε κλωνικό και υποκλωνικό επίπεδο. (27) Το πρότυπο εξέλιξης της νόσου είναι κλωνικό, με την πρόοδο της νόσου να οδηγείται από την παράλληλη εξέλιξη διαφορετικών υποκλώνων. (28)

Αναφορικά με τις σωματικές μεταλλάξεις στο ΠΜ, παρά την απουσία μια οδηγού μετάλλαξης, υπάρχουν ορισμένες συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια MAPK και NF-κβ, στην επιδιόρθωση του DNA και τον κυτταρικό κύκλο. Περίπου 50% των ασθενών με ΠΜ εμφανίζουν μετάλλαξη σε κάποιο γονίδιο που εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK. Ειδικότερα, μετάλλαξη στα ογκογονίδια KRAS και NRAS διαπιστώνεται σε περίπου 21.2% και 19.4% των ασθενών αντίστοιχα, ενώ στο BRAF που επίσης εμπλέκεται στο εν λόγω σηματοδοτικό μονοπάτι στο 6.7%. Οι μεταλλάξεις στο KRAS και στο NRAS είναι στην πλειονότητα των περιπτώσεων αμοιβαία αποκλειόμενες. Η μέση κλωνική συχνότητα αυτών των μεταλλάξεων αντιστοιχεί περίπου σε 30%, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για δευτερεύοντα γενετικά συμβάντα σχετιζόμενα με την πρόοδο της νόσου. (16) Μεταλλάξεις διαπιστώθηκαν σε 27 γονίδια που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι NF-κβ, το οποίο κατέχει κύριο ρόλο στις αιματολογικές κακοήθειες που προέρχονται από τα Β-λεμφοκύτταρα και αντιστοιχούν στο 17% των περιπτώσεων. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε ενεργοποίηση του μονοπατιού, και στα γονίδια αυτά περιλαμβάνονται τα TRAF3, CYLD, LTB, IRF4 και άλλα. (16) Σωματικές μεταλλάξεις που αφορούν γονίδια που εμπλέκονται στο μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA παρατηρούνται επίσης στο ΠΜ. Παραλλαγές στο p53 με τη μορφή είτε μεταλλάξεων, είτε διαγραφής του αλληλίου διαπιστώθηκαν στο 11% των ασθενών με ΠΜ, ενώ ακόμη μεταλλάξεις ή διαγραφή διαπιστώθηκαν και στα γονίδια ATM και ATR, τα οποία επίσης εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA. (16)

Επιπλέον, μεταλλάξεις παρατηρούνται σε γονίδια που σχετίζονται με τη γονιδιακή έκφραση (επεξεργασία RNA και μετάφραση), όπως το TENT5C και το DIS3 στο 10% των περιπτώσεων. (16, 27) Τέλος, αδρανοποιητικές μεταλλάξεις ή διαγραφές γονιδίων όπως τα CDKN2C, CDKN2A και RB1, που αποτελούν γονίδια με ανασταλτικό ρόλο στην προαγωγή του κυτταρικού κύκλου διαπιστώνονται στο ΠΜ. (25)

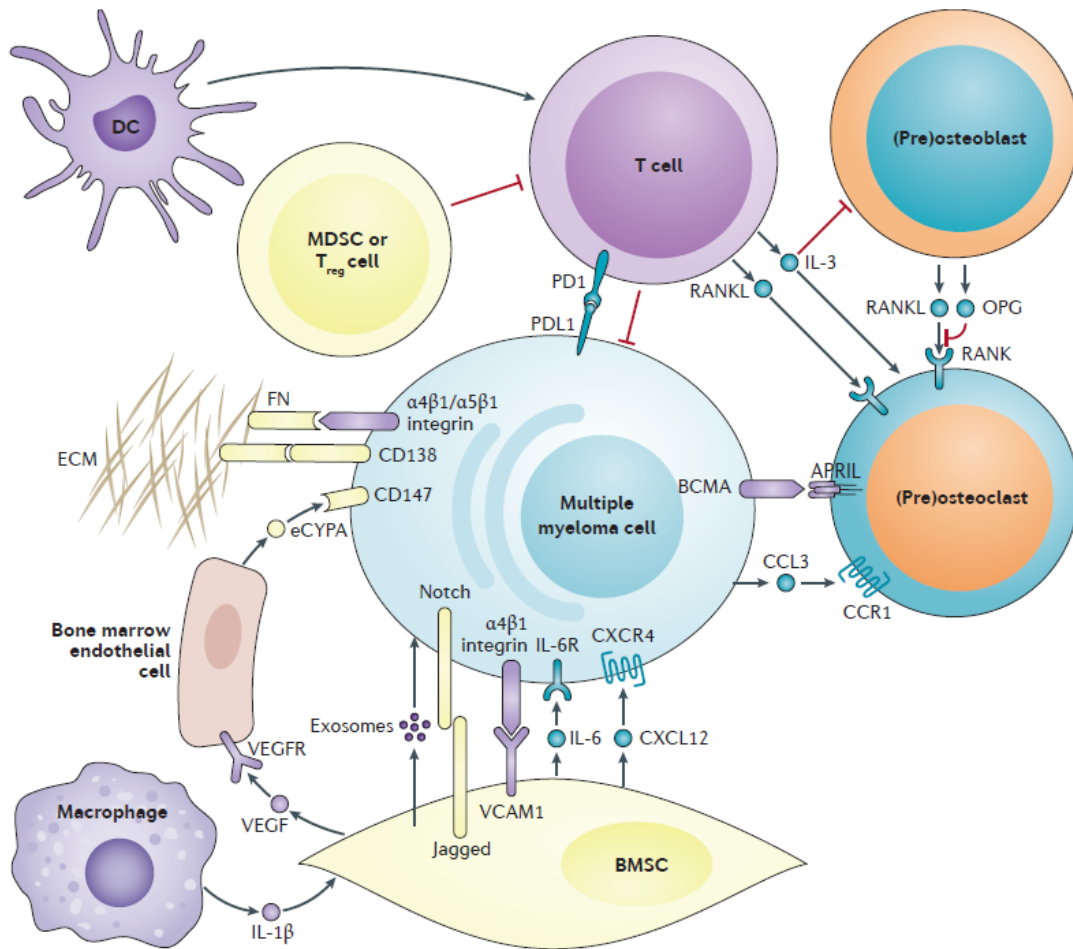
1.3.5 Ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών

Η αλληλεπίδραση μεταξύ κακοήθων πλασματοκυττάρων και μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην παθογένεση, τη θεραπεία και την υποτροπή στο ΠΜ. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να είναι αποτέλεσμα άμεσης διακυτταρικής επικοινωνίας μέσω μορίων προσκόλλησης, ή έκκρισης σηματοδοτικών μορίων όπως κυτταροκίνες ή εξωσώματα (Εικόνα 2). Ο μυελός των οστών απαρτίζεται από ένα κυτταρικό στοιχείο αποτελούμενο από αιμοποιητικά (B-κύτταρα, T-κύτταρα, κύτταρα φυσικοί φονείς, κύτταρα της μυελικής σειράς, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα) και μη αιμοποιητικά κύτταρα (μεσεγχυματικά αρχέγονα κύτταρα, ινοβλάστες, λιποκύτταρα, οστεοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα) και ένα ακυτταρικό στοιχείο αποτελούμενο από την εξωκυττάρια ουσία και διαλυτά στοιχεία, όπως κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες και άλλα διαλυτά μόρια. (29)

Στο ΠΜ, τα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών έχουν κυρίως ανοσοκατασταλτική δράση, βοηθώντας τα μυελωματικά κύτταρα να διαφύγουν του ανοσοποιητικού συστήματος και παράλληλα υποστηρίζουν με διάφορους μηχανισμούς την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. (30) Τα κατασταλτικά κύτταρα της μυελικής σειράς (Myeloid-derived suppressor cells; MDSCs) ασκούν την ανοσοκατασταλτική τους δράση εμποδίζοντας την T-κυτταρική απάντηση και επιτρέπουν έτσι στα μυελωματικά κύτταρα να διαφύγουν του ανοσοποιητικού συστήματος.(31) Ακόμη, τα κύτταρα αυτά προάγουν την αγγειογένεση παράγοντας MMP-9, ενώ τέλος παίζουν ρόλο στην οστεοκλαστογένεση μιας και αποτελούν πρόδρομες μορφές των οστεοκλαστών. (32, 33). Τα T-ρυθμιστικά κύτταρα είναι CD4+ T-κύτταρα που χαρακτηρίζονται από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FOXP3. Στο ΠΜ, όπως και τα MDSCs, τα T-ρυθμιστικά κύτταρα καταστέλλουν την αποτελεσματική αντίδραση του ανοσοποιητικού εναντίον των μυελωματικών

κυττάρων, παρεμποδίζοντας τη λειτουργία των αντιγονοπαρουσιαστικών και των T-κυττάρων τελεστών είτε με διακυτταρική επαφή ή με έκκριση κυτταροκινών. (34) Επιπροσθέτως, τα δενδριτικά κύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς έχει δειχθεί ότι έχουν ελλιπή δράση στο ΠΜ προάγοντας περαιτέρω των κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κακοήθων κυττάρων. (33) Τα μακροφάγα τέλος, εκκρίνουν μια πληθώρα προαγγειογενετικών κυτταροκινών, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF), οι ιντερλευκίνες IL-8, IL-1b, IL-10 και IL-6, και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNFα). Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την προαγωγή της αγγειογένεσης και τον πολλαπλασιασμό των μυελωματικών κυττάρων. (33)

Τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών συνδέονται στενά με τα πλασματοκύτταρα μέσω μιας σειράς συνδετικών μορίων, όπως το μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης 1 (ICAM-1) και το μόριο αγγειακής κυτταρικής προσκόλλησης 1 (VCAM-1). Η σύνδεση αυτή πυροδοτεί τη σηματοδότηση μέσω μιας σειράς κυτταρικών μονοπατιών όπως τα RAS/MAPK, NFκB, και PI3K στα πλασματοκύτταρα, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό τους και την αντοχή στη χορηγούμενη θεραπεία. (30) Ακόμη, τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών εκκρίνουν κυτταροκίνες όπως η IL-6, η οποία αποτελεί μόριο κλειδί στο ΠΜ, καθώς προάγει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των πλασματοκυττάρων. Τα πλασματοκύτταρα από την πλευρά τους εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες, όπως ο VEGF και ο FGF, που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των στρωματικών κυττάρων δημιουργώντας έτσι ένα ανατροφοδοτούμενο κύκλο σημαντικό για την εξέλιξη του ΠΜ. (33) Επιπλέον, τα στρωματικά κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν τον προερχόμενο από τα στρωματικά κύτταρα παράγοντα 1 (SDF-1) που ανήκει στον άξονα του CXCR4 και είναι σημαντικός για τις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών καθώς και για τη διασπορά των μυελωματικών κυττάρων διαμέσου του μυελού των οστών, αλλά και σε εξωμυελικές εστίες. (30) Τέλος, τα στρωματικά κύτταρα εκκρίνουν εξωσώματα με miRNA και πρωτεΐνες που προσλαμβάνονται από τα πλασματοκύτταρα και επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων και τον πολλαπλασιασμό τους. (33)



Εικόνα 2: Κεντρική θέση στην παθοφυσιολογία του πολλαπλού μυελώματος (ΠΜ) κατέχει το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Η αλληλεπίδραση μεταξύ κακοήθων πλασματοκυττάρων και μικροπεριβάλλοντος μπορεί να είναι αποτέλεσμα άμεσης διακυτταρικής επικοινωνίας μέσω μορίων προσκόλλησης, αλλά μπορεί να είναι και αποτέλεσμα έκκρισης ουσιών όπως κυτταροκίνες ή εξωσώματα και είναι θεμελιώδης στην παθογένεση, αλλά και την εμφάνιση αντοχής στη θεραπεία. *Εικόνα από Kumar et al. 2017 (12)*

1.3.6 Παθοφυσιολογία της οστικής νόσου του ΠΜ

Η οστική νόσος του ΠΜ είναι αποτέλεσμα διαταραχής της ισορροπίας της φυσιολογικής οστικής αναδόμησης που προκύπτει από αυξημένη οστεοκλαστική και μειωμένη οστεοβλαστική δραστηριότητα. (35). Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών αποτελείται από εξωκυττάρια ουσία και κυτταρικά στοιχεία (αιμοποιητικά και στρωματικά κύτταρα), τα οποία σε ασθενείς με ΠΜ παράγουν μόρια που πυροδοτούν ανισορροπία ανάμεσα στην καταστροφή και

το σχηματισμό νέου οστού. Η παθοφυσιολογία της οστικής νόσου του ΠΜ αποδίδεται σχηματικά στην *Εικόνα 3*.

Το μονοπάτι του ενεργοποιητή του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα κΒ και του προσδέτη του (RANK/RANKL) κατέχει κεντρικό ρόλο στην οστική νόσο του ΠΜ. Ο υποδοχέας RANK είναι μέλος της οικογένειας του TNF και εκφράζεται στην επιφάνεια των προ-οστεοκλαστών. Ο προσδέτης του RANK (RANKL) είναι μια κυτταροκίνη που εκφράζεται κυρίως στα οστεοκύτταρα, καθώς επίσης και στα στρωματικά κύτταρα του μυελού και τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα. Η πρόσδεση του RANKL στον RANK οδηγεί σε σύντηξη των προ-οστεοκλαστών και ακολούθως στο σχηματισμό ώριμων οστεοκλαστών ικανών να εκκινήσουν την οστική απορρόφηση. Η οστεοπροτεγερίνη (OPG) είναι επίσης μέλος της οικογένειας του TNF, εκκρίνεται από τους οστεοβλάστες και λειτουργεί ως αδρανοποιητικός υποδοχέας του RANKL, δηλαδή προσδέεται σε αυτόν και τον αποτρέπει από το να συνδεθεί στον RANK. Η ισορροπία ανάμεσα στον RANKL και την OPG ρυθμίζει την οστεοκλαστική δραστηριότητα. (36) Στο ΠΜ, το μονοπάτι RANK/RANKL απορρυθμίζεται οδηγώντας σε αυξημένη οστική απορρόφηση. (37) Στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών ασθενών με ΠΜ, ο RANKL υπερεκφράζεται και η οστεοπροτεγερίνη υποεκφράζεται. (38) Ειδικότερα, τα μυελωματικά κύτταρα εκφράζουν διακυττάριο και διαλυτό RANKL επάγοντας την οστική αποδόμηση. (39). Επιπλέον, προάγουν την παραγωγή του RANKL από τους οστεοκλάστες εκκρίνοντας το πεπτίδιο PTHrP που δρα παρακρινώς στο περιβάλλον του μυελού των οστών. Ακόμη, τα κύτταρα του ΠΜ εκκρίνουν DKK1, έναν αναστολέα του σηματοδοτικού μονοπατιού WNT που οδηγεί σε μειωμένη έκφραση οστεοπροτεγερίνης. (40, 41)

Το σηματοδοτικό μονοπάτι WNT επίσης εμπλέκεται στην οστική νόσο του ΠΜ. Τα μυελωματικά κύτταρα και τα οστεοκύτταρα εκφράζουν μόρια που αναστέλλουν το εν λόγω σηματοδοτικό μονοπάτι, όπως η σκληροστίνη, ο DKK1 και οι πρωτεΐνες SFRP2 και FRZB, οδηγώντας σε μειωμένη οστική παραγωγή και αυξημένη οστική αποδόμηση. (42) Ο DKK1 συνδέεται στον συνυποδοχέα LRP5/6 μαζί με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες KREMEN1 και KREMEN2 οδηγώντας σε εσωτερίκευση των LRPs και αδρανοποίηση του μονοπατιού. (43) Ο DKK1 ακόμη συμβάλλει στην οστική νόσο όπως προαναφέρθηκε με έμμεσο τρόπο διαταράσσοντας την ισορροπία μεταξύ

RANKL/OPG (41) και το ίδιο κάνει και η σκληροσίνη. (44) Η σκληροσίνη παράγεται από τα οστεοκύτταρα και αναστέλλει την ενεργοποίηση του WNT στα κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς, ενώ προάγει την απόπτωση των ώριμων οστεοβλαστών ενεργοποιώντας την οδό των κασπασών. (45, 46) Τα κύτταρα του ΠΜ εκκρίνουν σκληροσίνη και τα αυξημένα επίπεδά της σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών. (47, 48) Αναφορικά με τη μη κανονική οδό ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού WNT, το ενδιαφέρον στρέφεται στο RUNX2. (49) Τα κύτταρα του ΠΜ αναστέλλουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών μπλοκάροντας τη δραστηριότητα του RUNX2 στα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών. (50)

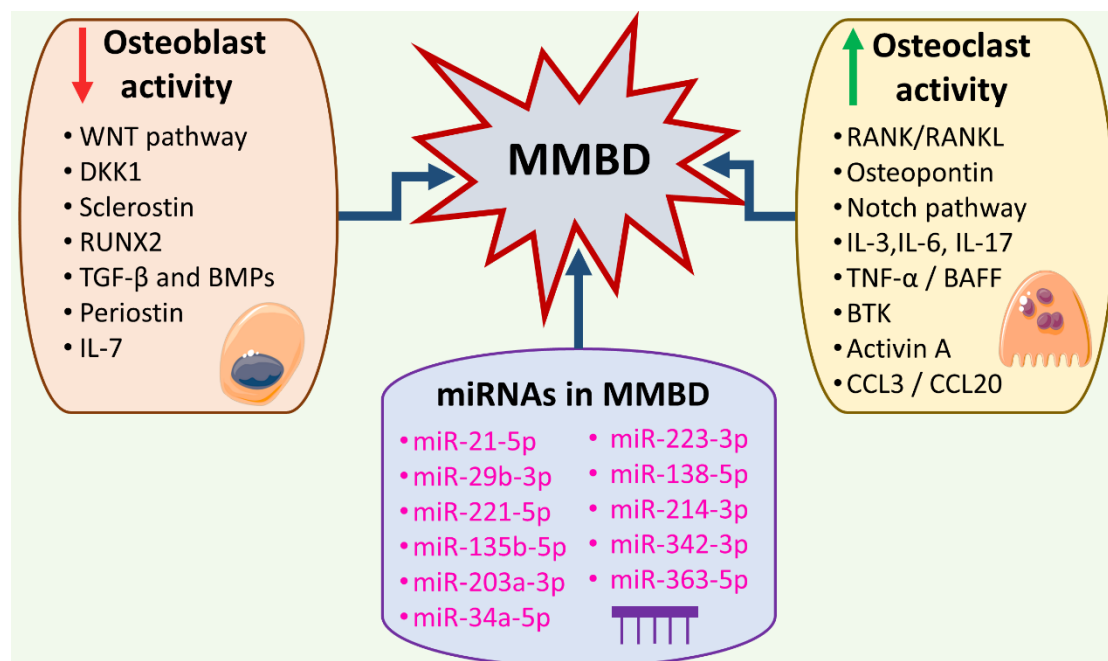
Οι BMPs είναι μέλη της οικογένειας του TGF- β που διαδραματίζουν αμφιλεγόμενο ρόλο στην οστική νόσο του ΠΜ. (51) Πειράματα καθορισμού του μεταγραφικού προφίλ ανέδειξαν ότι η αναστολή της σηματοδότησης που επάγεται από τις BMPs κατέστειλε την οστική νόσο του ΠΜ. (52) Αντιθέτως, υπάρχουν δεδομένα ότι η BMP2 προάγει την οστεοβλαστογένεση. (53)

4 διαμεμβρανικοί υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια NOTCH. Όταν ένας από τους δύο τύπους προσδέτη (JAG1, JAG2 και DLL1, DLL3, DLL4) στα γειτνιάζοντα κύτταρα συνδέεται με ένα NOTCH υποδοχέα στο κύτταρο δέκτη, η πρωτεάση ADAM κόβει το εξωκυττάριο τμήμα του NOTCH υποδοχέα, ενώ το σύμπλεγμα της γ -σεκρετάσης κόβει και απελευθερώνει στο κυτταρόπλασμα το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα (ICN). Το ενδοκυττάριο τμήμα μεταναστεύει στον πυρήνα του κυττάρου, όπου προάγει τη μεταγραφή των γονιδίων HES και HEY. Το μονοπάτι NOTCH εμπλέκεται στην οστεοκλαστογένεση που επάγεται από τα κύτταρα του ΠΜ. Τα κύτταρα του ΠΜ εκφράζουν υποδοχείς NOTCH1,2,3 που συνδέονται με τους προσδέτες τους στο ίδιο ή στα γειτονικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού NOTCH οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του RANKL από τα μυελωματικά κύτταρα. (54)

Τα μυελωματικά κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες που προάγουν την οστική απορρόφηση από τους οστεοκλάστες. (55) Το CCL3 είναι μια κυτταροκίνη που εκκρίνεται από τα κύτταρα του μυελώματος. (56) Προάγει την οστεοκλαστογένεση ενισχύοντας τη δράση του RANKL και της IL-6 στην ωρίμανση των οστεοκλαστών, ενώ παράλληλα εμποδίζει την αναδόμηση του οστού μειώνοντας την έκφραση του

RUNX2, το οποίο είναι μεταγραφικός παράγοντας με σημαντικό ρόλο στην οστεοβλαστογένεση. (49)

Η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) είναι μια κυτταροκίνη που εμπλέκεται στον οστικό μεταβολισμό και παράγεται από τα πρόδρομα κύτταρα της μυελικής σειράς. Η IL-6 ενισχύει τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και συμβάλλει στην επιβίωση των κακοήθων κυττάρων. Επιπροσθέτως, διεγείρει τα πλασματοκύτταρα να εκκρίνουν VEGF που ενεργοποιεί περαιτέρω τους οστεοκλάστες μέσω πρόσδεσης στην επιφάνειά τους. (57)



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση του μοριακού υποβάθρου της οστικής νόσου του πολλαπλού μυελώματος (ΠΜ). Απεικονίζονται μονοπάτια και μόρια που εμπλέκονται στην οστική νόσο του ΠΜ και επιδρούν είτε στην οστεοβλαστική, είτε στην οστεοκλαστική δραστηριότητα. Ακόμη απεικονίζονται miRNAs τα οποία εμπλέκονται στην οστική νόσο του ΠΜ.

1.4 Κλινικές εκδηλώσεις του ΠΜ

Η ειδοποιός διαφορά που διακρίνει το ΠΜ από τις πρόδρομες μορφές του είναι η παρουσία συμπτωμάτων ως αποτέλεσμα βλαβών σε όργανα στόχους οφειλόμενων στην υποκείμενη νόσο. Αυτά συνοψίζονται από το ακρωνύμιο «CRAB» που αντιστοιχεί σε υπερασβεστιαμία, νεφρική νόσο, αναιμία και οστική νόσο. Η

υπερασβεστιαϊμία είναι μια τυπική κλινική εκδήλωση του ΠΜ και συναντάται περίπου στο 28 % των ασθενών κατά τη διάγνωση με βάση μια μεγάλη αναδρομική μονοκεντρική μελέτη. (58) Είναι αποτέλεσμα αυξημένης αποδόμησης του οστού από τους οστεοκλάστες που οδηγεί στη δημιουργία οστεολυτικών βλαβών. Η σχετιζόμενη με το ΠΜ νεφρική νόσος αποτελεί συχνή επιπλοκή κατά τη διάγνωση, και η συχνότητά της κυμαίνεται από 20-50% ανάλογα με τον ακριβή ορισμό της. Ο πιο συχνός μηχανισμός είναι η νεφροπάθεια από νεφροσωληναριακούς κυλίνδρους (cast nephropathy), η οποία παρατηρείται όταν η πειραματική διήθηση μεγάλων ποσοτήτων ελαφρών αλύσεων ξεπερνά την ικανότητα των κυττάρων του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου να πραγματοποιήσουν ενδοκυττάρωση και αποδόμησή τους. Έτσι, οι ελαφρές αλύσεις φτάνουν στα άπω τμήματα του νεφρώνα όπου δημιουργούν κυλίνδρους (casts) και ως αποτέλεσμα απόφραξη και φλεγμονή των νεφρικών σωληναρίων. Σπανιότερα, η νεφρική προσβολή μπορεί να οφείλεται σε νόσο από εναπόθεση της μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης (MIDD), αμυλοείδωση, άμεση διήθηση από κακοήθη κύτταρα ή επίκτητο σύνδρομο Fanconi. (59) Η αναιμία, ορθόχρωμη ορθοκυτταρική συνήθως, είναι συνήθης εκδήλωση του ΠΜ και παρατηρείται στο 75% των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών. (58) Η αναιμία αυτή είναι πολυπαραγοντικής αιτιολογίας και οφείλεται στη διήθηση του μυελού από κακοήθη κύτταρα που έχει ως αποτέλεσμα μείωση των ερυθροβλαστών, στην ανεπάρκεια ερυθροποιητίνης σε περιπτώσεις που συνυπάρχει νεφρική ανεπάρκεια, στη μειωμένη απαντητικότητα των προερυθροβλαστών στην ερυθροποιητίνη, στην αναιμία χρόνιας νόσου, στην αύξηση του όγκου του πλάσματος που οφείλεται στην παραπρωτεΐνη, ενώ τέλος μία από τις κυριότερες αιτίες αναιμίας είναι η επαγωγή της απόπτωσης των ερυθροβλαστών από τα μυελωματικά κύτταρα. (60, 61) Τέλος, η οστική νόσος του ΠΜ είναι μια από τις εκδηλώσεις του που σχετίζονται με σημαντική νοσηρότητα και επηρεασμένη ποιότητα ζωής και συναντάται στο 80% των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών. Είναι αποτέλεσμα της επαγόμενης από τα μυελωματικά κύτταρα αυξημένης οστεοκλαστικής και μειωμένης οστεοβλαστικής δραστηριότητας. (62)

1.5 Διάγνωση του ΠΜ – Νέα διαγνωστικά κριτήρια

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, το ΠΜ αποτελεί κακοήθεια προερχόμενη από τα τελικώς διαφοροποιημένα πλασματοκύτταρα και εντάσσεται σε ένα φάσμα διαταραχών που ονομάζονται μονοκλωνικές γαμμαπάθειες. Του πολλαπλού μυελώματος προηγείται σχεδόν πάντα μια ασυμπτωματική κατάσταση που ονομάζεται μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (MGUS) και συναντάται περίπου στο 3% του μεσήλικου πληθυσμού (>50 ετών). (63, 64) Ο ρυθμός εξέλιξης του MGUS σε ΠΜ είναι περίπου 1% το χρόνο. (9) Μία ενδιάμεση κατάσταση ανάμεσα στο MGUS και το ΠΜ είναι το ασυμπτωματικό ΠΜ (ΑΠΜ). Ο κίνδυνος εξέλιξης σε ΠΜ είναι μεγαλύτερος στο ΑΠΜ και συγκεκριμένα αντιστοιχεί σε 10% το χρόνο για τα 5 πρώτα χρόνια από τη διάγνωση, 3% το χρόνο για τα επόμενα 5 χρόνια και στη συνέχεια 1% το χρόνο. (10) Πρόκειται για μια ασυμπτωματική κατάσταση με μεγάλη ετερογένεια στην κλινική της πορεία. Διάφορα προγνωστικά μοντέλα έχουν προταθεί σχετικά με τον κίνδυνο εξέλιξη του ΑΠΜ σε ΠΜ, αλλά διέπονται από ασυμφωνία μεταξύ τους. (65)

Τα διαγνωστικά κριτήρια του ΠΜ ανανεώθηκαν το 2014. Το ΠΜ είναι μια νόσος στη διάγνωση της οποίας εμπλέκονται κλινικοπαθολογικά κριτήρια. Μέχρι πρόσφατα σημαντική βλάβη σε όργανα στόχους απαιτούνταν για την έναρξη θεραπείας. Η προσέγγιση αυτή προστάτευε ένα ποσοστό ατόμων με ασυμπτωματική νόσο από το να λάβουν αγωγή με σημαντικές τοξικότητες σε μια εποχή που οι διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές ήταν πολύ περιορισμένες και απαρτίζονταν κυρίως από κλασική χημειοθεραπεία. Πλέον, με τις νέες θεραπευτικές και διαγνωστικές δυνατότητες και με σαφή επιστημονικά δεδομένα ότι η έγκαιρη παρέμβαση σε υψηλού ρίσκου ασυμπτωματικούς ασθενείς μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση, η Διεθνής Ομάδα Εργασίας του Πολλαπλού Μυελώματος (IMWG) προχώρησε το 2014 σε ανανέωση των κατευθυντήριων οδηγιών σχετικά με τη διάγνωση του ΠΜ. (66, 67)

Τα νέα διαγνωστικά κριτήρια για το ΠΜ και τις σχετιζόμενες πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 1. Η διάγνωση του ΠΜ απαιτεί διήθηση του μυελού από μονοκλωνικά κακοήθη πλασματοκύτταρα μεγαλύτερη ή ίση του 10% ή πλασματοκύττωμα αποδεδειγμένο με βιοψία συν την παρουσία ενός τουλάχιστον από μια σειρά χαρακτηριστικών που αποτελούν τα χαρακτηριστικά που

ορίζουν το ΠΜ (myeloma defining events; MDEs). Τα MDEs περιλαμβάνουν τα γνωστά CRAB κριτήρια συν 3 νέους βιοδείκτες ενδεικτικούς παρουσίας κακοήθειας, οι οποίοι είναι: διήθηση του μυελού $\geq 60\%$, λόγος ελεύθερων ελαφρών αλύσεων ≥ 100 με την προϋπόθεση ότι η εμπλεκόμενη άλυσος είναι ≥ 100 mg/l, και η παρουσία πάνω από μίας εστιακής αλλοίωσης στη μαγνητική τομογραφία. (66) Η διήθηση του μυελού σε ποσοστό $\geq 60\%$ χωρίς την παρουσία βλαβών σε όργανα στόχους είναι πολύ σπάνια, αλλά όταν παρατηρείται υπάρχει υψηλή πιθανότητα εμφάνισης βλαβών στα όργανα στόχους σε διάστημα λίγων μηνών. (68) Ο ακραία διαταραγμένος λόγος ελεύθερων ελαφρών αλύσεων σε ασθενείς με ασυμπτωματικό μύελωμα φαίνεται από μελέτες να σχετίζεται με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο προόδου σε συμπτωματική νόσο εντός διετίας. (69, 70) Τέλος, οι εστιακές αλλοιώσεις στη μαγνητική τομογραφία σε ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα επίσης φάνηκε να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης σε συμπτωματική νόσο εντός διετίας με τον διάμεσο χρόνο μέχρι την πρόοδο σε συμπτωματική νόσο να κυμαίνεται από 13-15 μήνες. (71, 72)

Πλασματοκυτταρική δυσκρασία	Διαγνωστικά κριτήρια
Μη IgM μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (ΜΓΑΣ)	<ul style="list-style-type: none"> • Παραπρωτεΐνη ορού (όχι IgM) < 3 g/dl • Διήθηση μυελού από κλωνικά πλασματοκύτταρα $< 10\%$ ¹ • Απουσία βλαβών σε όργανα στόχους όπως υπερασβεστιαμία, νεφρική δυσλειτουργία, αναιμία και οστική νόσος (κριτήρια CRAB) που μπορούν να αποδοθούν στην πλασματοκυτταρική δυσκρασία <p><i>Και τα 3 παραπάνω κριτήρια πρέπει να πληρούνται για να τεθεί η διάγνωση</i></p>
Ασυμπτωματικό πολλαπλό μύελωμα (ΑΠΜ)	<ul style="list-style-type: none"> • Παραπρωτεΐνη ορού (IgG ή IgA) ≥ 3 g/dl ή παραπρωτεΐνη ούρων ≥ 500 mg το 24ωρο και/ή διήθηση μυελού των οστων από κλωνικά πλασματοκύτταρα 10-60% • Απουσία myeloma defining events ή αμυλοείδωσης <p><i>Και τα 2 παραπάνω κριτήρια πρέπει να πληρούνται για να τεθεί η διάγνωση</i></p>

<p>Πολλαπλό μυέλωμα</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Διήθηση μυελού των οστών από κλωνικά πλασματοκύτταρα $\geq 10\%$ ή πλασματοκύττωμα (οστικό ή εξωμυελικό) επιβεβαιωμένο παθολογοανατομικά • Οποιοδήποτε από τα παρακάτω myeloma defining events: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Παρουσία βλάβης σε όργανα στόχους που οφείλεται στην υποκείμενη πλασματοκυτταρική δυσκρασία. Ειδικότερα: <ul style="list-style-type: none"> <u>Υπερασβεστιαμία</u>: ασβέστιο ορού πάνω από 1 mg/dl υψηλότερο από το ανώτερο φυσιολογικό όριο ή τιμή ασβεστίου ορού >11 mg/dl <u>Νεφρική ανεπάρκεια</u>: κάθαρση κρεατινίνης <40 ml/min ή κρεατινίνη ορού >2 mg/dl <u>Αναιμία</u>: τιμή αιμοσφαιρίνης πάνω από 2 g/dl κάτω από το κατώτερο φυσιολογικό όριο ή τιμή αιμοσφαιρίνης <10 g/dl <u>Οστικές βλάβες</u>: μία ή περισσότερες οστεολυτικές αλλοιώσεις σε απλές ακτινογραφίες ολόκληρου του σκελετού, σε αξονική τομογραφία (CT) ή σε αξονική τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET-CT) ➤ Οποιοσδήποτε ή και περισσότεροι του ενός από τους παρακάτω βιοδείκτες ενδεικτικούς κακοήθειας: <ul style="list-style-type: none"> - Διήθηση του μυελού από κλωνικά πλασματοκύτταρα $\geq 60\%$ - Λόγος εμπλεκόμενης προς μη εμπλεκόμενη ελεύθερης ελαφράς αλύσου ορού ≥ 100 (η εμπλεκόμενη ελεύθερη ελαφρά άλυσος πρέπει να είναι ≥ 100 mg/l) - >1 εστιακή αλλοίωση (τουλάχιστον 5 mm) σε μαγνητική τομογραφία
<p>IgM μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (IgM ΜΓΑΣ)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • IgM παραπρωτεΐνη ορού < 3 g/dl • Διήθηση μυελού από λεμφοπλασματοκύτταρα $<10\%$ • Απουσία αναιμίας, β συμπτωμάτων, υπεργλοιοτότητας, λεμφαδενοπάθειας ή ηπατοσπληνομεγαλίας που μπορούν να αποδοθούν στην υποκείμενη λεμφοπλασματοκυτταρική δυσκρασία

	<i>Και τα 3 παραπάνω κριτήρια πρέπει να πληρούνται για να τεθεί η διάγνωση</i>
Μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας ελαφρών αλύσεων	<ul style="list-style-type: none"> • Διαταραγμένος λόγος ελεύθερων ελαφρών αλύσεων <0.26 ή >1.65 • Αύξηση των επιπέδων της σχετικής ελεύθερης ελαφράς αλύσου (κ σε λόγο >1.65 και λ σε λόγο <0.26) • Ανοσοκαθίλωση αρνητική για βαριά άλυσο ανοσοσφαιρίνης • Απουσία βλαβών σε όργανα στόχους όπως υπερασβεστιαμία, νεφρική δυσλειτουργία, αναιμία και οστική νόσος (κριτήρια CRAB) που μπορούν να αποδοθούν στην πλασματοκυτταρική δυσκρασία • Διήθηση μυελού από κλωνικά πλασματοκύτταρα <10% • Παραπρωτεΐνη ούρων < 500 mg/24ωρο <p><i>Όλα τα παραπάνω κριτήρια πρέπει να πληρούνται για να τεθεί η διάγνωση</i></p>
Μονήρες πλασματοκύττωμα	<ul style="list-style-type: none"> • Μονήρης οστική ή εξωμυελική βλάβη με παθολογοανατομικά πιστοποιημένη διήθηση από κλωνικά πλασματοκύτταρα • Φυσιολογικός μυελός των οστών με απουσία διήθησης από κλωνικά πλασματοκύτταρα • Φυσιολογικός απεικονιστικός έλεγχος των οστών και μαγνητική τομογραφία (MRI) ή CT σπονδυλικής στήλης και πυέλου εκτός από τη γνωστή βλάβη • Απουσία βλαβών σε όργανα στόχους όπως υπερασβεστιαμία, νεφρική δυσλειτουργία, αναιμία και οστική νόσος (κριτήρια CRAB) που μπορούν να αποδοθούν σε λεμφοπλασματοκυτταρική δυσκρασία <p><i>Όλα τα παραπάνω κριτήρια πρέπει να πληρούνται για να τεθεί η διάγνωση</i></p>
Μονήρες πλασματοκύττωμα με ελάχιστη συμμετοχή του μυελού ²	<ul style="list-style-type: none"> • Μονήρης οστική ή εξωμυελική βλάβη με παθολογοανατομικά πιστοποιημένη διήθηση από κλωνικά πλασματοκύτταρα • Διήθηση μυελού από κλωνικά πλασματοκύτταρα <10% • Φυσιολογικός απεικονιστικός έλεγχος των οστών και μαγνητική τομογραφία (MRI) ή CT σπονδυλικής στήλης και πυέλου εκτός από τη γνωστή βλάβη

	<ul style="list-style-type: none"> • Απουσία βλαβών σε όργανα στόχους όπως υπερασβεστιαμία, νεφρική δυσλειτουργία, αναιμία και οστική νόσος (κριτήρια CRAB) που μπορούν να αποδοθούν σε λεμφοπλασματοκυτταρική δυσκρασία <p><i>Όλα τα παραπάνω κριτήρια πρέπει να πληρούνται για να τεθεί η διάγνωση</i></p>
Σύνδρομο POEMS	<ul style="list-style-type: none"> • Πολυνευροπάθεια • Διαταραχή πολλαπλασιασμού μονοκλωνικών πλασματοκυττάρων (σχεδόν πάντα λ) • Οποιοδήποτε από τα 3 μείζονα κριτήρια <ul style="list-style-type: none"> ➢ Σκληρυντικές οστικές αλλοιώσεις ➢ Νόσος Castleman ➢ Αυξημένα επίπεδα του VEGF³ • Οποιοδήποτε από τα 6 ελάσσονα κριτήρια <ul style="list-style-type: none"> ➢ Οργανομεγαλία (σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία ή λεμφαδενοπάθεια) ➢ Αύξηση εξωαγγειακού όγκου (οιδήματα, πλευριτικές συλλογές, ασκίτης ➢ Ενδοκρινοπάθειες (επινεφριδίων, θυρεοειδούς, υπόφυσης, γονάδων, παραθυρεοειδούς, παγκρέατος)⁴ ➢ Δερματικές αλλοιώσεις (υπέρχρωση, υπερτρίχωση, ακροκυάνωση, ερυθρότητα κτλ) ➢ Οίδημα οπτικής θηλής ➢ Θρομβοκυττάρωση/Πολυκυτταραιμία <p><i>Και τα 4 κριτήρια πρέπει να πληρούνται για να τεθεί η διάγνωση. Ακόμη θα πρέπει τα χαρακτηριστικά αυτά να έχουν χρονική σχέση μεταξύ τους και να μην μπορούν να αποδοθούν σε άλλες αιτίες</i></p>
Συστηματική AL αμυλοείδωση ⁵	<ul style="list-style-type: none"> • Παρουσία ενός συστηματικού συνδρόμου που σχετίζεται με την εναπόθεση αμυλοειδούς (όπως συμμετοχή νεφρού, καρδιάς, ήπατος, γαστρεντερικού ή περιφερικών νεύρων) • Θετική για αμυλοειδές χρώση ερυθρού του Congo σε οποιοδήποτε ιστό (πχ λίπος, μυελός ή οποιοδήποτε άλλο όργανο) • Ενδείξεις ότι το αμυλοειδές σχετίζεται με ελαφρές αλύσους όπως προκύπτει από άμεση εξέταση του αμυλοειδούς χρησιμοποιώντας πρωτεωμική ανάλυση βασιζόμενη σε

	<p>φασματομετρία μάζας (mass spectrometry) ή ανοσοηλεκτρονική μικροσκόπηση</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ενδείξεις παρουσίας διαταραχή πολλαπλασιασμού μονοκλωνικών πλασματοκυττάρων (παραπρωτεΐνη ορού ή ούρων, διαταραγμένος λόγος ελαφρών αλύσεων ή κλωνικά πλασματοκύτταρα στο μυελό των οστών
--	--

¹Η εξέταση μυελού των οστών μπορεί να αναβληθεί σε MGUS χαμηλού κινδύνου, ²Το μονήρες πλασματοκύττωμα με διήθηση μυελού $\geq 10\%$ θεωρείται πολλαπλό μύελωμα, ³Συνιστάται η τιμή να θεωρείται αυξημένη όταν είναι τουλάχιστον τρεις ή τέσσερις φορές πάνω από την τιμή αναφοράς του εργαστηρίου, ⁴Απαιτείται ενδοκρινική διαταραχή εκτός του διαβήτη ή του υποθυρεοειδισμού που είναι πολύ συχνά στον γενικό πληθυσμό, ⁵ Ασθενείς που πληρούν τα κριτήρια τόσο για αμυλοείδωση όσο και για μύελωμα θεωρείται ότι πάσχουν και από τα δύο

Πίνακας 1: Διαγνωστικά κριτήρια της Ομάδας Εργασίας του Πολλαπλού Μυελώματος για το πολλαπλό μύελωμα και τις σχετιζόμενες πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες. (66)

1.6 Σταδιοποίηση και εκτίμηση κινδύνου στο ΠΜ

Η εκτίμηση της πρόγνωσης είναι πολύ σημαντική τόσο για τη σωστή ενημέρωση του ασθενούς, όσο και για τις θεραπευτικές επιλογές που θα ακολουθηθούν. Η κλινική έκβαση του ΠΜ είναι αποτέλεσμα μιας ποικιλίας παραγόντων, στους οποίους περιλαμβάνονται τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του όγκου (κυτταρογενετικές ανωμαλίες, εξωμυελική ανάπτυξη, επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης), το φορτίο της νόσου (επίπεδα β2 μικροσφαιρίνης) και η φυσική κατάσταση του ασθενούς (ηλικία, συννοσηρότητες, performance status). (73, 74)

Για τη σταδιοποίηση κινδύνου και την εκτίμηση της πρόγνωσης των ασθενών έχουν προταθεί διάφορα προγνωστικά μοντέλα. Παραδοσιακά, η σταδιοποίηση του ΠΜ βασιζόταν στο σύστημα σταδιοποίησης κατά Durie Salmon, το οποίο κατηγοριοποιεί τους ασθενείς με βάση το φορτίο της νόσου. (75) Το 2005 προτάθηκε το διεθνές σύστημα σταδιοποίησης του ΠΜ (International Staging System; ISS), το οποίο ενσωματώνει το φορτίο της νόσου, όπως αυτό εκφράζεται από τη β2 μικροσφαιρίνη, και έναν παράγοντα προσδιοριστικό της κατάστασης του ασθενούς, την αλβουμίνη. Το ISS ταξινομεί τους ασθενείς σε τρεις ομάδες με διαφορετική πρόγνωση: το στάδιο I με διάμεση ολική επιβίωση (overall survival; OS) τους 62 μήνες, το στάδιο II με διάμεση OS τους 44 μήνες και το στάδιο III με διάμεση OS τους 29 μήνες. (76)

Στάδιο	Κριτήρια
I	β2 μικροσφαιρίνη ορού < 3.5 mg/l και αλβουμίνη ορού ≥ 3.5 g/dl
II	Όχι στάδιο I ή III
III	β2 μικροσφαιρίνη ορού ≥ 5.5 mg/l

Πίνακας 2: Το Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης του ΠΜ (ISS).

Το σύστημα σταδιοποίησης ISS στερείται στοιχείων που προσδιορίζουν τη βιολογία της νόσου, η οποία φαίνεται ότι στο ΠΜ σχετίζεται με την πρόγνωση. Ο προσδιορισμός κυτταρογενετικών ανωμαλιών με τη μέθοδο του φθορίζοντος in situ υβριδισμού (fluorescent in situ hybridization; FISH) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των στοιχείων που χαρακτηρίζουν τη βιολογία της νόσου. Σύμφωνα με μελέτες, οι κύριες χρωμοσωμικές ανωμαλίες που σχετίζονται με νόσο υψηλού κινδύνου είναι οι χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις t(4;14) και t(14;16), καθώς και η διαγραφή του 17p. Η παρουσία ενός τουλάχιστον από τα παραπάνω σχετίζεται με διάμεση OS 24.5 μήνες, ενώ η απουσία και των τριών σχετίζεται με διάμεση OS 50.5 μήνες. (77) Επιπλέον, η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) αποτελεί βιοδείκτη ενδεικτικό της επιθετικότητας, του ταχέος πολλαπλασιασμού και του φορτίου της νόσου και συσχετίζεται με την ολική επιβίωση των ασθενών. (78, 79) Έτσι, το 2015 η διεθνής ομάδα εργασίας για το πολλαπλό μύελωμα πρότεινε μια αναθεωρημένη μορφή του συστήματος ISS (R-ISS; Revised International Staging System) για τη σταδιοποίηση κινδύνου των ασθενών με ΠΜ, η οποία ενσωματώνει στο ISS την LDH και την παρουσία κυτταρογενετικών ανωμαλιών. (80)

Στάδιο	Κριτήρια
I	<ul style="list-style-type: none"> • Στάδιο ISS I <u>και</u> • Απουσία κυτταρογενετικών ανωμαλιών υψηλού κινδύνου [δηλαδή t(4;14),t(14;16), del(17p)] <u>και</u> • Φυσιολογική τιμή LDH
II	<ul style="list-style-type: none"> • Όχι στάδιο I ή III
III	<ul style="list-style-type: none"> • Στάδιο ISS III <u>και</u> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Παρουσία μίας τουλάχιστον εκ των κυτταρογενετικών ανωμαλιών υψηλού κινδύνου [δηλαδή t(4;14),t(14;16), del(17p)] <u>ή</u> ➤ Υψηλή τιμή LDH

Πίνακας 3: Το αναθεωρημένο σύστημα σταδιοποίησης του ΠΜ (R-ISS), ο προσδιορισμός των κυτταρογενετικών ανωμαλιών γίνεται με τη μέθοδο FISH

Η μελέτη που εγκαθίδρυσε το R-ISS ως το πλέον αξιόπιστο σύστημα σταδιοποίησης ασθενών με ΠΜ συμπεριέλαβε 4445 ασθενείς από 11 διεθνείς πολυκεντρικές μελέτες. Με βάση το R-ISS, το 28% των ασθενών σταδιοποιήθηκε στο στάδιο I, το 62% στο στάδιο II και το 10% αυτών στο στάδιο III. Σε μια διάμεση περίοδο παρακολούθησης 46 μηνών τα ποσοστά 5ετούς ολικής επιβίωσης ήταν 82% για το στάδιο I, 62% για το στάδιο II και 40% για το στάδιο III. Το διάμεσο 5ετές OS δεν επιτεύχθηκε για τους ασθενείς σταδίου I, ενώ ήταν ίσο με 83 μήνες για το στάδιο II και 43 μήνες για το στάδιο III. Αναφορικά με την επιβίωση ελεύθερη προόδου νόσου (progression free survival; PFS), τα ποσοστά ήταν 55% για το στάδιο I, 36% για το στάδιο II και 24% για το στάδιο III και το αντίστοιχο διάμεσο PFS ήταν 66 μήνες για το στάδιο I, 42 μήνες για το στάδιο II και 29 μήνες για το στάδιο III. (80)

1.7 Προσδιορισμός της ανταπόκρισης στη θεραπεία και παρακολούθηση ασθενών με ΠΜ

Η ανταπόκριση στη θεραπεία του ΠΜ υπόκειται σε συγκεκριμένα κριτήρια που ορίζονται από τη διεθνή ομάδα εργασίας για το ΠΜ και περιγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 4. Για την εκτίμηση της ανταπόκρισης, οι ασθενείς υποβάλλονται σε

τακτική παρακολούθηση και κλινικοεργαστηριακό έλεγχο. Εκτός από τον βασικό αιματολογικό έλεγχο με γενική αίματος και βιοχημικές εξετάσεις, σημαντική για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης είναι η μέτρηση της παραπρωτεΐνης ορού (M-protein) μέσω της ηλεκτροφόρησης λευκωμάτων ορού, καθώς και η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ούρων για τη μέτρηση της παραπρωτεΐνης ούρων (U-peak) και ο προσδιορισμός των ελεύθερων ελαφρών αλύσεων ορού ειδικά σε ασθενείς με μη μετρήσιμη νόσο στον ορό και τα ούρα (M-protein < 1 g/dl, U-peak < 200 mg/24h). Οι εξετάσεις αυτές πρέπει να πραγματοποιούνται μια φορά το μήνα σε ασθενείς υπό θεραπεία και τουλάχιστον μία φορά το τρίμηνο σε ασθενείς υπό παρακολούθηση ή σε θεραπεία συντήρησης. Απεικονιστικός έλεγχος για την επανεκτίμηση της οστικής νόσου γίνεται συνήθως επί ενδείξεων και συμπτωμάτων ή για τον προσδιορισμό της απουσία ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου απεικονιστικά (PET-CT), ενώ εξετάσεις μυελού γίνονται για την επιβεβαίωση της πλήρους ύφεσης ή της υποτροπής. (81)

Με την εισαγωγή σύγχρονων θεραπευτικών επιλογών στο ΠΜ ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών επιτυγχάνει πλήρη ύφεση. Ανέκυψε τα τελευταία χρόνια λοιπόν η ανάγκη να αναθεωρηθούν τα κλασικά κριτήρια ανταπόκρισης και να προστεθούν σε αυτά κριτήρια που προσδιορίζουν την ελάχιστη υπολειπόμενη νόσο (MRD- minimal residual disease) τόσο στο μυελό με τη χρήση αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS; next generation sequencing) ή κυτταρομετρίας ροής νέας γενιάς (NGF; next generation flow), όσο και εκτός του μυελού των οστών, χρησιμοποιώντας απεικονιστικές μεθόδους, ειδικότερα PET-CT. (82) Αναφορικά με το όριο που χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η αρνητική MRD στο μυελό φαίνεται ότι η απουσία κακοήθων πλασματοκυττάρων σε 1000000 κύτταρα του μυελού των οστών ($<10^{-6}$) σχετίζεται με καλύτερη πρόβλεψη της επιβίωσης συγκριτικά με υψηλότερα όρια- τιμές διαχωρισμού, όπως για παράδειγμα το 10^{-5} . Αναφορικά με την απεικονιστική MRD, έχει δειχθεί ότι το PET-CT εντοπίζει υπερμεταβολικές εστίες σε ένα ποσοστό 15-20% ασθενών με αρνητική MRD στο μυελό. (83) Ο προσδιορισμός της MRD και η ενσωμάτωση της στα κριτήρια ανταπόκρισης είναι πολύ σημαντική, μιας και μελέτες αποδεικνύουν ότι αρνητική MRD στο μυελό σχετίζεται με καλύτερη ολική και ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση τόσο κατά την πρώτη γραμμή, όσο και στην υποτροπή. (84) Εντούτοις, η χρήση της MRD για τη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων

είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Τα αναθεωρημένα κριτήρια ανταπόκρισης της διεθνούς ομάδας εργασίας για το ΠΜ μετά την προσθήκη της MRD παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 5.

<p>Αυστηρώς πλήρης ανταπόκριση (stringent complete response – sCR)</p>	<p>Πλήρης ανταπόκριση, συν φυσιολογικός λόγος ελεύθερων ελαφρών αλύσεων και απουσία κλωνικών πλασματοκυττάρων ανοσοϊστοχημικά στην οστεομυελική βιοψία (λόγος κ/λ \leq 4:1 ή \geq 1:2 για ασθενείς κ και λ αντίστοιχα μετά τη μέτρηση \geq 100 πλασματοκυττάρων)</p>
<p>Πλήρης ανταπόκριση (complete response- CR)</p>	<p>Αρνητική ανοσοκαθήλωση ορού και ούρων και εξαφάνιση εξωμυελικών πλασματοκυττωμάτων αν προϋπήρχαν και <5% πλασματοκύτταρα στο μυελόγραμμα</p>
<p>Πολύ καλή μερική ανταπόκριση (very good partial response – VGPR)</p>	<p>Παραπρωτεΐνη ορού και ούρων ανιχνεύσιμη στην ανοσοκαθήλωση, αλλά όχι στην ηλεκτροφόρηση ή \geq90% μείωση της παραπρωτεΐνης ορού και παραπρωτεΐνη ούρων <100 mg / 24ωρο</p>
<p>Μερική ανταπόκριση (partial response – PR)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • \geq50% μείωση της παραπρωτεΐνης ορού και μείωση της παραπρωτεΐνης ούρων \geq90% ή σε <200 mg το 24ωρο, • αν η παραπρωτεΐνη ορού και ούρων είναι μη μετρήσιμη, απαιτείται μείωση \geq50% στη διαφορά μεταξύ εμπλεκόμενης και μη εμπλεκόμενης ελεύθερης ελαφράς αλύσου, • αν η παραπρωτεΐνη ορού και ούρων και οι ελεύθερες ελαφρές άλυσιοι ορού είναι μη μετρήσιμες, απαιτείται \geq50% μείωση της διήθησης από πλασματοκύτταρα, δεδομένου ότι αυτή ήταν \geq 30% κατά τη διάγνωση. Επιπλέον με αυτά τα κριτήρια απαιτείται μείωση \geq50% στο μέγεθος των εξωμυελικών

	πλασματοκυττωμάτων αν αυτά υπήρξαν κατά τη διάγνωση.
Ελάχιστη ανταπόκριση (minimal response – MR)	≥25%, αλλά ≤49% μείωση της παραπρωτεΐνης ορού και μείωση της παραπρωτεΐνης ούρων 24ωρου κατά 50-89%. Επιπλέον με τα παραπάνω κριτήρια, μία μείωση ≥50% στο μέγεθος των εξωμυελικών πλασματοκυττωμάτων αν υπήρχαν κατά τη διάγνωση.
Σταθερή νόσος (stable disease – SD)	Δε συνίσταται να χρησιμοποιείται ως ένδειξη ανταπόκρισης στη θεραπεία. Η σταθερή πορεία της νόσου περιγράφεται καλύτερα παρέχοντας δεδομένα που αφορούν το χρόνο μέχρι την πρόοδο νόσου. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται οι ασθενείς που δεν πληρούν τα κριτήρια για να ενταχθούν στις υπόλοιπες κατηγορίες.
Πρόοδος νόσου (progressive disease – PD)	<p>Οποιοδήποτε ή περισσότερα από ένα από τα παρακάτω κριτήρια:</p> <p>Αύξηση κατά 25% από τη χαμηλότερη επιβεβαιωμένη τιμή ανταπόκρισης σε ένα ή παραπάνω από τα παρακάτω κριτήρια:</p> <ul style="list-style-type: none"> • παραπρωτεΐνη ορού (η απόλυτη αύξηση πρέπει να είναι ≥ 0.5 g/dl) • αύξηση της παραπρωτεΐνης ορού ≥ 1 g/dl αν η χαμηλότερη τιμή παραπρωτεΐνης είναι ≥ 5 g/dl • παραπρωτεΐνη ούρων (η απόλυτη αύξηση πρέπει να είναι ≥ 200 mg/24ωρο) • σε ασθενείς με μη μετρήσιμη παραπρωτεΐνη ορού και ούρων, στη διαφορά μεταξύ εμπλεκόμενης και μη εμπλεκόμενης ελεύθερης ελαφράς αλύσου (η απόλυτη αύξηση πρέπει να είναι > 10 mg/dl) • σε ασθενείς με μη μετρήσιμη παραπρωτεΐνη ορού και ούρων και μη

	<p>μετρήσιμη ελεύθερη ελαφρά άλυσο, στο ποσοστό διήθησης του μυελού από πλασματοκύτταρα ανεξάρτητα από τη διήθηση στη διάγνωση (η απόλυτη αύξηση πρέπει να είναι $\geq 10\%$)</p> <p>Εμφάνιση νέων αλλοιώσεων, $\geq 50\%$ αύξηση από τη χαμηλότερη τιμή στο άθροισμα των γινομένων των μέγιστων καθέτων διαμέτρων σε περισσότερες από μία βλάβες ή $\geq 50\%$ αύξηση στη μεγαλύτερη διάμετρο μίας πρότερης αλλοίωσης με βραχύ άξονα > 1 cm, $\geq 50\%$ αύξηση στα κυκλοφορούντα πλασματοκύτταρα (ελάχιστο 200 κύτταρα/ μl) αν αυτή είναι η μόνη μετρήσιμη νόσος.</p>
Κλινική υποτροπή (clinical relapse)	<p>Η κλινική υποτροπή απαιτεί ένα από τα υπόλοιπα κριτήρια:</p> <ul style="list-style-type: none"> • άμεσες ενδείξεις εξελισσόμενης νόσου και/ή βλαβών σε όργανα στόχους (κριτήρια CRAB) σχετιζόμενων με την υποκείμενη πλασματοκυτταρική δυσκρασία (δε χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ελεύθερης προόδου νόσου επιβίωσης, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη) • εμφάνιση νέων εξωμυελικών πλασματοκυττωμάτων ή οστικών βλαβών • σαφής αύξηση στο μέγεθος των υπαρχόντων πλασματοκυττωμάτων ή οστικών βλαβών. Σαφής αύξηση ορίζεται ως 50% (και ≥ 1 cm) αύξηση στο άθροισμα των γινομένων των μέγιστων καθέτων διαμέτρων των μετρήσιμων βλαβών • υπερασβεστιαμία (>11 mg/dl) • μείωση στην αιμοσφαιρίνη ≥ 2 g/dl μη σχετιζόμενη με τη θεραπεία ή άλλες μη

	<p>σχετιζόμενες με το πολλαπλό μυέλωμα καταστάσεις</p> <ul style="list-style-type: none"> • αύξηση στην τιμή της κρεατινίνης ορού κατά 2 mg/dl ή περισσότερο από την έναρξη της αγωγής και οφειλόμενη στο πολλαπλό μυέλωμα • υπεργλοιοίτητα οφειλόμενη στην παραπρωτεΐνη ορού
Υποτροπή από την πλήρη ανταπόκριση (να χρησιμοποιείται μόνο αν το τελικό αποτέλεσμα είναι η ελεύθερη νόσου επιβίωση)	<p>Παρουσία ενός ή παραπάνω από τα παρακάτω κριτήρια:</p> <ul style="list-style-type: none"> • επανεμφάνιση της παραπρωτεΐνης ορού ή ούρων με ανοσοκαθήλωση ή ηλεκτροφόρηση • εμφάνιση $\geq 5\%$ πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών • εμφάνιση οποιουδήποτε άλλου σημείου πρόοδου νόσου (πχ νέα πλασματοκυττώματα, οστεολυτικές αλλοιώσεις ή υπερασβεστιαμία)
Υποτροπή από αρνητική ελάχιστη υπολειπόμενη νόσο - MRD (να χρησιμοποιείται μόνο αν το τελικό αποτέλεσμα είναι η ελεύθερη νόσου επιβίωση)	<p>Παρουσία ενός ή παραπάνω από τα παρακάτω κριτήρια:</p> <ul style="list-style-type: none"> • απώλεια της αρνητικής ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου – MRD (στοιχεία κλωνικών πλασματοκυττάρων στο next generation flow ή στο next generation sequencing ή απεικονιστική εξέταση θετική για υποτροπή του μυελώματος) • επανεμφάνιση της παραπρωτεΐνης ορού ή ούρων με ανοσοκαθήλωση ή ηλεκτροφόρηση • εμφάνιση $\geq 5\%$ πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών • εμφάνιση οποιουδήποτε άλλου σημείου πρόοδου νόσου (πχ νέα πλασματοκυττώματα, οστεολυτικές αλλοιώσεις ή υπερασβεστιαμία)

Πίνακας 4: Κλασικά κριτήρια ανταπόκρισης της διεθνούς ομάδας εργασίας (IMWG) για το πολλαπλό μυέλωμα. (82)

Παρατεταμένα MRD αρνητική νόσος	MRD αρνητική νόσος στο μυελό είτε με NGS ή NGF και απεικονιστική MRD όπως ορίζεται παρακάτω, επιβεβαιωμένη με τουλάχιστον 1 χρόνο διαφορά. Περαιτέρω εκτιμήσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προσδιορίσουν τη διάρκεια της αρνητικής MRD
MRD αρνητική νόσος στην κυτταρομετρία ροής	Απουσία φαινοτυπικά ανώμαλων κλωνικών πλασματοκυττάρων με τη χρήση NGF σε δείγματα μυελού των οστών χρησιμοποιώντας την τεχνική που ορίζεται από τη EuroFlow για τον προσδιορισμό της MRD στο ΠΜ με ελάχιστη ευαισθησία 1 στα 10 ⁵ εμπύρνηνα κύτταρα ή περισσότερο.
MRD αρνητική νόσος χρησιμοποιώντας αλληλούχιση νέας γενιάς	Απουσία κλωνικών πλασματοκυττάρων με τη χρήση NGS σε δείγματα μυελού των οστών, όπου η παρουσία κλώνου ορίζεται ως λιγότερες από δύο ταυτόσημες αναγνώσεις αλληλούχισης μετά από αλληλούχιση DNA δειγμάτων μυελού των οστών χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα LymphoSIGHT με ελάχιστη ευαισθησία 1 στα 10 ⁵ εμπύρνηνα κύτταρα ή περισσότερο.
MRD αρνητική νόσος σε ασθενείς με θετική απεικόνιση στην έναρξη	Αρνητική MRD με τη χρήση NGS ή NGF και εξαφάνιση κάθε μεταβολικά ενεργού εστίας σε σχέση με προηγούμενα PET/CT ή μείωση του SUV σε λιγότερο από τη δεξαμενή αίματος του μεσοθωρακίου ή σε λιγότερο από τους γύρω φυσιολογικούς ιστούς.

Πίνακας 5: MRD κριτήρια ανταπόκρισης της διεθνούς ομάδας εργασίας για το ΠΜ (προαπαιτείται πλήρης ανταπόκριση), MRD: ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος, NGS: αλληλούχιση νέας γενιάς, NGF: κυτταρομετρία ροής νέας γενιάς, SUV: τυποποιημένη τιμή πρόσληψης

1.8 Θεραπεία του ΠΜ

Η θεραπεία του ΠΜ βασίζεται κυρίως στη χρήση συνδυασμού φαρμάκων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, ενώ πολύ σημαντική για τη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων είναι η κατάταξη των ασθενών σε υποψήφιους ή μη για αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Παλαιότερα, η θεραπεία βασιζόταν αποκλειστικά σε κλασικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Την τελευταία 20ετία, η ραγδαία εξέλιξη στη θεραπευτική του ΠΜ έχει προσθέσει στη φαρέτρα μας μια πληθώρα νέων επιλογών που έχουν οδηγήσει σε σημαντική βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών. Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά οι κατηγορίες φαρμάκων και τα θεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του ΠΜ.

1.8.1 Κατηγορίες φαρμάκων που έχουν ένδειξη για τη θεραπεία του ΠΜ

i. Κλασικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα

Στη θεραπεία του ΠΜ χρησιμοποιούνταν ανέκαθεν φάρμακα που ανήκουν στην κατηγορία των αλκυλιόντων παραγόντων. Ένα κλασικό τέτοιο φάρμακο είναι η μελφαλάνη. Η μελφαλάνη δρα προκαλώντας αλκυλίωση της γουανίνης και επάγει τη δημιουργία δεσμών μεταξύ κλώνων του DNA, εμποδίζοντας έτσι τον αναδιπλασιασμό του. Η κύρια θέση της μελφαλάνης στη θεραπεία του ΠΜ πλέον είναι ως μεγαθεραπεία πριν την αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών (ASCT) κυττάρων. Ακόμη, μπορεί να χορηγηθεί σε συνδυασμό με πρεδνιζόνη συν θαλιδομίδη ή βορτεζομίμη σε ασθενείς ακατάλληλους για αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Σχετικά με τις ανεπιθύμητες ενέργειες, σχετίζεται με μυελοκαταστολή, βλεννογονίτιδα σε μεγάλες δόσεις και δευτερεύουσες κακοήθειες (πχ λευχαιμίες).

Ένα ακόμη φάρμακο της κατηγορίας των αλκυλιόντων παραγόντων με σημαντική θέση στη θεραπεία του ΠΜ είναι η κυκλοφωσφαμίδη. Δρα δημιουργώντας διασταυρούμενες συνδέσεις μεταξύ των κλώνων του DNA οδηγώντας έτσι τα κύτταρα σε απόπτωση. Χρησιμοποιείται στο ΠΜ τόσο στην πρώτη γραμμή, όσο και στην υποτροπή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα. Ακόμη χρησιμοποιείται για την

κινητοποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων πριν τη συλλογή στην αυτόλογη μεταμόσχευση. Μπορεί να προκαλέσει και αυτή μυελοκαταστολή, λοιμώξεις και αιμορραγική κυστίτιδα και σε μεγάλες δόσεις πρέπει για το λόγο αυτό να συγχορηγείται με μέσνα.

Σπανιότερα, θέση στη θεραπεία του ΠΜ έχει η δοξορουβικίνη που ανήκει στην οικογένεια των ανθρακυκλινών. Είναι αναστολέας του ενζύμου τοποϊσομεράση II. Χορηγείται σε συνδυασμό με βορτεζομίμπη σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει το φάρμακο αυτό και έχουν λάβει μια τουλάχιστον γραμμή θεραπείας. Πέρα από την αιματολογική τοξικότητα υπάρχει συσχέτιση με σημαντική καρδιοτοξικότητα και η συνολική δόση δεν πρέπει να ξεπερνά τα 550 mg/m². (85)

ii. Κορτικοστεροειδή

Τα κορτικοστεροειδή αποτελούν ακρογωνιαίο λίθο στη θεραπεία του ΠΜ. Χρησιμοποιείται συνήθως η δεξαμεθαζόνη είτε ως ώση (υψηλές δόσεις για σύντομο διάστημα), είτε εβδομαδιαία σε υψηλή δόση σε όλα τα σχήματα, είτε αφορούν την πρώτη γραμμή, είτε αφορούν ασθενείς σε υποτροπή. Δε συνιστάται η χορήγηση κορτικοστεροειδών σε σχήματα συντήρησης λόγω της τοξικότητας που προέρχεται από τη μακροχρόνια χορήγησή τους. Η λίστα με τις ανεπιθύμητες ενέργειες των κορτικοστεροειδών είναι μακρά και περιλαμβάνει λοιμώξεις, εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη και οστεοπόρωσης, καταστολή του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης, ψυχιατρικές διαταράξεις, μυοπάθεια, εμφάνιση καταρράκτη, σύνδρομο Cushing και άλλα. (85)

iii. Ανοσοτροποποιητικά φάρμακα (IMiDs)

Η θαλιδομίδη είναι ένα από τα πρώτα ανοσοτροποποιητικά φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στο ΠΜ. Επιδρά πολλαπλώς στο ανοσοποιητικό σύστημα τροποποιώντας τις συνιστώσες του, ενισχύοντας την ανοσολογική επαγρύπνηση και τροποποιώντας το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών στο ΠΜ. (86) Η θαλιδομίδη διαταράσσει τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων του ΠΜ με τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών πχ εμποδίζοντας την παραγωγή ιντερλευκινών όπως IL-6, IL-1β, αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF) και αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) αναστέλλοντας έτσι

τον πολλαπλασιασμό των κακοήθων πλασματοκυττάρων. Επιπλέον, επιδρά στα T-λεμφοκύτταρα και μειώνει την παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF-α). (87) Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι τα ανοσοτροποποιητικά φάρμακα στοχεύουν την πρωτεΐνη cereblon, η οποία ανήκει σε ένα σύμπλεγμα της E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης. (88) Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδόμηση στο πρωτεάσωμα των πρωτεϊνών Ίκαρος (IKZF1) και Αίολος (IKZF3) που αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες με σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων του ΠΜ. (89) Είναι φάρμακο που χορηγείται από του στόματος και έχει θέση στην πρώτη γραμμή, αλλά και στην υποτροπή σε συνδυασμό μόνο με δεξαμεθαζόνη ή και με τρίτο φάρμακο άλλης κατηγορίας. Η θαλιδομίδη σχετίζεται με αυξημένο θρομβωτικό κίνδυνο, περιφερική νευροπάθεια συχνά μη αναστρέψιμη, και τερατογένεση.

Η λεναλιδομίδη ανήκει στην ίδια κατηγορία με τη θαλιδομίδη, αλλά είναι σημαντικά πιο ισχυρή και αποτελεσματική ως προς την ανοσοτροποποιητική της δράση. Όμοια με τη θαλιδομίδη εμποδίζει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, ενώ ακόμη εμποδίζει την προσκόλληση των κακοήθων πλασματοκυττάρων στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών μειώνοντας έτσι την παραγωγή IL-6 και TNF-α μέχρι και 50000 φορές περισσότερο από τη θαλιδομίδη. Η λεναλιδομίδη ενεργοποιεί σε πολύ πιο μεγάλο βαθμό από τη θαλιδομίδη τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων, ενώ επίσης ενεργοποιεί και τα κύτταρα φυσικούς φονείς. (90) Επιπλέον, η λεναλιδομίδη εμποδίζει την αγγειογένεση περίπου 3 φορές περισσότερο από τη θαλιδομίδη μειώνοντας την έκκριση VEGF και IL-6. (86, 87) Ομοίως με τη θαλιδομίδη, η λεναλιδομίδη δρα επίσης στοχεύοντας το cereblon. Αντίστοιχα με τη θαλιδομίδη χορηγείται από του στόματος και έχει θέση τόσο στην πρώτη γραμμή όσο και στην υποτροπή ως συστατικό πολλαπλών θεραπευτικών σχημάτων. Συγκριτικά με τη θαλιδομίδη ο κίνδυνος εμφάνισης νευροπάθειας είναι πολύ μικρός, ενώ ακόμη η λεναλιδομίδη σχετίζεται με αυξημένο θρομβωτικό κίνδυνο, γαστρεντερικές διαταραχές, εξάνθημα, μυελοκαταστολή, τερατογένεση και δευτερεύουσες πρωτοπαθείς κακοήθειες. Το φάρμακο παρουσιάζει νεφρική απέκκριση, οπότε χρειάζεται τροποποίηση δόσης σε νεφρική ανεπάρκεια.

Η πομαλιδομίδη, όπως και η λεναλιδομίδη δρα ενισχύοντας τη δράση των T-λεμφοκυττάρων και των κυττάρων φυσικών φονέων, αναστέλοντας την έκκριση

προφλεγμονωδών κυτταροκινών και ασκώντας αντιαγγειογενετική δράση. Δρα και αυτή στο cereblon με αποτέλεσμα την αποδόμηση στο πρωτεάσωμα των πρωτεϊνών Ίκαρος (IKZF1) και Αίολος (IKZF3), αλλά είναι πολύ πιο δραστική από τη λεναλιδομίδη και κατ' επέκταση από τη θαλιδομίδη. (91) Η πομαλιδομίδη χορηγείται μόνη της μαζί με δεξαμεθαζόνη ή σε συνδυασμό με φάρμακα άλλης κατηγορίας σε ασθενείς σε υποτροπή που έχουν λάβει ήδη βορτεζομίμη και λεναλιδομίδη. (92) Όπως και η λεναλιδομίδη, σχετίζεται με αιματολογική τοξικότητα, αυξημένο κίνδυνο θρομβοεμβολικών συμβαμάτων και τερατογένεση.

iv. Αναστολείς πρωτεασώματος

Η λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου στα φυσιολογικά κύτταρα έγκειται στην ανίχνευση ελαττωματικά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και στην προαγωγή της ουβικουιτίνωσης αυτών και της αποδόμησης στο πρωτεάσωμα. Στο πολλαπλό μυέλωμα οι μεγάλες ποσότητες ανοσοσφαιρίνης που παράγονται από τα μυελωματικά κύτταρα οδηγούν σε αυξημένο φορτίο πρωτεϊνών και επιβάρυνση του ενδοπλασματικού δικτύου. Οι αναστολείς πρωτεασώματος είναι μια σημαντική κατηγορία φαρμάκων στο ΠΜ, καθώς μπλοκάρουν το πρωτεάσωμα και κατ' επέκταση την αποδόμηση των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα αυξημένο στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο και απόπτωση των κακοήθων πλασματοκυττάρων. (93)

Η βορτεζομίμη είναι ο πρώτος αναστολέας πρωτεασώματος που εγκρίθηκε για το πολλαπλό μυέλωμα. Η εισαγωγή της βορτεζομίμης αποτέλεσε επανάσταση στη θεραπευτική του ΠΜ. (94, 95) Δρα αποτρέποντας την αποδόμηση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, οδηγώντας έτσι τα μυελωματικά κύτταρα σε απόπτωση. Ακόμη, η βορτεζομίμη μπλοκάρει την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του πυρηνικού παράγοντα κΒ (NF-κΒ) αποτρέποντας την αποδόμηση του αναστολέα του NFκΒ. Έτσι αναστέλλεται η ενεργοποίηση πολλαπλών αντι-αποπτωτικών γονιδίων. Η βορτεζομίμη οδηγεί ακόμη στην αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης NOXA, που αποτελεί μέλος της οικογένειας του BCL-2 (B cell lymphoma 2) με προ-αποπτωτική δράση. (96) Επιπλέον, αναστέλλει την οστεοκλαστική και επάγει την οστεοβλαστική δραστηριότητα οδηγώντας σε αυξημένη οστεογένεση. (97) Η αναστολή του πρωτεασώματος από την βορτεζομίμη είναι αντιστρεπτή. Πρόκειται για φάρμακο με ένδειξη τόσο σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΠΜ, όσο

και στην υποτροπή. Σχετικά με το προφίλ ασφαλείας του φαρμάκου, το οποίο πλέον χορηγείται με υποδόρια έγχυση, σχετίζεται με περιφερική νευροπάθεια, δυσκοιλιότητα, υπόταση, ενώ όσον αφορά την αιματολογική τοξικότητα σχετίζεται με θρομβοπενία.

Η καρφιλζομίμη είναι ένας αναστολέας πρωτεασώματος νέας γενιάς που συνδέεται μη αντιστρεπτά με το πρωτεάσωμα και το ανοσοπρωτεάσωμα και οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού και επαγωγή της απόπτωσης σε μυελωματικά κύτταρα ασθενών με νόσο ανθεκτική στη βορτεζομίμη. (98) Η καρφιλζομίμη έλαβε έγκριση ως μονοθεραπεία στηριζόμενη σε κλινικές μελέτες που ανέδειξαν καλύτερα ποσοστά ανταπόκρισης σε ασθενείς με ανθεκτική ή υποτροπιάζουσα νόσο (99), ενώ ακόμη ο συνδυασμός της με λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη ή και μόνο δεξαμεθαζόνη εγκρίθηκε μετά από δεδομένα μελετών που ανέδειξαν μεγαλύτερο διάστημα επιβίωσης ελεύθερης προόδου νόσου σε ασθενείς που είχαν υποτροπιάσει σε προηγούμενες γραμμές θεραπείας σε σύγκριση με θεραπευτικά σχήματα αναφοράς. (100, 101) Τελευταία, μελετάται και η θέση της στην πρώτη γραμμή θεραπείας του ΠΜ, δεδομένου ότι υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν καλή ανοχή και ασφάλεια αυτής σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς. (102) Η καρφιλζομίμη χορηγείται ενδοφλεβίως δις εβδομαδιαίως και σχετίζεται κυρίως με ανεπιθύμητες ενέργειες από το καρδιαγγειακό, όπως υπέρταση και καρδιακή ανεπάρκεια (103), ενώ υπάρχουν και αναφορές για συσχέτιση του φαρμάκου με νεφρική ανεπάρκεια και θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια. (104) Τέλος, το φάρμακο σχετίζεται ακόμη με αιματολογική τοξικότητα, ενώ εμφανίζει χαμηλά ποσοστά περιφερικής νευροπάθειας λόγω της εκλεκτικής του δράσης.

Η ιξαζομίμη είναι ο πρώτος από του στόματος αναστολέας πρωτεασώματος, και συνδέεται αντιστρεπτά με το πρωτεάσωμα. Η ιξαζομίμη επάγει την απόπτωση των μυελωματικών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των κασπασών, ενώ επίσης αποτρέπει την ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-κβ στα μεσεγγυματικά κύτταρα του μυελού των οστών, αίροντας έτσι την προστατευτική δράση αυτών στα κύτταρα του μυελού των οστών. Τέλος, αναστέλλει τη σχετιζόμενη με τα κακοήθη κύτταρα αγγειογένεση. (105) Σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική νόσο, η χορήγηση ιξαζομίμης σε συνδυασμό με λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη οδήγησε σε

μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερης προόδου νόσου επιβίωσης (PFS) συγκριτικά με τους ασθενείς που έλαβαν συνδυασμό λεναλιδομίδης με δεξαμεθαζόνη. (106) Η ιξαζομίμη χορηγείται στην υποτροπιάζουσα νόσο, αν και ο ρόλος της έχει μελετηθεί και στην πρώτη γραμμή θεραπείας. (107) Σχετικά με το προφίλ ασφαλείας της, σχετίζεται με αιματολογική τοξικότητα, γαστρεντερικές διαταραχές, εμφάνιση εξανθήματος και μικρότερη επίπτωση νευροπάθειας συγκριτικά με τη βορτεζομίμη.

v. Μονοκλωνικά αντισώματα

Τα μονοκλωνικά αντισώματα προσδένονται σε ειδικά αντιγόνα στην επιφάνεια των κυττάρων, στην εν λόγω περίπτωση των πλασματοκυττάρων, οδηγώντας τα στον κυτταρικό θάνατο. Ο θάνατος των κακοήθων κυττάρων είναι αποτέλεσμα κυτταρικής διαμεσολαβούμενης κυτταροτοξικότητας που εξαρτάται από αντισώματα (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC), εξαρτώμενης από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητας (complement-dependent cytotoxicity; CDC) και φαγοκυττάρωσης που εξαρτάται από αντισώματα (antibody-dependent cellular phagocytosis; ADCP). (108) Η δαρατουμουμάμη (daratumumab), η ισατουξιμάμη (isatuximab) και η ελοτουζουμάμη (elotuzumab) είναι τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του ΠΜ.

Η δαρατουμουμάμη είναι ένα πλήρως ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CD38, που αποτελεί δείκτη κυτταρικής επιφανείας που υπερεκφράζεται από τα πλασματοκύτταρα, και δρα με όλους τους μηχανισμούς μεσολαβούμενης από το ανοσοποιητικό σύστημα κυτταροτοξικότητας που αναφέρονται ανωτέρω. Επιπλέον, η δαρατουμουμάμη φαίνεται πως έχει και ανοσοτροποποιητικό ρόλο στοχεύοντας τα T-ρυθμιστικά και B-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα και τα μυελικής προέλευσης κατασταλτικά κύτταρα, μειώνοντας έτσι την ανοσοκατασταλτική τους δράση. (109) Η δαρατουμάμη χορηγείται ενδοφλεβίως ή υποδορίως και μπορεί να χορηγηθεί ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα νόσο ή στην πρώτη γραμμή θεραπείας. (110-113) Πρόκειται για φάρμακο με καλό προφίλ ασφαλείας με σημαντικότερες ανεπιθύμητες ενέργειες τις σχετιζόμενες με την έγχυση συστηματικές αντιδράσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρεμβάλλεται στις μεθόδους διασταύρωσης αίματος, οπότε πρέπει να χρησιμοποιούνται ειδικές μέθοδοι κατά τη μετάγγιση αίματος στους εν λόγω ασθενείς.

Η ισατουξιμάμπη είναι ένα χιμαιρικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CD38, το οποίο πέραν της ενεργοποίησης των κλασικών μηχανισμών κυτταρικού θανάτου των πλασματοκυττάρων που πραγματοποιούνται από τελεστές του ανοσοποιητικού συστήματος και αναλύονται ανωτέρω, επάγει άμεσα την απόπτωση στα πλασματοκύτταρα μέσω ενεργοποίησης κασπασών, αλλά και ενεργοποιώντας τον εξαρτώμενο από λυσοσώματα κυτταρικό θάνατο. (114) Το Isatuximab χορηγείται ενδοφλεβίως και έχει ένδειξη σε υποτραπιάζουσα νόσο, αν και ο ρόλος του μελετάται και στην πρώτη γραμμή θεραπείας. (115, 116) Το συγκεκριμένο φάρμακο παρουσιάζει παρόμοιο προφίλ ασφαλείας με τη δαρατουμουμάμπη.

Η ελοτουζουμάμπη είναι ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του SLAMF7, μιας γλυκοπρωτεΐνης που εκφράζεται στην επιφάνεια των πλασματοκυττάρων. Το εν λόγω μονοκλωνικό αντίσωμα συνδέεται με το SLAMF7 και ασκεί αντιμυελωματική δράση με το μηχανισμό της μεσολαβούμενης από κύτταρα φυσικούς φονείς κυτταροτοξικότητας που εξαρτάται από αντισώματα. Επιπλέον, φαίνεται ότι το SLAMF7 εκφράζεται και στην επιφάνεια των κυττάρων φυσικών φονέων και η σύνδεση της ελοτουζουμάμπης με αυτό ενισχύει την κυτταροτοξική τους δράση έναντι των μυελωματικών κυττάρων. (117) Επιπλέον, η ελοτουζουμάμπη φαίνεται να εμποδίζει την πρόσδεση των κακοήθων πλασματοκυττάρων στο στρώμα του μυελού των οστών. Το συγκεκριμένο μονοκλωνικό αντίσωμα χορηγείται ενδοφλεβίως και έχει ένδειξη στην υποτροπιάζουσα νόσο συγχρηγούμενο με ανοσοτροποποιητικό φάρμακο (λεναλιδομίδη ή πομαλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη). (118, 119) Αναφορικά με το προφίλ ασφαλείας είναι ανάλογο με τα λοιπά μονοκλωνικά αντισώματα και αποτελεί ένα καλά ανεκτό φάρμακο.

vi. Αναστολείς ιστονικών αποακετυλασών

Η πανομπινοστάτη δρα αναστέλλοντας την ενζυμική δραστηριότητα των ιστονικών αποακετυλασών. Τα συγκεκριμένα ένζυμα καταλύουν την αποακετυλίωση ιστονικών και μερικών μη ιστονικών πρωτεϊνών. Η αναστολή της δραστηριότητάς τους έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ακετυλίωση των ιστονών με αποτέλεσμα τη χαλαρότητα της χρωματίνης και τη μεταγραφική ενεργότητα. Αυτό οδηγεί σε αυξημένη έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων τα οποία είχαν αδρανοποιηθεί λόγω της ανώμαλης ακετυλίωσης των ιστονών στα κακοήθη πλασματοκύτταρα. (120) Η πανομπινοστάτη

χορηγείται από του στόματος και έχει ένδειξη στην υποτοπιάζουσα νόσο συγχωρηγούμενη με βορτεζομίμη και δεξαμεθαζόνη. (121) Σχετίζεται με αιματολογική, γαστρεντερική και καρδιαγγειακή τοξικότητα.

vii. Αναστολέας της εξπορτίνης

Η σελινεξόρη είναι ένας από του στόματος αναστολέας της εξπορτίνης 1 (XPO1), η οποία είναι υπεύθυνη για την εξαγωγή από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα πληθώρας πρωτεϊνών και RNA. Στα μυελωματικά κύτταρα παρατηρείται υπερέκφραση της εξπορτίνης 1 που οδηγεί σε αυξημένη μεταφορά ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών έξω από τον πυρήνα, επιτρέποντας στα κακοήθη κύτταρα να διαφύγουν από τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ακόμη, η εξπορτίνη 1 ευθύνεται για τη μεταφορά mRNA ογκοπρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα από όπου ευοδώνουν την εξέλιξη της κακοήθειας. Η σελινεξόρη είναι ο πρώτος εκλεκτικός αναστολέας της εξπορτίνης 1 που οδηγεί σε αναστολή της διαρροής των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών από τον πυρήνα και σε μείωση της μετάφρασης των mRNA των ογκοπρωτεϊνών. Έχει έγκριση για χορήγηση σε ασθενείς που έχουν λάβει τουλάχιστον τέσσερις προηγούμενες γραμμές θεραπείας και είναι ανθεκτικοί σε τουλάχιστον δύο αναστολείς πρωτεασώματος, δύο ανοσοτροποποιητικά φάρμακα και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CD38. (122) Η σελινεξόρη σχετίζεται κυρίως με ανεπιθύμητες ενέργειες από το γαστρεντερικό και με αιματολογική τοξικότητα.

viii. Φάρμακα συζευγμένα με αντισώματα

Το αντιγόνο ωρίμανσης των B κυττάρων (BCMA ή TNFRSF17) είναι ένας υποδοχέας που εκφράζεται στην επιφάνεια των πλασματοκυττάρων, αλλά όχι στα «παρθένα» Β-λεμφοκύτταρα, ούτε τα κύτταρα μνήμης. Αποτελεί έτσι ένα ιδανικό μόριο στόχο για θεραπευτική στόχευση.(123) Το belantamab mafodotin είναι ένα αφουκοζυλιωμένο ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1k έναντι του BCMA, το οποίο είναι συζευγμένο μέσω ενός ανθεκτικού στις πρωτεάσες μαλεϊμιδοκαπροϋλικού συνδέσμου με το φάρμακο μονομεθυλαυριστατίνη F (MMAF). (124) Το belantamab mafodotin συνδέεται με το BCMA στην επιφάνεια του κυττάρου και εν συνεχεία εισέρχεται στο καρκινικό κύτταρο και ο κυτταροτοξικός παράγοντας

απελευθερώνεται, διαταράσσοντας το δίκτυο των μικροσωληνίσκων και οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση. Επιπλέον, το αντίσωμα επάγει την καταστροφή των πλασματοκυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της εξαρτώμενης από αντίσωμα κυτταρικής μεσολαβούμενης κυτταροτοξικότητας και φαγοκυττάρωσης. Ακόμη, η επαγόμενη από το φάρμακο απόπτωση σχετίζεται με δείκτες ανοσογενούς κυτταρικού θανάτου που ενδέχεται να συνεισφέρουν σε επίκτητη ανοσολογική απόκριση έναντι των κακοήθων πλασματοκυττάρων. (124, 125) Το συγκεκριμένο φάρμακο χορηγείται ενδοφλεβίως ως μονοθεραπεία και έχει ένδειξη στην υποτροπή της νόσου σε ασθενείς με ΠΜ που έχουν λάβει τουλάχιστον τέσσερις προηγούμενες γραμμές θεραπείας και είναι ανθεκτικοί σε τουλάχιστον έναν αναστολέα πρωτεασώματος, ένα ανοσοτροποποιητικό φάρμακο και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CD38. Από τις ανεπιθύμητες ενέργειες αναφέρεται οφθαλμική τοξικότητα με τη μορφή κερατοπάθειας, μειωμένη οπτική οξύτητα, καθώς και θρομβοπενία και εμβρυομητρική τοξικότητα.

ix. CAR T-cells (Chimeric Antigen Receptor T-cells)

Τα CAR T-cells είναι γενετικά τροποποιημένα T-λεμφοκύτταρα του ασθενούς που φέρουν συνθετικό υποδοχέα έναντι αντιγόνου επιφανείας των κακοήθων κυττάρων. Τα T-λεμφοκύτταρα συλλέγονται από τον ασθενή με τη διαδικασία της λευκαφαίρεσης και εν συνεχεία τροποποιούνται γενετικά μέσω ενός συστήματος μεταφοράς γονιδίων με τη χρήση ιού ή άλλων μη βασιζόμενων σε ιούς τεχνολογιών. Όταν τα λεμφοκύτταρα αυτά, τα οποία εκφράζουν τον χιμαιρικό υποδοχέα έναντι του αντιγόνου-στόχου, χορηγηθούν στον ασθενή, συνδέονται με το αντιγόνο στην επιφάνεια των κακοήθων κυττάρων και ενεργοποιούν μια αλληλουχία κυτταροτοξικών σημάτων που οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση. Η μεγάλη επιτυχία των CAR T-cells που στοχεύουν το CD19 στη θεραπεία ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες προερχόμενες από τα B λεμφοκύτταρα, όπως η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα B-κύτταρα οδήγησε στο να μελετηθεί η θέση αυτών στη θεραπεία και άλλων αιματολογικών κακοηθειών. (126, 127) Στο πολλαπλό μύελωμα το πιο ευρέως μελετημένο μόριο στόχος είναι το BCMA για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω, αν και είναι υπό εξέλιξη κλινικές μελέτες που ερευνούν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια CAR T-cells με άλλους στόχους

όπως το SLAMF7, το CD38 και το CD138. (128) Το πρώτο φάρμακο αυτής της κατηγορίας που εγκρίθηκε στο ΠΜ είναι το idecabtagene vicleucel. Πρόκειται για CAR-T έναντι του BCMA με θεαματικά αποτελέσματα σε ασθενείς με νόσο σε πολλαπλή υποτροπή. (129) Έχει ένδειξη σε ασθενείς με ανθεκτικό ή υποτραπιάζον ΠΜ μετά από τουλάχιστον τέσσερις γραμμές θεραπείας συμπεριλαμβανομένου ενός αναστολέα πρωτεασώματος, ενός ανοσοτροποποιητικού φαρμάκου και ενός μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του CD38. Σχετικά με τις τοξικότητες της θεραπείας, σχετίζεται με άλλοτε άλλης βαρύτητας σύνδρομο απελευθέρωσης κυτταροκινών και με νευρολογική τοξικότητα, καθώς και αιματολογική τοξικότητα. Οι ασθενείς παρακολουθούνται εντατικά μετά την έγχυση του φαρμάκου για τουλάχιστον δέκα ημέρες για την πιθανότητα εμφάνισης συνδρόμου απελευθέρωσης κυτταροκινών.

1.8.2 Ασυμπτωματικό ΠΜ

Μέχρι στιγμής καμία θεραπεία δεν έχει λάβει έγκριση στο ΑΠΜ και οι ασθενείς τίθενται σε τακτική παρακολούθηση. Ενώ για το χαμηλού ρίσκου ΑΠΜ φαίνεται ότι δε χρειάζεται άμεσα έναρξη θεραπείας, τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στη διερεύνηση της ανάγκης πρώιμης έναρξης θεραπείας σε ασθενείς με ΑΠΜ ενδιάμεσου και κυρίως υψηλού ρίσκου, όπως ορίζεται από τους Lakshman και συνεργάτες. (130) Στους ασθενείς αυτούς λοιπόν, τα αποτελέσματα δύο τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών φάσης III έδειξαν ότι η λεναλιδομίδη σχετίζεται με παράταση του PFS. (131, 132) Ακόμη, ενθαρρυντικά αποτελέσματα έχουν παρουσιάσει και μελέτες φάσης II που μελετούν το ρόλο μονοκλωνικών αντισωμάτων στη θεραπεία αυτής της κατηγορίας ασθενών. (133) Συνιστάται οι ασθενείς με υψηλού ρίσκου ΑΠΜ να ενθαρρύνονται να συμμετάσχουν σε κλινικές μελέτες φάσης III που θα αναδείξουν την κατάλληλη θεραπεία που θα παράσχει πλεονέκτημα επιβίωσης στους ασθενείς αυτούς.

1.8.3 Νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς που πληρούν τα κριτήρια για αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Σε νέους ασθενείς (ηλικία < 70 ετών) χωρίς συννοσηρότητες και σε καλή γενική κατάσταση, η ενδεδειγμένη θεραπεία είναι η εισαγωγική θεραπεία που

ακολουθείται από megaθεραπεία με μελφαλάνη και αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και εν συνεχεία αγωγή συντήρησης με λεναλιδομίδη. Η επιλογή της αυτόλογης μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στην πρώτη ύφεση, στην εποχή των νεότερων θεραπειών για το ΠΜ, υποστηρίζεται από δύο πρόσφατες κλινικές μελέτες φάσης III. Η πρώτη εξ αυτών συμπεριέλαβε 700 ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν εισαγωγική θεραπεία με 3 κύκλους βορτεζομίμπη, λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη (VRd) και μετά θεραπεία εδραίωσης είτε με 5 ακόμη κύκλους VRd ή megaθεραπεία με μελφαλάνη και αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ακολουθούμενη από 2 επιπλέον κύκλους VRd. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν εν συνεχεία θεραπεία συντήρησης με λεναλιδομίδη για 1 έτος. Μετά από διάμεσο χρόνο παρακολούθησης 44 μηνών, στο σκέλος του VRd, και 43 μηνών στο σκέλος της αυτόλογης μεταμόσχευσης, το διάμεσο PFS ήταν μεγαλύτερο για τους ασθενείς που υπεβλήθησαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση (50 έναντι 36 μηνών, $p < 0.001$). Η διαφορά στην επιβίωση διατηρήθηκε σε όλες τις υποκατηγορίες των ασθενών, ακόμη και σε αυτούς με υψηλού ρίσκου ΠΜ. Το OS στην 4ετία δε διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων. (134) Η δεύτερη μελέτη διεξήχθη από το Ευρωπαϊκό Δίκτυο για το Μυέλωμα (European Myeloma Network; EMN) και συμπεριέλαβε 1503 ασθενείς οι οποίοι έλαβαν εισαγωγική θεραπεία με 3-4 κύκλους βορτεζομίμπη, κυκλοφωσφαμίδη και δεξαμεθαζόνη (VCD) και μετά τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν είτε βορτεζομίμπη, μελφαλάνη και πρεδνιζόνη (VMP) ή αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Εν συνεχεία τυχαιοποιήθηκαν δεύτερη φορά για το αν θα λάβουν αγωγή εδραίωσης με 2 κύκλους VRd ή όχι. Και τα δύο σκέλη έλαβαν θεραπεία συντήρησης με λεναλιδομίδη μέχρι προόδου νόσου ή σημαντικής τοξικότητας. Με μία διάμεση παρακολούθηση 60.3 μηνών, το διάμεσο PFS ήταν μεγαλύτερο για το σκέλος της αυτόλογης μεταμόσχευσης (56.7 μήνες έναντι 41.9 μηνών, $p = 0.0001$). (135)

Αναφορικά με το σχήμα της εισαγωγικής θεραπείας, χρησιμοποιείται μια τριπλέτα φαρμάκων που περιέχει τουλάχιστον βορτεζομίμπη και δεξαμεθαζόνη. (136) Ο συνδυασμός βορτεζομίμπης με θαλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη (VTD) είχε ως αποτέλεσμα καλύτερα ποσοστά ανταπόκρισης σε σχέση με το συνδυασμό

βορτεζομίμπης, κυκλοφωσφαμίδης και δεξαμεθαζόνης (VCD). (137) Σε μελέτες με ένα σκέλος ασθενών, ο συνδυασμός βορτεζομίμπη, λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη (VRd) είχε ως αποτέλεσμα σε μεγάλο ποσοστό ανταποκρίσεις τουλάχιστον ίσες με VGPR και μεγαλύτερες, ενώ συσχετίστηκε και με παρατεταμένο PFS. (138, 139) Δυστυχώς δεν υπάρχει μελέτη που να συγκρίνει απευθείας το VTD με το VRd ως εισαγωγική θεραπεία. Υπάρχει μόνο μια ολοκληρωμένη ανάλυση τριών τυχαιοποιημένων μελετών που δείχνει ότι το VRd ως εισαγωγική θεραπεία έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερα ποσοστά VGPR και αρνητικού MRD συγκριτικά με το VTD. (140) Τελευταία, δεδομένα που υποστηρίζουν την εισαγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων και ειδικά της δαρατουμουμάμπης στην πρώτη γραμμή θεραπείας έχουν αλλάξει τα δεδομένα στην αντιμετώπιση αυτής της ομάδας των ασθενών. Η φάσης III τυχαιοποιημένη μελέτη CASSIOPEIA σύγκρινε δύο ομάδες ασθενών που έλαβαν εισαγωγική θεραπεία οι μεν με βορτεζομίμπη, θαλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη (VTD), οι δε με VTD και δαρατουμουμάμπη (DaraVTD) και ακολούθως υπεβλήθησαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση, θεραπεία εδραίωσης και θεραπεία συντήρησης. Το PFS στους 18 μήνες έδειξε υπεροχή του DaraVTD έναντι του VTD (93% έναντι του 85%, $P < 0.0001$). (141) Ο συνδυασμός της δαρατουμουμάμπης με το VRd είχε ακόμη καλύτερα αποτελέσματα όπως φάνηκε από τη μελέτη GRIFFIN, όπου οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 4 κύκλους VRd ή DaraVRd και ακολούθως αυτόλογη μεταμόσχευση. Εν συνεχεία, οι ασθενείς έλαβαν θεραπεία εδραίωσης με VRd ή DaraVRd και συντήρηση με λεναλιδομίδη ± δαρατουμουμάμπη (26 κύκλοι). Στη μελέτη αυτή τα ποσοστά του PFS στους 24 μήνες ήταν 95.8 % για το DaraVRd έναντι 89.8% για το VRd. (142) Η αντικατάσταση της βορτεζομίμπης με καρφιλζομίμπη σε συνδυασμό με λεναλιδομίδη είχε ως αποτέλεσμα υψηλά ποσοστά MRD αρνητικότητας ακόμη και σε ασθενείς με υψηλού ρίσκου μύελωμα. (143) Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει μελέτη που να συγκρίνει απευθείας το VRd με το KRd (καρφιλζομίμπη, λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη) ως εισαγωγική θεραπεία. Η Ευρωπαϊκή Εταιρία Παθολογικής Ογκολογίας (European Society for Medical Oncology; ESMO) συνιστά ως πρώτη επιλογή για εισαγωγική θεραπεία, μεταξύ των τριπλετών, το VRd που φαίνεται να χαρακτηρίζεται από το καλύτερο προφίλ ανοχής και αποτελεσματικότητας [II,B], και μεταξύ των τετραπλών σχημάτων, το DaraVTD [I,A], το οποίο έχει εγκριθεί πρόσφατα στην Ευρώπη και αλλάζει τα δεδομένα στην

αντιμετώπιση αυτών των ασθενών. (81) Ως εναλλακτικές σε περίπτωση μη διαθεσιμότητας προτείνονται τα σχήματα VTD [I,A] και VCD [II,B].

Το σχήμα προετοιμασίας για αυτόλογη μεταμόσχευση είναι διαχρόνικα η υψηλή δόση μελφαλάνης (μεγαθεραπεία) σε δόση 200 mg/m². Προσθήκες άλλων φαρμάκων στη μεγαθεραπεία με μελφαλάνη που έχουν μελετηθεί αύξησαν την τοξικότητα χωρίς να προσδώσουν όφελος επιβίωσης. (144, 145)

Αναφορικά με τη θεραπεία εδραίωσης, δεν αποτελεί έως σήμερα καθιερωμένη πρακτική. Η μελέτη EMN02/HO95 έδειξε ότι η θεραπεία εδραίωσης με VRd επέκτεινε το PFS συγκριτικά με τη μη χορήγηση θεραπείας εδραίωσης. Είναι σημαντικό όμως να αναφέρουμε ότι στη μελέτη αυτή είχαν χρησιμοποιηθεί ως εισαγωγική θεραπεία 4 κύκλοι VCD και όχι τα σχήματα που αποτελούν σήμερα πρώτη επιλογή. (135) Αναφορικά με τη δεύτερη διαδοχική προγραμματισμένη αυτόλογη μεταμόσχευση, φαίνεται ότι οι ασθενείς υψηλού ρισκού, που εμφανίζουν κακά κυτταρογενετικά είναι αυτοί που επωφελούνται περισσότερο. (146)

Η θεραπεία συντήρησης με λεναλιδομίδη μετά την αυτόλογη μεταμόσχευση αποτελεί θεραπεία εκλογής για όλους τους ασθενείς με ΠΜ [I,A]. Η λεναλιδομίδη ως θεραπεία συντήρησης προσφέρει όφελος ως προς το PFS και το OS με βάση μεγάλες τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες. (147, 148) Αποτελεί θεραπεία εγκεκριμένη στην Ευρωπαϊκή Ένωση για όλους τους ασθενείς με ΠΜ μετά την αυτόλογη μεταμόσχευση μέχρι προόδου νόσου. Οι αναστολείς πρωτεασώματος βορτεζομίμη και ιξαζομίμη έχουν επίσης μελετηθεί ως θεραπεία συντήρησης με ικανοποιητικά αποτελέσματα, αλλά ακόμη δεν αποτελούν εγκεκριμένη θεραπεία. (149, 150)

1.8.4 Ηλικιωμένοι ασθενείς ή ασθενείς με νεοδιαγνωσθέν ΠΜ που δεν πληρούν τα κριτήρια για αυτόλογη μεταμόσχευση αχέγων αιμοποιητικών κυττάρων

Τα σχήματα βορτεζομίμη, μελφαλάνη, πρεδνιζόνη (VMP) και λεναλιδομίδη, δεξαμεθαζόνη (Rd) αποτελούσαν παλαιότερα θεραπεία εκλογής για αυτή την κατηγορία ασθενών. Έκτοτε, δεδομένα μεγάλων τυχαιοποιημένων μελετών φάσης III έχουν αλλάξει το σκηνικό. Η σύγκριση του σχήματος βορτεζομίμη, λεναλιδομίδη, δεξαμεθαζόνη (VRd) με το σχήμα λεναλιδομίδη, δεξαμεθαζόνη (Rd) σε μια από τις

μελέτες αυτές έδειξε υπεροχή του VRd τόσο όσον αφορά το PFS (διάμεσο PFS 41 έναντι 29 μηνών, $p=0.003$) όσο και το OS (διάμεσο OS δεν έχει επιτευχθεί για το VRd έναντι 69 μηνών για το Rd, $p=0.0114$). (151) Με βάση αυτά τα δεδομένα το VRd εγκρίθηκε για χορήγηση σε αυτή την ομάδα ασθενών από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency; EMA). Η προσθήκη του μονοκλωνικού αντισώματος δαρατουμουμάμπη στο VMP και το Rd δημιούργησε νέα δεδομένα στην πρώτη γραμμή θεραπείας αυτής της ομάδας ασθενών. Η μελέτη ALCYONE έδειξε υπεροχή του VMP έναντι του DaraVMP τόσο αναφορικά με το PFS, όσο και με το OS, ενώ η μελέτη MAIA έδειξε υπεροχή του DaraRd συγκριτικά με το Rd αναφορικά με το PFS. (152, 153) Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην έγκριση των σχημάτων αυτών τον Οκτώβριο του 2019. Η θεραπεία συντήρησης δεν είναι η συνήθης πρακτική σε αυτή την ομάδα ασθενών καθώς τα εγκεκριμένα σχήματα χορηγούνται συνήθως μέχρι την πρόοδο νόσου ή μέχρι να εμφανιστεί μη ανεκτή τοξικότητα. Παρόλα αυτά, η ιξαζομίμπη έχει μελετηθεί σε τυχαίοποιημένη μελέτη φάσης III σε σύγκριση με placebo ως θεραπεία συντήρησης σε ασθενείς ακατάλληλους για μεταμόσχευση και συσχετίστηκε με παράταση του PFS.(154)

1.8.5 Θεραπεία ασθενών με υποτροπιάζον και ανθεκτικό ΠΜ

Για τους ασθενείς που υποτροπιάζουν μετά την πρώτη γραμμή θεραπείας υπάρχουν αρκετές θεραπευτικές επιλογές στη φαρέτρα μας. Για εκείνους που υπεβλήθησαν στην πρώτη γραμμή θεραπείας σε αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και θεραπεία συντήρησης με λεναλιδομίδη και παρέμειναν σε ύφεση για ένα διάστημα ίσο ή μεγαλύτερο των 36 μηνών, η αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ως θεραπεία διάσωσης αποτελεί μια επίλογη. (81, 155) Για τους ασθενείς που στην πρώτη γραμμή θεραπείας έλαβαν ένα σχήμα βασισμένο στη βορτεζομίμπη χωρίς τη χορήγηση λεναλιδομίδης ή δαρατουμουμάμπης συνίσταται να λάβουν σχήμα βασισμένο στη λεναλιδομίδη, όπως καρφυλοζομίμπη, λεναλιδομίδη, δεξαμεθαζόνη (KRd), δαρατουμουμάμπη, λεναλιδομίδη, δεξαμεθαζόνη (DaraRd) ιξαζομίμπη, λεναλιδομίδη, δεξαμεθαζόνη (IRd) ή ελοτουζουμάμπη, λεναλιδομίδη, δεξαμεθαζόνη (EloRd). Ο συνδυασμός DaraRd προσφέρει το καλύτερο PFS σε αυτή την κατηγορία ασθενών (111), ενώ οι συνδυασμοί KRd, DaraRd, EloRd ανέδειξαν όφελος στην ολική επιβίωση σε σύγκριση

με το συνδυασμό Rd. (156-158) Για ασθενείς ανθεκτικούς στη λεναλιδομίδη συστήνεται η χορήγηση ενός από τα παρακάτω σχήματα: πομαλιδομίδη με βορτεζομίμη και δεξαμεθαζόνη (PomVd), δαρατουμουμάμη με καρφιλζομίμη και δεξαμεθαζόνη (DaraKd), ισατουξιμάμη με βορτεζομίμη και δεξαμεθαζόνη (IsaVd) ή δαρατουμουμάμη με βορτεζομίμη και δεξαμεθαζόνη (DaraVd). (159, 160) Η δαρατουμουμάμη με καρφιλζομίμη και δεξαμεθαζόνη έχει αναδείξει τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς το PFS σε αυτή την κατηγορία ασθενών. (161) Μια ακόμη επιλογή για ασθενείς ανθεκτικούς στη λεναλιδομίδη που εμφανίζουν τη διαμετάθεση t(11;14) και είναι ευαίσθητοι στους αναστολείς πρωτεασώματος αποτελεί το σχήμα βενετοκλάξη, βορτεζομίμη, δεξαμεθαζόνη. (162)

Η αντιμετώπιση ασθενών στην τρίτη και περαιτέρω γραμμή θεραπείας αποτελεί μια πρόκληση μετά την έγκριση των μονοκλωνικών αντισωμάτων στην πρώτη γραμμή και τις συνεχώς αυξανόμενες θεραπευτικές επιλογές. Για τους ασθενείς που έχουν εκτεθεί ή είναι ανθεκτικοί τόσο στη βορτεζομίμη, όσο και στη λεναλιδομίδη συστήνονται οι συνδυασμοί: δαρατουμουμάμη με καρφιλζομίμη ή πομαλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη, ισατουξιμάμη με πομαλιδομίδη ή καρφιλζομίμη και δεξαμεθαζόνη και ελοτουζουμάμη με πομαλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη. (163-165) Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω για τους ασθενείς στην πρώτη υποτροπή, και στην κατηγορία αυτή για ασθενείς που εμφανίζουν τη διαμετάθεση t(11;14) και είναι ανθεκτικοί στη λεναλιδομίδη, αλλά ευαίσθητοι στους αναστολείς πρωτεασώματος επιλογή αποτελεί το σχήμα βενετοκλάξη, βορτεζομίμη, δεξαμεθαζόνη.

Για τους ασθενείς που είναι ανθεκτικοί σε 3 κατηγορίες φαρμάκων (ανοσοτροποποιητικά, αναστολείς πρωτεασώματος και μονοκλωνικά αντισώματα), η σελινεξόρη με δεξαμεθαζόνη ή το belantamab mafodotin αποτελούν επιλογές. Η σελινεξόρη είναι ένας από του στόματος εκλεκτικός αναστολέας της εξπορτίνης. Το belantamab mafodotin είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με φάρμακο που στοχεύει τον αντιγόνο ωρίμανσης των B-κυττάρων (BCMA). (81)

1.9 Τα μη κωδικά RNAs

Μελέτες αλληλούχισης του γονιδιώματος έχουν αποδείξει ότι ένα μεγάλο ποσοστό αυτού είναι μεταβολικά ενεργό. Παρόλα αυτά, μόλις 3% αυτού κωδικοποιεί

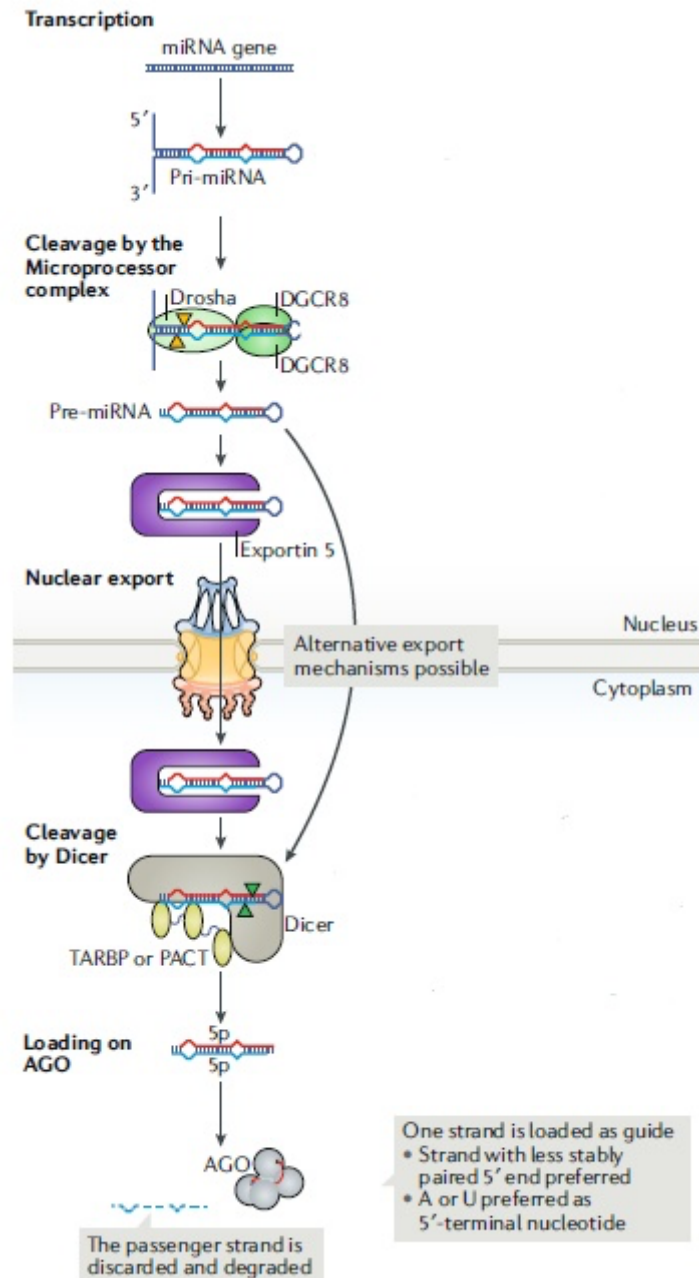
πρωτεΐνες, ενώ το υπόλοιπο δίνει γένεση στα μη κωδικά RNA (non coding RNAs). (166) Τα μη κωδικά RNA χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα δομικά και τα ρυθμιστικά. Τα δομικά μη κωδικά RNA είναι μια μεγάλη ομάδα μη κωδικών RNA απαραίτητων για τη λειτουργία του κυττάρου και περιλαμβάνει τα rRNAs (ribosomal RNAs), tRNAs (transfer RNAs), snoRNAs (small nucleolar RNAs), snRNAs (small nuclear RNAs). (167, 168) Η ανακάλυψη των ρυθμιστικών μη κωδικών RNA το 1990 άλλαξε τελείως την αντίληψη για τον λειτουργικό ρόλο των μορίων αυτών. (169) Τα μη κωδικά RNA διακρίνονται περαιτέρω βάσει μεγέθους στα μικρά μη κωδικά RNA (small non coding RNAs- snRNAs) με μέγεθος μικρότερο από 200 νουκλεοτίδια και τα μακρά μη κωδικά RNA (long non coding RNAs-lncRNAs) μεγέθους μεγαλύτερου των 200 νουκλεοτιδίων. (170, 171) Στα μικρά ρυθμιστικά μη κωδικά RNA συμπεριλαμβάνονται τα miRNAs, τα μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs), τα RNAs που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Piwi (piRNAs), καθώς και τα θραύσματα των tRNAs (tRFs). (168)

1.10 Τα miRNAs

Τα ώριμα miRNAs είναι μονόκλινα μόρια RNA μήκους ~22 νουκλεοτιδίων με ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων, τα οποία φαίνεται να είναι εξελικτικά διατηρημένα, καθώς απαντώνται σε μια πληθώρα οργανισμών. (172) Η πρώτη απόδειξη της ύπαρξης αυτών των μορίων ήταν τη δεκατία του 1990, όταν διαπιστώθηκε ότι στον *Caenorhabditis Elegans* (*C.Elegans*), το γονίδιο *lin-4* δεν παράγει κάποιο πεπτίδιο, αλλά δίνει γένεση σε ένα μικρό μονόκλινο RNA, το οποίο μάλιστα είναι συμπληρωματικό με την 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA γονιδίου *lin-14* και μειώνει την ποσότητα της παραγόμενης από αυτό πρωτεΐνης χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα του αντίστοιχου mRNA. (173, 174) 7 περίπου χρόνια μετά, το 2000, ανακαλύφθηκε στον ίδιο οργανισμό το δεύτερο miRNA, το μόριο *let-7*. (175) Τα miRNAs εμπλέκονται σε κάθε κυτταρική διαδικασία και είναι ουσιώδη για τη διαφοροποίηση και την ομοιοστάση των κυττάρων και την εξέλιξη των οργανισμών. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η εξάλειψη, σε προκλινικά μοντέλα ποντικών, των απαραίτητων για τη βιογένεση των miRNAs *Drosha* και *Dicer* ήταν θανατηφόρος για τα έμβρυα ποντικών. (176)

1.10.1 Βιογένεση των miRNAs

Η βιογένεση των miRNAs είναι μια διαδικασία αποτελούμενη από πολλά στάδια (Εικόνα 4). Η μεταγραφή των γονιδίων των miRNAs γίνεται κυρίως από την πολυμεράση II. (177) Η θέση των miRNAs στο γονιδίωμα είναι συνήθως εντός εσωνίων κωδικών ή μη κωδικών μεταγράφων, αλλά μπορούν να βρίσκονται και σε περιοχές εξωνίων. (178) Το αρχικό μετάγραφο ονομάζεται pri-miRNA (primary miRNA) και προκύπτει μετά από τη μεταγραφή του miRNA γονιδίου εντό του πυρήνα. Έχει μήκος αρκετών χιλιάδων βάσεων και μετά τη μεταγραφή του αναδιπλώνεται σχηματίζοντας φουρκέτα. Το pri-miRNA μπορεί να περιέχει ένα μόνο ώριμο μόριο miRNA ή ένα σύμπλεγμα (cluster) από σχετιζόμενα miRNAs. (179) Το πρόδρομο μόριο αποτελεί υπόστρωμα για την RNase Drosha (μέλος της οικογένειας RNase III), η οποία λειτουργεί συνεργατικά με την πρωτεΐνη DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) και δημιουργεί το σύμπλοκο επεξεργασίας των miRNAs. (180) Ειδικότερα, η Drosha αναγνωρίζει στη βάση της φουρκέτας το σημείο όπου ενώνεται το δίκλωνο με το μονόκλωνο RNA, ενώ η DGCR8 προσδένεται στο στέλεχος για να διασφαλίσει τη σωστή διατομή. (181) Η λειτουργία του συμπλόκου είναι σημαντική καθώς επιτρέπει στη Drosha να κόψει σωστά το πρόδρομο μόριο, ώστε να προκύψει το pre-miRNA (precursor miRNA) μήκους περίπου 70 νουκλεοτιδίων. Το μόριο pre-miRNA είναι μια φουρκέτα 70 νουκλεοτιδίων, στο 3' άκρο της οποίας δημιουργείται μια προεξοχή 2 νουκλεοτιδίων. Στο 5' άκρο υπάρχει μια φωσφορική ομάδα και στο 3' ένα υδροξύλιο, τυπικά ευρήματα προϊόντων RNase III. (182) Μόλις σχηματιστεί το πρόδρομο μόριο pre-miRNA, μεταφέρεται μέσω της εξπορτίνης 5 στο κυτταρόπλασμα. Η εξπορτίνη αναγνωρίζει τα μόρια pre-miRNA μέσω της προεξοχής στο 3' άκρο. (183) Στο κυτταρόπλασμα η Dicer (184), που αποτελεί ένζυμο της οικογένειας RNase III, προσδένει το pre-miRNA και το κόβει σε συγκεκριμένο για το είδος μήκος, δημιουργώντας ένα δίκλωνο miRNA με μια τυπική προεξοχή στο 3' άκρο. (185-187) Στα σπονδυλωτά, η λειτουργία της Dicer ρυθμίζεται από τις TARBP (TAR RNA-binding protein) και PACT (protein activator of the interferon- induced protein). (188, 189) Το δίκλωνο ώριμο μόριο miRNA που προκύπτει αποτελείται από ένα 5p κλώνο και ένα 3p κλώνο. Τέλος, ο οδηγός κλώνος του δίκλωνου μορίου miRNA προσδένεται σε μια πρωτεΐνη αργοναύτη (AGO), ενώ ο άλλος αποσυντίθεται. (190)

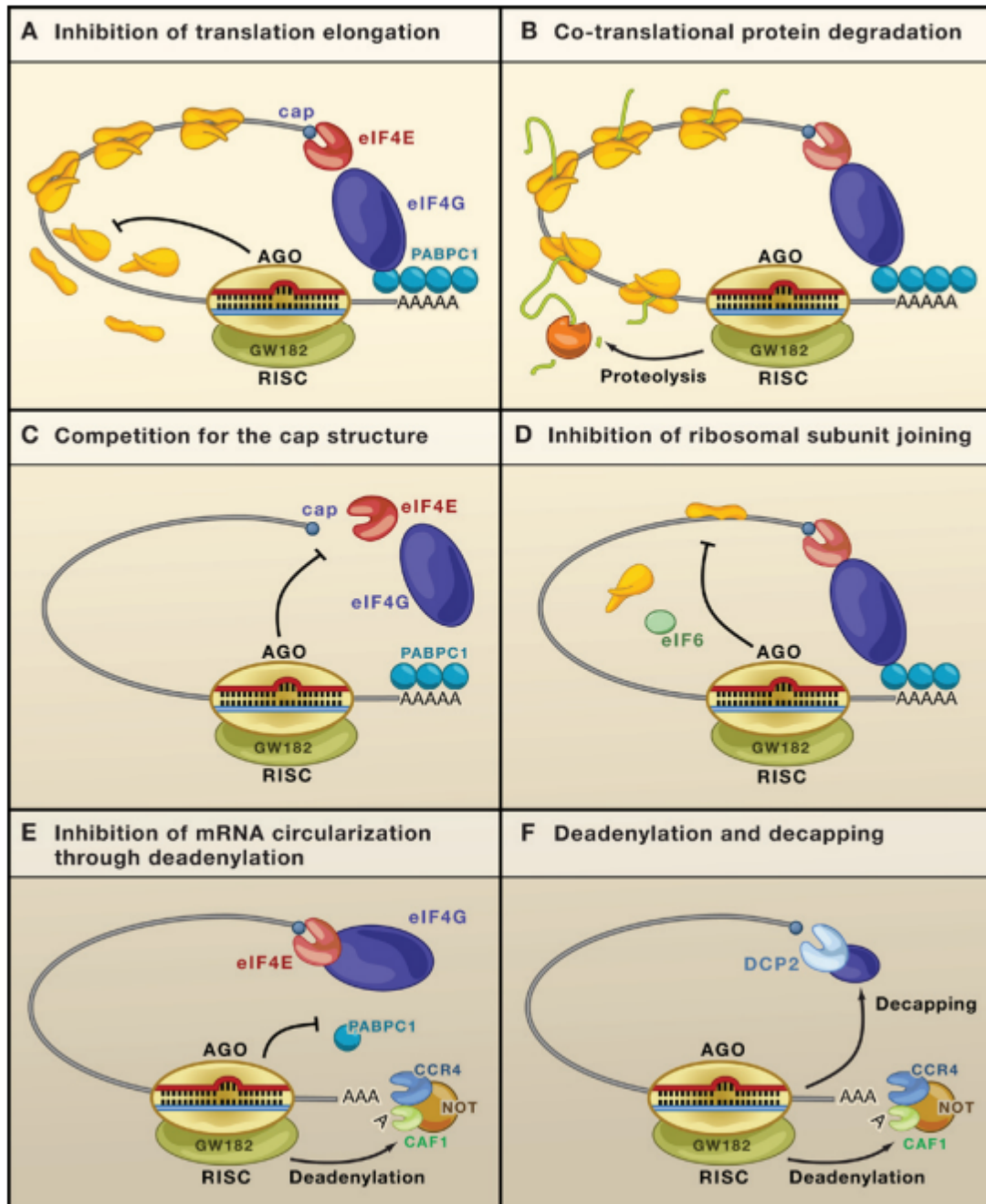


Εικόνα 4: Η βιογένεση των miRNAs είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων. Μεταγράφονται από την RNA πολυμέραση II ως πρόδρομα μόρια και εν συνεχεία υφίστανται επεξεργασία σε πολλαπλά επίπεδα. *Εικόνα τροποποιημένη από Gebert et al. 2019 (191)*

1.10.2 Λειτουργία και μηχανισμός δράσης των miRNAs

Τα miRNAs είναι ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης που βρίσκονται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Κάθε miRNA μπορεί να στοχεύει εκατοντάδες mRNAs,

και αντίστοιχα κάθε mRNA μπορεί να στοχεύεται από εκατοντάδες miRNAs. (192, 193) Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, το δίκλωνο ώριμο miRNA «φορτώνεται» σε ένα σύμπλεγμα που ονομάζεται RISC (RNA Induced Silencing Complex). Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες αποτελούν μέρος αυτού του συμπλέγματος και είναι σημαντικές για την τελική επεξεργασία σε μονόκλωνο miRNA, καθώς αυτές αποβάλλουν τον συμπληρωματικό κλώνο. Το σύμπλεγμα RISC ελέγχει τη μετάφραση του mRNA στόχου με το μηχανισμό της παρεμβολής του RNA (RNA interference). Το miRNA είναι αυτό που οδηγεί το RISC στο mRNA στόχο. Ακολουθως, το RISC ρυθμίζει την έκφραση του mRNA μέσω αποδόμησης του ή αναστολής της μετάφρασής του. Όσο μεγαλύτερο είναι το ταίριασμα των βάσεων μεταξύ miRNA και mRNA στόχου, τόσο πιθανότερο είναι να δράσει μέσω της αποδόμησης του mRNA. (194) Το RISC ανάζητα τις ομόλογες περιοχές στα mRNAs μέσω του miRNA του. Οι περιοχές αυτές βρίσκονται συνήθως στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA. Η αλληλουχία κλειδί, μέσω της οποίας το miRNA προσδέεται στο mRNA στόχο βρίσκεται στο 5' άκρο του από το νουκλεοτίδιο 2 ως 8 και ονομάζεται seed sequence. (193) Οι αλληλουχίες αυτές πρέπει να εμφανίζουν άριστο ταίριασμα βάσεων με τις ομόλογες περιοχές της 3' αμετάφραστης περιοχής του mRNA. Από τη στιγμή που θα πραγματοποιηθεί η πρόσδεση αυτή, υπάρχουν πολλοί πιθανοί μηχανισμοί που προκαλούν από παρεμπόδιση της μετάφρασης του mRNA μέχρι αποδόμηση αυτού. Το RISC μπορεί να παρεμποδίσει τη μετάφραση του mRNA στόχου μετά την έναρξη αυτής, παρεμποδίζοντας την επιμήκυνση του παραγόμενου πεπτιδίου ή προκαλώντας πρωτεόλυση αυτού. (195) Ακόμη, το RISC μπορεί να παρεμποδίσει την έναρξη της μετάφρασης με μια ποικιλία μεθόδων, όπως με την παρεμπόδιση της δημιουργίας του συμπλόκου του παράγοντα έναρξης eIF4E, την παρεμπόδιση της πρόσδεσης της μεγάλης υπομονάδας 60s του ριβοσώματος και την παρεμπόδιση της κυκλοποίησης του mRNA, εμποδίζοντας έτσι την πρόσδεση της πολυA ουράς στο cap του mRNA. (196) Τέλος, όπως προαναφέρθηκε, το RISC μπορεί να οδηγήσει σε αποδόμηση του mRNA μέσω διάσπασης του cap και της πολυA ουράς, καθιστώντας έτσι το μόριο ασταθές.



Εικόνα 5: Οι μηχανισμοί με τους οποίους πραγματοποιείται η επαγόμενη από τα miRNAs αναστολή της έκφρασης των γονιδίων. (A) Μηχανισμοί μετά την έναρξη της μετάφρασης. Τα miRNAs αναστέλλουν την επιμήκυνση της παραγόμενης πρωτεΐνης ή προκαλούν πρόωπη αποδέσμευση των υπομονάδων του ριβοσώματος. (B) Μηχανισμοί που δρουν παράλληλα με την έναρξη της μετάφρασης. Αποδόμηση της παραγόμενης πρωτεΐνης παράλληλα με τη μετάφραση αυτής. (C-E) Μηχανισμοί που παρεμποδίζουν την έναρξη της μετάφρασης. (F) Αποδόμηση του mRNA επαγόμενη από το RISC (RNA Induced Silencing Complex). *Εικόνα από Eulalio et al. 2008 (197)*

1.10.3 Ο ρόλος των miRNAs στις ανθρώπινες νεοπλασίες

Τα τελευταία χρόνια, η εκτενής έρευνα πάνω στο ρόλο των miRNAs κατέδειξε τον σημαντικό τους ρόλο σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική διαίρεση, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και ο κυτταρικός θάνατος. Δεδομένου του ρόλου τους στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, γρήγορα το ενδιαφέρον στράφηκε στη διερεύνηση του ρόλου των miRNAs στις νεοπλασίες. Η πρώτη ερευνητική απόδειξη της σχέσης της απορρύθμισης των miRNAs με την εμφάνιση κακοήθειας ήρθε το 2002 από τον Calin και τους συνεργάτες του. Η ερευνητική αυτή ομάδα είχε ως στόχο την ανάδειξη της παρουσίας ογκοκατασταλτικών γονιδίων στη χρωμοσωμική περιοχή 13q14, η οποία απαλείφεται συχνά στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ). Ανακάλυψαν ότι στη χρωμοσωμική αυτή περιοχή βρίσκεται η αλληλουχία που κωδικοποιεί τα miRNAs miR-15a και miR-16-1. Ακολούθως, ανέδειξαν ότι τα μόρια αυτά εξαλείφονται ή υποεκφράζονται στην πλειοψηφία των κλινικών περιπτώσεων με ΧΛΛ που μελετήθηκαν. (198) Περαιτέρω έρευνα ανέδειξε ότι τα συγκεκριμένα μόρια ασκούν ογκοκατασταλτική δράση καταστέλλοντας την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 στα Β λεμφοκύτταρα. (199) Η συγκεκριμένη ανακάλυψη πυροδότησε σημαντικό ενδιαφέρον και έστρεψε την επιστημονική κοινότητα στην αναζήτηση του ρόλου των miRNAs στις κακοήθειες. Μελέτες αλληλούχισης γονιδιώματος και προφίλ έκφρασης miRNA ανέδειξαν ότι η έκφραση των μορίων αυτών απορρυθμίζεται στις νεοπλασίες και πολλές φορές η γονιδιακή υπογραφή αυτών σχετίζεται με τη διάγνωση ή την πρόγνωση των ασθενών.

Έχει δειχθεί ότι τα miRNAs μπορούν να δρουν είτε ως ογκογονίδια ή ως ογκοκατασταλτικά γονίδια. Η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs στα καρκινικά κύτταρα είναι σε κάποιες περιπτώσεις αποτέλεσμα αλλαγής του αριθμού των αντιγράφων ή της θέσης των γονιδίων τους ως αποτέλεσμα απαλοιφής, ενίσχυσης ή διαμετάθεσης. Για παράδειγμα, στον καρκίνο του πνεύμονα, η χρωμοσωμική περιοχή 5q33 που περιλαμβάνει τα miRNA miR-143 και miR-145 συχνά απαλείφεται, οδηγώντας σε υποέκφραση των μορίων αυτών. (200) Αντιθέτως η ομάδα γονιδίων miR17-92 ενισχύεται σε μια σειρά κακοηθειών όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, τα Β λεμφώματα και η οξεία Τ λεμφοβλαστική λευχαιμία. (201-203) Σε άλλες περιπτώσεις,

η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs στα καρκινικά κύτταρα είναι αποτέλεσμα της απορρύθμισης κάποιων μεταγραφικών παραγόντων κλειδιά, όπως το p53. Το c-Myc για παράδειγμα έχει δείξει ότι ασκεί την ογκογόνο δράση του ενισχύοντας τη μεταγραφή του ογκογόνου miR17-92 cluster ή καταστέλλοντας τη μεταγραφή μιας σειράς ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως τα miR-15a, miR-26, miR-29, miR-30 και το let-7. (204, 205) Η έκφραση των miRNAs υπόκειται επίσης σε έλεγχο μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων, όπως ισχύει και για τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Έτσι για παράδειγμα, η υπερμεθυλίωση κάποιων ογκοκατασταλτικών miRNA μορίων, όπως τα miR-148a και miR-34b/c παρατηρείται σε σειρές καρκινικών κυττάρων, και η αποκατάσταση της έκφρασης αυτών φαίνεται να σχετίζεται με μειωμένη αύξηση του όγκου και αναστολή της εμφάνισης μεταστάσεων in vivo. (206) Τέλος, η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs στις νεοπλασίες είναι σε κάποιες περιπτώσεις αποτέλεσμα σφαλμάτων σε ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία σύνθεσης των μορίων αυτών. Για παράδειγμα, τα χαμηλότερα επίπεδα mRNA του ενζύμου Dicer, και επομένως τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του let-7 συσχετίστηκαν με δυσμενή πρόγνωση μετεγχειρητικά σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα. (207)

1.11 Τα tRFs

1.11.1 Τα μεταφορικά RNAs (tRNAs)

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, τα μεταφορικά RNAs (tRNAs) μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση III ως πρώιμα-tRNA στον πυρήνα. Ακολούθως, υφίστανται εκτεταμένη μεταμεταγραφική τροποποίηση από τις ενδονουκλεάσες RNάση P και Z. (208, 209) Τα πρώιμα μόρια tRNA υφίστανται μια σειρά τροποποιήσεων, όπως η αφαίρεση του 5' οδηγού και της 3' ουράς, η τροποποίηση νουκλεοτιδίων, η συρραφή, η προσθήκη της 3'-CCA ουράς και η αμινοακυλίωση. (210)

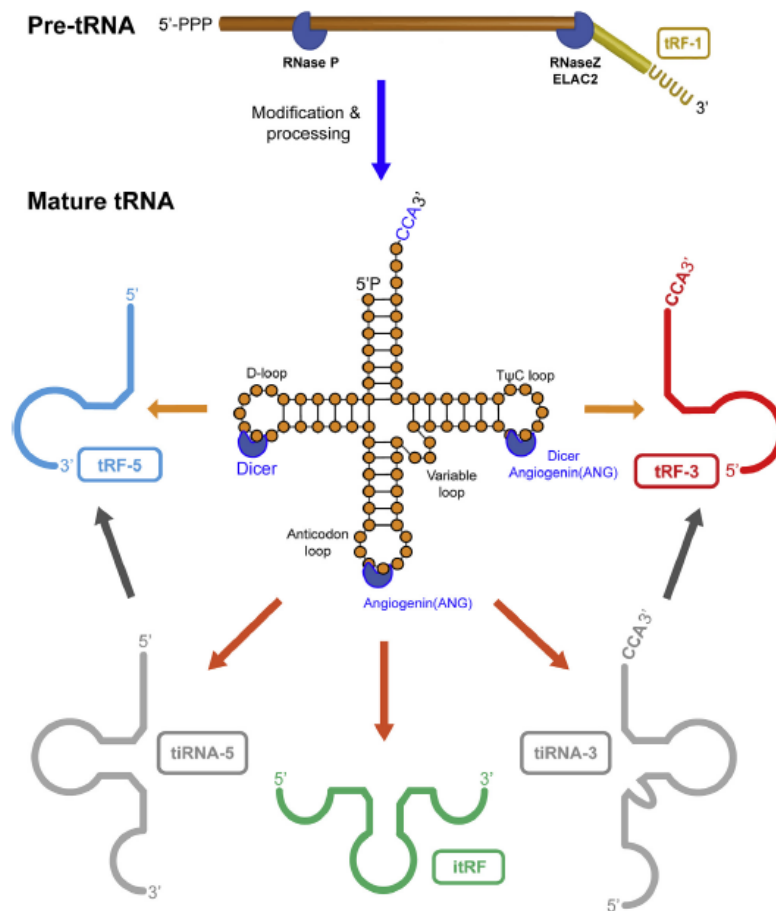
Ένα ορθά αναδιπλωμένο tRNA, έχει 3 διακριτούς βρόγχους, τον βρόγχο D, τον βρόγχο αντικωδικονίου και τον βρόγχο T. Τα tRNA έχουν μήκος 73-90 νουκλεοτίδια και η παλαιότερη και πλέον διατηρημένη λειτουργία τους είναι να δρουν ως μεσολαβητές κατά την πρωτεϊνική σύνθεση. (211)

1.11.2 Βιογένεση θραυσμάτων των tRNA (tRNA fragments; tRFs)

Τα tRFs ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, τα tRNA μισά (tRNA halves ή tiRNAs), και τα μικρά θραύσματα RNA προερχόμενα από tRNA (tRFs). Τα tiRNAs έχουν μήκος 30-40 νουκλεοτίδια. Είναι αποτέλεσμα αποκοπής στον βρόγχο αντικωδικονίου του ώριμου tRNA και διακρίνονται σε 5' tRNA halves και 3' tRNA halves ανάλογα με το πιο άκρο περιλαμβάνουν. (212) Παράγονται από την επαγόμενη από το στρες διάσπαση του tRNA, η οποία πραγματοποιείται σε συνθήκες υποσιτισμού, υποξίας, οξειδωτικού στρες, υπερθερμίας και έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία. (213, 214) Υπάρχουν 4 είδη tRFs με βάση το σημείο αποκοπής του ώριμου ή πρόδρομου tRNA μεταγράφου. Τα προερχόμενα από ώριμα tRNA μόρια tRFs έχουν μήκος 14-30 νουκλεοτίδια και κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε τρεις κατηγορίες, τα 5' tRFs, 3' tRFs και τα i-tRFs. (215) Τα 5' tRFs και 3' tRFs προέρχονται από το 5' και 3' άκρο αντίστοιχα, του ώριμου tRNA και αποκόπτονται στο κυτταρόπλασμα. (216) Τα i-tRFs προέρχονται από το εσωτερικό του μορίου του ώριμου tRNA μεταγράφου και μπορεί να συμπεριλαμβάνουν το αντικωδικόνιο. (215) Τα 5' tRFs προκύπτουν από διάσπαση του ώριμου tRF είτε στο βρόγχο D ή μεταξύ του βρόγχου D και του βρόγχου του αντικωδικονίου. Τα 3' tRF προκύπτουν από διάσπαση στο βρόγχο T. Οι δύο αυτές κατηγορίες, καθώς προέρχονται από το ώριμο tRNA μετάγραφο εμπεριέχουν την αλληλουχία 3'-CCA. (217) Τα tsRNAs (μικρά τοξικά tRNA) ή tRF-1 ή 3'U tRF έχουν μήκος 16-48 νουκλεοτίδια και είναι μονόκλινα και παρόμοια με τα 5' tRF και 3' tRF, αλλά προέρχονται από το 5' ή το 3' άκρο του πρόδρομου tRNA μεταγράφου και όχι από το ώριμο και σχηματίζονται στον πυρήνα και όχι στο κυτταρόπλασμα. Τα θραύσματα που προέρχονται από το 3' άκρο του πρόδρομου tRNA έχουν μια ουρά από θυμίνες. (218)

Αναφορικά με τη βιογένεση των θραυσμάτων των μεταφορικών RNA, τα tsRNAs είναι παράγωγα της δράσης των ενζύμων RNάση P και RNάση Z στο πρόδρομο tRNA μετάγραφο, χωρίς τη συμμετοχή της RNase Dicer. (219) Παρόλα αυτά, έχει περιγραφεί η παραγωγή tsRNAs από δίκλινη μορφή του πρόδρομου tRNA με τη συμμετοχή του ενζύμου Dicer. (220) Τα tRFs είναι προϊόντα αποκοπής του ώριμου tRNA μεταγράφου από την RNase Dicer. (220, 221) Τα tRNA halves παράγονται από δράση του ενζύμου Αγγειογενίνη (ANG) σε συνθήκες στρες, στο ώριμο tRNA

μετάγραφο. Το ένζυμο ANG βρίσκεται συνήθως στον πυρήνα, αλλά σε συνθήκες στρες αποδεσμεύεται από τον υποδοχέα της αγγειογενίνης RNH1 και εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα όπου συμβάλλει στην παραγωγή των tRNA halves. (222)



Εικόνα 6: Βιογένεση των tRFs. Εικόνα από Sun et al. (215)

Τα ονόματα των tRFs προσδιορίζονται βάσει της κατηγορίας tRF, του αμινοξέος που φέρει το tRNA προέλευσης και του αντίστοιχου αντικωδικονίου.

1.11.3 Ρόλος των tRFs

Μια σειρά επιστημονικών δεδομένων υποστηρίζουν το ρόλο των θραυσμάτων των tRNAs στη ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Πληθώρα θραυσμάτων tRNA έχουν βρεθεί σε σύμπλοκα με πρωτεΐνες Αργοναύτες. (223) Για παράδειγμα, στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, συγκεκριμένα 5'-tRFs ενσωματώνονται στο σύμπλοκο Αργοναύτη 1 (AGO1) και στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs στόχους. (224) Όπως αναφέραμε ήδη παραπάνω, οι πρωτεΐνες αργοναύτες αποτελούν βασικά συστατικά του συμπλόκου RISC, μέσω του οποίου πραγματοποιείται η παρεμβολή του RNA

(RNA interference), οδηγώντας σε αποικοδόμηση του mRNA στόχου ή σε αναστολή της μετάφρασης. Ακόμη, πολλά tRFs έχουν βρεθεί σε σύμπλοκα RISC και σε άλλα είδη, όπως η *Drosophila melanogaster*, αλλά και ο άνθρωπος. Τα 3'-tRFs έχει βρεθεί ότι σχηματίζουν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες Αργοναύτες, ιδίως με τις Ago3 και Ago4. (219) Ακόμη, υπάρχουν αναφορές ότι και τα tiRNAs καταστέλλουν τη μετάφραση, συσχετιζόμενα με πρωτεΐνες αργοναύτες μέσω της παρεμβολής του RNA. (225) Για τα tiRNAs όμως υπάρχουν αναφορές ότι εμπλέκονται στην πρωτεϊνοσύνθεση και με άλλους τρόπους. Για παράδειγμα, κάποια 5' tRNA halves μετατοπίζουν παράγοντες έναρξης της μετάφρασης τόσο στο mRNA το οποίο διαθέτει καλύπτρα, όσο και στο mRNA που δεν έχει καλύπτρα, καταστέλλοντας τη μετάφραση. Ακόμη, μελέτες έχουν δείξει ότι τα 5'-tiRNAs αλληλεπιδρούν με τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα και ανταγωνίζονται με το mRNA, αποτρέποντας την πρωτεϊνοσύνθεση σε συνθήκες αλκαλικού στρες. (226) Υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που υποστηρίζουν ότι υπάρχουν 3' tRF μόρια που ενισχύουν τη μετάφραση. Ειδικότερα, ένα 3' tiRNA-Leu ενισχύει τη μετάφραση δυο ριβοσωμικών πρωτεϊνών με καίριο ρόλο στη βιογένεση των ριβοσωμάτων. (227) Σε καταστάσεις στρες, τα tRFs δεσμεύονται στο κυτόχρωμα C τόσο in vivo όσο και in vitro και παρεμποδίζουν το σχηματισμό του αποπτωσώματος, με άμεσο επακόλουθο την εξασθένιση της σηματοδότησης της απόπτωσης. (228)

1.11.4 tRFs και κακοήθειες

Τα καρκινικά κύτταρα δεδομένου του ταχύτατου πολλαπλασιασμού τους χαρακτηρίζονται από αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση σε σύγκριση με τα υγιή κύτταρα. Αυτό ανατανακλάται στην αυξημένη παραγωγή tRNA και rRNA σε αυτά. Ακόμη, η ANG υπερεκφράζεται στην πλειοψηφία των κακοηθειών, καθώς έχει φανεί ότι συμβάλλει στην επαγωγή της αγγειογένεσης. (229) Αυτό συνεπάγεται ότι στα καρκινικά κύτταρα υπάρχει αυξημένη ποσότητα θραυσμάτων tRNA.

Τα θραύσματα των tRNAs φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις κακοήθειες ρυθμίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ικανότητα των κυττάρων να μεθίστανται και τη γονιδιακή έκφραση εν γένει. (230, 231)

Μελέτες έχουν αναδείξει συγκεκριμένα προφίλ έκφρασης tRFs με βάση τον τύπο του καρκίνου, επιτρέποντας έτσι την διάκρισή τους. Μια ερευνητική ομάδα σχεδίασε τσιπ μικροσυστοιχιών για την διερεύνηση της έκφρασης tsRNAs σε δείγματα διαφόρων καρκινικών ιστών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, των ωοθηκών, του πνεύμονα, του κολορθικού καρκίνου και της ΧΛΛ. Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι η έκφραση 31 tsRNAs μπορεί να διακρίνει μεταξύ των διαφόρων τύπων κακοηθειών. (232)

Υπάρχει μια πληθώρα παραδειγμάτων θραυσμάτων tRNAs που εμπλέκονται σε κακοήθειες. Το ts-36 ή tRF-1001 φαίνεται πως λειτουργεί ως ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου στον καρκίνο του προστάτη προάγοντας τη μετάβαση από την φάση G2 του κυτταρικού κύκλου στη φάση M. Η εισαγωγή στα κύτταρα αυτά του συμπληρωματικού σε αυτό το θραύσμα si-tRF-1001 οδήγησε σε αλληλεπίδραση των δυο μορίων και αδρανοποίηση του ts-36 με αποτέλεσμα τον μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στασιμότητα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2. (218) Επιπλέον, τα tRF-Glu, tRF-Asp, tRF-Gly και tRF-Tyr είναι αυξημένα σε συνθήκες υποξίας σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και ενισχύουν τη δράση της προσδένουσας ογκογόνα μετάγραφα πρωτεΐνης YBX1. Τα θραύσματα αυτά δρουν προκαλώντας αστάθεια σε μια σειρά από ογκογόνα mRNA, με την αποσύνδεση των 3' αμετάφραστων περιοχών τους από την YBX1. (233) Επιπλέον, το tRF / miR-1280 ανταγωνίζεται την ογκογόνο δράση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch οδηγώντας σε αναστολή της εξέλιξης του καρκίνου του παχέος εντέρου. (234) Εν γένει, τα tRFs φαίνεται ότι έχουν βασικό ρόλο στην εξέλιξη των κακοηθειών ασκώντας άλλοτε ογκογόνο και άλλοτε ογκοκατασταλτική δράση.

1.12 MiRNAs και tRFs στο ΠΜ

Όπως προαναφέρθηκε, τα μη κωδικά RNA διαδραματίζουν σημαίνοντα ρόλο στις κακοήθειες. Όπως και στις υπόλοιπες νεοπλασίες, υπάρχουν μελέτες που καταδεικνύουν το ρόλο αυτών και ιδιαίτερα των miRNAs στο ΠΜ. Για παράδειγμα, τα miR-221/222 έχει δείχθει ότι μειώνουν την έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων στο ΠΜ και η καταστολή της έκφρασης αυτών των miRNA είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της εξέλιξης του ΠΜ in vivo και in vitro. (122) Το miR-125a-5p

υπερεκφράζεται σε κύτταρα του ΠΜ. Η καταστολή της δράσης του με τη χρήση ενός ανταγωνιστικού μορίου anti-miR-125a-5p είχε ως αποτέλεσμα μείωση του πολλαπλασιασμού και του μεταστατικού δυναμικού των κυττάρων, καθώς και ενίσχυση της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού του p53. (125,126) Το miR-21 είναι ένα ακόμη ζωτικής σημασίας μόριο για την εξέλιξη του ΠΜ, ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν την επιβίωση των κυττάρων και στοχεύοντας ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως τα Ras homolog (Rho) - B και PTEN. (124) Το μόριο miR-214-3p επίσης επάγει την επιβίωση των κακοήθων πλασματοκυττάρων στοχεύοντας τα αποπτωτικά μονοπάτια FBXW7 και PTEN/AKT/GSK3. (120) Από την άλλη, υπάρχουν miRNA που δρουν ογκοκατασταλτικά στο ΠΜ. Για παράδειγμα, το miR-155 έχει βρεθεί ότι υποεκφράζεται στο ΠΜ και η αποκατάσταση της έκφρασής του φάνηκε ότι οδηγεί σε μειωμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, υποστηρίζοντας έτσι το ρόλο του ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο. (134) Ομοίως, τα μόρια miR-15a και miR-16-1 υποεκφράζονται σε περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ. Έχει δειχθεί ότι τα μόρια αυτά αναστέλλουν μόριο εμπλεκόμενα σε μονοπάτια που επάγουν την επιβίωση των κακοήθων κυττάρων, όπως οι MAP (mitogen-activated protein) κινάσες, η πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT και ο ενεργοποιητής του NF-κB MAP3KIP3. Η προσθήκη των δύο αυτών miRNA μορίων στα κύτταρα του ΠΜ οδήγησε σε απόπτωση τα κύτταρα και κατέστειλε την ανάπτυξη του όγκου. (235)

Μια πληθώρα miRNA έχουν συσχετιστεί επίσης με την οστική νόσο του ΠΜ. Για παράδειγμα, το μόριο miR-21-5p έχει βρεθεί ότι συντελεί στην ανισορροπία μεταξύ των RANKL/OPG που διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο στην παθοφυσιολογία της οστικής νόσου του ΠΜ. Ειδικότερα, το miR-21-5p υπερεκφράζεται στα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών ασθενών με ΠΜ συγκριτικά με τα αντίστοιχα υγιών ανθρώπων. Ερευνητικά δεδομένα απέδειξαν ότι το μόριο εμπλέκεται στην οστική νόσο του ΠΜ, καθώς στοχεύει και αναστέλλει την οστεοπροτεγερίνη. Η αποκατάσταση της έκφρασής του στα μεσεγχυματικά κύτταρα ασθενών οδήγησε σε μειωμένη οστική απορρόφηση. (236) Το miR-203a-3p επίσης εμπλέκεται στην οστική νόσο του ΠΜ αναστέλλοντας το μονοπάτι WNT3A/ β-κατενίνη. Τα επίπεδα του miRNA αυτού στα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των

οστών ασθενών με ΠΜ είναι χαμηλότερα σε σχέση με τα μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από υγιείς μάρτυρες. Η αναστολή του miR-203a-3p είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη ενεργοποίηση του μονοπατιού WNT και αυξημένη οστεοβλαστική διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων. (237)

Σε αντίθεση με τις πολλαπλές αναφορές του ρόλου των miRNA στη βιβλιογραφία, τα tRFs έχουν μελετηθεί σε πολύ μικρό βαθμό στο ΠΜ και οι αναφορές στη βιβλιογραφία είναι πολύ περιορισμένες. (238, 239)

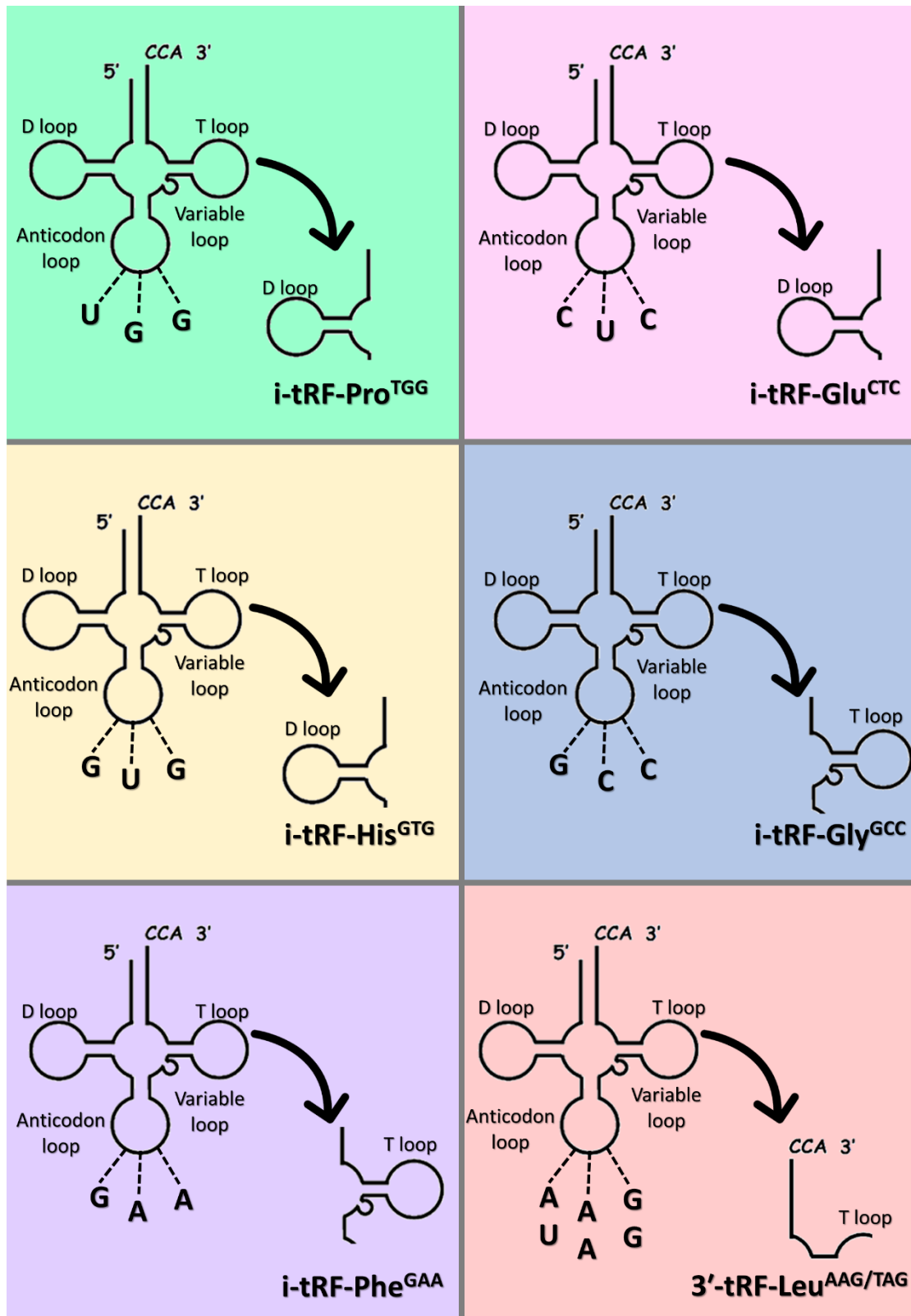
Β.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Σκοπός και σχεδιασμός της μελέτης

Το ΠΜ αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη αιματολογική κακοήθεια και η αιτιολογία του δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστή. Τα miRNAs και τα tRFs είναι μόρια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και κατέχουν καίριο ρόλο στις νεοπλασίες. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να διερευνήσει το ρόλο των μορίων αυτών στην παθογένεση του ΠΜ, καθώς και να αξιολογήσει την αξία τους ως προγνωστικούς και προβλεπτικούς βιοδείκτες, καθώς και βιοδείκτες με διαγνωστική αξία. Απώτερος σκοπός, να θέσει τη βάση για την περαιτέρω διερεύνηση των μορίων που θα αναδειχθούν, ως υποψήφιων βιοδεικτών με διαγνωστική και προγνωστική αξία που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην κάλυψη κλινικών αναγκών.

Για το σκοπό αυτό, στο πρώτο στάδιο της μελέτης ερευνήθηκε η έκφραση μιας ομάδας miRNAs (miR-15a-5p, miR-16-5p, miR-21-5p, miR-25-3p, miR-125b-5p, miR-155-5p, miR-221-3p, miR-222-3p, και miR-223-3p) με βιβλιογραφικά τεκμηριωμένο ρόλο στις αιματολογικές κακοήθειες, καθώς και μίας ομάδας tRFs (i-tRF-Pro^{TGG}, i-tRF-Glu^{CTC}, i-tRFHis^{GTC}, i-tRF-Gly^{GCC}, i-tRF-Phe^{GAA}, και 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG}) που φαίνεται να σχετίζονται με τις νεοπλασίες εν γένει, σε δείγματα μυελού των οστών, ειδικότερα στα CD138+ κύτταρα, τα οποία αντιστοιχούν στα πλασματοκύτταρα του μυελού των οστών, προερχόμενα από ασθενείς με ΠΜ (76 ασθενείς) και ασυμπτωματικό ΠΜ (18 ασθενείς). Τα tRFs που μελετήθηκαν απεικονίζονται στην *Εικόνα 7*. Η MINTbase v.2.0, μια βάση δεδομένων που περιλαμβάνει tRFs που έχουν ανιχνευθεί στον άνθρωπο, χρησιμοποιήθηκε για να συνδυαστούν τα tRFs με τα tRNAs από τα οποία προέρχονται. (240) Ειδικότερα, μελετήθηκαν οι διαφορές στην έκφραση των ανωτέρω μικρών μη κωδικών RNA στα κύτταρα ασθενών με ΠΜ συγκριτικά με τα κύτταρα ασθενών με ασυμπτωματικό ΠΜ, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου, καθώς και η διαφορετική έκφραση των μορίων αυτών μεταξύ ομάδων ασθενών με ΠΜ με διαφορετικά χαρακτηριστικά της νόσου (για παράδειγμα παρουσία ή μη οστικής νόσου), ενώ ακόμη προσδιορίστηκε ο προγνωστικός ρόλος των ανωτέρω μορίων στο ΠΜ.



Εικόνα 7: Γραφική απεικόνιση της χαρτογράφησης των θραυσμάτων RNA που προέρχονται από tRNA (tRFs) που διερευνήθηκαν σε αυτή τη μελέτη με τα αντίστοιχα tRNA προέλευσής τους.

Σε δεύτερο χρόνο εφαρμόστηκε μια πιο καθολική προσέγγιση με σκοπό τον προσδιορισμό του πλέον κατάλληλου βιοδείκτη με κλινική και προγνωστική αξία στο ΠΜ. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS) με τη δημιουργία NGS βιβλιοθηκών για δείγματα προερχόμενα από CD138+ κύτταρα ασθενών με MGUS, ασυμπτωματικό ΠΜ, καθώς και ΠΜ R-ISS σταδίου I,II και III. Η περαιτέρω ανάλυση χωρίστηκε σε δύο βήματα, την ανάλυση των μεταβολών του μεταγραφώματος μεταξύ ΠΜ και των πρόδρομων μορφών του (MGUS, ασυμπτωματικό ΠΜ) και την ανάλυση των διαφορών μεταξύ των τριών διαφορετικών προγνωστικών σταδίων. Κατά το πρώτο βήμα εντοπίστηκαν τα miRNA που εκφράζονται τόσο στο ΠΜ, όσο και στα πρόδρομα στάδιά του και επιλέχτηκαν αυτά που παρουσιάζουν σημαντική διαφορά στην έκφραση ανάμεσα στις δύο κατηγορίες. Στο δεύτερο βήμα εντοπίστηκαν τα miRNA που εκφράζονται και στα τρία διαφορετικά προγνωστικά στάδια και επιλέχτηκαν αυτά που εμφανίζουν προοδευτική διαφοροποίηση μεταξύ αυτών. Τα miRNA που εμφάνιζαν διαφορές στην έκφραση και στις δύο κατηγορίες επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση σε ένα υποσύνολο των ασθενών της μελέτης. Εξ αυτών επιλέχθηκε το καλύτερο σε όρους προγνωστικής αξίας μόριο για να μελετηθεί στο σύνολο των ασθενών.

Τελικώς, δεδομένης της ανάγκης για βιοδείκτες αξιόπιστους αλλά και εύχρηστους, κάτι που προϋποθέτει τη μέτρησή τους σε υλικά τα οποία είναι εύκολο να συλλεχθούν χωρίς επεμβατικές μεθόδους, προχωρήσαμε στη μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων miRNA στο πλάσμα περιφερικού αίματος. Λόγω του ιδιαίτερου κλινικού και ερευνητικού ενδιαφέροντος για την οστική νόσο που συνοδεύει το ΠΜ προχωρήσαμε στη μελέτη μίας ομάδας miRNAs (let-7b-5p, miR-17-5p, miR-19b-3p, miR-29b-3p, miR-31-5p, miR-127-3p, miR-133b, miR-141-3p, miR-143-3p, miR-144-5p, miR-152-3p, miR-188-5p, miR203a, miR-214-3p, miR-320a-3p, miR-335-5p, miR-375-3p, miR-550a-3p, miR-582-5p) που κατέχουν σημαντικό ρόλο στην οστική νόσο διαφορετικής αιτιολογίας (οστεοπόρωση) στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ με ή χωρίς οστική νόσο. Σκοπός της ανάλυσης αυτής ήταν να προσδιοριστούν μόρια με πιθανή αξία ως διαγνωστικοί βιοδείκτες για την οστική νόσο του ΠΜ ή ως προγνωστικοί βιοδείκτες.

2.2 Ασθενείς και βιολογικό υλικό

Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν ενήλικες ασθενείς με νέα διάγνωση ΠΜ, ασυμπτωματικού ΠΜ ή MGUS. Ασθενείς που έλαβαν οποιαδήποτε αντιμυελωματική αγωγή ή πάσχουν από κάποια δεύτερη συνυπάρχουσα κακοήθεια αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Ο θεράπων ιατρός ενημέρωσε εκτενώς τον εκάστοτε ασθενή για τις διαδικασίες, τις μεθόδους και τους σκοπούς της μελέτης και απάντησε σε τυχόν διευκρινιστικές ερωτήσεις. Εν συνεχεία, ενήμερη γραπτή συγκατάθεση ελήφθη από κάθε συμμετέχοντα στη μελέτη. Η παρούσα μελέτη έχει εγκριθεί από το επιστημονικό συμβούλιο του Γ.Ν.Α. Αλεξάνδρα και έχει διεξαχθεί σύμφωνα με τις αρχές της διακήρυξης του Ελσίνκι.

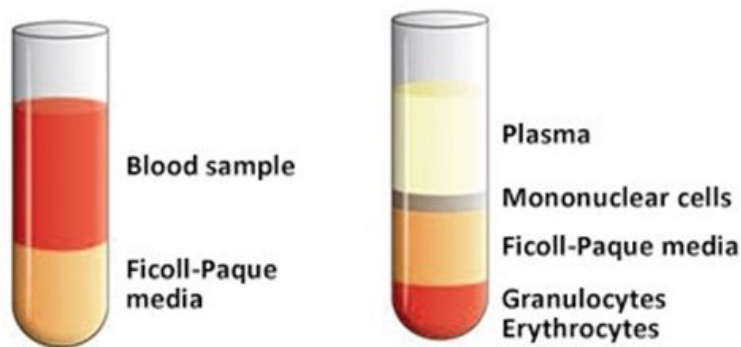
Μετά τη λήψη γραπτής συγκατάθεσης πραγματοποιήθηκε η συλλογή δειγμάτων αίματος και μυελού των οστών. Αναφορικά με τα δείγματα μυελού των οστών, 10 ml μυελού συλλέχθηκαν από κάθε συμμετέχοντα σε σωληνάρια που περιέχουν αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA). Τα δείγματα περιφερικού αίματος συλλέχθηκαν με τον ίδιο τρόπο, δηλαδή 10 ml περιφερικού αίματος από κάθε ασθενή σε σωληνάρια με EDTA. Η αρχική εκτίμηση των ασθενών, καθώς και η μεταγενέστερη παρακολούθηση αυτών έγινε με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες για τους ασθενείς με ΠΜ και λοιπές πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες. (81, 241) Μια αναλυτική βάση δεδομένων δημιουργήθηκε στην οποία καταγράφηκαν όλα τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, καθώς και δεδομένα που αφορούν τη θεραπεία και την ανταπόκριση.

2.3 Επεξεργασία δειγμάτων μυελού των οστών

2.3.1 Τεχνική Ficoll-Paque (φυγοκέντρηση βαθμίδωσης)

Απευθείας μετά τη συλλογή τους, τα δείγματα μυελού των οστών υπεβλήθησαν σε επεξεργασία. Αρχικά, το δείγμα μυελού των οστών που έχει συλλεχθεί σε φιαλίδια που περιέχουν EDTA, υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά. Το λίπος του μυελού των οστών απορρίπτεται, το πλάσμα αφαιρείται και τα κυτταρικά στοιχεία τοποθετούνται σε σωληνάριο Falcon όγκου 15 ml. Ακολούθως, εφαρμόζεται η τεχνική φυγοκέντρησης βαθμίδωσης κατά Ficoll-Paque, ώστε να απομονωθούν τα μονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών. Στο Falcon προσθέτουμε ποσότητα Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x (BioWest - Dulbecco's

Phosphate Buffered Saline 10X w/o Calcium w/o Magnesium X0515, Biowest SAS, France) ίση με την ποσότητα του δείγματος. Εν συνεχεία προσθέτουμε σε Falcon 50 ml, ποσότητα διαλύματος διαχωρισμού λεμφοκυττάρων (BioWest - Lymphosep, Lymphocyte Separation Media L0560, Biowest SAS, France) ίση με το δείγμα και προσθέτουμε στάγδην το μινερό με το PBS προσέχοντας να μην αναδευτούν. Φυγοκεντρούμε στα 400 g για 20 λεπτά χωρίς φρένο. Η μέθοδος βασίζεται σε έναν ουδέτερο, μεγάλου μοριακού βάρους υδρόφιλο πολυσακχαρίτη που διαλύεται εύκολα σε υδατικά διαλύματα και διαχωρίζει βάσει πυκνότητας τα συστατικά του αίματος. Έτσι, μετά τη φυγοκέντρηση δημιουργούνται τέσσερις φάσεις. Στον πυθμένα συσσωρεύονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια και ακριβώς από πάνω τους τα ουδετερόφιλα. Πάνω από αυτά βρίσκεται το μέσο διαχωρισμού των λεμφοκυττάρων και ακριβώς πάνω από αυτό, και μεταξύ αυτού και του πλάσματος που αποτελεί την τελευταία φάση του διαλύματος, βρίσκεται η στιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων (Εικόνα 8). Τα μονοπύρηννα κύτταρα αναρροφώνται και μεταφέρονται σε νέο σωληνάριο Falcon όγκου 15 ml. Σε αυτό προστίθενται 10 ml PBS, ακολουθεί μια φυγοκέντρηση στα 400 g για 7 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Προσθέτουμε άλλα 10 ml PBS και αναδεύουμε για να προχωρήσουμε στη μέτρηση των κυττάρων που απομονώσαμε. Για τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η χειροκίνητη μέθοδος Neubauer hemocytometer (HBG Germany, Bright Line) και η βιωσιμότητα ελέγχθηκε με τη χρήση διαλύματος Trypan Blue (Corning Trypan Blue Solution, 25-900-CI, Mediatech Inc, USA). Μετά τη μέτρηση το δείγμα φυγοκεντρείται εκ νέου στα 400 g για 7 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται.



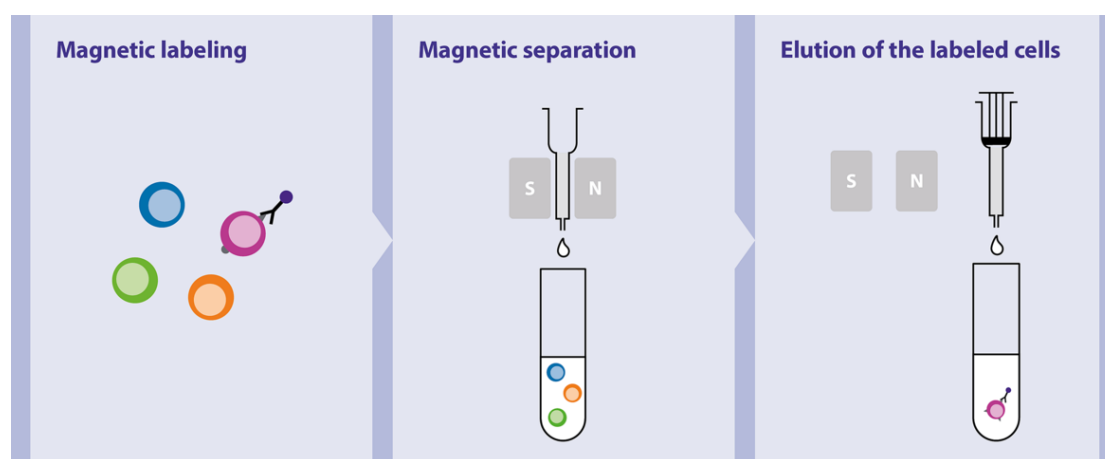
Εικόνα 8: Απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων χρησιμοποιώντας την τεχνική Ficoll-Paque. Πηγή: www.sigmaaldrich.com

2.3.2 Επιλογή των CD138+ πλασματοκυττάρων

Για την απομόνωση των CD138+ πλασματοκυττάρων εφαρμόστηκε θετική επιλογή με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων (beads) επικαλυμμένων με αντίσωμα έναντι του CD138. Η θετική επιλογή ενός σημασμένου κυττάρου-στόχου είναι μια μέθοδος μαγνητικού διαχωρισμού που βασίζεται στη σήμανση των κυττάρων-στόχων με μαγνητικά σφαιρίδια. Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε ένα αντίσωμα έναντι του αντιγόνου επιφανείας CD138 ή αλλιώς συνδεκάνη-1, που αποτελεί μια διαμεμβρανική θειϊκή πρωτεογλυκάνη ορόσημο για τα πλασματοκύτταρα του μυελού των οστών. (242, 243) Κατά το μαγνητικό διαχωρισμό, η ειδική στήλη τοποθετείται στο μαγνητικό πεδίο του κατάλληλου μαγνήτη και καθώς το μείγμα που περιέχει τα κύτταρα περνά μέσω αυτού, τα μαγνητικά σημασμένα κύτταρα κατακρατώνται στη στήλη, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά ρέουν δια μέσου αυτής (Εικόνα 9). Μετά από έκπλυση, η στήλη αφαιρείται από το μαγνητικό πεδίο και τα κύτταρα εκλούνται από τη στήλη.

Ειδικότερα, ξεκινάμε φτιάχνοντας το κατάλληλο buffer αποτελούμενο από 27 ml PBS, 135 μl αλβουμίνη και 108 μl EDTA. Εν συνεχεία, στο δείγμα που περιέχει τα μονοπύρηννα κύτταρα του μυελού των οστών, που δημιουργήσαμε στο προηγούμενο βήμα, προσθέτουμε το buffer και τα μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με αντι-CD138 αντίσωμα (CD138 MicroBeads, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). Πιο συγκεκριμένα, για κάθε 10×10^6 κύτταρα προσθέτουμε 90 μl buffer και 10 μl μαγνητικών beads. Το μείγμα ψύχεται για 15 λεπτά. Εν συνεχεία αραιώνεται με

επιπλέον buffer και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 400 g για 7 λεπτά. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο, αναδεύουμε με 500 µl buffer και ακολούθως τοποθετούμε τη στήλη στο μαγνήτη MACS Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) και πραγματοποιούμε πλύσεις με 3 ml buffer, σύνολο 4 τον αριθμό. Αφαιρούμε το φίλτρο με τα magnetic beads από το μαγνήτη και το τοποθετούμε σε Falcon 15 ml, προσθέτουμε 5 ml buffer και πιέζουμε με το έμβολο. Ακολούθως μετράμε, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τον αριθμό των CD138+ κυττάρων που απομονώθηκαν. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 400 g για 7 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίπτεται. Παγώνουμε τα κύτταρα σε pellet στους -80 °C.



Εικόνα 9: Εφαρμογή του μαγνητικού διαχωρισμού με τη χρήση magnetic beads επικαλυμμένων με ένα αντι-CD138 αντίσωμα για την απομόνωση των CD138+ πλάσματοκυττάρων. Πηγή: www.miltenyibiotec.com

2.3.3 Απομόνωση ολικού RNA από τα CD138+ κύτταρα

Για την απομόνωση του ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα TRI Reagent® (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH), το οποίο χρησιμοποιείται για την απομόνωση ολικού RNA, DNA και πρωτεϊνών, από ομογενοποιημένους ιστούς και κύτταρα. Το TRI Reagent είναι ένα μονοφασικό διάλυμα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης και φαινόλης. Το αντιδραστήριο αυτό βασίζεται στη μέθοδο Chomczynski και Sacchi, ώστε να επιτύχει την εκχύλιση του ολικού RNA προστατεύοντάς το παράλληλα από τις RNάσες. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μέθοδο, όξινο διάλυμα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, φαινόλης και

χλωροφορμίου, προκαλεί λύση των κυττάρων, αποδιάταξη των πρωτεϊνικών δομών και επομένως προστασία του RNA από τις RNάσες, οι οποίες μπορεί να προέρχονται από τα ίδια τα κύτταρα ή και από το περιβάλλον της εκχύλισης. (244)

Αρχικά, τα CD138+ κύτταρα διαλύονται σε 1 mL TRI Reagent® και επωάζονται σε 25°C για 5 min. Στη συνέχεια προστίθενται σε αυτό 200 µL χλωροφορμίου και ακολουθεί έντονη ανάδευση για 15 sec και επώαση σε 25°C για 10 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 12000 g για 15 min στους 4°C. Στη συνέχεια, απομονώνεται το διαυγές υπερκείμενο (υδατική φάση), το οποίο περιέχει το RNA και προστίθενται σε αυτό 500 µL ισοπροπανόλης. Το διάλυμα αναδεύεται έντονα για 10 sec, επωάζεται σε 25°C για 10 min, και φυγοκεντρείται σε 12000 g για 8 min σε 4°C. Εν συνεχεία αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθεται στο ίζημα 1 mL αιθανόλης 75%, ακολουθεί ανάδευση για 10 sec και φυγοκέντρηση σε 12000 g για 5 min σε 4°C. Τέλος, αφαιρείται το υπερκείμενο και γίνεται ανασύσταση του ιζήματος σε 50 µL ύδατος. Το απομονωμένο ολικό RNA φυλάσσεται σε θερμοκρασία -80°C.

2.3.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ολικού απομονωμένου RNA με τη χρήση φθορισμόμετρου

Η συγκέντρωση του ολικού RNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα προσδιορίστηκε με τη χρήση ενός φθορισμόμετρου Qubit™ 2 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, CA, USA). Συγκεκριμένα, 1 µl δείγματος ολικού RNA επωάζεται με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή με 199 µl του ενδεδειγμένου διαλύματος και 1 µl της κατάλληλης χρωστικής σε κατάλληλο διαυγές σωληνάριο χωρητικότητας 0.5 ml για 2 λεπτά. Ακολούθως, το σωληνάριο τοποθετείται στην ειδική θέση του φθορισμόμετρου για να γίνει μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού RNA.

Το φθορισμόμετρο είναι ένα όργανο που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας τον φθορισμό. Τα φθοροφόρα απορροφούν φως ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος διέγερσης και εκπέμπουν ή φθορίζουν φως μειωμένης ενέργειας και επομένως μικρότερου μήκους κύματος. Τα φθορισμόμετρα βασίζονται στη χρήση εμπορικά διαθέσιμων φθορίζουσων χρωστικών που έχουν τροποποιηθεί ώστε να εκπέμπουν φως μόνο όταν συνδέονται με το συγκεκριμένο μόριο στόχο (στην περίπτωσή μας RNA) που θέλουμε να ποσοτικοποιήσουμε. Έτσι, το φθορισμόμετρο μπορεί να συσχετίσει την

ένταση του φθορισμού του μετρούμενου δείγματος με τον αριθμό των βιολογικών μορίων ενδιαφέροντος που περιέχονται σε αυτό. Σε αντίθεση με το φασματοφωτόμετρο, το οποίο χρησιμοποιεί το ορατό φως και την υπεριώδη ακτινοβολία για να ποσοτικοποιήσει βιολογικά μόρια, το φθορισμόμετρο είναι εξαιρετικά πιο ευαίσθητο στην ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων, ενώ ακόμη χαρακτηρίζεται και από μεγαλύτερη ειδικότητα, καθώς εντοπίζει μόνο τα μόρια που συνδέονται στη φθορίζουσα χρωστική, σε αντίθεση με το φασματοφωτόμετρο που ανιχνεύει όλα τα μόρια που απορροφούν το φως σε μήκος κύματος 260 nm είτε πρόκειται για RNA, είτε για DNA ή πρωτεΐνες. Επιπλέον, με τη χρήση φασματοφωτομετρίας δε γίνεται να προσδιοριστούν μικρές ποσότητες νουκλεϊκών οξέων με ακρίβεια, σε αντίθεση με το φθορισμόμετρο το οποίο μπορεί να προσδιορίσει με ακρίβεια τη συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων, ακόμη και όταν πρόκειται για χαμηλές συγκεντρώσεις αυτών.

2.3.5 *In vitro* πολυαδενυλίωση

Τα μικρά μη κωδικά RNA δεν μπορούν ως έχουν να υποβληθούν, λόγω του μικρού τους μήκους, σε αντίστροφη μεταγραφή. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε η τεχνική της *in vitro* πολυαδενυλίωσης για την επιμήκυνσή τους, η οποία προσθέτει μια poly-A ουρά στο 3' άκρο του miRNA. Ειδικότερα, 2 μg ολικού RNA κάθε δείγματος πολυαδενυλιώνονται *in vitro* με τη χρήση μίας ανασυνδυασμένης *Escherichia coli* πολυ(A) πολυμεράσης (New England Biolabs Ltd., Ontario, Canada), μαζί με 80 μM ATP στους 37 °C για 60 λεπτά. Ακολουθεί ένα βήμα απενεργοποίησης του ενζύμου στους 65 °C για 10 λεπτά. Η αντίδραση πολυαδενυλίωσης πραγματοποιήθηκε σε ένα ABI GeneAmp 9700 PCR - Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, USA).

2.3.6 *Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με αντίστροφη μεταγραφή του RNA (reverse transcription, RT)*

2.3.6.1 Αρχή της μεθόδου

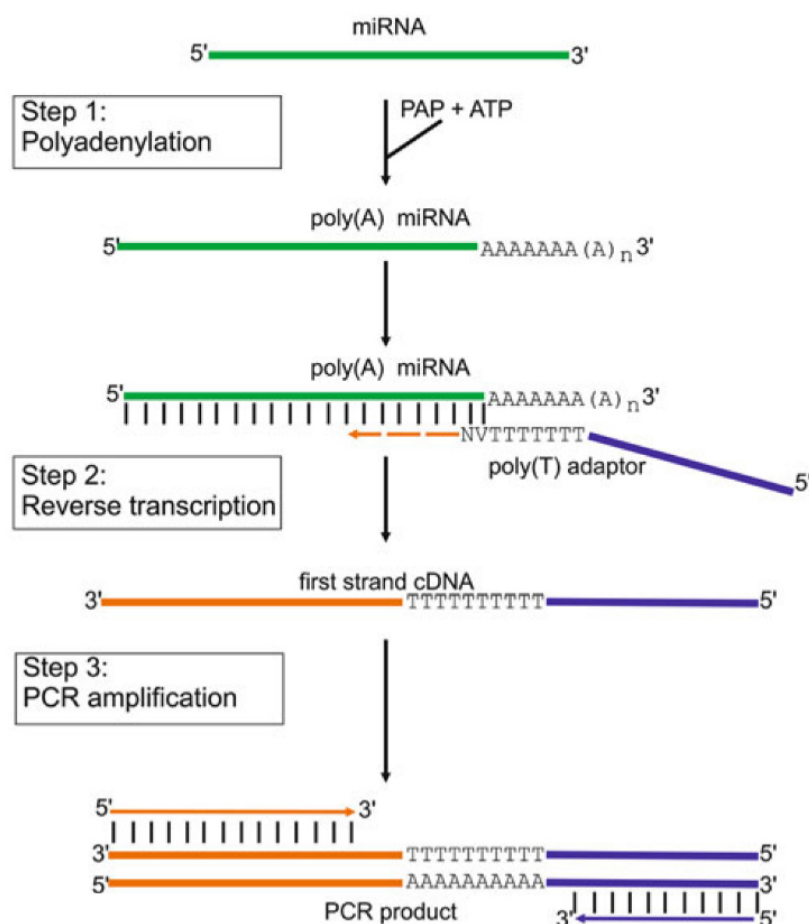
Η αντίστροφη μεταγραφή είναι η σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο RNA. Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιεί ένα ιικό ένζυμο, την αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase, RTase), η οποία είναι μια RNA εξαρτώμενη DNA πολυμεράση που πραγματοποιεί τη

μεταγραφή του RNA σε μόρια cDNA. Η αντίδραση ξεκινά όταν στο RNA υβριδοποιούνται μόρια κατάλληλου εκκινητή, και συνεχίζεται με την προσθήκη στα μόρια του εκκινητή δεοξυριβονουκλεοτιδίων συμπληρωματικών προς το RNA από την RTase (Εικόνα 10). Τρεις διαφορετικές κατηγορίες εκκινητών χρησιμοποιούνται στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής: τα τυχαία εξαμερή, τα ολιγομερή δεοξυθυμίδινης (oligo-dT), και ειδικός εκκινητής για συγκεκριμένο γονίδιο. Ο εκκινητής είναι αυτός που καθορίζει ποια μόρια RNA θα μεταγραφούν σε cDNA, δηλαδή την ειδικότητα της αντίδρασης. Τα τυχαία εξαμερή υβριδοποιούνται τυχαία στον συνολικό RNA, επιτρέποντας σε όλα τα μόρια RNA να δράσουν ως εκμαγεία για σύνθεση cDNA. Η χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων δεοξυθυμίνης ως εκκινητών βασίζεται στο γεγονός ότι όλα τα ευκαριωτικά μόρια mRNA πολυαδενυλιώνονται στο 3' άκρο τους κατά την ωρίμανσή τους. Επιπλέον, στην περίπτωση του δικού μας πειράματος η πολυαδενυλίωση των μικρών μη κωδικών RNA που έχει προηγηθεί, καθιστά επίσης τα oligo-dT κατάλληλα για χρήση ως εκκινητές για σύνθεση cDNA. Οι εκκινητές λοιπόν αυτοί υβριδοποιούνται στην poly(A) ουρά των mRNA και των πολυαδενυλιωμένων μικρών μη κωδικών RNA και επιτρέπουν τη σύνθεση cDNA μόνο από αυτά. Δεδομένου ότι τα mRNA και τα μικρά μη κωδικά RNA αποτελούν ένα μέρος του συνολικού RNA, η χρήση oligo-dT εκκινητών μειώνει την πολυπλοκότητα του παραγόμενου cDNA και βελτιώνει την απόδοση της αντίδρασης. Τέλος, η μέγιστη ειδικότητα στην αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικού εκκινητή που υβριδοποιείται μόνο στα μετάγραφα mRNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου ενδιαφέροντος. Πολύ σημαντική μετά την ολοκλήρωση της αντίστροφης μεταγραφής είναι η μη αντιστρεπτή αποδιάταξη της αντίστροφης μεταγραφάσης, διότι διαφορετικά το ένζυμο θα παραμείνει προσδεμένο στο νεοσύστατο cDNA παρεμποδίζοντας την ενίσχυση των αλληλουχιών με PCR στα επόμενα στάδια.

2.3.6.2 Συνθήκες αντίστροφης μεταγραφής για τη σύνθεση cDNA

Όλες οι αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής έλαβαν χώρα σε ένα μηχάνημα ABI GeneAmp 9700 PCR - Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, USA) και χρησιμοποιήθηκε ένας oligo-dT ως εκκινητής. Αρχικά, 2 μg πολυαδενυλιωμένου ολικού RNA αραιωμένου σε νερό αναμειγνύονται με μια

αλληλουχία oligo-dt εκκινητή (5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTVN-3', όπου V = G, A, C και N = G, A, T, C) (0.25 mM) και μείγμα dNTPs (0.5 mM έκαστο) και το μείγμα επωάζεται στους 65°C για 5 λεπτά για αποδιάταξη του RNA και ακολουθεί απότομη ψύξη στον πάγο για τον υβριδισμό του εκκινητή στην poly(A) ουρά των πολυαδενυλιωμένων μικρών μη κωδικών RNA. Στο μείγμα της αντίδρασης προστίθενται 4 μL 5X ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης [250 mM Tris-HCl (8,3 στους 25 °C), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 0,01 M dTT, 20 U αναστολέα RNaseOUT™ (Life Technologies Ltd., Carlsbad, CA, USA) και 100 μM αντίστροφης μεταγραφάσης MMLV (Life Technologies Ltd.). Εν συνεχεία ακολουθεί ένα στάδιο πολυμερισμού στους 37 °C για 52 λεπτά και ακολούθως επώαση στους 70 °C για 13 λεπτά για αποδιάταξη της αντίστροφης μεταγραφάσης.



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης cDNA από miRNA και ενίσχυσης της αλληλουχίας με real time qPCR. Βήμα 1: Μια poly(A) ουρά προστίθεται στο 3' άκρο των μορίων miRNA, Βήμα 2: Αντίστροφη μεταγραφή με τη χρήση ενός

προσαρμογέα εκκινητή που χρησιμοποιεί ένα oligo-dT και διαθέτει μια κοινή αλληλουχία στο 5' άκρο του για πρόσδεση σε ένα κοινό ανάστροφο εκκινητή και μία αλληλουχία από τα εκφυλισμένα νουκλεοτίδια NV στο 3' άκρο του (N: οποιαδήποτε βάση, V: οποιαδήποτε εκτός θυμίνης), Βήμα 3: Το cDNA χρησιμοποιείται για RT-qPCR χρησιμοποιώντας ένα ειδικό πρόσθιο εκκινητή και ένα κοινό ανάστροφο εκκινητή.
Εικόνα τροποποιημένη από Zöllner et al. 2014 (245)

2.3.7 Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Real-Time qPCR)

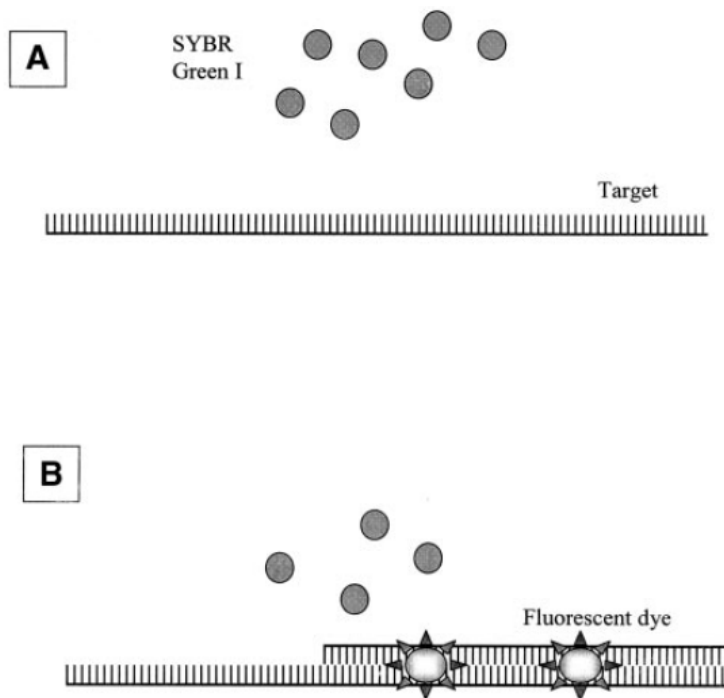
2.3.7.1 Αρχή της μεθόδου

Κατά τη συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, η ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας πραγματοποιείται μέσα σε ένα μείγμα με βελτιστοποιημένες συνθήκες, δηλαδή συγκεκριμένου pH και κατάλληλης ιονικής ισχύος, που περιέχει μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα με κατιόντα Mg^{2+} , δεοξυριβονουκλεοτίδια όλων των βάσεων (dNTPs), και ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων, ειδικών για την αλληλουχία-στόχο και γνωστών με το όνομα «εκκινητές» (primers). Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι συμπληρωματικές με τα άκρα των δύο αλυσίδων της επιθυμητής αλληλουχίας δίκλωνου DNA. Οι εκκινητές έχουν μήκος 20-30 δεοξυριβονουκλεοτιδικές βάσεις ώστε να εμφανίζουν καλή ειδικότητα για τη μοναδική αλληλουχία που θέλουμε να ενισχύσουμε, ενώ ακόμη είναι σημαντικό να μη σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές και η σύνθεση των νουκλεοτιδίων τους να είναι τέτοια ώστε να μην επιτρέπει λανθασμένο υβριδισμό αυτών, όπως πχ αν περιέχουν περιοχές με διαδοχικές επαναλήψεις βάσεων, που θα μπορούσε να οδηγήσει σε ολίσθηση του εκκινητή πάνω στην αλυσίδα «εκμαγείο». Η αντίδραση PCR περιλαμβάνει τρία επαναλαμβανόμενα στάδια ή αλλιώς κύκλους της αντίδρασης, τα οποία είναι η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, ο υβριδισμός των εκκινητών στην επιθυμητή αλληλουχία, και η επιμήκυνση των εκκινητών με πολυμερισμό δεοξυριβονουκλεοτιδίων.

Η βασική αρχή που διαφοροποιεί την PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR) από τη συμβατική είναι η προσθήκη φθορίζουσών χρωστικών ή σημασμένων ιχνηθετών που εκπέμπουν σήμα φθορισμού μόνο όταν προσδεθούν στο δίκλωνο προϊόν της. Η ποσότητα του προϊόντος που σχηματίζεται κατά την PCR σε πραγματικό χρόνο

ανιχνεύεται με μέτρηση του φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, και όχι στο τέλος της, όπως δηλαδή συμβαίνει στη συμβατική PCR.

Όπως αναφέραμε ήδη, ο ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της αντίδρασης στην PCR σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιείται αποκλειστικά με μέτρηση του φθορισμού. Υπάρχουν διάφορα συστήματα ανίχνευσης, που διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τους ειδικούς ιχνηθέτες (sequence-specific probes), που προσδένονται και ανιχνεύουν ειδικά το προϊόν ενδιαφέροντος, και τις μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές (non-specific labels) που προσδένονται γενικά σε δίκλινα μόρια DNA. Οι φθορίζουσες χρωστικές όταν βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή στο διάλυμα δεν φθορίζουν σχεδόν καθόλου, ενώ όταν συνδεθούν στο δίκλινο DNA εμφανίζουν έντονο φθορισμό. Με τον τρόπο αυτό, κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, όσο ο φθορισμός των χρωστικών αυτών αυξάνει, τόσο θεωρούμε ότι αυξάνονται τα προϊόντα της αντίδρασης τα οποία ποσοτικοποιούμε με τον τρόπο αυτό. Μία από τις μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές είναι η χρωστική SYBR Green I που προσδέεται στη μικρή αύλακα του DNA. Μετά την πρόσδεσή της στο δίκλινο DNA ο φθορισμός της αυξάνεται ως και εκατό φορές (*Εικόνα 11*). Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η σταθερότητά της (μόλις το 6% της δράσης της χάνεται μετά από 30 θερμικούς κύκλους PCR) και το χαμηλό κόστος, καθώς δε χρειάζεται να σχεδιαστούν ειδικοί ιχνηθέτες για το γονίδιο που θέλουμε να ενισχυθεί. Βασικό μειονέκτημα είναι η απουσία ειδικότητας που έχει ως αποτέλεσμα η χρωστική να δεσμεύεται σε οποιοδήποτε δίκλινο μόριο DNA σχηματίζεται κατά την αντίδραση. Είναι λοιπόν πολύ βασικό να γίνεται προσεκτικός σχεδιασμός των εκκινητών και βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR, ώστε να περιορίζονται τα μη επιθυμητά προϊόντα. Επίσης, η ειδικότητα των προϊόντων της PCR μπορεί να διαπιστωθεί μετά το τέλος της με ανάλυση με δημιουργία καμπύλης τήξης (melting curve analysis).



Εικόνα 11: (A) Η χρωστική SYBR Green ελεύθερη στο διάλυμα δεν εκπέμπει φωσ φθορισμού, (B) Μετά την πρόσδεσή της στο δίκλωνο μόριο DNA, η φθορίζουσα χρωστική SYBR Green φθορίζει. (246)

Κατά τους πρώτους κύκλους της PCR, το σήμα φθορισμού είναι ασθενές και δεν μπορεί να διακριθεί από το σήμα του υποβάθρου του συστήματος στη φάση αυτή, η οποία ονομάζεται «φάση υπόβαθρου» ή «φάση θορύβου» (background phase). Όσο προχωράει η αντίδραση, το προϊόν συσσωρεύεται και το πραγματικό σήμα υπερβαίνει κάποια στιγμή το σήμα του υποβάθρου, οπότε τη φάση θορύβου διαδέχεται η εκθετική φάση της αντίδρασης (exponential growth phase) ή λογαριθμική φάση (log phase). Στη φάση αυτή υπάρχουν σε αφθονία τα προϊόντα της αντίδρασης, τα οποία καταναλώνονται γρήγορα και έχουμε εκθετική αύξηση του προϊόντος της PCR. Έχουμε λοιπόν στην εκθετική φάση τη μέγιστη απόδοση της αντίδρασης με αποτέλεσμα τον διπλασιασμό του προϊόντος της PCR σε κάθε κύκλο. Με την πάροδο ενός αριθμού κύκλων σε μέγιστη απόδοση, η συγκέντρωση των συστατικών της αντίδρασης περιορίζεται, και επιπλέον, μέρος του προϊόντος της αντίδρασης αποικοδομείται. Έτσι περνάμε σε μια φάση σταδιακής μείωσης της απόδοσης της αντίδρασης που ονομάζεται γραμμική φάση (linear phase). Η

τελευταία φάση είναι η φάση κορεσμού ή πλατό (plateau), όπου διαπιστώνεται ελάττωση της δραστηριότητας της DNA πολυμεράσης.

Οι καμπύλες αναφοράς της PCR σε πραγματικό χρόνο διαχωρίζονται κατά τη λογαριθμική φάση της αντίδρασης. Οι καμπύλες αυτές αντικατοπτρίζουν τις διαφορές της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος. Ειδικότερα, όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση υποστρώματος έχουμε κατά την έναρξη της αντίδρασης, τόσο λιγότεροι κύκλοι χρειάζονται για να ανιχνευτεί το πρώτο σήμα φθορισμού που ξεπερνά το σήμα του υπόβαθρου. Αυτή είναι και η βασική διαφορά της PCR σε πραγματικό χρόνο από τη συμβατική PCR, ότι δηλαδή στην PCR σε πραγματικό χρόνο προσδιορίζεται η αρχική ποσότητα του μορίου-στόχου στη λογαριθμική φάση της αντίδρασης και όχι μετά το τέλος της αντίδρασης με ανάλυση «τελικού σημείου». Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για την ανίχνευση σήματος φθορισμού μεγαλύτερου από το σήμα του υπόβαθρου, δηλαδή πάνω από ένα επίπεδο ουδό (“threshold”), το οποίο ορίζεται από τον ερευνητή, είναι γνωστός ως «οριακός κύκλος» (threshold cycle, C_T).

Παρά τη χρησιμότητα της PCR, παρατηρούνται ορισμένα προβλήματα, όπως η μεταβλητότητα των τεχνικών εκχύλισης RNA και οι διαφορετικές αποδόσεις των αντιδράσεων αντίστροφης μεταγραφής και PCR, καθώς και οι διαφορές στην ποσότητα του ολικού RNA που προστίθεται εξ αρχής στις αντιδράσεις, που καθιστούν αναγκαία την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, σε μια προσπάθεια ελέγχου των σφαλμάτων. Αυτό επιτυγχάνεται με την κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου της PCR ως προς την ποσότητα του ολικού RNA που προστέθηκε στις αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής με τη χρήση ενός ή περισσότερων γονιδίων αναφοράς. Τα γονίδια αναφοράς είναι συνήθως γονίδια σταθερής έκφρασης (“housekeeping genes”). Ως γονίδιο αναφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ένα γονίδιο σταθερής έκφρασης ή η μέση έκφραση περισσότερων του ενός.

2.3.7.2 Συνθήκες PCR πραγματικού χρόνου για την ενίσχυση των μελετούμενων μικρών μη κωδικών RNA και των γονιδίων αναφοράς

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μελετούμενων tRFs και miRNAs χρησιμοποιήθηκε PCR σε πραγματικό χρόνο βασισμένη στη χημεία SYBR Green και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ένα PCR 7500 Fast Real Time System (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA). Ειδικοί πρόσθιοι εκκινητές, οι οποίοι παρατίθενται αναλυτικά στον πίνακα 6 σχεδιάστηκαν για κάθε miRNA και tRF που μελετήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, καθώς και για τα γονίδια αναφοράς, μαζί με έναν ανάστροφο εκκινητή συμπληρωματικό του oligo-dT εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της αντίστροφης μεταγραφής. Τα μικρά πυρηνοειδή RNA *SNORD43* (γνωστό και ως *RNU43* ή *U43*) και *SNORD48* (γνωστό και ως *RNU48* ή *U48*) χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς για την κανονικοποίηση της έκφρασης των μικρών μη κωδικών RNA που μελετήθηκαν.

Ειδικότερα, στο μείγμα της αντίδρασης προστίθενται 0.5 μl cDNA αραιωμένου 1:10, 5 μl KAPA™ SYBR® FAST qPCR master mix (2X) (Kapa Biosystems Inc., Woburn, MA, USA), 1 μl εκκινητή σε τελική συγκέντρωση 200 nM ο καθένας και 2.5 μl ύδωρ ελεύθερο RNAσών με τελικό όγκο αντίδρασης 10 μl. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιλαμβάνει ένα στάδιο αποδιάταξης των cDNA μορίων στους 95°C για 3 min, ενώ ακολουθούν 40 κύκλοι που αποτελούνται από ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης των προϊόντων της PCR στους 95°C για 30 sec και ένα στάδιο υβριδισμού του εκκινητή, πολυμερισμού των προϊόντων και ανίχνευσης φθορισμού στους 60°C για 30 sec. Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων ακολουθεί ένα στάδιο θέρμανσης των μειγμάτων στους 95°C με ρυθμό θέρμανσης 0.3°C/sec και συνεχή παρακολούθηση της εκπομπής φθορισμού, για τη δημιουργία καμπυλών τήξης (melting curves) των προϊόντων PCR. Η ανάλυση αυτή είναι βασική για τη διάκριση μεταξύ ειδικών προϊόντων PCR και διμερών εκκινητών ή μη ειδικών προϊόντων. Όλες οι αντιδράσεις επαναλήφθηκαν εις τριπλούν.

Κατεύθυνση	Μόριο που ενισχύει	Αλληλουχία (5'→3')	Μήκος (nt)	T _m (°C)
Πρόσθιος	miR-15a-5p	TAGCAGCACATAATGGTTTGT	21	54
	miR-16-5p	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG	22	57
	miR-21-5p	GTAGCTTATCAGACTGATGTTGAAA	25	54
	miR-25-3p	ATTGCACTTGTCTCGGTCTGA	21	58
	miR-125b-5p	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGAA	23	59
	miR-155-5p	AATGCTAATCGTGATAGGGGTAA	23	55
	miR-221-3p	GCTACATTGTCTGCTGGGTTTCA	23	60
	miR-222-3p	GAGCTACATCTGGCTACTGGGTAA	24	60
	miR-223-3p	TGTCAGTTTGTCAAATACCCCAA	23	56
	miR-181a-5p	ACATTCAACGCTGTCGGTGA	20	59
	miR-10a-5p	ACCCTGTAGATCCGAATTTGTGAA	24	57
	miR-218-5p	GGTTGTGCTTGATCTAACCATGT	23	56
	miR-503-5p	GCAGCGGGAACAGTTCTGCA	20	63
	miR-1-3p	GGGGTGGGAATGTAAAGAAGTATGTAT	26	55
	i-tRF-Pro ^{TGG}	GTTGGTCTAGGGGTATGATTCTCGGA	26	62
	i-tRF-Glu ^{CTC}	GTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGA	23	61
	i-tRF-His ^{GTG}	TGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCG	27	59
	i-tRF-Gly ^{GCC}	GAGGCCCGGGTTTCGATTC	18	62
	3'-tRF-Leu ^{AAG_TAG}	ATCCCACCGCTGCCACCA	18	66
	i-tRF-Phe ^{GAA}	TTAGACGGGCTCACATCACC	21	59
<i>SNORD43</i>	ACTTATTGACGGGCGGACA	19	59	
<i>SNORD48</i>	TGATGATGACCCCAGGTAACCTCT	23	59	
Ανάστροφος	κοινός	GCGAGCACAGAATTAATACGAC	22	56

Πίνακας 6: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR πραγματικού χρόνου για τη σχετική ποσοτικοποίηση των μελετούμενων μικρών μη κωδικών RNA και των γονιδίων αναφοράς

2.3.7.3 Ανάλυση και ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της PCR σε πραγματικό χρόνο

Όπως έχει αναφερθεί ήδη, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανίχνευσης SYBR Green. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης της PCR σε πραγματικό χρόνο δημιουργείται η καμπύλη ενίσχυσης της PCR, η οποία προκύπτει από την καταγραφή σε γράφημα της έντασης του εκπεμπόμενου φθορισμού της SYBR Green I ως προς τους κύκλους της αντίδρασης. Κατά τους πρώτους κύκλους της PCR, το σήμα θορύβου υπερκαλύπτει το πραγματικό σήμα της αντίδρασης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η μέτρηση του σήματος της αντίδρασης να μην είναι εφικτή στη φάση αυτή. Με την πάροδο των κύκλων και τη συσσώρευση του προϊόντος της PCR, το πραγματικό ανιχνεύσιμο σήμα φθορισμού (R_N) ξεπερνά το σήμα θορύβου (R_0) και η διαφορά τους ($\Delta R_N = R_N - R_0$) είναι πλέον ανιχνεύσιμη και αυξάνεται εκθετικά μέχρι ο ρυθμός αύξησης να αρχίσει να μειώνεται και τελικά να μηδενιστεί. Ακολουθώντας, πραγματοποιείται ανάλυση των προϊόντων της PCR με καμπύλη τήξης. Ειδικότερα, όταν η αντίδραση φτάσει σε πλατό, η θερμοκρασία αυξάνεται απότομα στους 95°C, έτσι ώστε όλα τα δίκλινα μόρια DNA να αποδιαταχθούν. Ακολουθεί απότομη ψύξη, για το σχηματισμό μόνο δίκλωνων μορίων DNA. Η καμπύλη τήξης που προκύπτει αναπαριστά το φθορισμό σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και προκύπτει με συνεχή μέτρηση του φθορισμού καθώς η θερμοκρασία αυξάνει και τα προϊόντα PCR αποδιατάσσονται οδηγώντας σε ελάττωση του φθορισμού. Η αρνητική παράγωγος αυτής της καμπύλης παρουσιάζει κορυφές που αντιστοιχούν στα προϊόντα της PCR. Η παρουσία μίας συγκεκριμένης κορυφής υποδηλώνει ότι πραγματοποιήθηκε μια απόλυτα ειδική αντίδραση PCR. Τελικώς προσδιορίζεται με ειδικό λογισμικό Sequence Detection System, v.1.2.3 (Applied Biosystems) το C_T κάθε δείγματος. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR ακολουθούνται γενικά δύο προσεγγίσεις, η απόλυτη και η σχετική ποσοτικοποίηση. Η πρώτη προσέγγιση έχει θέση όταν απαιτείται ο προσδιορισμός του απόλυτου αριθμού αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου, όπως για παράδειγμα ο προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων ενός ιού. Η σχετική ποσοτικοποίηση εκφράζει τη μεταβολή της έκφρασης της αλληλουχίας στόχου σε ένα εξεταζόμενο δείγμα σε σχέση με ένα δείγμα βαθμονομητή. Για τη σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιούνται δύο

μέθοδοι, η μέθοδος της σχετικής πρότυπης καμπύλης και η μέθοδος σύγκρισης των C_T , γνωστή και ως μέθοδος $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν και από τις δύο θεωρούνται ισοδύναμα.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των μικρών μη κωδικών RNA που μελετήθηκαν η μέθοδος $2^{-\Delta\Delta C_t}$, όπως έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία. (247) Τα μόρια στόχοι που ποσοτικοποιήθηκαν ήταν τα miR-15a-5p, miR-16-5p, miR-21-5p, miR-25-3p, miR-125b-5p, miR-155-5p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-223-3p, miR-1-3p, miR-181a-5p, miR-503-5p, miR-218-5p, miR-10a-5p, i-tRF-Pro^{TGG}, i-tRF-Glu^{CTC}, i-tRFHis^{GTC}, i-tRF-Gly^{GCC}, i-tRF-Phe^{GAA}, και 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG}, ενώ ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα μικρά πυρηνοειδή RNA *SNORD43* και *SNORD48*, λόγω της σταθερής τους έκφρασης στους ιστούς και του παρόμοιου μεγέθους τους με τα μόρια υπό μελέτη. Ως δείγμα βαθμονομητής χρησιμοποιήθηκε ένα pool 5 cDNA που προήλθαν από τα δείγματα των ασθενών της μελέτης. Τα επίπεδα κάθε miRNA ή tRF προσδιορίστηκαν σε σχετικές μονάδες ποσοτικοποίησης (relative quantification units-RQUs) ως ο λόγος κάθε miRNA ή tRF προς το γεωμετρικό μέσο των γονιδίων αναφοράς *SNORD43* και *SNORD48* διαιρημένο προς τον ίδιο λόγο για το δείγμα βαθμονομητή. Οι συναρτήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό είναι:

$$\Delta C_t_{\text{miRNA-tRF}(\text{δείγμα})} = C_{t\text{miRNA-tRF}(\text{δείγμα})} - [C_{t\text{SNORD43}(\text{δείγμα})} + C_{t\text{SNORD48}(\text{δείγμα})}]/2$$

$$\Delta\Delta C_{t\text{miRNA-tRF}(\text{δείγμα})} = \Delta C_{t\text{miRNA-tRF}(\text{δείγμα})} - \Delta C_{t\text{miRNA-tRF}(\text{βαθμονομητής})}$$

$$RQ_{\text{miRNA-tRF}(\text{δείγμα})} = 2^{-\Delta\Delta C_{t\text{miRNA-tRF}(\text{δείγμα})}}, \text{ RQ} = \text{relative quantification/σχετική ποσοτικοποίηση}$$

2.4 Επεξεργασία δειγμάτων περιφερικού αίματος

Απευθείας μετά τη συλλογή τους τα δείγματα περιφερικού αίματος υπεβλήθησαν σε επεξεργασία. Αρχικά, το δείγμα ολικού αίματος που έχει συλλεχθεί φυγοκεντρείται στα 1500 g στους 4°C για 10 λεπτά για να διαχωριστεί το πλάσμα από τα κυτταρικά στοιχεία του αίματος. Εν συνεχεία, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα δοχεία ελεύθερα RNAσών και υποβάλλεται σε δεύτερη φυγοκέντρηση στα 17000 g στους 4°C για 10 λεπτά για να απομακρυνθούν πλήρως υπολειπόμενα κυτταρικά θραύσματα και να μειωθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης του δείγματος από κυτταρικά

στοιχεία. Η παρουσία αιμόλυσης εκτιμήθηκε με φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό στο μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης της αιμοσφαιρίνης (414 nm) με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου BioSpec-nano (Shimadzu, Japan). Δείγματα με τιμή απορρόφησης πάνω από 0,2 θεωρούνται αιμολυμένα και εξαιρούνται της ανάλυσης. Όλα τα δείγματα καταψύχονται στους -80 °C μέχρι να υποβληθούν σε περαιτέρω επεξεργασία.

2.4.1 Απομόνωση miRNAs από πλάσμα περιφερικού αίματος

Πριν προχωρήσουμε στην απομόνωση των miRNAs από δείγματα περιφερικού αίματος, 25 fmol του συνθετικού cel-miR-39-3p προστίθενται σε κάθε δείγμα. Το μόριο αυτό λειτουργεί ως εξωγενής μάρτυρας αναφοράς και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των διαφορών στην απομόνωση μεταξύ των δειγμάτων και για την κανονικοποίηση της έκφρασης των miRNAs, όπως περιγράφεται στη συνέχεια. Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε το kit απομόνωσης NucleoSpin™ miRNA Plasma kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Duren, Germany). Αρχικά, 300 μl πλάσματος αναμειγνύονται με 90 μl buffer MLP, το οποίο προκαλεί μετουσίωση του υλικού και το δείγμα επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά. Στο επόμενο βήμα πραγματοποιείται κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και απομάκρυνσή τους μέσω φυγοκέντρησης. Ειδικότερα, 30 μl buffer MPP προστίθενται στο παραπάνω δείγμα και το δείγμα επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Εν συνεχεία, το δείγμα φυγοκεντρείται στα 11000 g για 3 λεπτά. Το καθαρό υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο. Στο επόμενο βήμα προετοιμάζονται οι συνθήκες πρόσδεσης των νουκλεϊκών οξέων στη στήλη καθαρισμού με την προσθήκη 400 μl ισοπροπανόλης. Επιπλέον, προστίθεται στο δείγμα, ως μεταφορέας, γλυκογόνο σε ποσότητα 2μg με σκοπό να βελτιωθεί η απόδοση ανάκτησης των miRNAs. Ακολούθως, μια κολώνα NucleoSpin miRNA τοποθετείται σε ένα σωληνάριο και το δείγμα μεταφέρεται στην κολώνα, ώστε τα νουκλεϊκά οξέα να προσδεθούν σε αυτή. Το δείγμα επώαζεται για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στα 11000 g. Το υλικό που απορρέει δια μέσου της στήλης απορρίπτεται και η στήλη επανατοποθετείται στο σωληνάριο. Ακολουθεί ένα βήμα διάσπασης του DNA που προσδένεται στη μεμβράνη, ώστε να αποφύγουμε πιθανές αλληλεπιδράσεις του DNA που απομονώνεται μαζί με το RNA με τη μέθοδο

αυτή κατά την ποσοτικοποίηση των miRNA με qPCR στα επόμενα στάδια επεξεργασίας του δείγματος. Συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται δύο πλύσεις, στην πρώτη προστίθενται 700 μl buffer MW2 στην κολώνα και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11000 g για 30 δευτερόλεπτα με απόρριψη του υλικού που απορρέει, ενώ κατά τη δεύτερη 250 μl του ίδιου buffer τοποθετούνται στην κολώνα και το δείγμα φυγοκεντρείται στα 11000 g για 2 λεπτά. Ακολουθεί η πέψη του DNA με την προσθήκη 50 μl rDNase στη μεμβράνη σιλικόνης της στήλης NucleoSprin και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στο επόμενο βήμα πραγματοποιείται πλύση και στέγνωμα της μεμβράνης της στήλης. Ειδικότερα, πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις. Κατά την πρώτη 100 μl buffer MW1 προστίθενται στην κολώνα και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11000 g για 30 δευτερόλεπτα. Το υλικό που απορρέει απορρίπτεται. Κατά τη δεύτερη πλύση 700 μl buffer MW2 προστίθενται στην κολώνα και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11000 g για 30 δευτερόλεπτα. Το υλικό που απορρέει απορρίπτεται. Τέλος, κατά την τρίτη πλύση 250 μl buffer MW2 προστίθενται στην κολώνα και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11000 g για 2 λεπτά μέχρι να στεγνώσει πλήρως η μεμβράνη. Στο τελευταίο βήμα πραγματοποιείται έκλυση των νουκλεϊκών οξέων από την κολώνα. Ειδικότερα, η κολώνα τοποθετείται σε ένα νέο σωληνάριο συλλογής, προστίθενται 30 μl ύδατος ελεύθερου RNAsών απευθείας στη κολώνα. Το δείγμα επιάζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί τέλος φυγοκέντρηση στα 11000 g για 1 λεπτό.

Η συγκέντρωση του ολικού RNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα προσδιορίστηκε με τη χρήση ενός φθορισμόμετρου Qubit™ 2 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, CA, USA), όπως περιγράφηκε ανωτέρω.

2.4.2 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με αντίστροφη μεταγραφή του RNA (reverse transcription, RT)

Όλες οι αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής έγιναν με χρήση του osteomiR™ test kit (TAmiRNA GmbH, Vienna, Austria) και έλαβαν χώρα σε ένα μηχάνημα ABI GeneAmp 9700 PCR - Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, USA). Οι αντιδράσεις πολυαδενυλίωσης και αντίστροφης μεταγραφής γίνονται σε ένα στάδιο. Χρησιμοποιήθηκε ένας poly-dT προσαρμογέας ως εκκίνητης που φέρει εκφυλισμένες βάσεις στο 3' άκρο του και μια γνωστή

αλληλουχία στο 5' άκρο του. Αρχικά προστίθεται μια poly-A ουρά στο 3' άκρο του miRNA. 2 μl πολυαδενυλιωμένου ολικού RNA αραιωμένου σε νερό αναμειγνύονται με 7.5 μl διαλύματος αντίδρασης (2 μl 5x buffer, 4.5 μl ύδατος ελεύθερου νουκλεασών και 1 μl μείγματος ενζύμων απο το kit) και η αντίδραση επωάζεται στους 42 °C για 60 λεπτά. Εν συνεχεία, ακολουθεί επώαση στους 95 °C για 5 λεπτά για αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Τέλος πραγματοποιείται απότομη ψύξη στους 4 °C.

2.4.3 Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Real-Time qPCR)

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση μιας ομάδα από 19 miRNA με βιβλιογραφικά τεκμηριωμένο ρόλο στην οστική νόσο άλλης αιτιολογίας (π.χ. οστεοπόρωση). Πρόκειται για τα παρακάτω μόρια: let-7b-5p, miR-17-5p, miR-19b-3p, miR-29b-3p, miR-31-5p, miR-127-3p, miR-133b, miR-141-3p, miR-143-3p, miR-144-5p, miR-152-3p, miR-188-5p, miR203a, miR-214-3p, miR-320a-3p, miR-335-5p, miR-375-3p, miR-550a-3p, miR-582-5p. Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μελετούμενων miRNAs χρησιμοποιήθηκε PCR σε πραγματικό χρόνο βασισμένη στη χημεία SYBR Green και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ένα ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) με τη χρήση plates έτοιμων για χρήση που περιέχονται στο kit osteomiR™ test kit (TAmiRNA GmbH, Vienna, Austria). Τα plates είναι προγεμισμένα με ειδικούς πρόσθιους και ανάστροφους εκκινητές, ενισχυμένους με την τεχνολογία Locked Nucleic Acids (LNA™). Το μείγμα της αντίδρασης περιέχει 1.8 μl cDNA, 90 μl ExiLENT SYBR® Green master mix (Exiqon, Denmark) και 88.2 μl ύδωρ ελεύθερο RNAσών σε τελικό όγκο αντίδρασης 180 μl. Ακολούθως, το plate φυγοκεντρείται στα 1500 g για 90 δευτερόλεπτα και 10 μl του μείγματος αντίδρασης προστίθενται σε κάθε υποδοχή του plate. Πριν την qPCR το plate φυγοκεντρείται εκ νέου στα 1500 g για 90 δευτερόλεπτα. Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιλαμβάνει ένα στάδιο αποδιάταξης των cDNA μορίων στους 95°C για 10 min, ενώ ακολουθούν 45 κύκλοι που αποτελούνταν από ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης των προϊόντων της PCR στους 95°C για 10 sec και ένα στάδιο υβριδισμού του εκκινητή, πολυμερισμού των προϊόντων και ανίχνευσης φθορισμού στους 60°C για 60 sec. Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων ακολουθεί ένα στάδιο θέρμανσης των μειγμάτων στους 95°C με ρυθμό

θέρμανσης 0.3°C/sec και συνεχή παρακολούθηση της εκπομπής φθορισμού, για τη δημιουργία καμπυλών τήξης (melting curves) των προϊόντων PCR.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, για την ποσοτικοποίηση των μελετούμενων μορίων χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία SYBR Green και η μέθοδος σύγκρισης των C_T , χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το εξωγενές cel-miR-39-3p, όπως περιγράφεται εκτενώς σε προηγούμενο εδάφιο.

2.5 miRNA sequencing

Βιβλιοθήκες αλληλούχισης νέας γενιάς (Next generation sequencing – NGS) κατασκευάστηκαν από 4 ασθενείς με ασυμπτωματικό ΠΜ, 4 ασθενείς με MGUS, 4 ασθενείς με R-ISS I ΠΜ, 8 με R-ISS II και 8 με R-ISS III. Οι βιβλιοθήκες NGS κατασκευάστηκαν με το QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen, Hilden, Germany) χρησιμοποιώντας 500 ng ολικού RNA ως πρότυπο ανά βιβλιοθήκη. Εν συντομία, προσαρμογείς προσδέθηκαν διαδοχικά στα 3' και 5' άκρα των miRNA, πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA βασιζόμενη σε UMIs (Unique Molecular Identifiers) ακολουθούμενη από εκκαθάριση του cDNA. Τελικά, πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση με τη χρήση ενός κοινού πρόσθιου εκκινητή και indexing ανάστροφων εκκινητών. Ο έλεγχος ποιότητας των βιβλιοθηκών miRNA-seq που δημιουργήθηκαν έγινε με τον 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), χρησιμοποιώντας το Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent). Τελικά, η επακόλουθη αλληλούχιση miRNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός Illumina NextSeq 550 (Illumina, San Diego, CA, USA), οδηγώντας στη δημιουργία αναγνώσεων μονής αλληλουχίας μήκους 75 ζευγών βάσεων για κάθε βιβλιοθήκη. Αναφορικά με τη βιοπληροφορική ανάλυση, ο έλεγχος ποιότητας των βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό FastQC, ενώ η περικοπή των προσαρμογέων έγινε με το αλγόριθμο TrimGalore. Αναγνώσεις αλληλουχιών με μήκη μικρότερα από 16 νουκλεοτίδια και μεγαλύτερα από 40 νουκλεοτίδια εξαιρέθηκαν από τις βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Στο επόμενο βήμα, το miRDeep2 χρησιμοποιήθηκε για να διευκρινιστεί το προφίλ έκφρασης των miRNA στα εξεταζόμενα δείγματα. (248) Για κάθε εξεταζόμενο δείγμα, μόνο τα miRNA με

>10 μη κανονικοποιημένες αναγνώσεις και θετικό σκορ miRDeer2 ελήφθησαν υπόψιν για περαιτέρω ανάλυση.

2.6 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό IBM SPSS Statistics (εκδ. 26) (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Για να εξετάσουμε τη διαφορά της έκφρασης των μελετούμενων μικρών μη κωδικών RNA ανάμεσα στα CD138+ κύτταρα ασθενών με ΠΜ και ασθενών με ασυμπτωματικό ΠΜ χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές δοκιμασίες, λόγω της μη κανονικής κατανομής της έκφρασης των μορίων αυτών. Για τη δημιουργία ενός σημείου λήψης απόφασης (cut-off) αναφορικά με την έκφραση των υπό μελέτη μικρών μη κωδικών RNA, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος X-tile, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν καθιερωμένα σημεία cut-off όσο αφορά την έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων. (249) Η δοκιμασία Mann-Whitney U test χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών στην έκφραση των μελετούμενων miRNAs και tRFs μεταξύ ασθενών με ΠΜ και ασυμπτωματικό ΠΜ και ανάμεσα στις διάφορες υποομάδες ασθενών με ΠΜ. Επίσης, διερευνήθηκε η σχέση της έκφρασης των υπό μελέτη μικρών μη κωδικών RNA με άλλες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους (ποιοτικές μεταβλητές) χρησιμοποιώντας το τεστ χ^2 ή τη στατιστική δοκιμασία Fisher (Fisher's Exact test), όπου αυτή κρίθηκε καταλληλότερη. Ακόμη, έγινε ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier και κατασκευάστηκαν καμπύλες ελεύθερης νόσου επιβίωσης (PFS) και ολικής επιβίωσης (OS) (250), οι διαφορές μεταξύ των οποίων εκτιμήθηκαν με τη στατιστική δοκιμασία Mantel-Cox (log rank). Επιπλέον, αναπτύχθηκαν μοντέλα μονομεταβλητής και πολυμεταβλητής παλινδρόμησης αναλογικού κινδύνου (HR) κατά Cox. Ανάλυση bootstrap (1000 δείγματα) στα μοντέλα μονοπαραγοντικής και πολυπαραγοντικής παλινδρόμησης εφαρμόστηκε για να προσδιοριστούν τα διορθωμένα για σφάλμα 95% όρια αξιοπιστίας κάθε αναλογικού κινδύνου.

Αναφορικά με το κομμάτι της μελέτης που αφορά την έκφραση διαφορετικών miRNAs στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΜ, χρησιμοποιήθηκαν και στην περίπτωση αυτή μη παραμετρικές δοκιμασίες, ενώ ο αλγόριθμος X-tile χρησιμοποιήθηκε και σε αυτό το στάδιο για να προσδιοριστούν τα cut-offs που

αφορούν την έκφραση των miRNAs. Συσχετίσεις της έκφρασης miRNAs στο περιφερικό αίμα με την επιβίωση ασθενών με ΠΜ μελετήθηκαν και στην περίπτωση αυτή με τις μεθόδους που περιγράφονται ανωτέρω. Για να διερευνηθεί η ικανότητα των υπό μελέτη miRNAs τόσο μεμονωμένα, όσο και συνδυαστικά να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες ικανοί να διακρίνουν τους ασθενείς με ΠΜ και οστική νόσο από αυτούς χωρίς χρησιμοποιήσαμε ανάλυση καμπύλης λειτουργικών χαρακτηριστικών δέκτη (Receiver Operating Characteristic; ROC curve) και ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης. Ανάλυση bootstrap (1000 δείγματα) χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση στην ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης για εσωτερική επαλήθευση. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (Area under the curve; AUC) υπολογίστηκε για κάθε miRNA και συγκρίθηκε με τα υπόλοιπα αναφορικά με την ικανότητά του να διακρίνει με ακρίβεια τους ασθενείς με ΠΜ και οστική νόσο από αυτούς χωρίς. Στο επόμενο στάδιο αναπτύχθηκαν πολλαπλά μοντέλα πολυπαραγοντικής λογιστικής παλινδρόμησης συνδυάζοντας τα miRNAs με την καλύτερη ικανότητα να διακρίνουν ασθενείς με οστική νόσο από αυτούς χωρίς. Η αξιολόγηση και σύγκριση αυτών των μοντέλων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση καμπύλης ROC.

3. Αποτελέσματα

3.1 Μελέτη έκφρασης μικρών μη κωδικών RNA στα CD138+ κύτταρα ασθενών με ΠΜ

Στο πρώτο στάδιο της μελέτης μας διερευνήθηκε η έκφραση των μικρών μη κωδικών RNA, που αναφέρονται ανωτέρω στο εδάφιο των μεθόδων, σε CD138+ κύτταρα μυελού των οστών ασθενών με ΠΜ και ασθενών με ασυμπτωματικό ΠΜ. Αναφορικά με τον πληθυσμό της μελέτης αυτής, συμπεριλήφθησαν 94 ασθενείς. 76 εξ αυτών έπασχαν από ΠΜ και οι υπόλοιποι 18 από ασυμπτωματικό ΠΜ. Πρόκειται για ενήλικες ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση μυελώματος, οι οποίοι δεν είχαν λάβει μέχρι τότε καμία θεραπεία. Από τη μελέτη εξαιρέθηκαν ασθενείς με άλλες συνυπάρχουσες κακοήθειες. Όλοι οι ασθενείς υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης μετά από ενημέρωση πριν από οποιαδήποτε διαδικασία της μελέτης.

Η διάμεση ηλικία ήταν τα 68 έτη (εύρος: 35-88) για τους ασθενείς με ΠΜ και 66 έτη (εύρος: 54-81) για τους ασθενείς με ασυμπτωματικό ΠΜ. Μόνο ένας εκ των ασθενών δεν έλαβε καμία θεραπεία, ενώ από τους υπόλοιπους 75, οι 63 (84%) έλαβαν αγωγή με συνδυασμό βορτεζομίμπης με ένα ανοσοτροποποιητικό φάρμακο (60 λεναλιδομίδη-3 θαλιδομίδη), 6 (8%) έλαβαν βορτεζομίμπη με κυκλοφωσφαμίδη και δεξαμεθαζόνη και οι υπόλοιποι 6 (8%) έλαβαν συνδυασμό λεναλιδομίδης με δεξαμεθαζόνη. Ακόμη, από τους 76 ασθενείς με ΠΜ, 21(27.6%) υπεβλήθησαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μετά από μεγαθεραπεία με μελφαλάνη, ενώ οι υπόλοιποι 55 (72.4%) δεν ήταν κατάλληλοι για αυτόλογη μεταμόσχευση είτε λόγω ηλικίας, είτε λόγω συννοσηροτήτων. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται στον Πίνακα 7.

Οι ασθενείς αξιολογήθηκαν για την παρουσία οστικής νόσου με τη χρήση της ολόσωμης αξονικής τομογραφίας χαμηλής δόσης (WBLDCT), πλην περιπτώσεων όπου αυτό δεν ήταν εφικτό (κινητικά προβλήματα, επηρεασμένο PS). Ως σκελετικά συμβάματα (SREs- skeletal related events) ορίστηκαν τα παρακάτω: 1) παθολογικό κάταγμα, 2) συμπίεση νωτιαίου μυελού, 3) ανάγκη για ακτινοθεραπεία σε οστική βλάβη, 4) ανάγκη για χειρουργείο σε οστική βλάβη. (251)

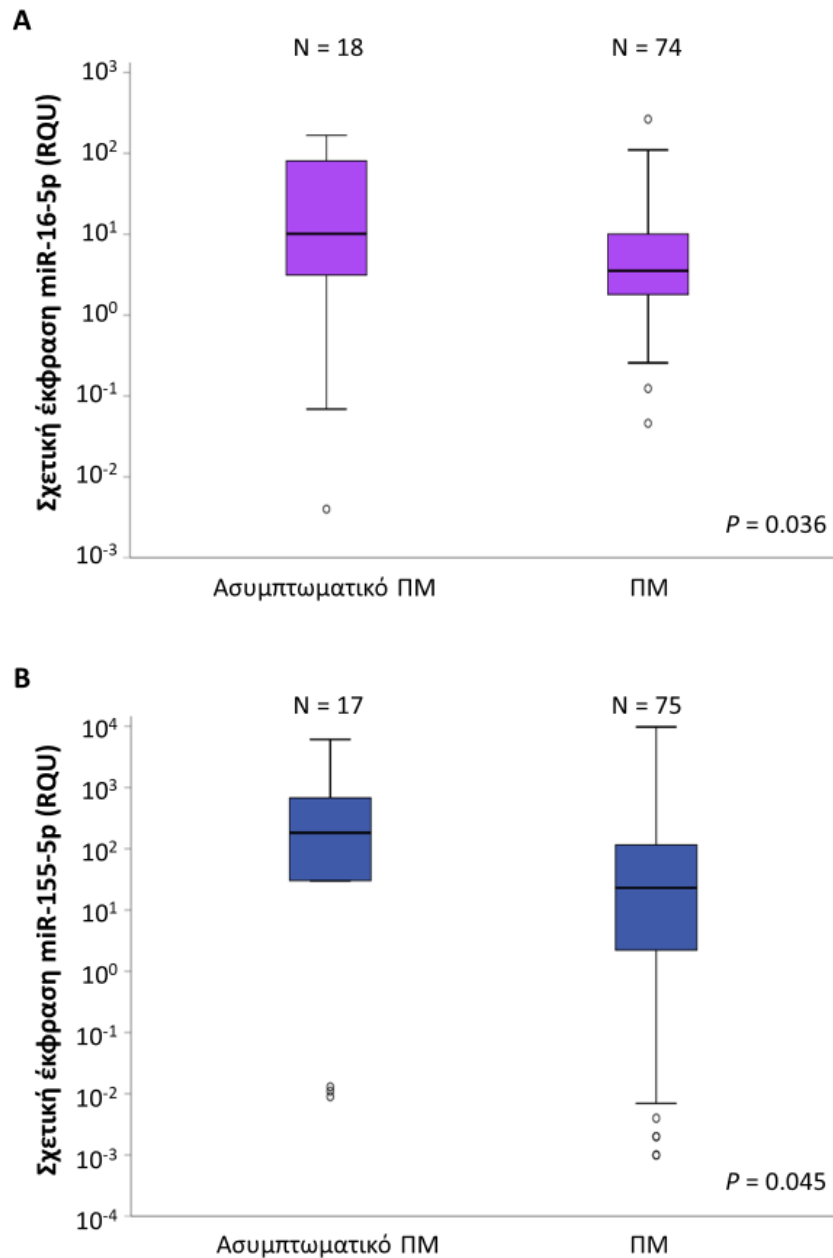
Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών με ΠΜ (%)
Φύλο	
Άνδρες	44 (57.9%)
Γυναίκες	32 (42.1%)
Τύπος ΠΜ	
IgG	44 (57.9%)
IgA	17 (22.4%)
IgD	2 (2.6%)
Ελαφρών αλύσεων	10 (13.2%)
Μη εκκριτικό	2 (2.6%)
Ελλιπή δεδομένα	1 (1.3%)
Στάδιο ISS¹	
I	15 (19.7%)
II	25 (32.9%)
III	34 (44.8%)
Ελλιπή δεδομένα	2 (2.6%)
Στάδιο R-ISS²	
I	11 (14.5%)
II	40 (52.6%)
III	18 (23.7%)
Ελλιπή δεδομένα	7 (9.2%)
Οστική νόσος	
Όχι	22 (28.9%)
Ναι	50 (65.8%)
Ελλιπή δεδομένα	4 (5.3%)
Οστεόλυση σε WBLDCT³	
Όχι	18 (23.7%)
Ναι	38 (50.0%)
Ελλιπή δεδομένα	20 (26.3%)
SREs⁴ (38 ασθενείς με ΠΜ)	
Όχι	18 (47.4%)
Ναι	20 (52.6%)

¹International Staging System, ²Revised International Staging System, ³Whole-body low-dose computed tomography, ⁴Skeletal-related events (σκελετικά συμβάματα); μόνο ασθενείς με παρουσία οστεολύσεων εκτιμήθηκαν για την παρουσία SREs.

Πίνακας 7: Κλινικά χαρακτηριστικά των 76 ασθενών με ΠΜ,

3.1.1 *MiRNAs και tRFs των οποίων η έκφραση διαφέρει μεταξύ των CD138+ κυττάρων ασθενών με ΠΜ και ασυμπτωματικό ΠΜ*

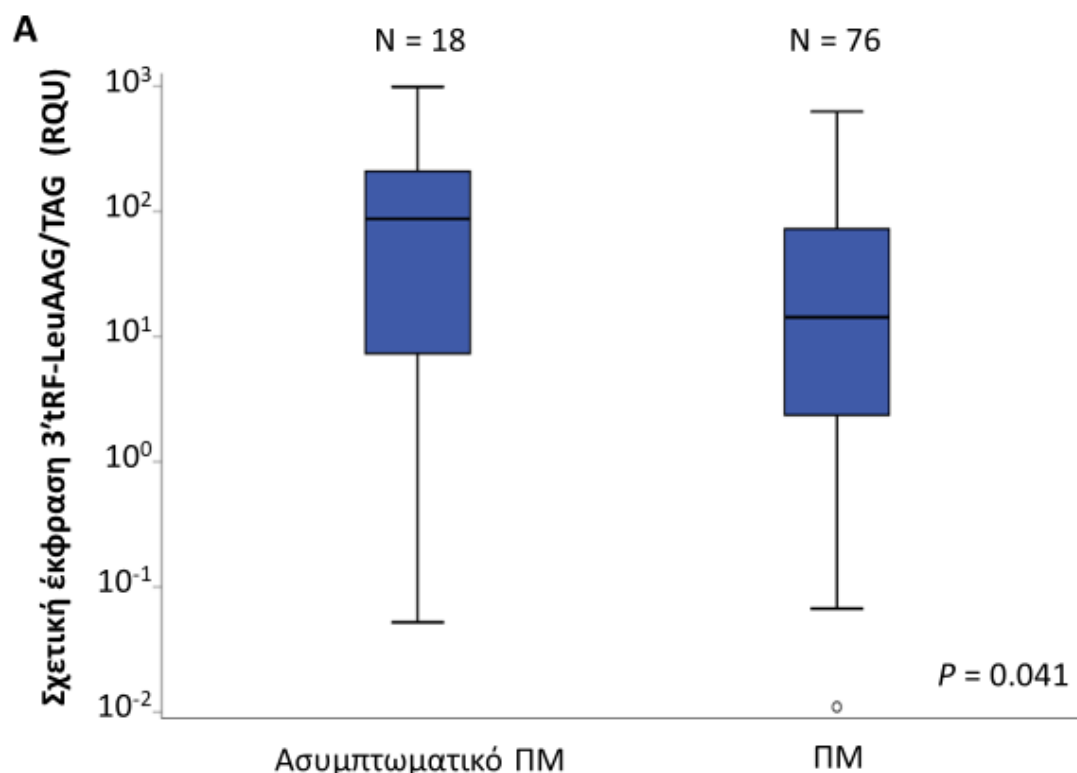
Η μελέτη μας απέδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης των μικρών μη κωδικών RNA, miR-16-5p και miR-155-5p είναι σημαντικά χαμηλότερα στα κύτταρα ασθενών με ΠΜ συγκριτικά με αυτά ασθενών με ασυμπτωματικό ΠΜ. Ειδικότερα, η σχετική έκφραση του miR-16-5p στα CD138+ πλασματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ εκφρασμένη ως η μέση τιμή αυτής \pm το τυπικό σφάλμα της μέση τιμής ήταν ίση με 13.77 ± 4.1 RQU (relative quantification units- μονάδες σχετικής ποσοτικοποίησης), ενώ στα αντίστοιχα κύτταρα των ασθενών με ασυμπτωματικό ΠΜ ήταν ίση με 44.58 ± 14.04 RQU. Με την εφαρμογή της στατιστικής δοκιμασίας Mann-Whitney U προκύπτει ότι η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.036$). Αντίστοιχα, αναφορικά με την έκφραση του miR-155-5p, η μέση τιμή της έκφρασής του στα CD138+ πλασματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ ήταν ίση με 366 ± 167.6 RQU, ενώ στα αντίστοιχα κύτταρα των ασθενών με ασυμπτωματικό ΠΜ ήταν ίση με 1285.7 ± 539.8 RQU. Αυτή η διαφορά είναι επίσης στατιστικά σημαντική ($p=0.045$). Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στηντην *εικόνα 12*.



Εικόνα 12: Θηκογράμματα που δείχνουν τη σχετική έκφραση των (A) miR-16-5p και (B) miR-155-5p στα CD138+ πλασματοκύτταρα ασθενών με ασυμπτωματικό ΠΜ και ΠΜ.

Αναφορικά με τα tRFs των οποίων η έκφραση μελετήθηκε επίσης στα CD138+ πλασματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ και ασυμπτωματικό ΠΜ, μόνο το 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} φαίνεται να διαφοροποιείται ως προς την έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών. Ειδικότερα, το συγκεκριμένο μόριο φαίνεται να υπερεκφράζεται στους

ασθενείς με ασυμπτωματικό ΠΜ. Η μέση τιμή (\pm το τυπικό σφάλμα αυτής) της σχετικής έκφρασης του συγκεκριμένου tRF ήταν 181.1 ± 62.5 RQU στα κύτταρα ασθενών με ασυμπτωματικό ΠΜ, ενώ η αντίστοιχη τιμή στα κύτταρα ασθενών με ΠΜ ήταν 51.5 ± 10.5 . Όπως διαπιστώθηκε από τη στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U, η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($p= 0.041$). (Εικόνα 13)

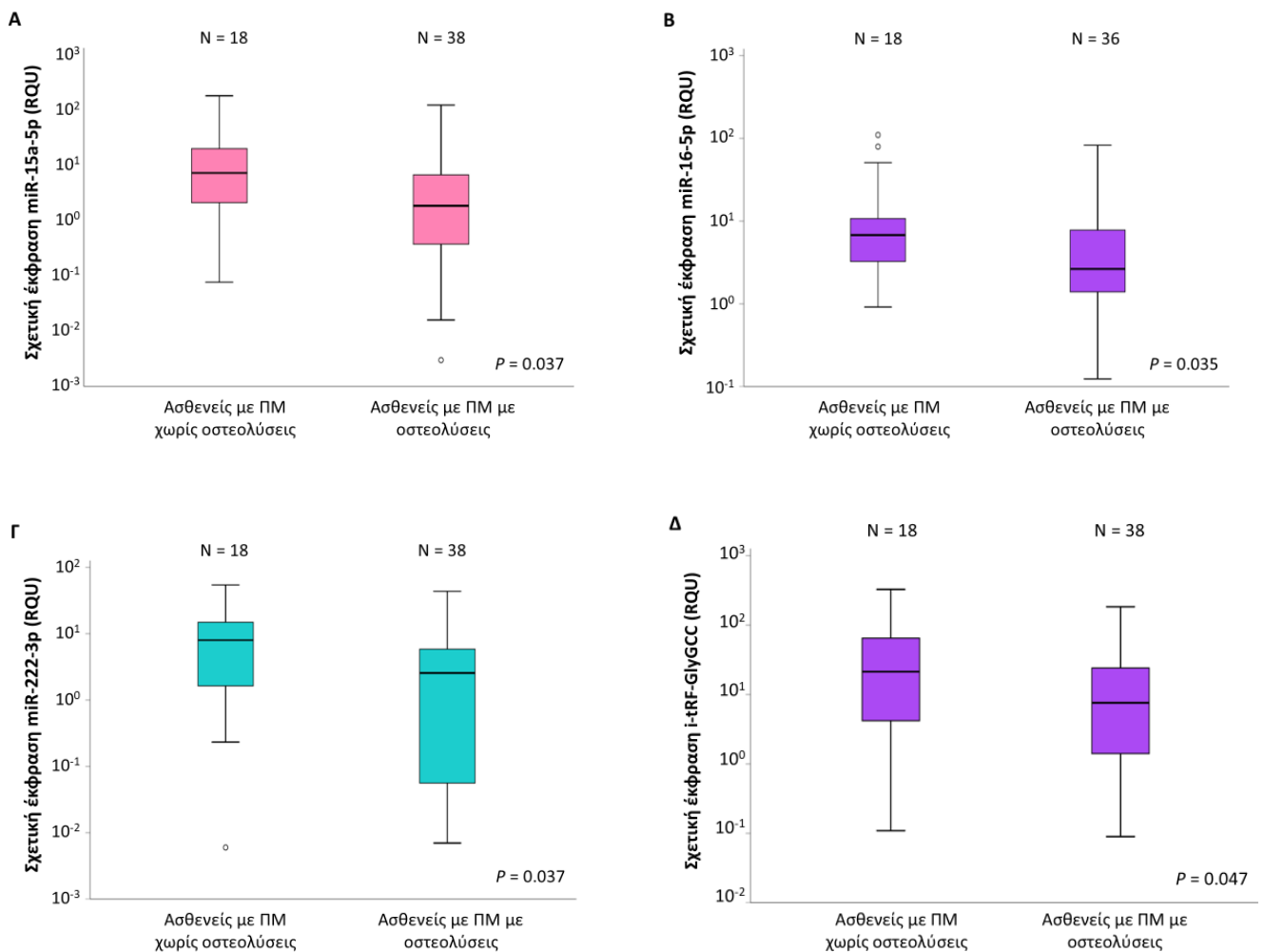


Εικόνα 13: Θηκόγραμμα που δείχνει τη σχετική έκφραση του 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} στα CD138+ κύτταρα ασθενών με ΠΜ και ασυμπτωματικό ΠΜ.

3.1.2. MiRNAs και tRFs των οποίων η έκφραση σχετίζεται με χαρακτηριστικά που αφορούν την οστική νόσο του πολλαπλού μυελώματος

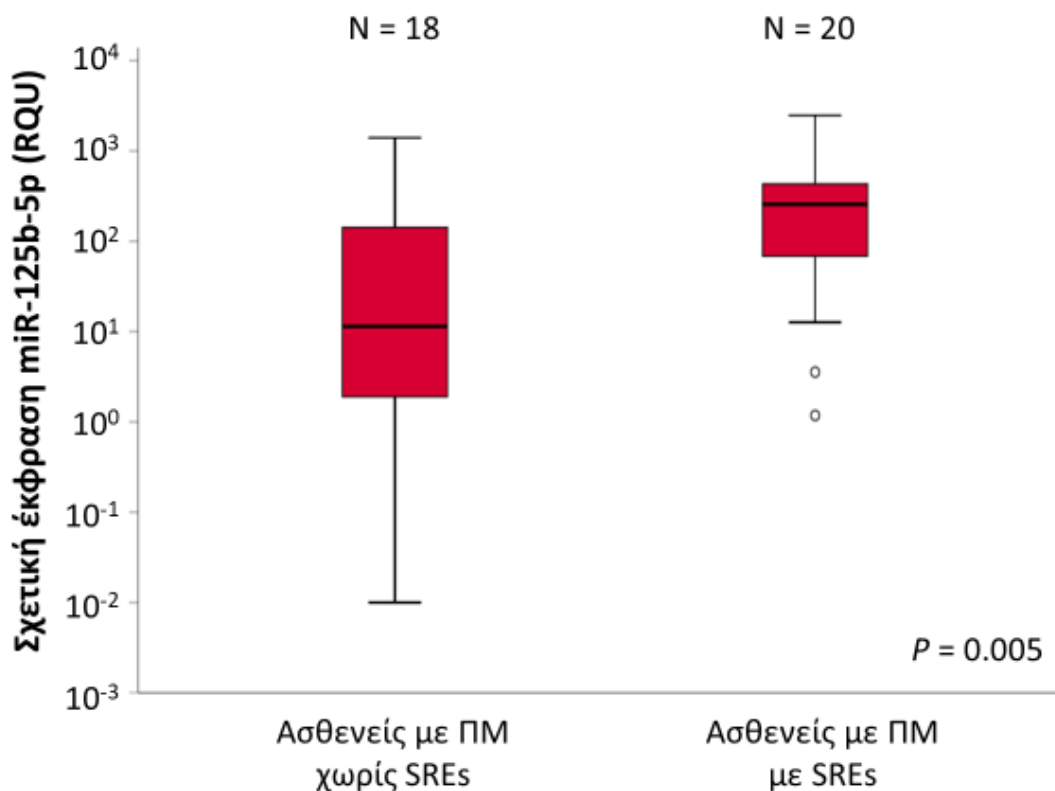
Με τη χρήση της στατιστικής δοκιμασίας Mann-Whitney U διαπιστώθηκαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των μορίων miR-15a-5p ($p=0.037$), miR-16-5p ($p=0.035$) και miR-222-3p ($p=0.037$) στα CD138+ πλασματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ και παρουσία οστεολύσεων στο WBLDCT συγκριτικά με τα κύτταρα ασθενών με ΠΜ χωρίς οστική νόσο. Ειδικότερα, η μέση τιμή (\pm το τυπικό σφάλμα αυτής) της σχετικής έκφρασης του miR-15a-5p ήταν ίση με 7.71 ± 3.25 RQU στους ασθενείς με ΠΜ και

παρουσία οστεολύσεων, ενώ η αντίστοιχη τιμή ήταν ίση με 29.93 ± 12.66 RQU σε αυτούς χωρίς. Αντίστοιχα, για το miR-16-5p η μέση τιμή της σχετικής έκφρασης του ήταν ίση με 7.49 ± 2.39 RQU στους ασθενείς με ΠΜ και παρουσία οστεολυτικών αλλοιώσεων στο WBLDCT, ενώ ήταν ίση με 19.27 ± 7.18 RQU στους ασθενείς με ΠΜ χωρίς την παρουσία οστεολυτικών αλλοιώσεων. Τέλος, αναφορικά με το miR-222-3p, η μέση τιμή της σχετικής έκφρασης του σε ασθενείς με ΠΜ και παρουσία οστεολύσεων ήταν ίση με 6.03 ± 1.65 RQU, ενώ η αντίστοιχη τιμή για τους ασθενείς χωρίς οστική νόσο ήταν ίση με 10.95 ± 3.17 RQU. Από τα tRFs που μελετήθηκαν διαπιστώθηκε ότι το i-tRF-Gly^{GCC} υπερεκφράζεται στα CD138+ πλάσματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ χωρίς την παρουσία οστεολύσεων (μέση τιμή \pm SE= 47.8 ± 18.3), συγκριτικά με αυτά ασθενών με οστεολύσεις (μέση τιμή \pm S.E. = 17.7 ± 5.1) και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($p= 0.047$). Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στην *εικόνα 14*.



Εικόνα 14: Θηκογράμματα που αναπαριστούν τη σχετική έκφραση των (Α) miR-15a-5p, (Β) miR-16-5p, (Γ) miR-222-3p και (Δ) i-tRF-GlyGCC στα CD138+ κύτταρα ασθενών με ΠΜ χωρίς και με την παρουσία οστεολύσεων στο WBLDCT (Whole Body Low Dose CT).

Στο υποσύνολο των ασθενών της μελέτης που εμφάνιζαν οστική νόσο στο WBLDCT (n=38), η ανάλυσή μας ανέδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης του miR-125b-5p ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με ΠΜ που εμφάνιζαν SREs (μέση τιμή \pm S.E. = 39.39 ± 12.72 RQU) συγκριτικά με αυτούς που εμφάνιζαν οστική νόσο χωρίς SREs (μέση τιμή \pm S.E. = 15.00 ± 8.12 RQU) ($p = 0.005$). Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στην εικόνα 15.

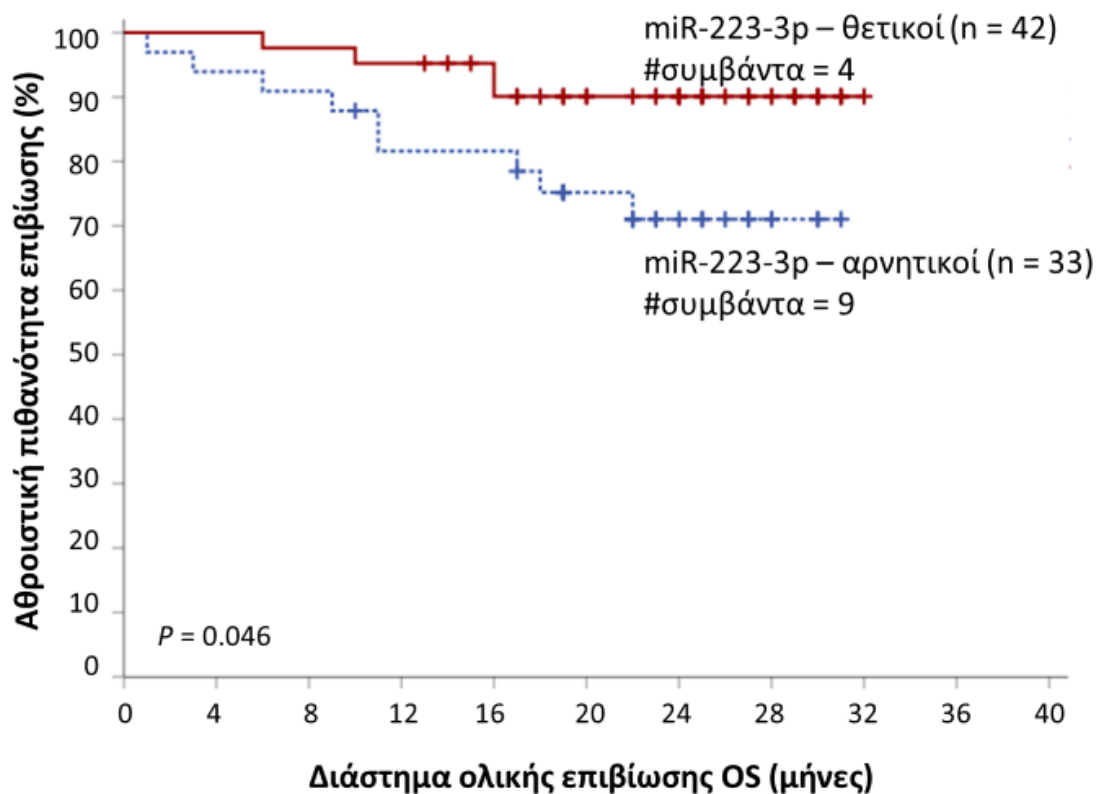


Εικόνα 15: Θηκόγραμμα που απεικονίζει τη σχετική έκφραση του miR-125b-5p στα CD138+ κύτταρα ασθενών με ΠΜ χωρίς και με SREs, SREs: skeletal related events.

3.1.3 MiRNAs και tRFs των οποίων η έκφραση στα CD138+ κύτταρα ασθενών με ΠΜ έχει προγνωστική αξία

Ο διάμεσος χρόνος παρακολούθησης των ασθενών με ΠΜ που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη ήταν 24 μήνες. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, 29 εκ των ασθενών εμφάνισαν πρόοδο νόσου, ενώ καταγράφηκαν 13 θάνατοι σχετιζόμενοι με το ΠΜ.

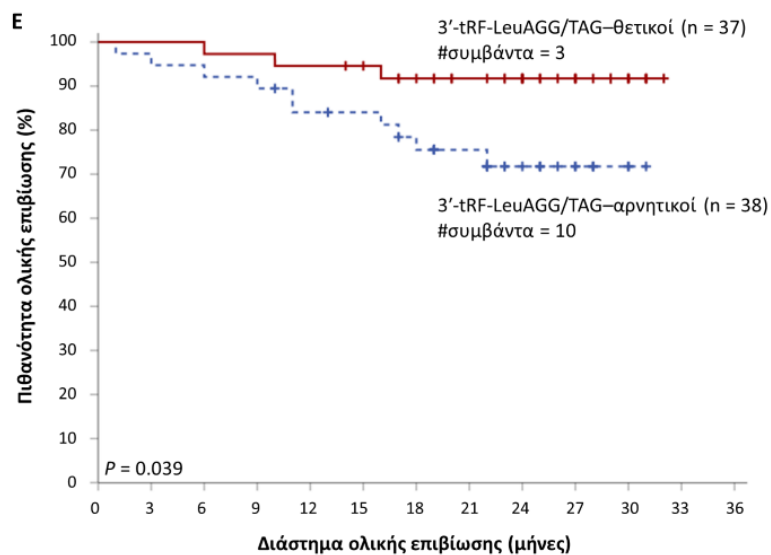
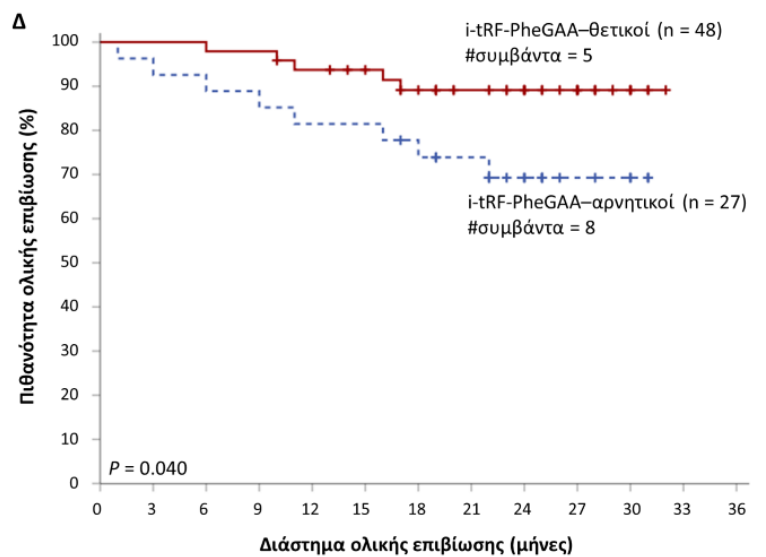
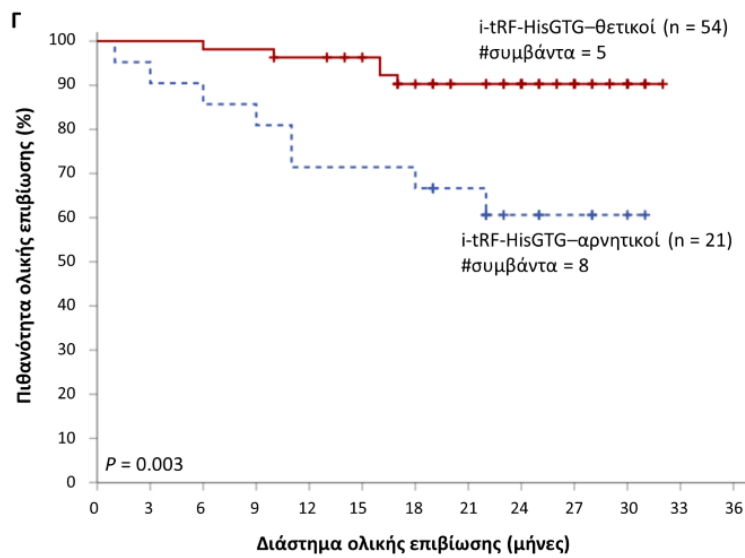
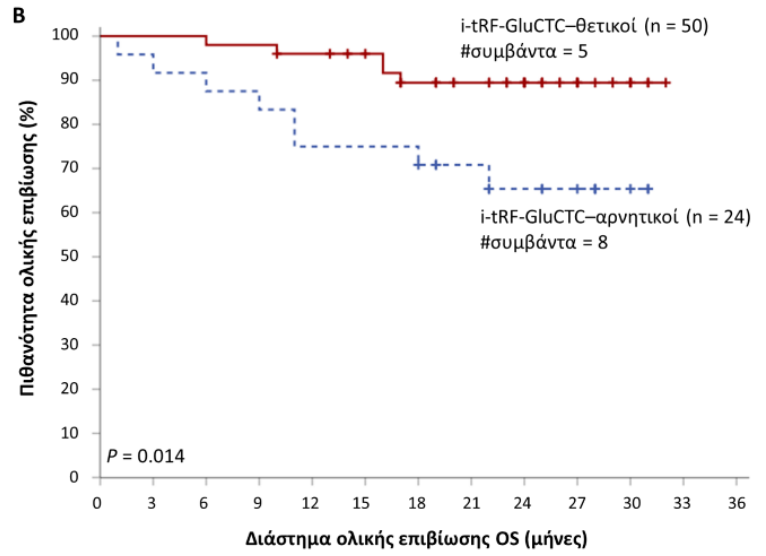
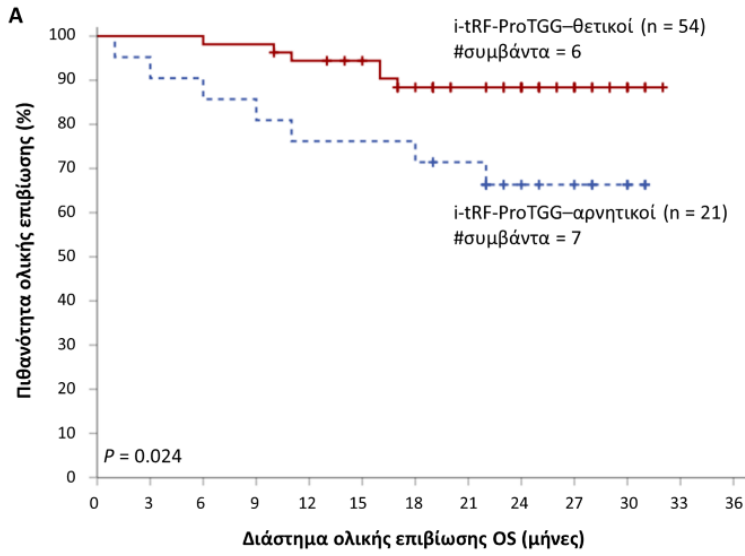
Εκ των μελετούμενων μορίων miRNA, το miR-223-3p ήταν το μόνο που φάνηκε να έχει προγνωστικό ρόλο στο ΠΜ. Όπως προαναφέρθηκε, προσδιορίστηκε με τον αλγόριθμο X-tile μια τιμή διαχωρισμού (cut-off) με βάση την οποία οι ασθενείς διακρίθηκαν σε miR-223-3p θετικούς και αρνητικούς. Η μονοπαραγοντική παλινδρόμηση κατά Cox με την εφαρμογή της μεθόδου bootstrap έδειξε ότι οι ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του miR-223-3p στα CD138+ πλασματοκύτταρά τους εμφανίζουν σημαντικά μικρότερα διαστήματα ολικής επιβίωσης (OS). Ο λόγος επικινδυνότητας HR ήταν ίσος με 3.11 (bootstrap p= 0.034). Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox με την εφαρμογή της μεθόδου bootstrap για να προσδιοριστεί η προγνωστική αξία του μορίου αυτού σε σχέση με το αναθεωρημένο διεθνές σύστημα σταδιοποίησης (R-ISS). Η ανάλυση έδειξε ότι η υποέκφραση του miR-223-3p διατηρεί τη δυσμενή προγνωστική της αξία ανεξάρτητα από το στάδιο R-ISS (HR=3.34, bootstrap p=0.046). Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier επιβεβαίωσε αυτά τα αποτελέσματα συσχετίζοντας τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του miR-223-3p με σημαντικά μικρότερα διαστήματα ολικής επιβίωσης (OS) (p=0.046). Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζονται στην *εικόνα 16*.



Εικόνα 16: Καμπύλη ολικής επιβίωσης Kaplan-Meier που δείχνει την προγνωστική αξία της έκφρασης του miR-223-3p στα CD138+ κύτταρα ασθενών με ΠΜ.

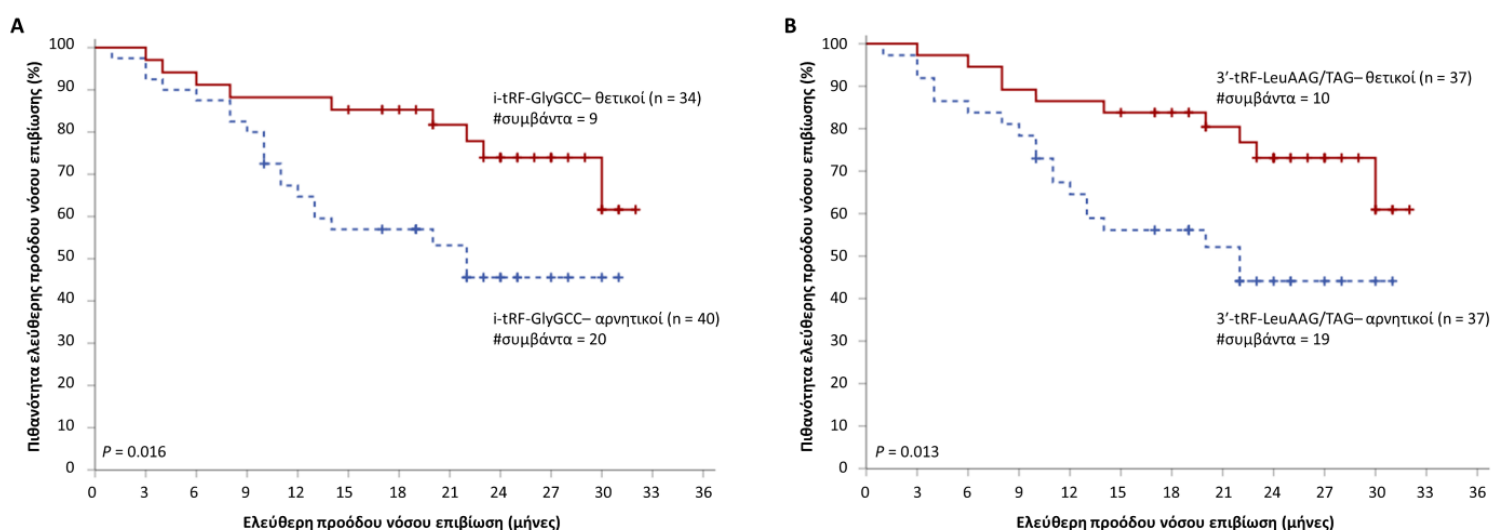
Παρομοίως για τα tRFs, οι ασθενείς ταξινομήθηκαν ανάλογα με την έκφραση του εκάστοτε tRF σε θετικούς και αρνητικούς με τη χρήση μιας τιμής διαχωρισμού (cut-off) που ορίστηκε από τον αλγόριθμο X-tile.

Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier ανέδειξε ότι οι ασθενείς με ΠΜ που παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των itRF-Pro^{TGG}, i-tRF-Glu^{CTC}, i-tRF-His^{GTG}, i-tRF-Phe^{GAA} ή 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} στα CD138+ κύτταρα τους εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα διάστημα ολικής επιβίωσης (OS) συγκριτικά με αυτούς που υποεκφράζουν τα συγκεκριμένα μόρια (p = 0.024, 0.014, 0.003, 0.040, και 0.039, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζονται στην εικόνα 17.



Εικόνα 17: Καμπύλες ολικής επιβίωσης Kaplan Meier που δείχνουν τις διαφορές στην επιβίωση ασθενών με ΠΜ με υψηλά επίπεδα έκφρασης (Α) i-tRF-Pro^{TGG}, (Β) i-tRF-Glu^{CTC}, (Γ) i-tRF-His^{GTC}, (Δ) i-tRF-Phe^{GAA}, (Ε) 3'-tRF-Leu^{AGG/TAG} συγκριτικά με ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης αυτών των μορίων.

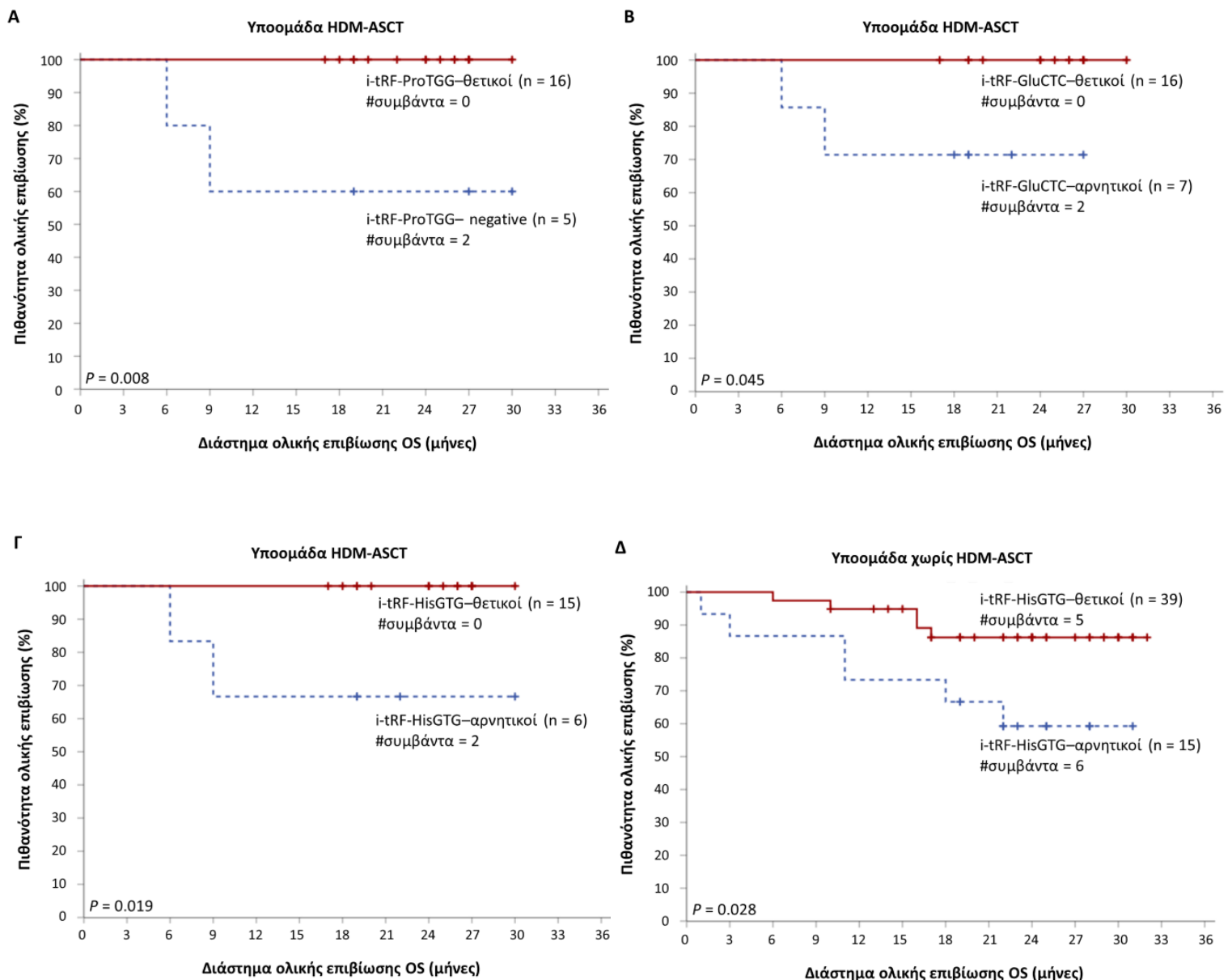
Αναφορικά με την ελεύθερη πρόοδο νόσου επιβίωση (PFS), η ανάλυση Kaplan Meier ανέδειξε ότι τα μόρια i-tRF-Gly^{GCC} και 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} έχουν αξία ως προς το PFS σε ασθενείς με ΠΜ στην 1^η γραμμή θεραπείας. Ειδικότερα, τα διαστήματα επιβίωσης ελεύθερης πρόοδου νόσου είναι σημαντικά μεγαλύτερα για ασθενείς που εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης i-tRF-Gly^{GCC} και 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} στα CD138+ κύτταρα τους ($p = 0.016$ και 0.013 αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην *εικόνα 18*



Εικόνα 18: Καμπύλες Kaplan Meier ελεύθερης πρόοδου νόσου επιβίωσης που δείχνουν τις διαφορές στα διαστήματα επιβίωσης ασθενών με ΠΜ με υψηλά επίπεδα έκφρασης (Α) i-tRF-Gly^{GCC}, (Β) 3'-tRF-Leu^{AGG/TAG} συγκριτικά με ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης αυτών των μορίων.

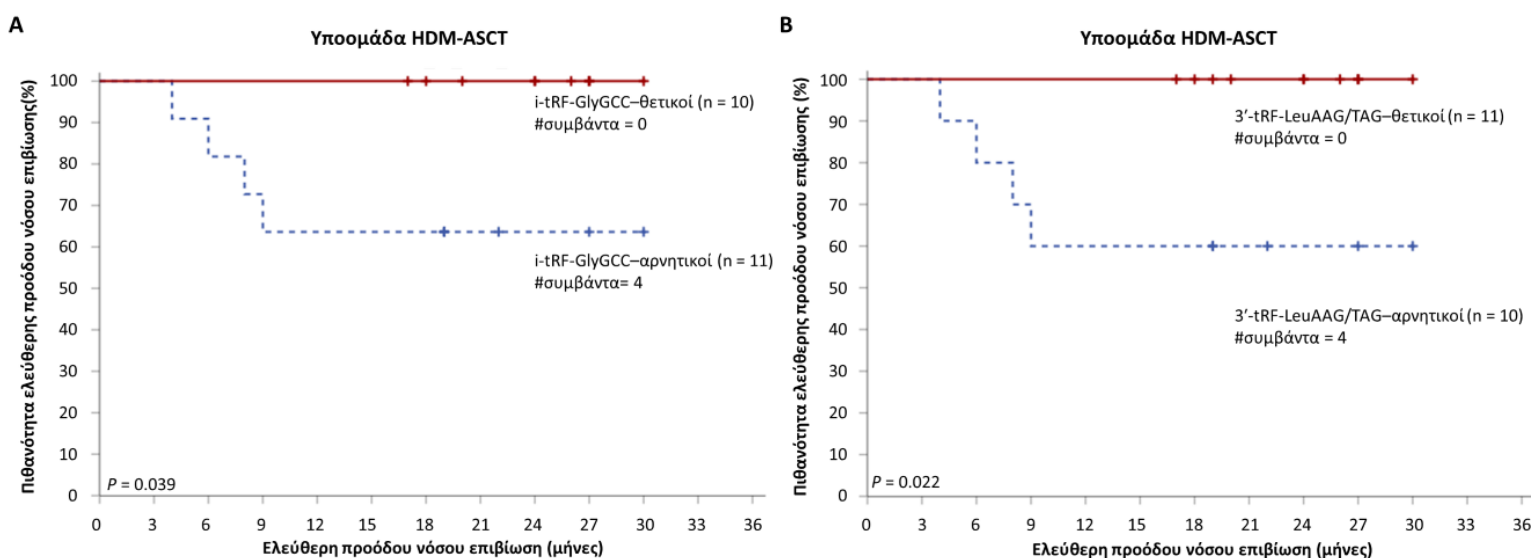
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα που υποδεικνύουν πιθανή αξία των μελετούμενων tRFs ως προγνωστικών βιοδεικτών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης σε δυο υποομάδες του πληθυσμού της μελέτης, τους ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μετά από megaθεραπεία με μελφαλάνη (HDM-ASCT) και σε αυτούς που δεν ήταν

κατάλληλοι υποψήφιοι για αυτόλογη μεταμόσχευση. Στην ομάδα των ασθενών που έχουν υποβληθεί σε HDM-ASCT, τα μόρια i-tRF-Pro^{TGG}, i-tRF-Glu^{CTC} και i-tRF-His^{GTG} είναι αυτά που διατηρούν τη θετική προγνωστική τους αξία αναφορικά με την ολική επιβίωση. Ειδικότερα, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των μορίων i-tRF-Pro^{TGG}, i-tRF-Glu^{CTC}, και i-tRF-His^{GTG} στα CD138+ κύτταρα αυτής της κατηγορίας ασθενών σχετίζονται με σημαντικά μεγαλύτερη ολική επιβίωση συγκριτικά με αυτούς που υποεκφράζουν τα εν λόγω μόρια ($p = 0.008, 0.045,$ και $0.019,$ αντίστοιχα). Στην υποομάδα των ασθενών που δεν υποβλήθηκαν σε HDM-ASCT, την θετική του προγνωστική αξία φάνηκε να διατηρεί το tRF i-tRF-His^{GTG}, καθώς οι ασθενείς της κατηγορίας αυτής που υπερεκφράζουν το συγκεκριμένο μόριο εμφανίζουν σηματικά μεγαλύτερα διαστήματα ολικής επιβίωσης συγκριτικά με αυτούς που το υποεκφράζουν ($p = 0.033$). Τα παραπάνω φαίνονται στην *Εικόνα 19*.



Εικόνα 19: Καμπύλες ολικής επιβίωσης Kaplan Meier που δείχνουν τις διαφορές στην ολική επιβίωση υποομάδων ασθενών με ΠΜ (πραγματοποίηση ή μη HDM-ASCT) ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης των εκάστοτε μορίων tRF (Α) i-tRF-Pro^{TGG} στην υποομάδα που έχει υποβληθεί σε HDM-ASCT, (Β) i-tRF-Glu^{CTC} στην υποομάδα που έχει υποβληθεί σε HDM-ASCT, (Γ) i-tRF-His^{GTG} στην υποομάδα που έχει υποβληθεί σε HDM-ASCT, (Δ) i-tRF-His^{GTG} στην υποομάδα που δεν έχει υποβληθεί σε HDM-ASCT.

Αναφορικά με την προβλεπτική αξία των μελετούμενων tRFs ως προς την επιβίωση μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση, η ανάλυση Kaplan Meier ανέδειξε ότι η θετική έκφραση των μορίων i-tRF-Gly^{GCC} και 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} σχετίζεται με μεγαλύτερα διαστήματα ελεύθερης προόδου νόσου επιβίωση (PFS) στην υποομάδα των ασθενών που υπεβλήθησαν σε HDM-ASCT. Ειδικότερα, τα διαστήματα επιβίωσης ελεύθερης προόδου νόσου ήταν σημαντικά μεγαλύτερα για ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε HDM-ASCT και εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης i-tRF-GlyGCC και 3'-tRF-LeuAAG/TAG στα CD138+ κύτταρα τους ($p = 0.039$ και 0.022 αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην εικόνα 20.



Εικόνα 20: Καμπύλες ελεύθερης προόδου νόσου επιβίωσης Kaplan Meier που δείχνουν τις διαφορές στην επιβίωση της υποομάδας ασθενών με ΠΜ που έχουν υποβληθεί σε HDM-ASCT ανάλογα με τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των (Α) i-tRF-Gly^{GCC} και (Β) 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG}.

	Συμμεταβλητή	HR ¹	95% ΔΕ ²	P	BCa ³ bootstrap ⁴ 95% ΔΕ ²	Bootstrap ⁴ P
Ολική επιβίωση (OS)	i-tRF-Pro^{TGG}					
	Θετικό	1.00				
	Αρνητικό	4.06	1.28 – 12.82	0.017	0.98 – 46.70	0.011
	R-ISS⁵	3.39	1.28 – 8.96	0.014	0.93 – 38.24	0.024
	i-tRF-Glu^{CTC}					
	Θετικό	1.00				
	Αρνητικό	5.87	1.75 – 19.63	0.004	1.02 – 5.58x10 ⁵	0.001
	R-ISS⁵	3.98	1.50 – 10.57	0.006	0.58 – 7.39x10 ⁵	0.010
	i-tRF-His^{GTG}					
Θετικό	1.00					
Αρνητικό	6.49	1.94 – 21.74	0.002	0.97 – 7.32x10 ⁵	0.001	
R-ISS⁵	3.77	1.44 – 9.91	0.007	0.87 – 4.42x10 ⁵	0.008	
Ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση (PFS)	i-tRF-Gly^{GCC}					
	Θετικό	1.00				
	Αρνητικό	3.06	1.33 – 7.00	0.008	1.12 – 12.63	0.007
	ISS⁶	2.22	1.25 – 3.95	0.007	1.20 – 7.71	0.008
	3'-tRF-Leu^{AAG/TAG}					
	Θετικό	1.00				
Αρνητικό	2.94	1.32 – 6.55	0.008	1.28 – 8.76	0.005	
ISS⁶	2.16	1.22 – 3.80	0.008	1.21 – 6.37	0.008	

¹Hazard ratio (σχετικός κίνδυνος); ² Διάστημα εμπιστοσύνης; ³ Bias-corrected and accelerated; ⁴ Βασισμένο σε δείγματα bootstrap; ⁵ Αναθεωρημένο Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης; ⁶ Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης

Πίνακας 8: Πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox αναφορικά με την επιβίωση των ασθενών με ΠΜ

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης του Cox με την εφαρμογή της μεθόδου bootstrap για να προσδιοριστεί η προγνωστική αξία των μελετούμενων μορίων tRFs σε σχέση με το διεθνές σύστημα σταδιοποίησης (ISS) και το αναθεωρημένο διεθνές σύστημα σταδιοποίησης (R-ISS). Η ανάλυση αυτή απέδειξε ότι η προγνωστική αξία των μορίων i-tRF-Pro^{TGG}, i-tRF-Glu^{CTC}, και i-tRF-His^{GTG} αναφορικά με την ολική επιβίωση των ασθενών με ΠΜ είναι ανεξάρτητη του συστήματος σταδιοποίησης R-ISS. Επιπλέον, η προγνωστική αξία των i-tRF-Gly^{GCC} και

3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} αναφορικά με την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση είναι ανεξάρτητη του συστήματος ISS. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στον Πίνακα 8.

3.2 Μελέτη miRNA-seq για την έκφραση miRNA στα CD138+ κύτταρα του μυελού ασθενών με πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες

Στο δεύτερο στάδιο της εν λόγω μελέτης εφαρμόστηκε, όπως προαναφέρθηκε, μια πιο καθολική προσέγγιση με σκοπό τον προσδιορισμό του πλέον κατάλληλου βιοδείκτη με κλινική και προγνωστική αξία στο ΠΜ. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS) με τη δημιουργία NGS βιβλιοθηκών για δείγματα προερχόμενα από CD138+ κύτταρα ασθενών με MGUS, ασυμπτωματικό ΠΜ, καθώς και ΠΜ σταδίου R-ISS I,II και III σε μία μεγαλύτερη κοόρτη ασθενών. Η περαιτέρω ανάλυση χωρίστηκε σε δύο βήματα, στην ανάλυση των μεταβολών του μεταγραφώματος μεταξύ ΠΜ και των πρόδρομων μορφών του (MGUS, ασυμπτωματικό ΠΜ) και στην ανάλυση των διαφορών μεταξύ των τριών διαφορετικών προγνωστικών σταδίων. Κατά το πρώτο βήμα εντοπίστηκαν τα miRNAs που εκφράζονται τόσο στο ΠΜ, όσο και στα πρόδρομα στάδιά του και επιλέχθηκαν αυτά που παρουσιάζουν σημαντική διαφορά στην έκφραση ανάμεσα στις δύο κατηγορίες. Στο δεύτερο βήμα εντοπίστηκαν τα miRNAs που εκφράζονται και στα τρία διαφορετικά προγνωστικά στάδια και επιλέχθηκαν αυτά που εμφανίζουν προοδευτική διαφοροποίηση μεταξύ αυτών. Τα miRNAs που εμφάνιζαν διαφορές στην έκφρασή τους και στις δύο κατηγορίες επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση σε ένα υποσύνολο των ασθενών της μελέτης. Εξ αυτών επιλέχθηκε το καλύτερο σε όρους προγνωστικής αξίας μόριο για να μελετηθεί στο σύνολο των ασθενών.

Συνολικά, 193 διαδοχικοί ασθενείς με ΠΜ (n=138), ασυμπτωματικό ΠΜ (n=30) και MGUS (n=25) συμπεριλήφθησαν στη μελέτη. Όλοι οι ασθενείς ήταν νεοδιαγνωσμένοι και δεν είχαν λάβει καμία θεραπεία για το ΠΜ. Η διάμεση ηλικία ήταν τα 69 έτη. Αναφορικά με τη σταδιοποίηση των ασθενών με βάση το διεθνές προγνωστικό σύστημα R-ISS, 24.7%, 47.8% και 20.3% των ασθενών ταξινομήθηκαν αντίστοιχα στα στάδια I, II και III. Το 65.2% των ασθενών με ΠΜ εμφάνιζε οστική νόσο. 121 ασθενείς έλαβαν κάποιο σχήμα βασισμένο στη βορτεζομίμη (βορτεζομίμη με λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη ή βορτεζομίμη με κυκλοφωσφαμίδη και δεξαμεθαζόνη), ενώ 11

έλαβαν σχήμα βασισμένο στη λεναλιδομίδη. Ακόμη, από τους 138 ασθενείς με ΠΜ 37 (26.8 %) υπεβλήθησαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μετά από μεγαθεραπεία με μελφαλάνη, ενώ οι υπόλοιποι 98 (71 %) δεν ήταν κατάλληλοι για αυτόλογη μεταμόσχευση είτε λόγω ηλικίας, είτε λόγω συννοσηροτήτων. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται στον *Πίνακα 9*.

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών n=193
Νόσος	
MGUS	25 (13.0%)
Ασυμπτωματικό ΠΜ	30 (15.5%)
ΠΜ	138 (71.5%)
Ασθενείς με ΠΜ (n=138)	
Στάδιο R-ISS¹	
R-ISS I	34 (24.6%)
R-ISS II	66 (47.8%)
R-ISS III	28 (20.3%)
Ελλιπή δεδομένα	10
Στάδιο ISS²	
ISS I	39 (28.3%)
ISS II	42 (30.4%)
ISS III	54 (39.2%)
Ελλιπή δεδομένα	3
Πρότερη διάγνωση sMM / MGUS	
Ναι	22 (15.9%)
Όχι	116 (84.1%)
Φύλο	
Άρρεν	77 (55.8%)
Θήλυ	61 (44.2%)
Θεραπεία	
Σχήματα βασισμένα στη βορτεζομίμη	121 (87.7%)
Λεναλιδομίδη-δεξαμεθαζόνη	11 (8.00%)
Άλλα	6
Οστική νόσος	
Ναι	90 (65.2%)
Όχι	36 (26.1%)
Ελλιπή δεδομένα	12
Ανταπόκριση στην 1^η γραμμή θεραπείας	
Αυστηρώς πλήρης ανταπόκριση (sCR)	26 (18.8%)
Πλήρης ανταπόκριση (CR)	18 (13.1%)
Πολύ καλή μερική ανταπόκριση (VGPR)	46 (33.3%)
Μερική ανταπόκριση (PR)	31 (22.5%)
Σταθερή νόσος (SD)	8 (5.80%)
Πρόοδος νόσου (PD)	2 (1.50%)
Ελλιπή δεδομένα	7

¹Revised International Staging System, ²International Staging System

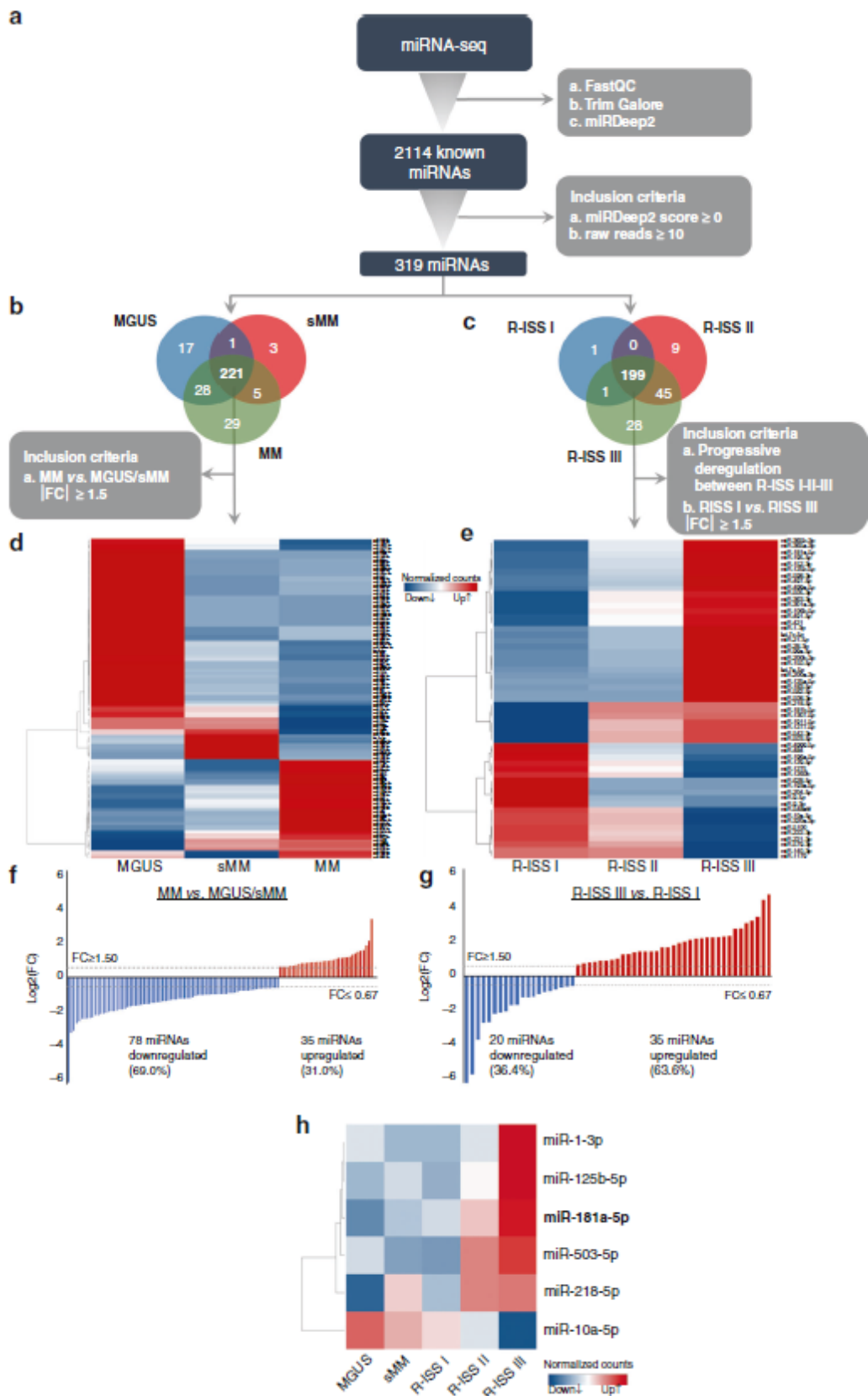
Πίνακας 9: Κλινικά χαρακτηριστικά της κοόρτης των ασθενών της μελέτης

3.2.1 Χρήση miRNA sequencing για τον προσδιορισμό του προφίλ έκφρασης miRNA στα CD138+ κύτταρα του μυελού των οστών ασθενών με πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες

Για τη διερεύνηση των μεταβολών στην έκφραση των miRNA στο ΠΜ πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση miRNA (miRNA-seq) στα CD138+ πλασματοκύτταρα του μυελού των οστών ασθενών με ΠΜ, ασυμπτωματικό ΠΜ και MGUS με τη χρήση του συστήματος Illumina NextSeq 550. Τα κύρια βήματα της ροής εργασιών κατά τη διαδικασία αλληλούχισης miRNA παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα 21. Αρχικά πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα του «θορύβου» με τη χρήση των λογισμικών FastQC, TrimGalore και miRDeep2. Ακολούθως, 2114 διαφορετικά γνωστά miRNAs χαρτογραφήθηκαν επιτυχώς στην αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος. Για περαιτέρω φιλτράρισμα των αποτελεσμάτων εξαιρέσαμε τα miRNAs με λιγότερες από 10 αδρές αναγνώσεις και αρνητικό σκορ miRDeep2. Με τον τρόπο αυτό περιορίσαμε τα αποτελέσματα στα 319 miRNAs, τα οποία επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση (Εικόνα 21a). Εν συνεχεία η ανάλυσή μας χωρίστηκε σε δύο βήματα με σκοπό να διερευνήσουμε τις μεταβολές σε επίπεδο μεταγραφώματος μεταξύ α. ΠΜ και ασυμπτωματικού ΠΜ ή MGUS και β. ασθενών με ΠΜ σταδίων R-ISS I, II και III.

Εστιάζοντας στις διαφορές μεταξύ ΠΜ και ασυμπτωματικού ΠΜ/MGUS, 221 από τα 319 miRNAs διαπιστώθηκε ότι εκφράζονται συγχρόνως στους ασθενείς με ΠΜ, ασυμπτωματικό ΠΜ και MGUS (Εικόνα 21b). Μεταξύ αυτών, 113 miRNAs διαπιστώθηκε ότι έχουν διαφορετική έκφραση μεταξύ των δειγμάτων ασθενών με ΠΜ και ασυμπτωματικό ΠΜ/MGUS με fold change (FC) ≥ 1.5 ή FC ≤ 0.67 (Εικόνα 21d). Εξ αυτών, 35 (31.0%) miRNAs φάνηκε ότι υπερεκφράζονται στο ΠΜ συγκριτικά με το ασυμπτωματικό ΠΜ και το MGUS (Εικόνα 21f). Ομοίως, 199 από τα 319 miRNAs εκφράζονται και στα 3 στάδια R-ISS (Εικόνα 21c). Βάζοντας ως κριτήρια τη βαθμιαία απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs μεταξύ των σταδίων R-ISS I,II και III και τη μεταβολή (fold change) (FC) ≥ 1.5 ή FC ≤ 0.67 μεταξύ των τριών σταδίων καταλήξαμε σε 55 miRNAs (Εικόνα 21e), εκ των οποίων 35 miRNAs (63.6%) φάνηκε ότι υπερεκφράζονται στο στάδιο R-ISS III συγκριτικά με το R-ISS I (Εικόνα 21 g).

Συνολικά έξι miRNAs (miR-1-3p, miR-125b-5p, miR-181a-5p, miR-503-5p, miR-218-5p και miR-10a-5p) εμφάνιζαν διαφορετική έκφραση ταυτόχρονα μεταξύ ΠΜ και ασυμπτωματικού ΠΜ ή MGUS, αλλά και μεταξύ των σταδίων R-ISS III και R-ISS I (Εικόνα 21h). Τα μόρια αυτά επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση της έκφρασής τους και κλινική αξιολόγηση σε μια υποομάδα της κοόρτης των ασθενών με ΠΜ αποτελούμενη από 45 ασθενείς. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά της υποομάδας αυτής και της συνολικής κοόρτης. Η ανάλυση επιβίωσης ανέδειξε το miR-181a ως το μόνο υποψήφιο μόριο που είχε στατιστικά σημαντική δυσμενή συσχέτιση τόσο με την ολική επιβίωση (OS) (Kaplan–Meier: $p=0.016$, μονοπαραγοντική Cox: HR=8.455; $p=0.044$) όσο και με την επιβίωση ελεύθερη προόδου νόσου (PFS) (Kaplan–Meier: $p=0.036$, μονοπαραγοντική Cox: HR=2.880; $p=0.047$) των ασθενών με ΠΜ, ενώ δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με το OS όσο και με το PFS για τα λοιπά υποψήφια μόρια (miR-1-3p, miR-125b-5p, miR-503-5p, miR-218-5p και miR-10a-5p). Με βάση αυτά τα χαρακτηριστικά το μόριο αυτό επιλέχτηκε ώστε να αξιολογηθεί η κλινική του αξία στη σταδιοποίηση κινδύνου και την πρόγνωση των ασθενών με ΠΜ.

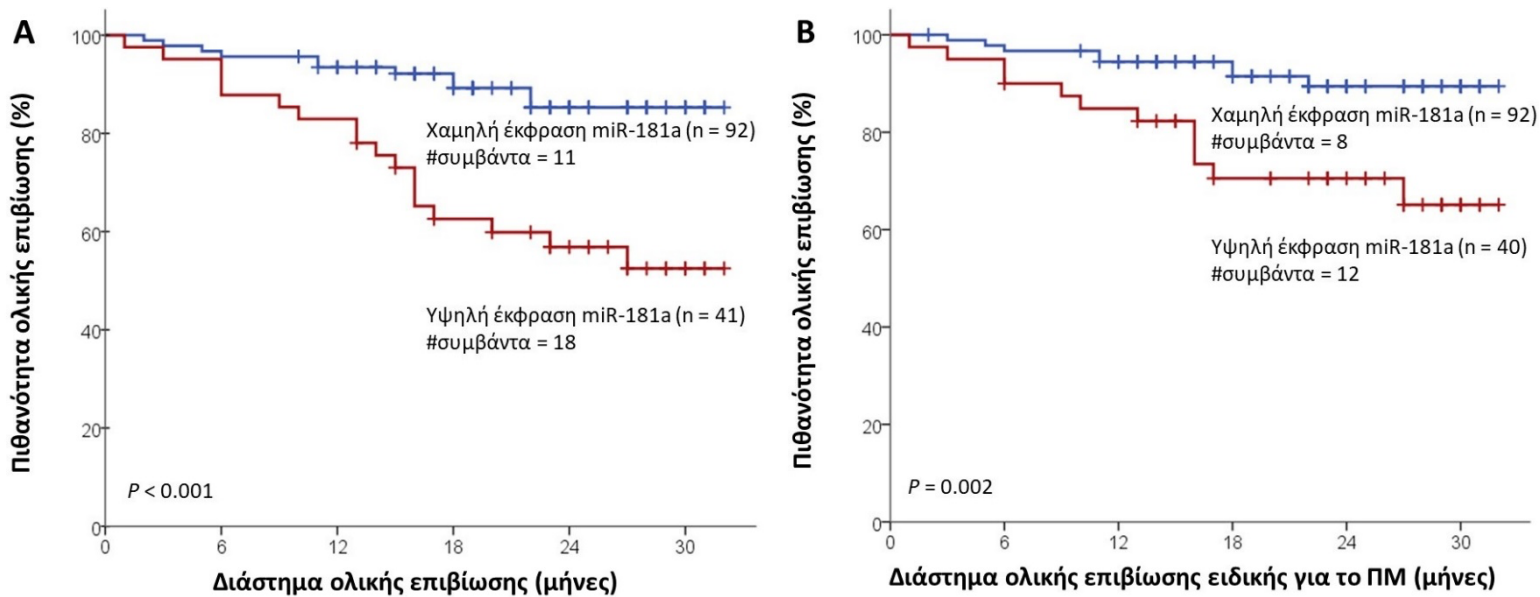


Εικόνα 21: Προφίλ έκφρασης miRNAs στα CD138+ πλασματοκύτταρα. (α) Διάγραμμα ροής εργασιών της ανάλυσης miRNA-seq στα CD138+ πλασματοκύτταρα του μυελού

ασθενών με ΠΜ, ασυμπτωματικό ΠΜ και MGUS. Διάγραμμα Venn που παρουσιάζει τα κοινά miRNAs μεταξύ (b) ΠΜ, ασυμπτωματικού ΠΜ και MGUS και (c) μεταξύ R-ISS I-II-III. Θερμικός χάρτης (heatmap) των miRNAs με διαφορετική έκφραση μεταξύ (d) ασθενών με ΠΜ, ασυμπτωματικό ΠΜ και MGUS και (e) μεταξύ των ασθενών σταδίου R-ISS I-II-III. Θηκόγραμμα της log₂FC των miRNAs (f) μεταξύ ΠΜ και ασυμπτωματικό ΠΜ/MGUS και (g) μεταξύ R-ISS III και R-ISS I. (h) Θερμικός χάρτης των miRNAs που εμφανίζουν διαφορά στην έκφραση ταυτόχρονα μεταξύ MGUS, ασυμπτωματικού ΠΜ και των σταδίων του R-ISS. Το κόκκινο αντιστοιχεί σε υψηλά και το μπλε σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης των miRNAs, FC: fold change.

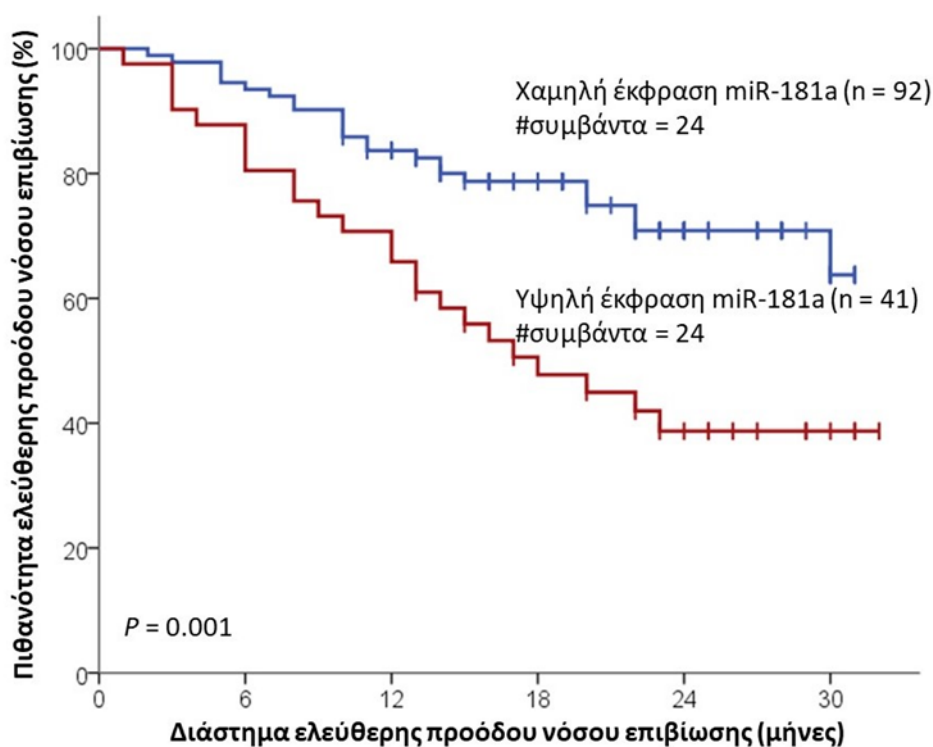
3.2.2 Η υπερέκφραση του miR-181a στα CD138+ κύτταρα του μυελού ασθενών με ΠΜ σχετίζεται με βραχύ διάστημα μέχρι την υποτροπή μετά την πρώτη γραμμής θεραπείας και με δυσμενή αποτελέσματα ως προς την επιβίωση

Για να εκτιμηθεί η προγνωστική αξία της έκφρασης του miR-181a στα CD138+ πλασματοκύτταρα του μυελού των οστών πραγματοποιήθηκε ανάλυση Kaplan-Meier και ανάλυση παλινδρόμησης του Cox. Ο αλγόριθμος X-tile χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί η βέλτιστη τιμή διαχωρισμού (cut-off), η οποία στην περίπτωση αυτή αντιστοιχεί στο 70^ο εκατοστημόριο. Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier ανέδειξαν σημαντικά μικρότερο διάστημα ολικής επιβίωσης (OS) στους ασθενείς με ΠΜ που χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση του miR-181a στα CD138+ κύτταρα του μυελού τους ($p < 0.001$) (Εικόνα 22A). Η δυσμενής προγνωστική αξία της υπερέκφρασης του miR-181a διατηρείται και όσον αφορά την ειδική για το ΠΜ επιβίωση ($p = 0.002$) (Εικόνα 22B). Η μονοπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης του Cox κατέδειξε επίσης τη σημαντικά μικρότερη ολική επιβίωση στους ασθενείς με ΠΜ και αυξημένη έκφραση miR-181a (HR: 3.867; 95% CI: 1.825–8.193; $p < 0.001$) (Πίνακας 10).



Εικόνα 22: Καμπύλες Kaplan-Meier για (A) την ολική επιβίωση και (B) την ειδική για το ΠΜ ολική επιβίωση, οι οποίες καταδεικνύουν τη δυσμενή έκβαση των ασθενών με ΠΜ που υπερεκφράζουν το miR-181a στα CD138+ πλασματοκύτταρα του μυελού των οστών συγκριτικά με αυτούς που εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης.

Αναφορικά με την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση (PFS) οι καμπύλες Kaplan-Meier κατέδειξαν ότι οι ασθενείς με υπερέκφραση του miR-181a εμφανίζουν σημαντικά μικρότερο διάστημα ελεύθερης προόδου νόσου επιβίωσης (PFS) ($p = 0.001$) (Εικόνα 23), το οποίο επιβεβαιώθηκε από την ανάλυση μονοπαραγοντικής παλινδρόμησης του Cox (HR: 2.559; 95% CI: 1.453–4.507; $p = 0.001$) (Πίνακας 11), συγκριτικά με τους ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του miR-181a.



Εικόνα 23: Καμπύλη Kaplan-Meier για την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση ασθενών με ΠΜ, ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης του miR-181a, η οποία καταδεικνύει την αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης προόδου νόσου των ασθενών με ΠΜ που υπερεκφράζουν το miR-181a στα CD138+ πλασματοκύτταρα του μυελού των οστών συγκριτικά με αυτούς που εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του μορίου.

	Μεταβλητή	ΛΕ ¹	95% ΔΕ ²	P	BCa ³ bootstrap ⁴ 95% ΔΕ ²	Bootstrap P
Μονοπαραγοντική ανάλυση	Ηλικία	1.04	1.01 – 1.08	0.01	1.01 – 1.08	0.01
	R-ISS (III vs. I/II) ⁵	2.33	1.14 – 4.77	0.02	0.98 – 4.77	0.02
	Κυτταρογενετικά υψηλού κινδύνου (ναι vs. Όχι)	2.80	1.31 – 6.00	0.01	1.35 – 6.76	0.01
	B2M ⁶ (>5.5 mg/L vs. ≤5.5 mg/L)	3.49	1.69 – 7.20	0.001	1.64 – 8.41	0.001
	LDH ⁷ (αυξημένα vs. φυσιολογικά)	1.80	0.89 – 3.64	0.10	0.74 – 3.52	0.10
	Κρεατινίνη (≥2 mg/dl vs. <2 mg/dl)	2.04	0.95 – 4.37	0.07	0.74 – 4.11	0.07
	HDM/ASCT (όχι vs. ναι)	2.36	0.91 – 6.11	0.08	0.94 – 16.10	0.06
	Ανταπόκριση (PD,SD,PR vs. VGRP, CR, sCR)	3.63	1.78 – 7.41	<0.01	1.78 – 7.82	0.001
	Φύλο (άνδρες vs. γυναίκες)	1.47	0.73 – 2.98	0.28	0.73 – 3.15	0.27
	miR-181a (υψηλά vs. χαμηλά)	3.87	1.83 – 8.19	<0.001	1.84 – 8.68	0.001
Πολυπαραγοντική ανάλυση ⁸	miR-181a (υψηλά vs. χαμηλά)	2.63	1.12 – 6.19	0.03	0.69 – 19.2	0.04

¹ Λόγος επικινδυνότητας (HR), ² Διάστημα εμπιστοσύνης του εκτιμώμενου Λόγου Επικινδυνότητας, ³Bias-corrected and accelerated, ⁴Βασισμένο σε δείγματα bootstrap, ⁵Αναθεωρημένο Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης (Revised International Staging System), ⁶ β₂ μικροσφαιρίνη (B2M). ⁷ Γαλακτική Αφυδρογονάση (LDH). ⁸ Το πολυπαραγοντικό μοντέλο που αφορούν την ολική επιβίωση συμπεριέλαβε το miR-181a και ως συμμεταβλητές την ηλικία των ασθενών, το στάδιο R-ISS, τη β₂ μικροσφαιρίνη, την LDH, τα κυτταρογενετικά υψηλού κινδύνου, την κρεατινίνη ορού, το φύλο και την ανταπόκριση στη 1^η γραμμή θεραπείας

Πίνακας 10: Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox (μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική) αναφορικά με την προγνωστική ικανότητα της έκφρασης του miR-181a ως προς την ολική επιβίωση ασθενών με ΠΜ.

Επιπλέον, για να εκτιμηθεί η ανεξάρτητη προγνωστική αξία του miR-181a στο ΠΜ, εφαρμόστηκε πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης του Cox προσαρμοσμένη ως προς το στάδιο R-ISS των ασθενών, την παρουσία κυτταρογενετικών αλλοιώσεων υψηλού κινδύνου [+1q21, t(4;14), del(17p13), t(14;16), t(11;14), del(13q)], τα επίπεδα της β₂ μικροσφαιρίνης της LDH και της κρεατινίνης, το φύλο και την ηλικία των ασθενών, καθώς και το αν έχουν υποβληθεί ή όχι σε HDM-ASCT και την ανταπόκριση στην πρώτη γραμμή θεραπείας. Η ανάλυση ανέδειξε ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του miR-181a στα CD138+ κύτταρα του μυελού ασθενών με ΠΜ αποτελούν

ανεξάρτητο δυσμενή προγνωστικό παράγοντα ως προς την ολική επιβίωση ασθενών με ΠΜ (HR: 2.629; 95% CI: 1.117–6.187; $p = 0.027$) (Πίνακας 10) και ως προς τον υψηλότερο κίνδυνο προόδου νόσου μετά από πρώτης γραμμής θεραπεία (HR: 2.524; 95% CI: 1.300–4.899; $p = 0.006$)(Πίνακας 11).

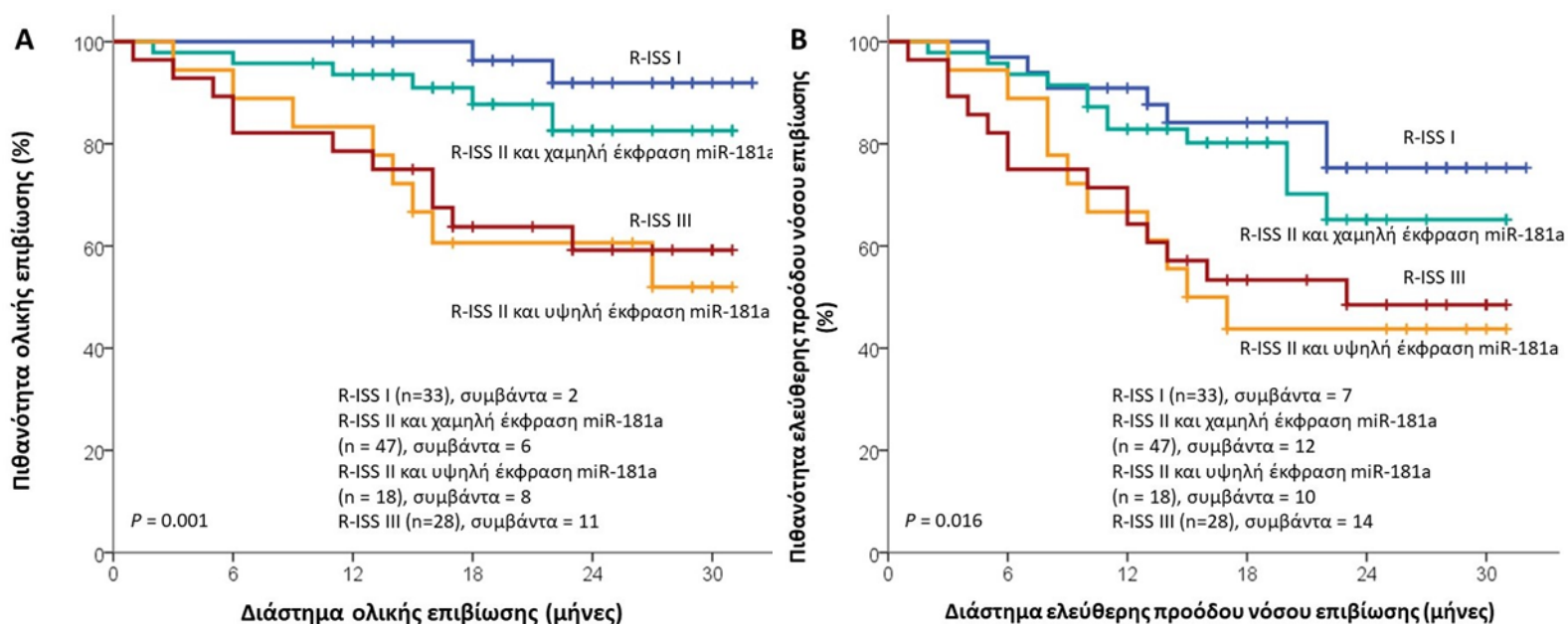
	Μεταβλητή	ΛΕ ¹	95% ΔΕ ²	P	BCa ³ bootstrap ⁴ 95% ΔΕ ²	Bootstrap P
Μονοπαραγοντική ανάλυση	Ηλικία	1.03	1.01 – 1.06	0.01	1.01 – 1.07	0.01
	R-ISS (III vs. I/II)	1.89	1.05 – 3.42	0.04	0.94 – 3.54	0.04
	Κυτταρογενετικά υψηλού κινδύνου (ναι vs. Όχι)	2.06	1.19 – 3.59	0.01	1.25 – 3.75	0.01
	B2M ⁶ (>5.5 mg/L vs. ≤5.5 mg/L)	3.23	1.88 – 5.57	<0.001	1.87 – 5.95	0.001
	LDH ⁷ (αυξημένα vs. φυσιολογικά)	1.61	0.92 – 2.82	0.10	0.87 – 2.81	0.10
	Κρεατινίνη (≥2 mg/dl vs. <2 mg/dl)	1.55	0.82 – 2.94	0.18	0.77 – 3.09	0.18
	HDM/ASCT (όχι vs. ναι)	2.70	1.28 – 5.72	0.01	1.31 – 8.95	0.01
	Ανταπόκριση (PD,SD,PR vs. VGRP, CR, sCR)	6.86	3.85 – 12.2	<0.01	3.94 – 12.2	0.001
	Φύλο (άνδρες vs. γυναίκες)	0.87	0.52 – 1.47	0.61	0.53 – 1.40	0.59
	miR-181a (υψηλά vs. χαμηλά)	2.56	1.45 – 4.51	0.001	1.42 – 4.64	0.001
Πολυπαραγοντική ανάλυση ⁸	miR-181a (υψηλά vs. χαμηλά)	2.52	1.30 – 4.90	0.06	0.82 – 10.44	0.01

¹ Λόγος επικινδυνότητας (HR), ² Διάστημα εμπιστοσύνης του εκτιμώμενου Λόγου Επικινδυνότητας, ³Bias-corrected and accelerated, ⁴Βασισμένο σε δείγματα bootstrap, ⁵ Αναθεωρημένο Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης (Revised International Staging System), ⁶ β₂ μικροσφαιρίνη (B2M). ⁷ Γαλακτική Αφυδρογονάση (LDH). ⁸ Το πολυπαραγοντικό μοντέλο που αφορούν την ολική επιβίωση συμπεριέλαβε το miR-181a και ως συμμεταβλητές την ηλικία των ασθενών, το στάδιο R-ISS, τη β₂ μικροσφαιρίνη, την LDH, τα κυτταρογενετικά υψηλού κινδύνου, την κρεατινίνη ορού, το φύλο και την ανταπόκριση στη 1^η γραμμή θεραπείας

Πίνακας 11: Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox (μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική) αναφορικά με την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση ασθενών με ΠΜ.

3.2.3. Η υπερέκφραση του miR-181a ενισχύει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό την προγνωστική ικανότητα των κλινικά εδραιωμένων προγνωστικών δεικτών για το ΠΜ όταν συνδυαστεί με αυτούς

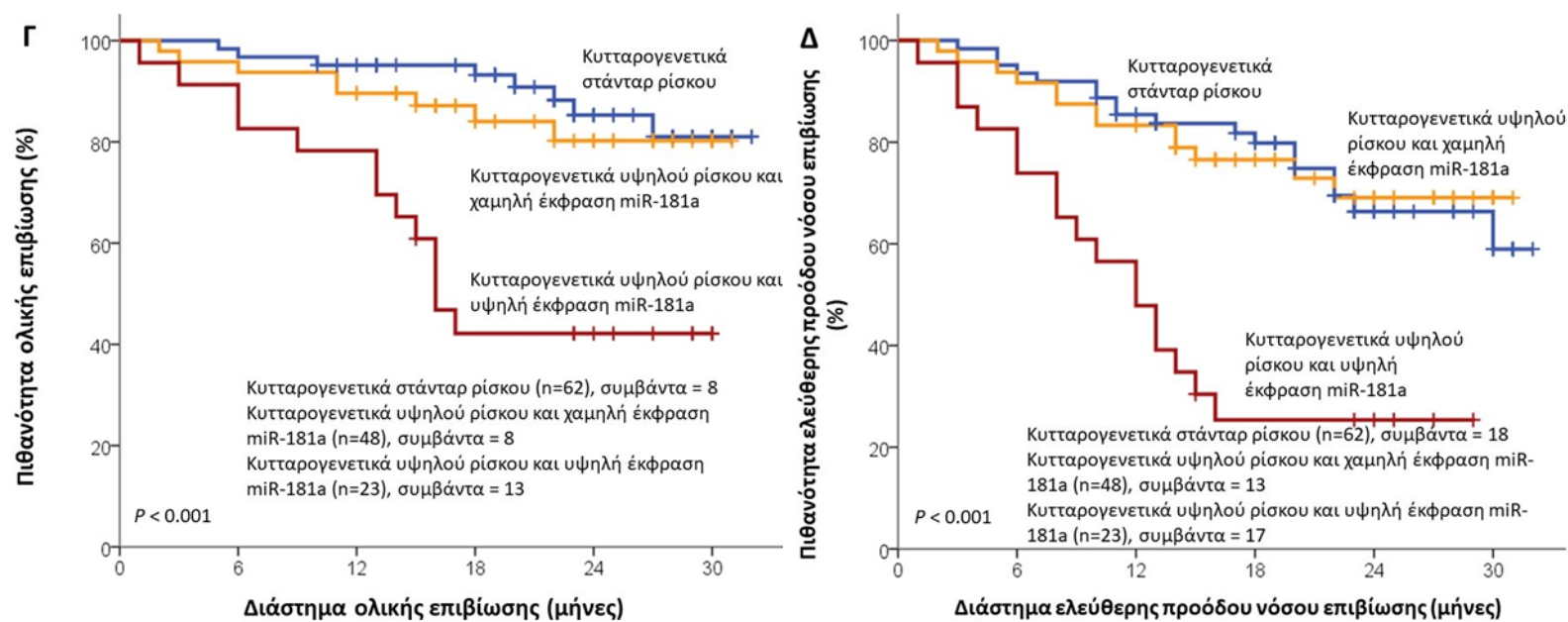
Ορμώμενοι από την ανεξάρτητη προγνωστική αξία του miR-181a, διερευνήσαμε περαιτέρω την ικανότητα του να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα των εδραιωμένων κλινικά προγνωστικών δεικτών για το ΠΜ να προβλέψουν την πρόγνωση των ασθενών. Το προγνωστικό στάδιο R-ISS, τα κυτταρογενετικά υψηλού ρίσκου [+1q21, t(4;14), del(17p13), t(14;16), t(11;14), del(13q)] και η ανταπόκριση στην πρώτη γραμμή θεραπείας αποτελούν τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους προγνωστικούς δείκτες της νόσου. Η ενσωμάτωση του miR-181a με αυτούς τους δείκτες βελτίωσε σαφώς την εκτίμηση της πρόγνωση των ασθενών. Ειδικότερα, οι καμπύλες Kaplan–Meier ανέδειξαν ότι ο συνδυασμός του σταδίου R-ISS με την υπερέκφραση του miR-181a παρέχει ένα καλύτερο μοντέλο διαστρωμάτωσης για την ολική επιβίωση (OS) ($p = 0.001$) (Εικόνα 24A) και την ελεύθερη πρόοδο νόσου επιβίωση (PFS) ($p = 0.016$) (Εικόνα 24B) ασθενών με ΠΜ. Ειδικότερα, οι ασθενείς σταδίου R-ISS II που υπερεκφράζουν το miR-181a παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερο διάστημα ολικής και ελεύθερης πρόοδου νόσου επιβίωσης, ανάλογο με αυτό των ασθενών σταδίου R-ISS III, συγκριτικά με τους ασθενείς σταδίου R-ISS II με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης miR-181a, οι οποίοι εμφανίζουν διαστήματα επιβίωσης που προσομοιάζουν αυτά ασθενών σταδίου R-ISS I.



Εικόνα 24: Τα επίπεδα έκφρασης του miR-181a στα CD138+ κύτταρα των ασθενών με ΠΜ συνεισφέρουν στην αποτελεσματικότερη διαστρωμάτωση κινδύνου ασθενών με ΠΜ. Καμπύλες επιβίωσης Kaplan–Meier για την (Α) ολική επιβίωση (OS) και (Β) την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση (PFS) ασθενών με ΠΜ ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης του miR-181a σε συνδυασμό με το στάδιο R-ISS.

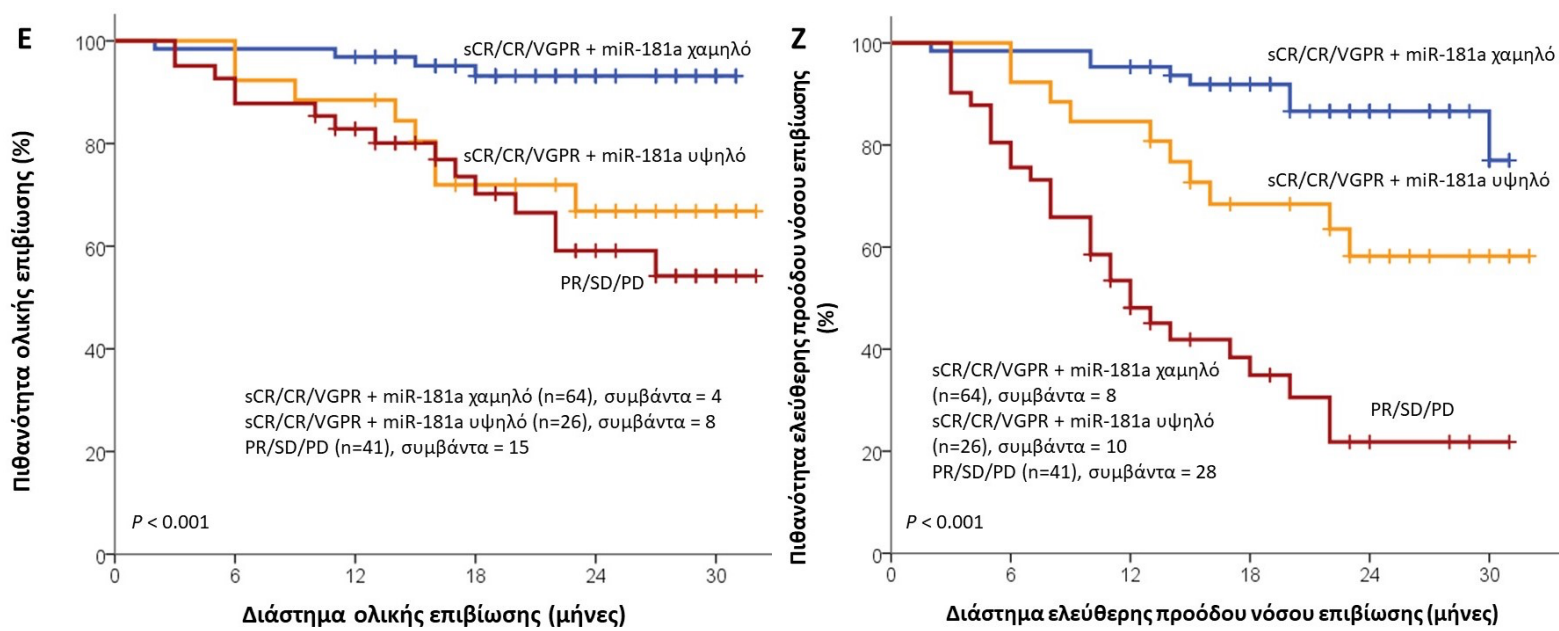
Ομοίως, τα επίπεδα έκφρασης του miR-181a στα CD138+ κύτταρα του μυελού είναι ικανά να συνεισφέρουν στην περαιτέρω διαστρωμάτωση του κινδύνου δυσμενούς έκβασης της νόσου μεταξύ των ασθενών με κυτταρογενετικά υψηλού κινδύνου. Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς με κυτταρογενετικές αλλοιώσεις υψηλού ρίσκου και αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-181a εμφανίζουν σημαντικά δυσμενέστερη έκβαση της νόσου αναφορικά με την ολική επιβίωση (OS) ($p < 0.001$) και την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση ($p < 0.001$) συγκριτικά με αυτούς που εμφανίζουν κυτταρογενετικές αλλοιώσεις υψηλού ρίσκου αλλά υποεκφράζουν το miR-181a, των οποίων η επιβίωση προσομοιάζει αυτών που ανήκουν στην ομάδα στάνταρ κινδύνου.

(Εικόνα 25)



Εικόνα 25: Τα επίπεδα έκφρασης του miR-181a στα CD138+ κύτταρα των ασθενών με ΠΜ συνεισφέρουν στην αποτελεσματικότερη διαστρωμάτωση κινδύνου ασθενών με ΠΜ. Καμπύλες επιβίωσης Kaplan–Meier για την ολική επιβίωση (OS) και την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση (PFS) ασθενών με ΠΜ ανάλογα με τα κυτταρογενετικά υψηλού κινδύνου.

Τέλος, φαίνεται ότι η έκφραση του miR-181a μπορεί να συμβάλει στη περαιτέρω διαστρωμάτωση της πρόγνωσης ασθενών ανάλογα με την ανταπόκρισή τους στην πρώτη γραμμή θεραπείας. Πιο λεπτομερώς, η υπερέκφραση του miR-181a μπορεί να εντοπίσει τους ασθενείς που βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν πρόοδο νόσου ($p < 0.001$) ή να έχουν μικρότερο διάστημα ολικής επιβίωσης ($p < 0.001$) μεταξύ αυτών που εμφανίζουν τις βέλτιστες ανταποκρίσεις στη θεραπεία (αυστηρώς πλήρης ανταπόκριση—sCR, πλήρης ανταπόκριση—CR και πολύ καλή μερική ανταπόκριση—VGPR). (Εικόνα 26)



Εικόνα 26: Τα επίπεδα έκφρασης του miR-181a στα CD138+ κύτταρα των ασθενών με ΠΜ συνεισφέρουν στην αποτελεσματικότερη διαστρωμάτωση κινδύνου ασθενών με ΠΜ. Καμπύλες επιβίωσης Kaplan–Meier για την ολική επιβίωση (OS) και την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση (PFS) ασθενών με ΠΜ ανάλογα με την ανταπόκριση στην 1^η γραμμή θεραπείας.

3.3 Μελέτη κυκλοφορούντων miRNA βιοδεικτών με κλινική-διαγνωστική και προγνωστική αξία στην οστική νόσο του ΠΜ

Στο τελικό στάδιο της μελέτης προχωρήσαμε στο να μελετήσουμε την έκφραση μιας ομάδας miRNAs (19) που σχετίζονται με την οστεοπόρωση, στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ και να αξιολογήσουμε την κλινική χρησιμότητα αυτών αναφορικά με την οστική νόσο του ΠΜ. Πρόκειται για τα παρακάτω μόρια: let-7b-5p, miR-17-5p, miR-19b-3p, miR-29b-3p, miR-31-5p, miR-127-3p, miR-133b, miR-141-3p, miR-143-3p, miR-144-5p, miR-152-3p, miR-188-5p, miR203a, miR-214-3p, miR-320a-3p, miR-335-5p, miR-375-3p, miR-550a-3p, miR-582-5p.

Οι ασθενείς αξιολογήθηκαν για την παρουσία οστικής νόσου με τη χρήση της ολόσωμης αξονικής τομογραφίας χαμηλής δόσης (WBLDCT), πλην περιπτώσεων όπου αυτό δεν ήταν εφικτό (κινητικά προβλήματα, επηρεασμένο PS). Ως σκελετικά συμβάματα (SREs- skeletal related events) ορίστηκαν τα παρακάτω: 1) παθολογικό κάταγμα, 2) συμπίεση νωτιαίου μυελού, 3) ανάγκη για ακτινοθεραπεία σε οστική βλάβη, 4) ανάγκη για χειρουργείο σε οστική βλάβη. (251) Η προγνωστική σταδιοποίηση των ασθενών έγινε βάσει του αναθεωρημένου διεθνούς συστήματος σταδιοποίησης (R-ISS).

Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 62 ασθενείς με ΠΜ με ή χωρίς οστική νόσο σχετιζόμενη με το ΠΜ κατά τη διάγνωση. 35 εξ αυτών έπασχαν από ΠΜ με οστική νόσο, ενώ οι υπόλοιποι 27 δεν εμφάνιζαν οστική νόσο. Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν ενήλικες ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση μυελώματος, οι οποίοι δεν είχαν λάβει μέχρι τότε καμία θεραπεία. Από τη μελέτη εξαιρέθηκαν ασθενείς με άλλες συνυπάρχουσες κακοήθειες. Όλοι οι ασθενείς υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης μετά από ενημέρωση πριν από οποιαδήποτε διαδικασία της μελέτης.

Η διάμεση ηλικία των ασθενών της μελέτης ήταν τα 62 έτη (εύρος: 35-90). Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελούνταν από 35 (56.5%) άνδρες ασθενείς και 27 (43.5%) γυναίκες. Στην υποομάδα των ασθενών με οστική νόσο, 20 από τους 35 (57.1%) εμφάνιζαν SREs κατά τη διάγνωση. 18 (29%) από τους ασθενείς της μελέτης ήταν R-ISS σταδίου I, 25 (40.3%) R-ISS σταδίου II και 12 (19.4%) R-ISS σταδίου III, ενώ για τους υπόλοιπους 7 (11.3%) τα δεδομένα είναι ελλιπή. 60 (96.8%) ασθενείς

έλαβαν αγωγή με συνδυασμό βορτεζομίμπης με ένα ανοσοτροποποιητικό φάρμακο ή με κυκλοφωσφαμίδη και δεξαμεθαζόνη και οι υπόλοιποι 2 (3.2%) έλαβαν συνδυασμό λεναλιδομίδης με δεξαμεθαζόνη. Ακόμη, 38 (61.3%) ασθενείς υπεβλήθησαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μετά από megaθεραπεία με μελφαλάνη, ενώ οι υπόλοιποι 24 (38.7%) δεν ήταν κατάλληλοι για αυτόλογη μεταμόσχευση είτε λόγω ηλικίας, είτε λόγω συννοσηροτήτων. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται στον Πίνακα 12.

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών (%)
Φύλο	
Άνδρες	35 (56.5%)
Γυναίκες	27 (43.5%)
Τύπος ΠΜ	
IgA	17 (27.5%)
IgG	35 (56.5%)
IgD	2 (3.2%)
Ελαφρών αλύσεων	4 (6.4%)
Μη εκκριτικό ΠΜ	4 (6.4%)
Στάδιο ISS ¹	
I	23 (37.1%)
II	15 (24.2%)
III	23 (37.1%)
Ελλιπή δεδομένα	1 (1.6%)
Στάδιο R-ISS ²	
I	18 (29%)
II	25 (40.3%)
III	12 (19.4%)
Ελλιπή δεδομένα	7 (11.3%)
Θεραπεία 1^{ης} γραμμής	
Βασιζόμενη σε βορτεζομίμπη	60 (96.8%)
Βασιζόμενη σε IMiD	2 (3.2%)
HDM-ASCT ³	
Ναι	38 (61.3%)
Όχι	24 (38.7%)

Οστική νόσος	
Ναι	35 (56.5%)
Όχι	27 (43.5%)
SREs⁴ (στους 35 με οστική νόσο)	
Ναι	20 (57.1%)
Όχι	15 (42.9%)
Θεραπεία με διφωσφονικά	
Ναι	35 (56.5%)
Όχι	27 (43.5%)

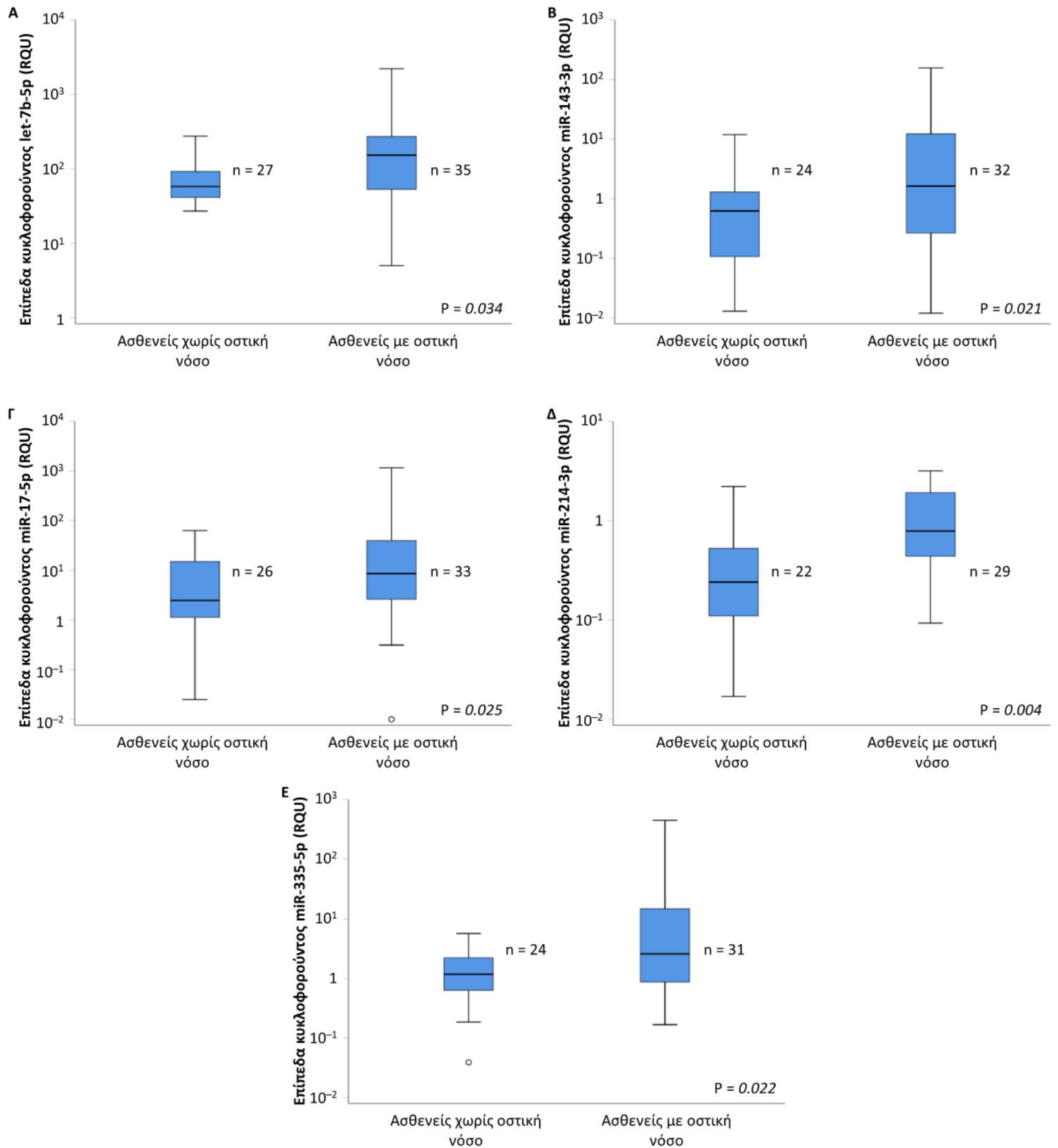
¹ International Staging System, ² Revised International Staging System, ³ Αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μετά από μεγαθεραπεία με μελφαλάνη, ⁴ Skeletal-related events (σκελετικά συμβλήματα).

Πίνακας 12: Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών,

3.3.1 Κυκλοφορούντα miRNAs που μπορούν να διακρίνουν ασθενείς με οστική νόσο του ΠΜ από αυτούς χωρίς

Η ανάλυση με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann–Whitney U ανέδειξε 5 κυκλοφορούντα miRNAs, ειδικότερα τα let-7b-5p ($p = 0.034$), miR-143-3p ($p = 0.021$), miR-17-5p ($p = 0.025$), miR-214-3p ($p = 0.004$), και miR-335-5p ($p = 0.022$), των οποίων η έκφραση είναι σημαντικά υψηλότερη στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ και οστική νόσο συγκριτικά με τους ασθενείς με ΠΜ χωρίς οστική νόσο. Ειδικότερα, η μέση τιμή (\pm την τυπική απόκλιση αυτής) της σχετικής έκφρασης του let-7b-5p ήταν ίση με 247.52 ± 65.47 RQU στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ και οστική νόσο, ενώ η αντίστοιχη τιμή ήταν ίση με 101.26 ± 22.15 RQU σε αυτούς χωρίς. Αντίστοιχα, για το miR-143-3p η μέση τιμή των επιπέδων έκφρασής του ήταν ίση με 15.65 ± 5.88 RQU στους ασθενείς με ΠΜ και οστική νόσο, ενώ η μέση τιμή της έκφρασής του ήταν 1.39 ± 0.52 RQU στους ασθενείς με ΠΜ χωρίς οστική νόσο. Επιπλέον, αναφορικά με το miR-17-5p, η μέση τιμή των επιπέδων έκφρασής του σε ασθενείς με οστική νόσο ήταν ίση με 59.49 ± 34.80 RQU, ενώ η αντίστοιχη τιμή για τους ασθενείς χωρίς ήταν ίση με 10.72 ± 3.08 RQU. Για το μόριο miR-214-3p η μέση τιμή \pm SE ήταν ίση με 5.13 ± 4.05 στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ με οστική νόσο και 0.46 ± 0.11 σε αυτό ασθενών χωρίς. Τέλος, όσον αφορά το miR-335-5p η μέση τιμή των επιπέδων έκφρασής του ήταν ίση με $22.28 \pm$

14.46 RQU στους ασθενείς με ΠΜ και οστική νόσο και 1.58 ± 0.29 RQU στους ασθενείς με ΠΜ χωρίς οστική νόσο. Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζονται στην *Εικόνα 27*.



Εικόνα 27: Θηκογράμματα που αναπαριστούν τη διαφορετική έκφραση των (Α) let-7b-5p, (Β) miR-143-3p, (Γ) miR-17-5p, (Δ) miR-214-3p, και (Ε) miR-335-5p στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ με ή χωρίς οστική νόσο.

Για να διερευνήσουμε αν τα επίπεδα έκφρασης των κυκλοφορούντων let-7b-5p, miR-143-3p, miR-17-5p, miR-214-3p, και miR-335-5p μπορούν να διακρίνουν τους ασθενείς με οστική νόσο από αυτούς χωρίς πραγματοποιήσαμε ανάλυση χαρακτηριστικής καμπύλης λειτουργίας δέκτη (ROC curve analysis) και ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης. Η μονοπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση ανέδειξε ότι εκτός του miR-17-5p, τα υπόλοιπα τέσσερα miRNAs μπορούν να προβλέψουν με ακρίβεια την παρουσία οστικής νόσου του ΠΜ. Ειδικότερα, η υπερέκφραση του miR-143-3p στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ φάνηκε ότι σχετίζεται με σχεδόν διπλάσια πιθανότητα παρουσίας οστικής νόσου κατά τη διάγνωση. Παρομοίως, αυξημένα επίπεδα έκφρασης let-7b-5p, miR-214-3p, και miR-335-5p συσχετίζονται με τριπλάσια πιθανότητα ο ασθενής να εμφανίζει οστική νόσο κατά τη διάγνωση. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στον Πίνακα 13.

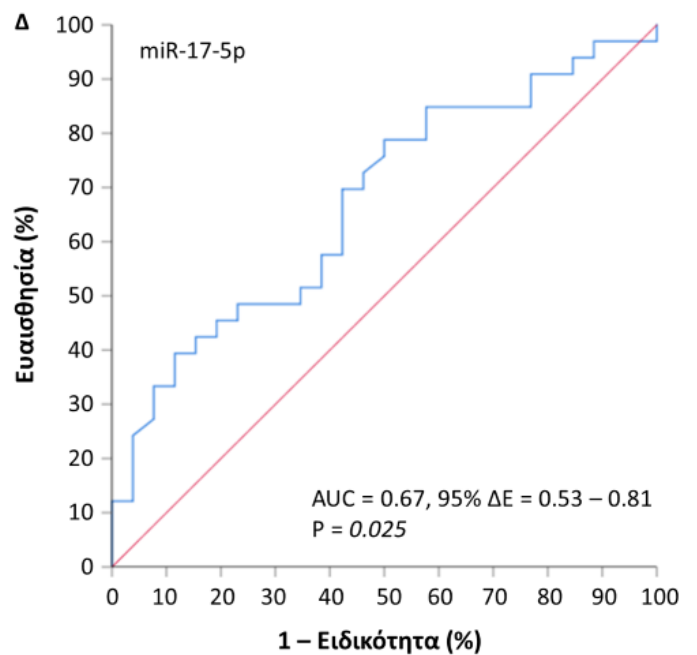
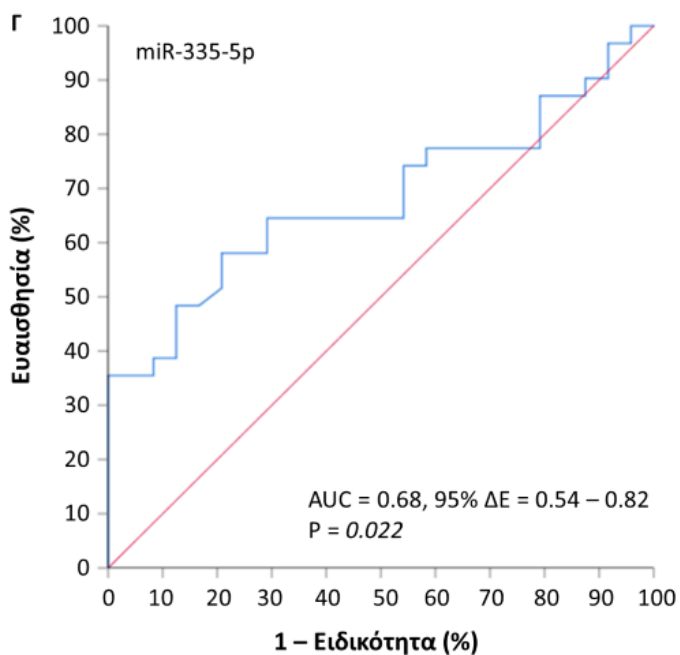
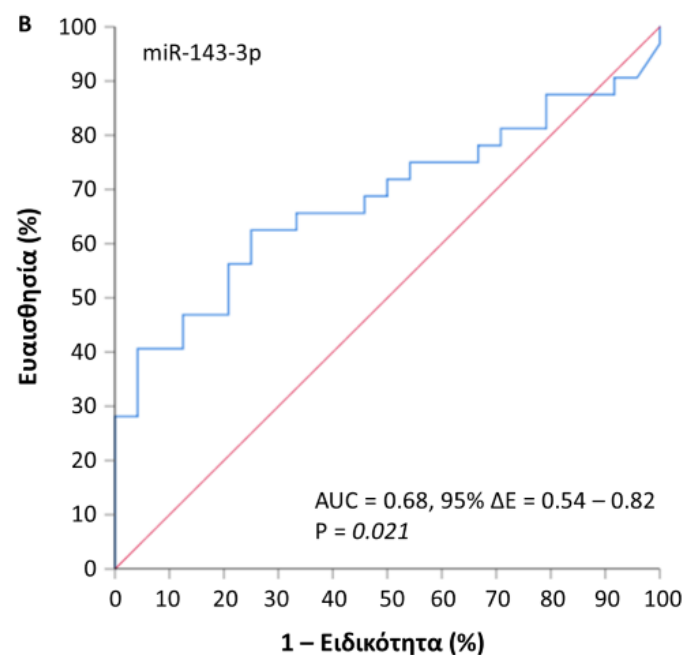
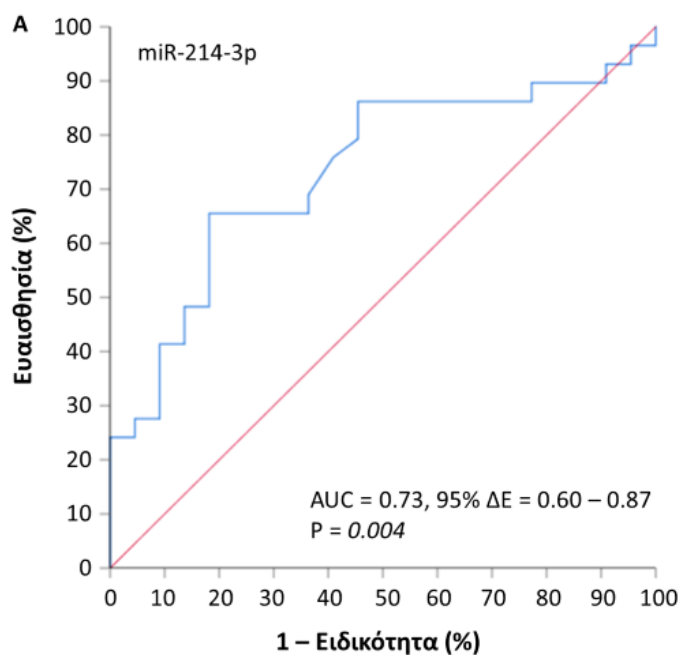
Μεταβλητή	ΛΠ ¹	95% ΔΕ ²	P	BCa ³ bootstrap ⁴ 95% ΔΕ ²	Bootstrap ⁴ P
let-7b-5p	3.13	1.04 – 9.44	0.043	1.86 – 14.30	0.044
miR-143-3p	1.86	1.07 – 3.23	0.029	1.14 – 4.13	0.020
miR-17-5p	1.89	1.01 – 3.54	0.048	1.07 – 4.62	0.052
miR-214-3p	3.07	1.15 – 8.21	0.025	1.28 – 20.49	0.032
miR-335-5p	3.24	1.23 – 8.51	0.017	1.57 – 10.70	0.004

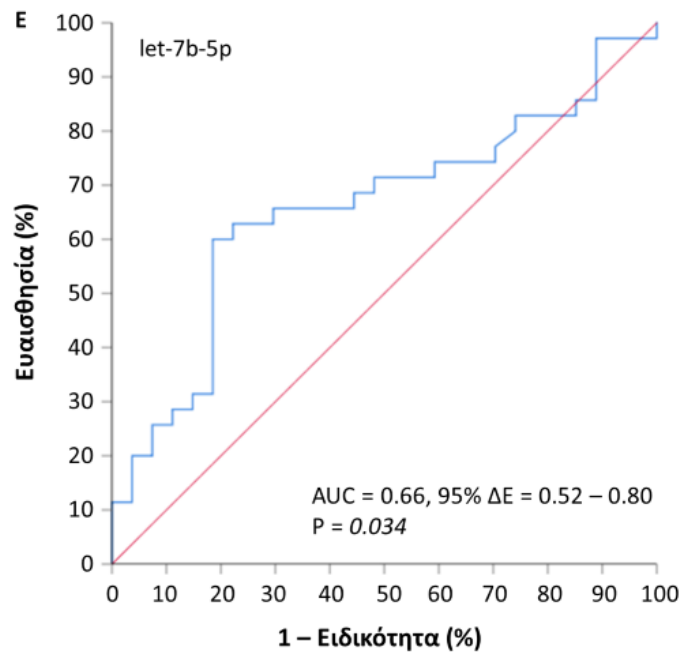
¹ Λόγος πιθανοτήτων (OR),² Διάστημα εμπιστοσύνης του λόγου πιθανοτήτων, ³Bias-corrected and accelerated, ⁴Βασισμένο σε δείγματα bootstrap

Πίνακας 13: Μονοπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση για την πρόβλεψη της παρουσίας οστικής νόσου βάσει των επιπέδων έκφρασης των let-7b-5p, miR-143-3p, miR-17-5p, miR-214-3p, και miR-335-5p στο πλάσμα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν απο την ανάλυση καμπύλης ROC, η οποία όμως προσέδωσε και στο miR-17-5p την ικανότητα να διακρίνει ασθενείς με ΠΜ και οστική νόσο από αυτούς χωρίς. Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση καμπύλης ROC έδειξε ότι και τα 5 miRNAs μπορούν να διακρίνουν αποτελεσματικά τους ασθενείς με ΠΜ και οστική νόσο από αυτούς χωρίς. Την καλύτερη διακριτική ικανότητα φάνηκε να έχει το miR-214-3p, ακολουθούμενο από τα μόρια miR-143-3p, miR-335-5p, miR-

17-5p, και let-7b-5p. Ειδικότερα για το miR-214-3p, η AUC (Area Under Curve; Περιοχή Κάτω από την Καμπύλη) της καμπύλης ROC ήταν ίση με 0.73 με 95% ΔΕ (διάστημα εμπιστοσύνης)=0.6-0.87 και $p=0.004$. Όσον αφορά το miR-143-3p η AUC της καμπύλης ROC ήταν ίση με 0.68 με 95% ΔΕ=0.54-0.82 και $p=0.021$. Ακολούθως, για το miR-335-5p, AUC=0.68 με 95% ΔΕ=0.54-0.82 και $p=0.022$, για το miR-17-5p AUC=0.67 με 95% ΔΕ=0.53-0.81 και $p=0.025$. Τέλος για το let-7b-5p AUC=0.66, 95% ΔΕ=0.52-0.8 και $p=0.034$. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται στην εικόνα 28.





Εικόνα 28: Καμπύλες ROC που δείχνουν την ικανότητα των (Α) miR-214-3p, (Β) miR-143-3p, (Γ) miR-335-5p, (Δ) miR-17-5p, (Ε) let-7b-5p να διακρίνουν τους ασθενείς με οστική νόσο από αυτούς χωρίς.

Παραταύτα, ενώ τα παραπάνω μόρια μπορούν να προβλέψουν την παρουσία οστικής νόσου σε ασθενείς με ΠΜ κατά τη διάγνωση, η ανάλυσή μας δεν κατάφερε να καταδείξει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα των κυκλοφορούντων αυτών miRNAs και τη βαρύτητα της οστικής νόσου, όπως υποδεικνύεται από τον αριθμό των οστεολύσεων και την παρουσία SREs.

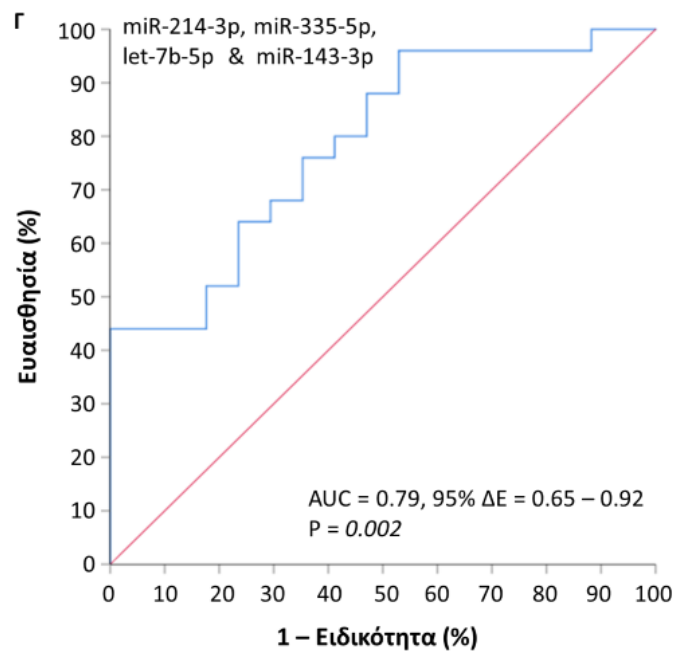
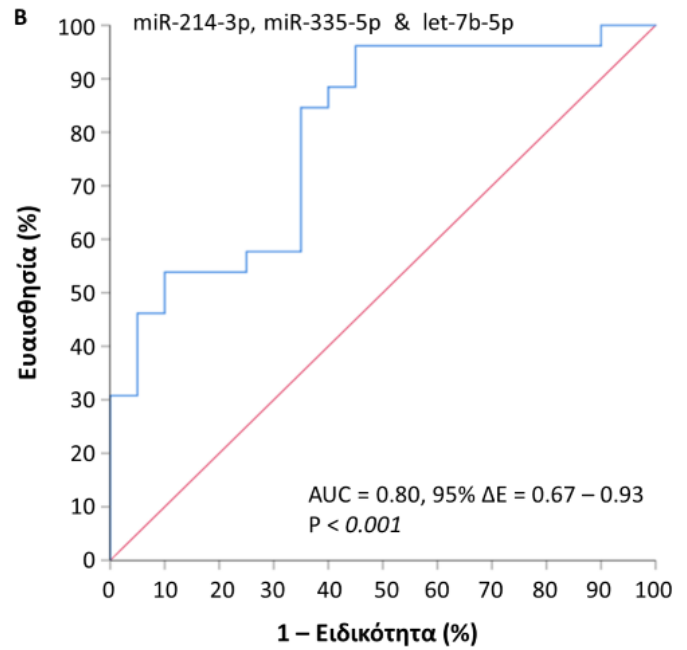
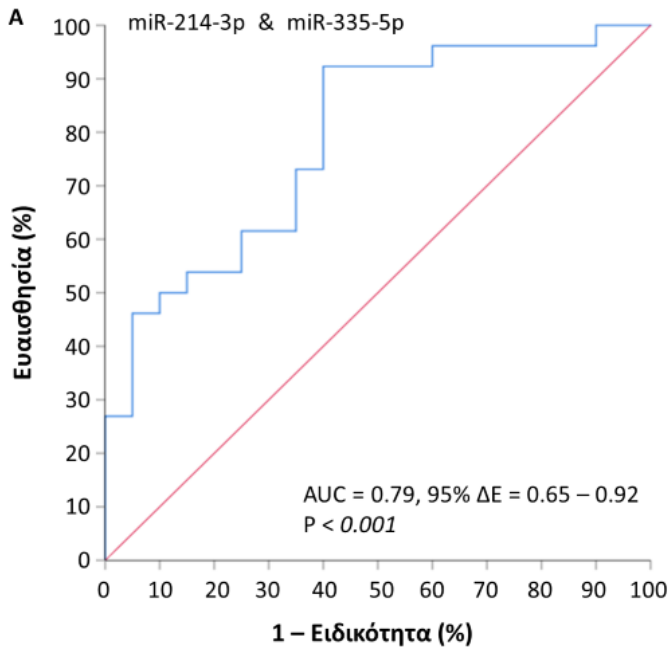
3.3.2 Δημιουργία και αξιολόγηση ενός προβλεπτικού μοντέλου για την οστική νόσο του ΠΜ βασιζόμενου στα κυκλοφορούντα miRNAs

Πολλαπλά μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης αναπτύχθηκαν για να εκτιμήσουν την πιθανότητα των ασθενών με ΠΜ να εμφανίσουν οστική νόσο κατά τη διάγνωση. Τα μοντέλα αυτά συμπεριέλαβαν ως μεταβλητές τα επίπεδα στο πλάσμα των μορίων let-7b-5p, miR-143-3p, miR-214-3p, και miR-335-5p, τα οποία αξιολογήθηκαν τόσο με την ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης, όσο και με την ανάλυση καμπύλης ROC και αναδείχθηκαν ως τα καλύτερα εκ των μελετούμενων μόρια αναφορικά με την ικανότητά τους να προβλέψουν την πιθανότητα εμφάνισης οστικής νόσου σχετιζόμενης με το ΠΜ. Προκειμένου να προκύψει το πλέον αξιόπιστο μοντέλο πρόβλεψης της οστικής νόσου του ΠΜ, ελέγχθησαν όλοι οι συνδυασμοί 2, 3 ή 4 εκ

των παραπάνω μορίων. Η αξιολόγηση των παραπάνω μοντέλων παλινδρόμησης έγινε με ανάλυση καμπύλης ROC.

Εφαρμόζοντας όλους τους δυνατούς συνδυασμούς miRNAs ανά δυάδες παρατηρήσαμε ότι το πιο αποτελεσματικό μοντέλο, ως προς την πρόβλεψη της οστικής νόσου, εξ αυτών που περιλαμβάνουν 2 miRNAs απαρτίζεται από τα miR-214-3p and miR-335-5p. Οι πιθανότητες παρουσίας οστικής νόσου υπολογίστηκαν με τη λογαριθμική συνάρτηση $\text{logit}(P) = 1.85 \times \log(\text{miR-214-3p}) + 0.53 \times \log(\text{miR-335-5p}) + 0.61$ και ακολούθως χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία μιας καμπύλης ROC. Στη συνέχεια συνδυάστηκαν τα τρία πιο αποτελεσματικά μόρια miRNA για την πρόβλεψη της οστικής νόσου, δηλαδή τα miR-214-3p, miR-335-5p, και let-7b-5p. Έτσι δημιουργήθηκε ένα λογαριθμικό μοντέλο αποτελούμενο από 3 μόρια miRNA, το $\text{logit}(P) = 0.86 \times \log(\text{let-7b-5p}) + 1.74 \times \log(\text{miR-214-3p}) + 0.18 \times \log(\text{miR-335-5p}) - 3.71$.

Ο συνδυασμός αυτός παρέχει ένα μοντέλο αποτελούμενο από τρεις μεταβλητές, το οποίο χαρακτηρίζεται από ελαφρώς καλύτερη προβλεπτική αξία συγκριτικά με το ανωτέρω περιγραφόμενο μοντέλο δύο μεταβλητών. Τέλος, ο συνδυασμός και των τεσσάρων miRNA σε ένα αυτόνομο μοντέλο $\text{logit}(P) = 0.87 \times \log(\text{let-7b-5p}) + 1.42 \times \log(\text{miR-214-3p}) - 0.29 \times \log(\text{miR-335-5p}) + 0.51 \times \log(\text{miR-143-3p}) - 3.68$ δεν κατάφερε να παράσχει αυξημένη προβλεπτική ικανότητα συγκριτικά με τα μοντέλα που αποτελούνται από 2 ή 3 μόρια miRNA. Αν και με την ανάλυση καμπύλης ROC τα προτεινόμενα μοντέλα ανέδειξαν μικρές διαφορές ως προς την ικανότητά τους να προβλέψουν την οστική νόσο του ΠΜ, παρόλα αυτά, το καλύτερο προβλεπτικό μοντέλο αναδείχθηκε εκείνο που απαρτίζεται από τα μόρια let-7b-5p, miR-214-3p, και miR-335-5p. Αν βασιστούμε στις προβλεπόμενες πιθανότητες που προκύπτουν ως αποτέλεσμα από το μοντέλο των 3 miRNA, μια τιμή «κατώφλι» πιθανότητας ίση με 0.37 αντιστοιχεί σε αυξημένη ευαισθησία του μοντέλου (ευαισθησία: 96%, ειδικότητα: 55%), ενώ ένα «κατώφλι» πιθανότητας ίσο με 0.7 αντιστοιχεί σε αυξημένη ειδικότητα (ευαισθησία: 54%, ειδικότητα: 90%). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην *Εικόνα 29*.



Εικόνα 29: Καμπύλες ROC για τα πολυπαραγοντικά μοντέλα πρόβλεψης της οστικής νόσου, όπως προκύπτουν από συνδυασμό (A) των miR-214-3p και miR-335-5p, (B) των miR-214-3p, miR-335-5p και let-7b-5p και (Γ) των miR-214-3p, miR-335-5p, let-7b-5p και miR-143-3p. Ο συνδυασμός των 3 μορίων αποτελεί το καλύτερο προγνωστικό μοντέλο για την πρόβλεψη της οστικής νόσου.

3.3.3 Αξιολόγηση της προγνωστικής αξίας των κυκλοφορούντων miRNA που μελετήθηκαν

Δεδομένου ότι τα κυκλοφορούντα miRNAs μπορούν να αποτελέσουν πολύ πιο εύχρηστους και ευρέως εφαρμόσιμους προγνωστικούς βιοδείκτες από τα αντίστοιχα μόρια προερχόμενα από τα CD138+ κύτταρα του μυελού των οστών, προχωρήσαμε στο να αξιολογήσουμε την πιθανή προγνωστική αξία των μορίων αυτών που αναδείχθηκαν ως βιοδείκτες ικανοί να προβλέψουν την οστική νόσο του ΠΜ. Ο αλγόριθμος X-tile χρησιμοποιήθηκε, όπως ανωτέρω, για να διακρίνει τους ασθενείς σε δύο κατηγορίες, ως αυτούς που έχουν χαμηλή ή υψηλή έκφραση των κυκλοφορούντων let-7b-5p, miR-143-3p, miR-17-5p, miR-214-3p, και miR-335-5p. Τα επίπεδα cut-off που προέκυψαν ήταν 86.2 RQU για το let-7b-5p, 0.4 RQU για το miR-143-3p, 6.1 RQU για το miR-17-5p, 0.42 RQU για το miR-214-3p και 0.97 RQU για το miR-335-5p. Από το σύνολο των 62 ασθενών που αποτελούν τον πληθυσμό της μελέτης, 1 εξαιρέθηκε από την ανάλυση επιβίωσης λόγω ελλιπούς παρακολούθησης. Από τους υπόλοιπους 61 ασθενείς με ΠΜ, 11(18%) ασθενείς κατέληξαν και 18 (29.5%) ασθενείς εμφάνισαν πρόοδο νόσου κατά την περίοδο παρακολούθησης της μελέτης. Η διάμεση ολική επιβίωση (OS) του πληθυσμού της μελέτης ήταν 24 μήνες, ενώ η διάμεση ελεύθερη πρόοδο νόσου επιβίωση (PFS) ήταν 20 μήνες. Η μονοπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox ανέδειξε ότι χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στο πλάσμα των let-7b-5p και miR-335-5p σχετίζονται με σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο πρόοδου νόσου στην πρώτη γραμμή θεραπείας. Ο λόγος επικινδυνότητας (HR) για τη σύγκριση των υψηλών επιπέδων έκφρασης του let-7b-5p με τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης αυτού είναι ίσος με $HR= 0.22$, (95% ΔΕ= 0.081-0.59, $p=0.003$ / bootstrap 95% ΔΕ= 0.074-0.52, $p=0.004$). Αντίστοιχα για τη σύγκριση των υψηλών επιπέδων έκφρασης του miR-335-5p με τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης αυτού, ο λόγος επικινδυνότητας (HR) είναι 0.41 (95% ΔΕ=0.17-0.98, $p=0.044$ / bootstrap 95% ΔΕ=0.15-0.97, $p=0.027$). Η πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox έδειξε ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης στο πλάσμα των let-7b-5p και miR-335-5p διατηρούν την αρνητική προγνωστική τους αξία ανεξάρτητα από τις καθιερωμένες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους με προγνωστική αξία στο ΠΜ. Ειδικότερα, στην πολυπαραγοντική ανάλυση με συμμεταβλητές την ηλικία, το R-

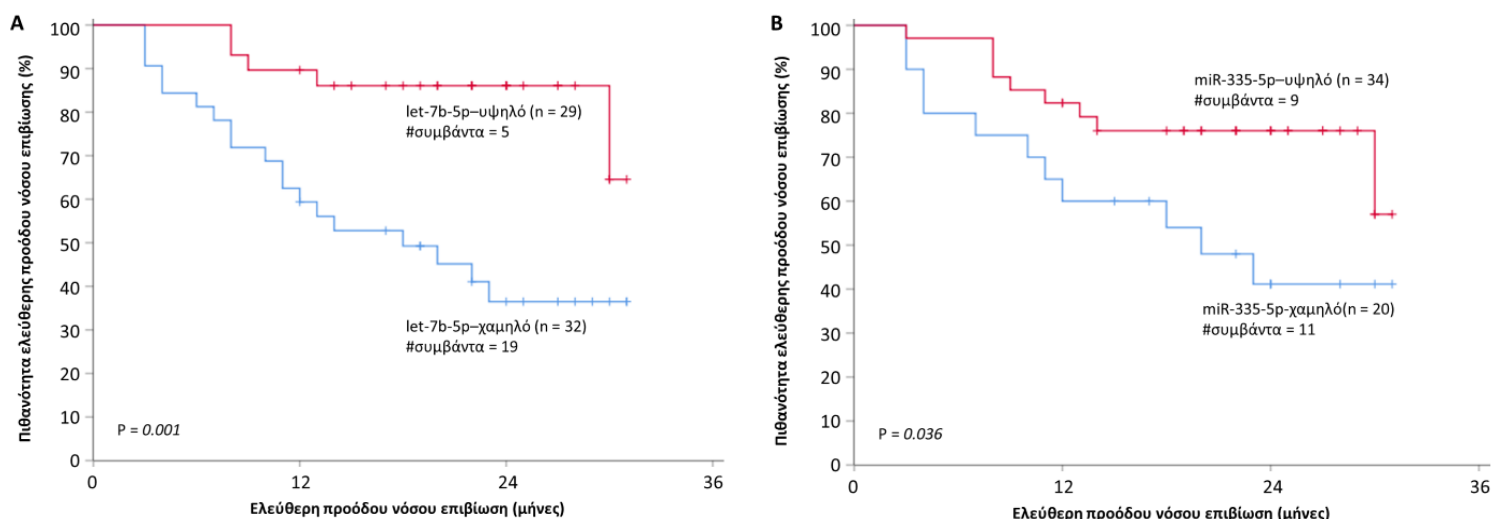
ISS, τη β2 μικροσφαιρίνη και την LDH, ο HR για τη σύγκριση των υψηλών επιπέδων έκφρασης του let-7b-5p με τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης αυτού είναι ίσος με HR= 0.25 , (95% ΔΕ= 0.078-0.82, p=0.022/ bootstrap 95% ΔΕ= 0.082-0.51, p=0.011) και ο HR για τη σύγκριση των υψηλών επιπέδων έκφρασης του miR-335-5p με τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης αυτού είναι ίσως με 0.31 (95% ΔΕ=0.11-0.85, p= 0.024/ bootstrap 95% ΔΕ=0.098-0.55, p=0.021). Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζονται στον Πίνακα 14.

	Μεταβλητή	ΛΕ ¹	95% ΔΕ ²	P	BCa ³ bootstrap ⁴ 95% ΔΕ ²	Bootstrap P
Μονοπαραγοντική ανάλυση	Ηλικία	1.02	0.98 – 1.06	0.26	0.82 – 2.01	0.30
	R-ISS ⁵	1.58	0.89 – 2.83	0.12	0.93 – 2.88	0.097
	B2M ⁶ (>5.5 mg/L vs. ≤5.5 mg/L)	2.18	0.98 – 4.88	0.056	1.00 – 5.21	0.045
	LDH ⁷ (αυξημένα vs. φυσιολογικά)	1.21	0.48 – 3.10	0.69	0.37 – 3.00	0.70
	let-7b-5p (υψηλά vs. χαμηλά)	0.22	0.081 – 0.59	0.003	0.074 – 0.52	0.004
	miR-335-5p (υψηλά vs. χαμηλά)	0.41	0.17 – 0.98	0.044	0.15 – 0.97	0.027
Πολυπαραγοντική ανάλυση ⁸	Ηλικία	1.02	0.98 – 1.07	0.38	0.97 – 1.10	0.49
	R-ISS ⁵	1.23	0.42 – 3.54	0.71	0.32 – 5.64	0.70
	B2M ⁶ (>5.5 mg/L vs. ≤5.5 mg/L)	1.11	0.23 – 5.26	0.90	0.12 – 8.33	0.91
	LDH ⁷ (αυξημένα vs. φυσιολογικά)	0.59	0.17 – 2.00	0.40	0.15 – 1.75	0.40
	let-7b-5p (αυξημένα vs. φυσιολογικά)	0.25	0.078 – 0.82	0.022	0.082 – 0.51	0.011
	Ηλικία	1.04	0.98 – 1.09	0.21	0.96 – 1.17	0.27
	R-ISS ⁵	1.06	0.33 – 3.33	0.93	0.20 – 6.55	0.93
	B2M ⁶ (>5.5 mg/L vs. ≤5.5 mg/L)	2.61	0.51 – 13.29	0.25	0.26 – 34.81	0.30
	LDH ⁷ (αυξημένα vs. φυσιολογικά)	0.67	0.19 – 2.43	0.56	0.13 – 2.31	0.54
	miR-335-5p (αυξημένα vs. φυσιολογικά)	0.31	0.11 – 0.85	0.024	0.098 – 0.55	0.021

¹ Λόγος επικινδυνότητας (HR), ² Διάστημα εμπιστοσύνης του εκτιμώμενου Λόγου Επικινδυνότητας, ³Bias-corrected and accelerated, ⁴Βασισμένο σε δείγματα bootstrap, ⁵Αναθεωρημένο Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης (Revised International Staging System), ⁶ β₂ μικροσφαιρίνη (B2M). ⁷ Γαλακτική Αφυδρογονάση (LDH). ⁸ Τα πολυπαραγοντικά μοντέλα που αφορούν την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση συμπεριέλαβαν το let-7b-5p ή το miR-335-5p και ως συμμεταβλητές την ηλικία των ασθενών, το στάδιο R-ISS, τη β2 μικροσφαιρίνη και την LDH.

Πίνακας 14: Ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox αναφορικά με την προγνωστική ικανότητα των κυκλοφορούντων let-7b-5p και miR-335-5p ως προς την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση ασθενών με ΠΜ.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, η ανάλυση με καμπύλες επιβίωσης Kaplan–Meier ανέδειξε ότι οι ασθενείς με υποέκφραση των κυκλοφορούντων let-7b-5p και/ή miR-335-5p στο πλάσμα τους εμφανίζουν σημαντικά μικρότερα διαστήματα επιβίωσης ελεύθερης προόδου νόσου ($p=0.001$ και $p=0.036$ αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στην *Εικόνα 30*.



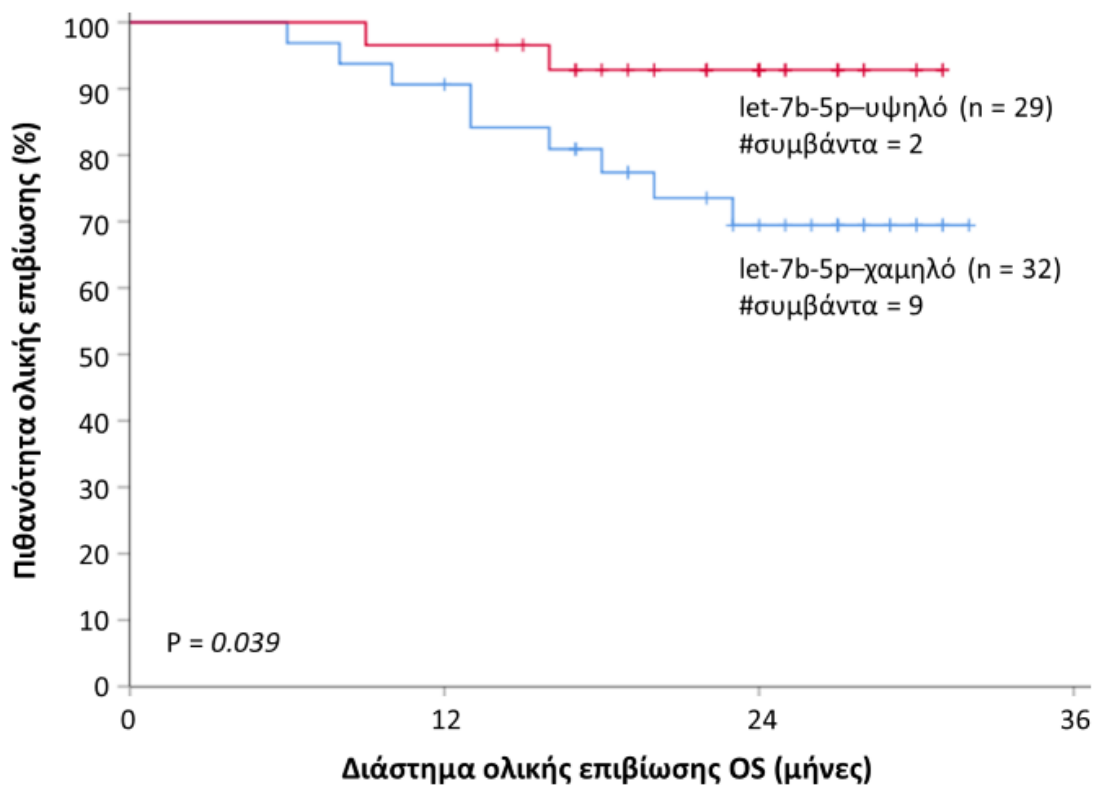
Εικόνα 30: Καμπύλες Kaplan Meier ελεύθερης προόδου νόσου επιβίωσης, που δείχνουν τις διαφορές στα διαστήματα PFS στην πρώτη γραμμή θεραπείας ασθενών με ΠΜ με υψηλά επίπεδα έκφρασης (A) let-7b-5p και (B) miR-335-5p συγκριτικά με ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης αυτών των μορίων. Η υποέκφραση των ανωτέρω μορίων καταδεικνύεται ως πιθανός δυσμενής προγνωστικός δείκτης στο ΠΜ.

Αναφορικά με την πιθανή αξία των δύο ανωτέρω κυκλοφορούντων βιοδεικτών στην ολική επιβίωση, η μονοπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox ανέδειξε ότι οι ασθενείς με μειωμένα επίπεδα έκφρασης του κυκλοφορούντος let-7b-5p εμφανίζουν σημαντικά μικρότερο διάστημα ολικής επιβίωσης. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στον *πίνακα 15*. Τα ανωτέρω επιβεβαιώθηκαν από την ανάλυση επιβίωσης Kaplan Meier (*Εικόνα 31*).

Μεταβλητή	ΛΕ ¹	95% ΔΕ ²	P	BCa ³ bootstrap ⁴ 95% ΔΕ ²	Bootstrap P
Ηλικία	1.02	0.97 – 1.08	0.46	0.97 – 1.08	0.38
R-ISS ⁵	2.98	1.13 – 7.86	0.028	1.54 – 8.76	0.002
B2M ⁶ (>5.5 mg/L vs. ≤5.5 mg/L)	3.43	1.00 – 4.88	0.049	0.96 – 16.44	0.017
LDH ⁷ (αυξημένα vs. φυσιολογικά)	2.04	0.59 – 6.98	0.26	0.40 – 7.31	0.21
let-7b-5p (υψηλά vs. χαμηλά)	0.23	0.049 – 1.060	0.059	0.014 – 0.75	0.025

¹ Λόγος επικινδυνότητας (HR), ² Διάστημα εμπιστοσύνης του εκτιμώμενου Λόγου Επικινδυνότητας, ³Bias-corrected and accelerated, ⁴Βασισμένο σε δείγματα bootstrap, ⁵ Αναθεωρημένο Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης (Revised International Staging System), ⁶ β₂ μικροσφαιρίνη (B2M). ⁷ Γαλακτική Αφυδρογονάση (LDH).

Πίνακας 15: Μονοπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης Cox για την προγνωστική αξία του κυκλοφορούντος let-7b-5p ως προς την ολική επιβίωση ασθενών με ΠΜ.



Εικόνα 31: Καμπύλες Kaplan Meier ολικής επιβίωσης που δείχνουν τις διαφορές στο διάστημα επιβίωσης ασθενών με ΠΜ με υψηλά επίπεδα έκφρασης let-7b-5p συγκριτικά με ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης αυτού. Η υποέκφραση του let-7b-5p καταδεικνύεται ως πιθανός δυσμενής προγνωστικός δείκτης στο ΠΜ.

4. Συζήτηση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο γενικό μέρος της παρούσας διατριβής, τα miRNAs και άλλα μικρά μη κωδικά RNAs, όπως τα tRFs, εμπλέκονται στη ρύθμιση μιας πληθώρας κυτταρικών λειτουργιών και η απορρύθμιση της έκφρασής τους οδηγεί στην εμφάνιση ασθενειών και ιδιαίτερα κακοήθων νεοπλασμάτων. Κάτω από αυτό το πρίσμα, η αξιολόγηση του ρόλου των μορίων αυτών στην παθογένεση του ΠΜ και της οστικής νόσου αυτού αποτελεί σήμερα αντικείμενο ερευνητικού ενδιαφέροντος. Στα πλαίσια αυτά, η παρούσα διδακτορική διατριβή, μέσω των τριών διαφορετικών σταδίων στα οποία διεξήχθη, διερεύνησε το ρόλο των μικρών μη κωδικών RNA στο ΠΜ και την αξία αυτών ως βιοδείκτες της νόσου, καθώς και της σχετιζόμενης με αυτό οστικής νόσου.

Στο πρώτο στάδιο προσδιορίστηκε η έκφραση συγκεκριμένων miRNAs και tRFs, με επιστημονικά επιβεβαιωμένο ρόλο στις νεοπλασίες, στα πλασματοκύτταρα του μυελού των οστών ασθενών με ΠΜ και άλλες πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες. Εν συνεχεία, οι διαφορές στην έκφραση των μορίων αυτών συσχετίστηκαν με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου και με την πρόγνωση των ασθενών.

Όπως αναφέρθηκε ήδη στα αποτελέσματα, από τη μελέτη μας διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική υποέκφραση των μορίων miR-16-5p και miR-155-5p στα πλασματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ σε σχέση με αυτά των ασθενών με ασυμπτωματικό ΠΜ. Δεν είναι η πρώτη φορά που το miR-16-5p μελετάται στο ΠΜ. Τα γονίδια MIR16 και MIR15A εδράζονται στο χρωμόσωμα 13q. (252) Δεδομένου ότι η διαγραφή του 13q είναι μια συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία στο ΠΜ, σχετιζόμενη με δυσμενή πρόγνωση, υπήρξε αρκετό ενδιαφέρον από τους ερευνητές για τη διερεύνηση του ρόλου των δύο αυτών miRNAs στο ΠΜ. (253) Πολλές μελέτες υποστηρίζουν την υποέκφραση των miR-15a-5p και miR-16-5p σε ασθενείς με ΠΜ, συγκριτικά με φυσιολογικούς μάρτυρες. (235, 254, 255). Ακόμη, όταν η έκφρασή τους προσδιορίστηκε στον ορό ασθενών με ΠΜ, καθώς και MGUS και ασυμπτωματικό ΠΜ σε σύγκριση με φυσιολογικούς μάρτυρες, η έκφρασή τους ήταν μειωμένη στην ομάδα των πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών. Ειδικότερα, αποδείχθηκε ότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα του miR-16-5p μειώνονταν σταδιακά κατά την εξέλιξη από

μια υγιή κατάσταση στη νόσηση από ΠΜ. (256) Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αποδείξαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του miR-16-5p είναι χαμηλότερα στα CD138+ πλασματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ συγκριτικά με αυτά ασθενών με ασυμπτωματικό ΠΜ, υποδεικνύοντας ότι όχι μόνο τα κυκλοφορούντα, αλλά και τα ενδοκυττάρια επίπεδα του miR-16-5p μειώνονται κατά την εξέλιξη των πρόδρομων μορφών σε ΠΜ.

Σε μοριακό επίπεδο, τα miR-15a-5p και miR-16-5p αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στοχεύοντας τον VEGF και CABIN1, καθώς και τα μονοπάτια AKT και NF-κB, οπότε η υποέκφρασή του στο ΠΜ οδηγεί σε προαγωγή της νόσου με την αύξηση των συγκεντρώσεων των μορίων-στόχων τους. (257)

Στο ίδιο πλαίσιο, το μικρό μη κωδικό RNA miR-155-5p έχει δειχθεί ότι υποεκφράζεται στα πλασματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ συγκριτικά με αυτά υγιών μαρτύρων σε μια σειρά μελετών. Ακόμη, έχει δειχθεί ότι εκφράζεται διαφορετικά μεταξύ διαφόρων μυελωματικών κυτταρικών σειρών και τα επίπεδα έκφρασής του φαίνεται να εμφανίζουν προγνωστική αξία. (258-260) Καθώς δείξαμε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής ότι χαμηλότερα επίπεδα miR-155-5p βρίσκονται στα CD138+ κύτταρα ασθενών με ΠΜ συγκριτικά με αυτά ασθενών με ασυμπτωματικό ΠΜ, εικάζεται ότι υπάρχει σταδιακή μείωση των επιπέδων του miR-155-5p στα πλασματοκύτταρα κατά την πολυεπίπεδη διαδικασία της μυελωματογένεσης.

Τα tRFs έχουν μελετηθεί ελάχιστα στις πλασματοκυτταρικές δυσκαρασίες. Η παρούσα διδακτορική διατριβή επιβεβαίωσε την ύπαρξη των εν λόγω θραυσμάτων στα πλασματοκύτταρα των ασθενών με ΠΜ. Το μόριο 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} έχει συσχετιστεί με δυσμενή προγνωστικό χαρακτήρα στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ). (261) Η μελέτη μας απέδειξε την υπερέκφραση του μορίου 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} στους ασθενείς με ασυμπτωματικό ΠΜ συγκριτικά με τους ασθενείς με ΠΜ. Το εν λόγω μόριο πιθανά να υποεκφράζεται σταδιακά κατά την εξέλιξη από τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα στα κακοήθη πλασματοκύτταρα του ΠΜ. Περαιτέρω έρευνα χρειάζεται προκειμένου να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος του στην εξέλιξη του ΠΜ.

Στο βαθμό που γνωρίζουμε από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, αυτή είναι η πρώτη φορά που τα μόρια miR-15a-5p, miR-16-5p, miR-222-3p, και miR-125b-

5p συσχετίζονται με την οστική νόσο του πολλαπλού μυελώματος. Παρά το γεγονός ότι τα μόρια αυτά έχουν μελετηθεί στο ΠΜ, (262, 263) και έχουν συσχετιστεί σε ερευνητικές εργασίες με την οστεογένεση και άλλες μορφές οστικής νόσου, όπως η οστεοπόρωση, (264-267) δεν είχε περιγραφεί μέχρι στιγμής συσχέτιση με την οστική νόσο του ΠΜ. Ειδικότερα, η μελέτη αυτή απέδειξε ότι τα μόρια αυτά υποεκφράζονται σε ασθενείς με ΠΜ και οστική νόσο. Στο ίδιο πλαίσιο, η μελέτη ανέδειξε υποέκφραση του i-tRF-Gly^{GCC} σε ασθενείς με οστική νόσο. Αντιστοίχως, μέχρι τώρα δεν υπήρξαν αναφορές που να συσχετίζουν tRFs με την οστική νόσο του ΠΜ. Στις μέρες μας υπάρχει μια πληθώρα διαγνωστικών μεθόδων για τη διάγνωση της οστικής νόσου. Η ολόσωμη αξονική τομογραφία χαμηλής δόσης (Whole Body Low Dose Computed Tomography - WBLDCT) αποτελεί μέθοδο έκλογης, ενώ ακόμη η ολόσωμη μαγνητική τομογραφία (Whole Body Magnetic Resonance Imaging – WBMRI) και η αξονική τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET-CT) είναι διαθέσιμες σε ειδικές περιπτώσεις όπου χρειάζεται να προσδιοριστεί το πρότυπο διήθησης του μυελού και η παρουσία ενεργού νόσου σε συγκεκριμένες εστίες διήθησης. (241) Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν καθιερωμένοι βιοδείκτες στο αίμα που να μπορούν να θέσουν τη διάγνωση ή να είναι ενδεικτικοί της βαρύτητας της οστικής νόσου. Τα μόρια αυτά πιθανά να μπορέσουν να επιτελέσουν το ρόλο προβλεπτικών βιοδεικτών ή μορίων-στόχων για την οστική νόσο του ΠΜ. Τυχαιοποιημένες μελέτες είναι αναγκαίες για να υποστηρίξουν το ρόλο αυτών των μορίων ως βιοδείκτες της οστικής νόσου.

Επιπροσθέτως, στο πρώτο στάδιο της μελέτης μας διερευνήθηκε και η προγνωστική αξία των υπό εξέταση μορίων. Ειδικότερα, η υποέκφραση του miR-223-3p φάνηκε να αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα και να σχετίζεται με βραχύτερη ολική επιβίωση, ενώ η υπερέκφραση των i-tRF-Pro^{TGG}, i-tRF-Glu^{CTC}, i-tRF-His^{GTG}, και i-tRF-Phe^{GAA} φάνηκε να σχετίζεται με μεγαλύτερα διαστήματα ολικής επιβίωσης και η υπερέκφραση του i-tRF-Gly^{GCC} να σχετίζεται με μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερης προόδου νόσου επιβίωσης μετά την πρώτη γραμμή θεραπείας. Τέλος, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} συσχετίζονται με μεγαλύτερα διαστήματα ολικής και ελεύθερης προόδου νόσου επιβίωσης. Η σχέση αυτή όπως διαπιστώνεται από την πολυπαραγοντική ανάλυση είναι ανεξάρτητη του σταδίου R-ISS για το miR-223-3p και τα i-tRF-Pro^{TGG}, i-tRF-Glu^{CTC}, i-tRF-His^{GTG}. Σήμερα, το σύστημα

σταδιοποίησης R-ISS χρησιμοποιείται ευρέως για την πρόγνωση του ΠΜ. Με βάση το σύστημα αυτό οι ασθενείς κατηγοριοποιούνται σε 3 στάδια με σαφώς διακριτά ποσοστά επιβίωσης, τα R-ISS I (5-ετής ολική επιβίωση: 82%), R-ISS II (5-ετής ολική επιβίωση: 62%), και R-ISS III (5-ετής ολική επιβίωση: 40%). Μεταξύ αυτών, το στάδιο II αποτελεί την πολυπληθέστερη και πιο ετερογενή ομάδα ασθενών και αποτελεί το 62% του συνόλου ασθενών με ΠΜ. (80) Θα ήταν πολύ ενδιαφέρουσα η εισαγωγή ενός μοριακού βιοδείκτη με προγνωστική αξία ανεξάρτητη του συστήματος R-ISS, ικανού να ταξινομήσει περαιτέρω σε επιπλέον διακριτές προγνωστικές ομάδες τους ασθενείς που ανήκουν στο στάδιο R-ISS II. Η πιθανή προγνωστική αξία των μορίων αυτών στην κλινική πράξη και η ικανότητά τους να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί βιοδείκτες παράλληλα με το R-ISS ή ακόμη και να ενσωματωθούν σε αυτό, χρήζει διερεύνησης σε τυχαίοποιημένες κλινικές μελέτες που περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό ασθενών με ΠΜ. Ακόμη, αξίζει να αναφερθεί ότι όλα τα tRFs που μελετήθηκαν διατήρησαν ή έδειξαν μια τάση να διατηρήσουν την προγνωστική τους αξία σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Στην ομάδα των ασθενών που δεν υπεβλήθησαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση μόνο το i-tRF-His^{GTG} διατήρησε την προγνωστική του αξία αναφορικά με την ολική επιβίωση. Από τα θραύσματα tRF που μελετήθηκαν, τα i-tRF^{Gly^{GCC}}, i-tRF-Phe^{GAA}, και 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία ως προγνωστικοί βιοδείκτες στη ΧΛΛ. (261, 268) Αυτό υποστηρίζει τον πιθανό τους ρόλο ως προγνωστικούς και προβλεπτικούς βιοδείκτες σε μια σειρά αιματολογικών κακοηθειών. Περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου τους απαιτείται προκειμένου να αποδειχθεί αυτή η συσχέτιση και η κλινική τους αξία.

Στους περιορισμούς του σταδίου αυτού της μελέτης συγκαταλέγεται το σχετικά μικρό μέγεθος της κοόρτης των ασθενών. Αποτελεί όμως ο πλήθυσμος αυτός, μια ομάδα ασθενών αντιπροσωπευτική του γενικού πληθυσμού, καθώς οι ασθενείς που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη δεν υπάγονται σε περιορισμούς ως προς την ηλικία ή το performance status. Εξαιτίας του μικρού μεγέθους της κοόρτης, και της μικρής αντιπροσώπευσης σπανίων υποτύπων της νόσου που αυτή συνεπάγεται, η μελέτη μας μπορεί να παραθέσει κάποια δεδομένα σχετικά με την κλινική σημασία των μορίων αυτών ως βιοδείκτες, αλλά δεν είναι σε θέση να υποστηρίξει τη χρήση τους

στην κλινική πράξη,. Μεγάλες τυχαίοποιημένες μελέτες χρειάζονται ώστε να διερευνηθεί η αξία αυτών των μη κωδικών RNA ως βιοδεικτών στο ΠΜ. Επιπροσθέτως, η μελέτη μας στερείται μιας ομάδας φυσιολογικών control, δεδομένου ότι η λήψη μυελού των οστών είναι μια επώδυνη διαδικασία με πιθανές επιπλοκές που διενεργείται μόνο επί σοβαρής υποψίας αιματολογικής νόσου. Η αγορά και χρήση μη επεξεργασμένων δειγμάτων μυελού των οστών για ερευνητικούς σκοπούς θα μπορούσε να ενισχύσει την ισχύ των αποτελεσμάτων μας αναφορικά με τη διαγνωστική και προγνωστική αξία των υπό μελέτη μορίων στο ΠΜ. Όσον αφορά το τεχνικό κομμάτι, μια αδυναμία της qPCR που αναπτύχθηκε για την ποσοτικοποίηση των tRFs είναι ότι τα θραύσματα που προέρχονται από τα ίδια tRFs και έχουν μικρές αλλαγές στην αλληλουχία τους εντοπίζονται ως ένα μόριο και ποσοτικοποιούνται αθροιστικά. Τέλος, στους περιορισμούς του πειράματός μας θα πρέπει να αναφερθεί και το γεγονός ότι για τη θετική επιλογή των κακοήθων πλασματοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε ένα αντι-CD138 αντίσωμα ενσωματωμένο σε μαγνητικά σφαιρίδια. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να επιλεγούν στο σύνολο τους τα DC138+ πλασματοκύτταρα, τα οποία συμπεριλαμβάνουν όχι μόνο τα κακοήθη πλασματοκύτταρα, αλλά και τα αντίστοιχα φυσιολογικά. (269) Επιπλέον, έχει περιγραφεί ότι στο ΠΜ μπορεί να υπάρχει ένας αποδιαφοροποιημένος κλώνος με ταχύτερο ρυθμό πολλαπλασιασμού που είναι CD138-, ο οποίος στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν έχει συμπεριληφθεί στην ανάλυσή μας. (270) Οι σύγχρονες συστάσεις προτείνουν το συνδυασμό των CD38, CD138, και CD45 ως τον καλύτερο συνδυασμό δεικτών για την ταυτοποίηση και επιλογή των πλασματοκυττάρων, ενώ η προσθήκη του CD19 επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ αντιδραστικών και κλωνικών πλασματοκυττάρων με βάση τους πιο συνήθεις φαινοτύπους των μη φυσιολογικών πλασματοκυττάρων. (271-273) Παρόλα αυτά, η επεξεργασία των δειγμάτων μυελού των οστών με μαγνητικά σφαιρίδια που χρησιμοποιούν πολλαπλούς δείκτες για επίλογη των κακοήθων πλασματοκυττάρων θα αποτελούσε μια εργώδη και χρονοβόρα διαδικασία που πιθανότατα θα οδηγούσε σε ανεπαρκή αριθμό επιλεγμένων κυττάρων. (274) Η επιλογή κυττάρων βασισμένη σε αυτό το συνδυασμό αντισωμάτων για ανοσοφαινότυπο, θα ήταν εφικτή με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. (275) Εντούτοις, και στην περίπτωση αυτή, η ποσότητα του ολικού RNA που

απομονώνεται από τα επιλεγμένα κακοήθη πλασματοκύτταρα θα αποτελούσε από μόνη της περιοριστικό παράγοντα για τα πειράματά μας.

Συνοψίζοντας, η μελέτη αυτή εισάγει μια ομάδα miRNAs και tRFs που παρουσιάζουν ενδιαφέρον στο ΠΜ τόσο σε επίπεδο παθοφυσιολογίας της νόσου όσο και στην καθημερινή κλινική πράξη ως υποψήφιοι διαγνωστικοί και προγνωστικοί μοριακοί βιοδείκτες, καθώς και ως μόρια στόχοι για νέες θεραπείες και θα μπορούσε να αποτελέσει έναυσμα για τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες ικανές να επιβεβαιώσουν τυχόν τέτοιες συσχετίσεις.

Στο δεύτερο στάδιο της μελέτης μας, λαμβάνοντας υπόψιν τους περιορισμούς του πρώτου σταδίου, εφαρμόσαμε μια περισσότερο καθολική προσέγγιση πραγματοποιώντας αλληλούχιση νέας γενιάς σε μια σαφώς μεγαλύτερη κοόρτη ασθενών με σκοπό να εντοπίσουμε το μόριο αυτό που θα αποτελέσει τον περισσότερο αξιόπιστο προγνωστικό δείκτη για την επιβίωση των ασθενών με ΠΜ.

Εφαρμόζοντας miRNAseq στα CD138+ κύτταρα ασθενών με ΠΜ και τις πρόδρομες μορφές αυτού (ασυμπτωματικό ΠΜ και MGUS), διερευνήσαμε προφίλ έκφρασης miRNAs σχετιζόμενων με το ΠΜ και αναδείξαμε για πρώτη φορά την αξία του miR-181a ως προγνωστικού βιοδείκτη της νόσου. Η ανάλυση αλληλούχισης miRNA που εφαρμόσαμε ανέδειξε 6 υποψήφια μόρια miRNAs (miR-1-3p, miR-125b-5p, miR-181a-5p, miR-503-5p, miR-218-5p και miR-10a-5p), των οποίων η έκφραση διαφοροποιείται τόσο μεταξύ του ΠΜ και των πρόδρομων μορφών του, όσο και μεταξύ των διαφόρων προγνωστικών σταδίων του R-ISS. Από την ποσοτικοποίηση των ανωτέρω μορίων σε μια υποομάδα της κοόρτης των ασθενών με ΠΜ (n=45), με τη χρήση real-time qPCR και την ανάλυση επιβίωσης που ακολούθησε, το miR-181a αναδείχθηκε ως ο καλύτερος υποψήφιος για να αποτελέσει προγνωστικό βιοδείκτη αναφορικά με την ολική και την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση ασθενών με ΠΜ. Το miR-181a είναι μέλος της εξελικτικά διατηρημένης οικογένειας του miR-181(miR-181a/b/c/d), που κωδικοποιείται από τα γονίδια MIR181A1 (1q32.1) and MIR181A2 (9q33.3). Το μόριο αυτό κατέχει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική αιμοποίηση και αποτελεί ένα από τα πρώτα miRNAs που αποδείχθηκε ότι εκφράζεται κατά προτίμηση στο μυελό των οστών και συμβάλλει στη διαφοροποίηση των B και T λεμφοκυττάρων. (276, 277) Εστιάζοντας στο ρόλο του στο ΠΜ, υπάρχουν

βιβλιογραφικές αναφορές που υποστηρίζουν ότι το miR-181a υπερεκφράζεται στα πλασματοκύτταρα των ασθενών με ασυμπτωματικό ΠΜ ή MGUS συγκριτικά με υγιή άτομα, ενώ υπάρχουν και αναφορές που υποστηρίζουν την υπερέκφρασή του στο ΠΜ συγκριτικά με τον υγιή πληθυσμό καθώς και στα προχωρημένα στάδια της νόσου. (278, 279) Παρόλα αυτά, η κλινική του σημασία ως προς την πρόγνωση και την επιβίωση των ασθενών με ΠΜ δεν έχει μελετηθεί προηγουμένως.

Η ανάλυση επιβίωσης στην κοόρτη των ασθενών με ΠΜ της μελέτης μας (n= 138) ανέδειξε την ανεξάρτητη δυσμενή προγνωστική αξία του miR-181a, καθώς η υπερέκφραση του στα CD138+ πλασματοκύτταρα των ασθενών με ΠΜ συσχετίζεται με σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο πρώιμης υποτροπής και μικρότερο προσδόκιμο επιβίωσης. Η πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox ανέδειξε ότι η δυσμενής προγνωστική αξία του μορίου αυτού είναι ανεξάρτητη από τους εδραιωμένους προγνωστικούς δείκτες του ΠΜ, όπως είναι το σύστημα R-ISS και τα κυτταρογενετικά υψηλού ρίσκου, καθώς και ανεξάρτητη της ανταπόκρισης στην 1^η γραμμή θεραπείας, της πραγματοποίησης αυτόλογης μεταμόσχευσης, των επιπέδων της β2 μικροσφαιρίνης, LDH και κρεατινίνης, καθώς και του φύλου και της ηλικίας. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με μελέτες που έχουν διεξαχθεί για να διερευνηθούν τον ογκογόνο ρόλο του miR-181a στο ΠΜ. Ειδικότερα, η υπερέκφραση του μορίου σε κύτταρα ΠΜ της κυτταρικής σειράς RPMI8226 φάνηκε να προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ η καταστολή της έκφρασης του miR-181a οδήγησε σε σημαντικά μειωμένη επιβίωση και ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων και φάνηκε ότι επάγει την απόπτωση. (280, 281) Επιπλέον, η μείωση της έκφρασης του miR-181a (knockdown) in vivo σε μοντέλα ξενομοσχευμάτων ποντικών με ΠΜ φάνηκε ότι είχε ως αποτέλεσμα ισχυρή καταστολή της αύξησης του όγκου. (278, 281) Ο μηχανισμός με τον οποίο το miR-181a επάγει την εξέλιξη του όγκου στο ΠΜ αποδείχθηκε in vitro. Ειδικότερα, αποδείχθηκε ότι η υποέκφραση του long non coding RNA MEG3 το οποίο προσροφά και αδρανοποιεί (sponging) το miR-181a οδηγεί σε εξέλιξη του ΠΜ επαγόμενη από τη στόχευση του HOXA11. (282)

Πέραν του ΠΜ, έχει αναφερθεί η ογκογόνος δράση και η κλινική αξία του miR-181a σε μια σειρά συμπαγών και αιματολογικών κακοηθειών όπως ο καρκίνος των ωοθηκών, του μαστού, του παχέος εντέρου και του ορθού, του παγκρέατος και του

στομάχου, καθώς και στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) σε παιδιά και την οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ). (283-286) Τα υψηλά επίπεδα miR-181a φαίνεται ότι επάγουν τη μετάβαση από τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου στη φάση S και οδηγούν σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό στην ΟΜΛ των παιδιών, ρυθμίζοντας το ογκοκατασταλτικό γονίδιο ATM. (287) Επιπροσθέτως, στην ΟΛΛ των παιδιών, η στόχευση του WIF-1 από το miR-181-a οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού του Wnt/ β -κατενίνης και κατ'επέκταση σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. (286) Ακόμη, σε παιδιατρικούς ασθενείς με ΟΛΛ παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα miR-181a σε εξωσώματα, ενώ η καταστολή των επιπέδων του εξωσωμικού miR-181a οδήγησε σε μειωμένο πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων *in vitro*. (288)

Η προσθήκη 1q είναι μια συχνή κυτταρογενετική ανωμαλία που συσχετίζεται με την προαγωγή της νόσου από τις πρόδρομες μορφές στη συμπτωματική νόσο, ενώ ακόμη σχετίζεται με αυξημένο φορτίο νόσου, πρώιμη υποτροπή, αντοχή στη θεραπεία και χειρότερη πρόγνωση, ανεξάρτητα από την παρουσία άλλων κυτταρογενετικών υψηλού ρίσκου, το στάδιο ISS και την ηλικία. (289, 290) Παρότι το γονίδιο MIR181A1 εδράζεται στο χρωμόσωμα 1q32.1, η ανάλυσή μας δεν ανέδειξε κάποια συσχέτιση μεταξύ της προσθήκης 1q με τα επίπεδα του miR-181a, αναδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει σημαντικός αντίκτυπος της προσθήκης 1q στην κλινική αξία του miR-181a. Σε αυτό το πλαίσιο, η πολυπαραγοντική ανάλυση κατά Cox επιβεβαίωσε ότι η υπερέκφραση του miR-181a στα CD138+ πλάσματοκύτταρα έχει δυσμενή προγνωστική αξία ανεξάρτητη της προσθήκης 1q.

Στη συνέχεια του δεύτερου σταδίου της παρούσας μελέτης, βασιζόμενοι στην ανεξάρτητη προγνωστική αξία του miR-181a στο ΠΜ, ερευνήσαμε περαιτέρω την ικανότητά του να βελτιώσει την προγνωστική ικανότητα των εδραιωμένων προγνωστικών εργαλείων της νόσου και ιδιαίτερα του συστήματος R-ISS όταν συνεκτιμηθεί με αυτά. Ειδικότερα, ο προσδιορισμός του miR-181a βελτίωσε σημαντικά τη σταδιοποίηση κινδύνου των ασθενών με ΠΜ, και μάλιστα τα επίπεδα έκφρασης του μορίου φάνηκε ότι μπορούν να προβλέψουν τη δυσμενή επιβίωση των ασθενών με ΠΜ μέσα σε ομάδες ασθενών, όπως αυτοί σταδίου R-ISS II, οι ασθενείς με κυτταρογενετικά υψηλού ρίσκου και οι ασθενείς με καλή ανταπόκριση στη

θεραπεία πρώτης γραμμής. Όπως έχει αναφερθεί ανωτέρω, το στάδιο R-ISS II αποτελεί την πολυπληθέστερη και πιο ετερογενή ομάδα ασθενών, οπότε ένας βιοδείκτης που θα μπορούσε να σταδιοποιήσει περαιτέρω τους ασθενείς αυτού του σταδίου θα ήταν πολύ σημαντικός στην κλινική πράξη. Το miR-181a πιθανό να μπορούσε να αποτελέσει έναν τέτοιο βιοδείκτη με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης. Μεγάλες τυχαίοποιημένες κλινικές μελέτες χρειάζονται ώστε να μπορέσει να εδραιωθεί η θέση του μορίου αυτού ως προγνωστικού δείκτη στο ΠΜ.

Παρότι όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν μελέτες που έχουν καταδείξει τον ρόλο του miR-181a στην προαγωγή της νόσου στο ΠΜ, η απουσία περαιτέρω *in vitro* αξιολόγησης του ρυθμιστικού του ρόλου στα CD138+ πλασματοκύτταρα είναι ο βασικός περιορισμός αυτής της μελέτης. Επίσης, όπως προαναφέρθηκε στους περιορισμούς του πρώτου σταδίου, η χρήση μαγνητικών σφαιριδίων που φέρουν αντι-CD138 αντίσωμα για τη θετική επιλογή των πλασματοκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα να απομονώνονται πέρα από τα κακοήγη πλασματοκύτταρα και τα αντιδραστικά πλασματοκύτταρα, ενώ ακόμη δεν απομονώνονται οι κλώνοι αποδιαφοροποιημένων πλασματοκυττάρων που είναι CD138-.

Συνοψίζοντας, η μελέτη αυτή απέδειξε, μέσω miRNA αλληλούχισης, ότι το miR-181a υπερεκφράζεται στα CD138+ πλασματοκύτταρα του ΠΜ συγκριτικά με το ασυμπτωματικό ΠΜ και το MGUS, όπως και στα υψηλότερα στάδια R-ISS. Η ανάλυση επιβίωσης στην ομάδα ασθενών με ΠΜ ανέδειξε τη δυσμενή πρόγνωση ασθενών με ΠΜ που υπερεκφράζουν το μόριο αυτό. Τα μοντέλα πολυπαραγοντικής ανάλυσης ανέδειξαν ότι η δυσμενής προγνωστική αξία του miR-181a είναι ανεξάρτητη των λοιπών προγνωστικών δεικτών και η συνεκτίμηση των επιπέδων έκφρασής του μαζί με τους κλινικά καθιερωμένους δείκτες πρόγνωσης, όπως το R-ISS οδήγησε σε καλύτερη διαστρωμάτωση κινδύνου των ασθενών με ΠΜ, υποστηρίζοντας το ρόλο του μορίου ως βιοδείκτη με πιθανή προγνωστική αξία.

Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο της μελέτης μας εστιάσαμε στο ρόλο των κυκλοφορούντων miRNAs ως βιοδεικτών ικανών να προβλέψουν την οστική νόσο του ΠΜ. Τα κυκλοφορούντα miRNAs εντοπίζονται στα βιολογικά υλικά όπως αίμα και ούρα και χαρακτηρίζονται από μεγάλη σταθερότητα, ενώ είναι εύκολο να προσδιοριστούν με ελάχιστα επεμβατικές μεθόδους, χαρακτηριστικά που τα

καθιστούν μόρια που εν δυνάμει μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμους προγνωστικούς και όχι μόνο βιοδείκτες είτε μεμονωμένα, είτε ως πάνελ miRNA. (291)

Επιστημονικά δεδομένα έχουν αποδείξει το ρόλο των miRNAs τόσο στην οστεοβλαστογένεση, όσο και στην οστεοκλαστογένεση και η απορρύθμισή τους εμπλέκεται στην οστική νόσο του ΠΜ. (292) Η μελέτη μας ανέδειξε 5 miRNAs που εκφράζονται διαφορετικά ανάμεσα στο πλάσμα ασθενών με οστική νόσο και αυτών χωρίς. Ειδικότερα, η έκφραση των let-7b-5p, miR-143-3p, miR-17-5p, miR-335-5p, και miR-214-3p ήταν σημαντικά υψηλότερη στο πλάσμα ασθενών με οστική νόσο. Παρότι τα μόρια αυτά εμφάνιζαν σημαντική διαφορά στην έκφρασή τους μεταξύ ασθενών με και χωρίς οστική νόσο, δε διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασής τους και της βαρύτητας της οστικής νόσου ή της παρουσίας σκελετικών συμβαμάτων (SREs). Ακολούθως, διερευνήθηκε η ικανότητα αυτών των μορίων να διακρίνουν ασθενείς με οστική νόσο από αυτούς χωρίς. Η ανάλυση ROC ανέδειξε ότι όλα τα παραπάνω μόρια μπορούν να διακρίνουν ασθενείς με οστική νόσο από αυτούς χωρίς. Το μόριο miR-214-3p εμφάνιζε την καλύτερη διακριτική ικανότητα ακολουθούμενο από τα μόρια miR-143-3p, miR-335-5p, miR-17-5p, και let-7b-5p. Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν πολλαπλά μοντέλα προβλεπτικά της οστικής νόσου, που περιελάμβαναν ως μεταβλητές την έκφραση διαφόρων συνδυασμών των μορίων αυτών. Την καλύτερη προβλεπτική αξία φάνηκε ότι έχει το μοντέλο που απαρτίζεται από τα let-7b-5p, miR-214-3p, και miR-335-5p.

Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι το miR-214-3p αναδείχθηκε από τη μελέτη ως το πιο αποτελεσματικό μόριο εκ των μελετούμενων αναφóρικά με την πρόβλεψη της παρουσίας οστικής νόσου. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, το miR-214-3p εμπλέκεται στην οστική νόσο καταστέλλοντας την οστεοβλαστογένεση και επάγοντας παράλληλα την οστεοκλαστογένεση. Ειδικότερα, το μόριο αυτό στοχεύει και αδρανοποιεί τους παράγοντες ATF4 (activating transcription factor 4), osterix και FGFR1 (fibroblast growth factor 1), οι οποίοι εμφανίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των οστεοβλαστών, οδηγώντας έτσι σε διαταραγμένη οστεοβλαστογένεση. (293-295) Από την άλλη πλευρά, το miR-214-3p επίσης συμμετέχει στη ρύθμιση της οστεοκλαστογένεσης. Ο Zhao και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι το miR-214-3p αυξάνεται κατά τη διάρκεια της οστεοκλαστογένεσης.

Πιο συγκεκριμένα, το μόριο αυτό στοχεύει το PTEN και ρυθμίζει την οστεοκλαστογένεση μέσω του μονοπατιού PI3K/Akt pathway. (296) Βασιζόμενοι σε αυτά τα δεδομένα, το 2016, ο Hao και οι συνεργάτες του διερεύνησαν το ρόλο του ως βιοδείκτη στην οστική νόσο του ΠΜ. Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι τα επίπεδα του miR-214-3p είναι υψηλότερα στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ και οστική νόσο σε σύγκριση με αυτών χωρίς οστική νόσο και έτσι το μόριο αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει διαγνωστικό βιοδείκτη για την οστική νόσο. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα αυτά, καθώς αποδείξαμε ότι το miR-214-3p υπερέκφραζεται στο πλάσμα ασθενών με οστική νόσο και μπορεί να διακρίνει ασθενείς με οστική νόσο από αυτούς χωρίς. Επιπλέον, η μελέτη του Hao και συνεργατών απέδειξε συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του miR-214-3p με τη βαρύτητα της οστικής νόσου. Στην παρούσα μελέτη δε διαπιστώθηκε τέτοια συσχέτιση. (297)

Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι η παρούσα μελέτη περιγράφει για πρώτη φορά τη συσχέτιση των μορίων miR-143-3p, let-7b-5p, miR-335-5p, και miR-17-5p με την οστική νόσο του ΠΜ. Το miR-143-3p είναι ένα μόριο με αποδεδειγμένη κλινική αξία στο οστεοσάρκωμα. (298) Υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα αναφορικά με το ρόλο της υπερέκφρασης ή υποέκφρασης του miR-143-3p στον οστικό σχηματισμό ή την οστική αποδόμηση. Επιστημονικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η υπερέκφραση του miR-143-3p καταστέλλει την οστεογένεση στοχεύοντας άμεσα και μειώνοντας τα επίπεδα της *osterix*. (299) Αντιθέτως, άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι η υπερέκφραση του miR-143-3p οδηγεί σε αύξηση του οστικού σχηματισμού και μείωση της οστικής αποδόμησης. (300, 301) Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι υψηλά επίπεδα κυκλοφορούντος miR-143-3p παρατηρούνται σε ασθενείς με οστική νόσο διακρίνοντάς τους από αυτούς χωρίς οστική νόσο, αποκτώντας έτσι ένα ρόλο ως υποψήφιος βιοδείκτης ικανός να προβλέψει την παρουσία οστικής νόσου στους ασθενείς με ΠΜ. Αναφορικά με τα μέλη της οικογένειας miRNA let-7, υπάρχει πληθώρα δεδομένων που υποστηρίζουν τον καίριο ρόλο πολλών εξ αυτών στον οστικό σχηματισμό. Η υπερέκφραση του let-7a-5p αναστέλλει την οστεογένεση στοχεύοντας άμεσα τον TGFBR1, έναν υποδοχέα κινάσης σερίνης/θρεονίνης που εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF. (302, 303) Τα αποτελέσματα αυτά

είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης που ανέδειξε ότι υψηλά επίπεδα κυκλοφορούντος let-7b-5p είναι ενδεικτικά της παρουσίας οστικής νόσου. Όσον αφορά το μόριο miR-335-5p, παρότι δεδομένα βασικής έρευνας υποστηρίζουν ότι προάγει την οστεογένεση μέσω στόχευσης και μείωσης της έκφρασης του DKK1, δεδομένα μελετών σε ασθενείς με οστεοπόρωση συσχετίζουν τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του κυκλοφορούντος miR-335-5p με οστεοπορωτικά κατάγματα. (304-306) Η δική μας μελέτη επίσης συσχέτισε τα υψηλά επίπεδα του miR-335-5p στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ με την παρουσία οστικής νόσου. Τέλος, υπάρχουν ποικίλες αναφορές στη βιβλιογραφία που υποστηρίζουν τον ανασταλτικό ρόλο του miR-17-5p στον οστικό σχηματισμό. Το μόριο αυτό στοχεύει και οδηγεί σε υποέκφραση μόρια όπως οι πρωτεΐνες SMAD5 και BMP2, που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF οδηγώντας σε καταστολή της οστεογένεσης. (307-309) Μια μελέτη που συμπεριέλαβε ασθενείς με οστεοπόρωση και αξιολογούσε τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων miRNA στο περιφερικό αίμα των ασθενών έδειξε ότι το miR-17-5p υπερεκφράζεται, ομοίως με τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης σε ασθενείς με οστική νόσο σχετιζόμενη με το ΠΜ. (310)

Αναφορικά με τον προγνωστικό ρόλο των υπό μελέτη miRNAs, η παρούσα μελέτη ανέδειξε ότι η μειωμένη έκφραση των κυκλοφορούντων let-7b-5p και miR-335-5p σχετίζεται με σημαντικά μικρότερο διάστημα ελεύθερης προόδου νόσου επιβίωσης μετά την πρώτη γραμμή θεραπείας και αυξημένο κίνδυνο προόδου νόσου, ανεξάρτητα από άλλους προγνωστικούς παράγοντες για το ΠΜ. Όσο αφορά το let-7b-5p, η υποέκφρασή του στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ φάνηκε ότι αποτελεί δυσμενή προγνωστικό δείκτη ως προς την ολική επιβίωση. Αυτή δεν είναι η πρώτη φορά που τα μόρια αυτά συσχετίζονται με την πρόγνωση του ΠΜ. Το let-7b-5p είναι γνωστό για την ογκοκατασταλτική δράση του στο ΠΜ. Δρα στοχεύοντας άμεσα και μειώνοντας τα επίπεδα του υποδοχέα του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα 1 (IGF1R) και του ογκογονιδίου MYC. (311, 312) Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, υπάρχουν δεδομένα ότι χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του κυκλοφορούντος let-7b-5p σχετίζονται με μικρότερο διάστημα ολικής επιβίωσης. (313) Στο βέλτιστο της γνώσης μας, ο βιολογικός ρόλος του miR-335-5p στο ΠΜ δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς. Πρόσφατες αναφορές υποδεικνύουν πιθανό

ογκοκατασταλτικό ρόλο του miR-335-5p στο ΠΜ μέσω μείωσης των επιπέδων του IGF1R. (314) Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία εμμέσως με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η οποία ανέδειξε ότι χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του miR-335-5p στο πλάσμα ασθενών με ΠΜ σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση.

Από όσο γνωρίζουμε μετά από εκτενή ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, η μελέτη μας παρουσιάζει για πρώτη φορά συσχέτιση των παραπάνω μορίων με την οστική νόσο του ΠΜ. Παρόλα αυτά, βασικό περιορισμό αποτελεί ο μικρός αριθμός ασθενών που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη, γεγονός που αποτελεί εμπόδιο ως προς τη γενίκευση των αποτελεσμάτων της και την εδραίωση των μορίων αυτών ως διαγνωστικούς βιοδείκτες στην καθημερινή κλινική πρακτική.

Συνοψίζοντας, η παρούσα διάτριβη εξετάζει σε πολλαπλά επίπεδα την έκφραση miRNA και tRF βιοδεικτών στο ΠΜ και θέτει τη βάση για την ανάδειξη νέων προγνωστικών και διαγνωστικών βιοδεικτών. Ειδικότερα, μια σειρά μορίων miRNAs και tRFs μελετήθηκαν ως προς την έκφρασή τους στα CD138+ πλασματοκύτταρα των ασθενών της μελέτης. Στατιστικά σημαντική υποέκφραση των μορίων miR-16-5p, miR-155-5p και 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG} στα πλασματοκύτταρα ασθενών με ΠΜ σε σχέση με αυτά των ασθενών με ασυμπτωματικό ΠΜ διαπιστώθηκε από την ανάλυση αυτή. Επιπλέον, τα μόρια miR-15a-5p, miR-16-5p, miR-222-3p, miR-125b-5p και i-tRF-GlyGCC φάνηκε ότι υποεκφράζονται σε ασθενείς με ΠΜ και οστική νόσο. Ως προγνωστικοί παράγοντες σχετιζόμενοι με μεγαλύτερη ολική επιβίωση αναδείχθηκαν τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των miR-223-3p, i-tRF-Pro^{TGG}, i-tRF-Glu^{CTC}, i-tRF-His^{GTG}, και i-tRF-Phe^{GAA} και 3'-tRF-Leu^{AAG/TAG}. Το miR-181a αναδείχθηκε ως ο καλύτερος υποψήφιος για να αποτελέσει προγνωστικό βιοδείκτη αναφορικά με την ολική και την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση μετά από NGS και περαιτέρω αξιολόγηση σε μια μεγαλύτερη κοόρτη ασθενών. Η υπερέκφρασή του στα CD138+ πλασματοκύτταρα των ασθενών με ΠΜ συσχετίστηκε με σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο πρώιμης υποτροπής και μικρότερο προσδόκιμο επιβίωσης ανεξάρτητη από το R-ISS και τα κυτταρογενετικά υψηλού ρίσκου. Ο συνδυασμός του miR-181a με το R-ISS βελτίωσε σημαντικά τη σταδιοποίηση κινδύνου των ασθενών με ΠΜ, και μάλιστα μπόρεσε να σταδιοποιήσει περαιτέρω ασθενείς σταδίου R-ISS II. Τέλος,

αποδείχθηκε ότι τα μόρια let-7b-5p, miR-143-3p, miR-17-5p, miR-335-5p, και miR-214-3p εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα ασθενών με οστική νόσο και μπορούν να διακρίνουν ασθενείς με οστική νόσο από αυτούς χωρίς είτε ανεξάρτητα είτε ως συμμεταβλητές ενός προβλεπτικού μοντέλου.

Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cowan AJ, Allen C, Barac A, Basaleem H, Bensenor I, Curado MP, et al. Global Burden of Multiple Myeloma: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *JAMA Oncol.* 2018;4(9):1221-7.
2. Kristinsson SY, Landgren O, Dickman PW, Derolf AR, Bjorkholm M. Patterns of survival in multiple myeloma: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2003. *J Clin Oncol.* 2007;25(15):1993-9.
3. Waxman AJ, Mink PJ, Devesa SS, Anderson WF, Weiss BM, Kristinsson SY, et al. Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a population-based study. *Blood.* 2010;116(25):5501-6.
4. Landgren O, Graubard BI, Katzmann JA, Kyle RA, Ahmadizadeh I, Clark R, et al. Racial disparities in the prevalence of monoclonal gammopathies: a population-based study of 12,482 persons from the National Health and Nutritional Examination Survey. *Leukemia.* 2014;28(7):1537-42.
5. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Buadi FK, Pandey S, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia.* 2014;28(5):1122-8.
6. Georgakopoulou R, Fiste O, Sergentanis TN, Andrikopoulou A, Zagouri F, Gavriatopoulou M, et al. Occupational Exposure and Multiple Myeloma Risk: An Updated Review of Meta-Analyses. *J Clin Med.* 2021;10(18).
7. Khuder SA, Mutgi AB. Meta-analyses of multiple myeloma and farming. *Am J Ind Med.* 1997;32(5):510-6.
8. Mitchell JS, Li N, Weinhold N, Forsti A, Ali M, van Duin M, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for multiple myeloma. *Nat Commun.* 2016;7:12050.
9. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med.* 2002;346(8):564-9.
10. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2007;356(25):2582-90.

11. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(2):100-13.
12. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17046.
13. Gonzalez D, van der Burg M, Garcia-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, Gonzalez M, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 2007;110(9):3112-21.
14. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):160-71.
15. Walker BA, Wardell CP, Johnson DC, Kaiser MF, Begum DB, Dahir NB, et al. Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. *Blood*. 2013;121(17):3413-9.
16. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol*. 2015;33(33):3911-20.
17. Sergentanis TN, Kastiris E, Terpos E, Dimopoulos MA, Psaltopoulou T. Cytogenetics and Survival of Multiple Myeloma: Isolated and Combined Effects. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2016;16(6):335-40.
18. Bal S, Kumar SK, Fonseca R, Gay F, Hungria VT, Dogan A, et al. Multiple myeloma with t(11;14): unique biology and evolving landscape. *Am J Cancer Res*. 2022;12(7):2950-65.
19. Lawasut P, Groen RW, Dhimolea E, Richardson PG, Anderson KC, Mitsiades CS. Decoding the pathophysiology and the genetics of multiple myeloma to identify new therapeutic targets. *Semin Oncol*. 2013;40(5):537-48.
20. Stella F, Pedrazzini E, Agazzoni M, Ballester O, Slavutsky I. Cytogenetic Alterations in Multiple Myeloma: Prognostic Significance and the Choice of Frontline Therapy. *Cancer Invest*. 2015;33(10):496-504.
21. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, Usmani S, Siegel D, Anderson KC, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*. 2016;127(24):2955-62.

22. Chretien ML, Corre J, Lauwers-Cances V, Magrangeas F, Cleynen A, Yon E, et al. Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood*. 2015;126(25):2713-9.
23. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, Ashby TC, Bauer M, Davies FE, et al. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood*. 2018;132(6):587-97.
24. Manier S, Salem K, Glavey SV, Roccaro AM, Ghobrial IM. Genomic Aberrations in Multiple Myeloma. *Cancer Treat Res*. 2016;169:23-34.
25. Weinhold N, Ashby C, Rasche L, Chavan SS, Stein C, Stephens OW, et al. Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood*. 2016;128(13):1735-44.
26. Chng WJ, Huang GF, Chung TH, Ng SB, Gonzalez-Paz N, Troska-Price T, et al. Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia*. 2011;25(6):1026-35.
27. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*. 2014;25(1):91-101.
28. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(5):335-48.
29. Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: biological insights and early treatment strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:478-87.
30. Manier S, Kawano Y, Bianchi G, Roccaro AM, Ghobrial IM. Cell autonomous and microenvironmental regulation of tumor progression in precursor states of multiple myeloma. *Curr Opin Hematol*. 2016;23(4):426-33.
31. Ramachandran IR, Martner A, Pisklakova A, Condamine T, Chase T, Vogl T, et al. Myeloid-derived suppressor cells regulate growth of multiple myeloma by inhibiting T cells in bone marrow. *J Immunol*. 2013;190(7):3815-23.
32. Malek E, de Lima M, Letterio JJ, Kim BG, Finke JH, Driscoll JJ, et al. Myeloid-derived suppressor cells: The green light for myeloma immune escape. *Blood Rev*. 2016;30(5):341-8.

33. Kawano Y, Moschetta M, Manier S, Glavey S, Gorgun GT, Roccaro AM, et al. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunol Rev.* 2015;263(1):160-72.
34. Moschetta M, Kawano Y, Podar K. Targeting the Bone Marrow Microenvironment. *Cancer Treat Res.* 2016;169:63-102.
35. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer J.* 2018;8(1):7.
36. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-42.
37. Terpos E, Christoulas D, Gavriatopoulou M. Biology and treatment of myeloma related bone disease. *Metabolism.* 2018;80:80-90.
38. Pearce RN, Sordillo EM, Yaccoby S, Wong BR, Liau DF, Colman N, et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(20):11581-6.
39. Farrugia AN, Atkins GJ, To LB, Pan B, Horvath N, Kostakis P, et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation in vitro and correlates with bone destruction in vivo. *Cancer Res.* 2003;63(17):5438-45.
40. Spaan I, Raymakers RA, van de Stolpe A, Peperzak V. Wnt signaling in multiple myeloma: a central player in disease with therapeutic potential. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):67.
41. Qiang YW, Chen Y, Stephens O, Brown N, Chen B, Epstein J, et al. Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. *Blood.* 2008;112(1):196-207.
42. Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA, Christoulas D, Migkou M, Iakovaki M, Gkatzamanidou M, et al. Dickkopf-1: a suitable target for the management of myeloma bone disease. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13(7):839-48.

43. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*. 2002;417(6889):664-7.
44. Colucci S, Brunetti G, Oranger A, Mori G, Sardone F, Specchia G, et al. Myeloma cells suppress osteoblasts through sclerostin secretion. *Blood Cancer J*. 2011;1(6):e27.
45. Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, et al. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone*. 2004;35(4):828-35.
46. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J*. 2003;22(23):6267-76.
47. Brunetti G, Oranger A, Mori G, Specchia G, Rinaldi E, Curci P, et al. Sclerostin is overexpressed by plasma cells from multiple myeloma patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1237:19-23.
48. Terpos E, Christoulas D, Katodritou E, Bratengeier C, Gkatzamanidou M, Michalis E, et al. Elevated circulating sclerostin correlates with advanced disease features and abnormal bone remodeling in symptomatic myeloma: reduction post-bortezomib monotherapy. *Int J Cancer*. 2012;131(6):1466-71.
49. Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):98-105.
50. Liu H, Peng F, Liu Z, Jiang F, Li L, Gao S, et al. CYR61/CCN1 stimulates proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro and contributes to bone remodeling in vivo in myeloma bone disease. *Int J Oncol*. 2017;50(2):631-9.
51. Derynck R, Budi EH. Specificity, versatility, and control of TGF-beta family signaling. *Sci Signal*. 2019;12(570).
52. Gooding S, Olechnowicz SWZ, Morris EV, Armitage AE, Arezes J, Frost J, et al. Transcriptomic profiling of the myeloma bone-lining niche reveals BMP signalling inhibition to improve bone disease. *Nat Commun*. 2019;10(1):4533.
53. Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*. 2006;366(1):51-7.

54. Colombo M, Mirandola L, Platonova N, Apicella L, Basile A, Figueroa AJ, et al. Notch-directed microenvironment reprogramming in myeloma: a single path to multiple outcomes. *Leukemia*. 2013;27(5):1009-18.
55. Hengeveld PJ, Kersten MJ. B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy? *Blood Cancer J*. 2015;5:e282.
56. Terpos E, Politou M, Viniou N, Rahemtulla A. Significance of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha) in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2005;46(12):1699-707.
57. Tanaka Y, Abe M, Hiasa M, Oda A, Amou H, Nakano A, et al. Myeloma cell-osteoclast interaction enhances angiogenesis together with bone resorption: a role for vascular endothelial cell growth factor and osteopontin. *Clin Cancer Res*. 2007;13(3):816-23.
58. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2003;78(1):21-33.
59. Dimopoulos MA, Sonneveld P, Leung N, Merlini G, Ludwig H, Kastritis E, et al. International Myeloma Working Group Recommendations for the Diagnosis and Management of Myeloma-Related Renal Impairment. *J Clin Oncol*. 2016;34(13):1544-57.
60. Konig C, Kleber M, Ihorst G, Gropp A, Reinhardt H, Koch B, et al. Prevalence of iron overload vs iron deficiency in multiple myeloma: resembling or different from MDS--and stem cell transplant (SCT)--patients? *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013;13(6):671-80 e3.
61. Silvestris F, Cafforio P, Tucci M, Dammacco F. Negative regulation of erythroblast maturation by Fas-L(+)/TRAIL(+) highly malignant plasma cells: a major pathogenetic mechanism of anemia in multiple myeloma. *Blood*. 2002;99(4):1305-13.
62. Terpos E, Dimopoulos MA. Myeloma bone disease: pathophysiology and management. *Ann Oncol*. 2005;16(8):1223-31.
63. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 2009;113(22):5412-7.

64. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2006;354(13):1362-9.
65. Cherry BM, Korde N, Kwok M, Manasanch EE, Bhutani M, Mulquin M, et al. Modeling progression risk for smoldering multiple myeloma: results from a prospective clinical study. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(10):2215-8.
66. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):e538-48.
67. Mateos MV, Hernandez MT, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, Lopez Corral L, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2013;369(5):438-47.
68. Rajkumar SV, Larson D, Kyle RA. Diagnosis of smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011;365(5):474-5.
69. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Rajkumar SV. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013;27(4):941-6.
70. Waxman AJ, Mick R, Garfall AL, Cohen A, Vogl DT, Stadtmauer EA, et al. Classifying ultra-high risk smoldering myeloma. *Leukemia*. 2015;29(3):751-3.
71. Hillengass J, Fechtner K, Weber MA, Bauerle T, Ayyaz S, Heiss C, et al. Prognostic significance of focal lesions in whole-body magnetic resonance imaging in patients with asymptomatic multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2010;28(9):1606-10.
72. Kastiris E, Moulopoulos LA, Terpos E, Koutoulidis V, Dimopoulos MA. The prognostic importance of the presence of more than one focal lesion in spine MRI of patients with asymptomatic (smoldering) multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28(12):2402-3.
73. Russell SJ, Rajkumar SV. Multiple myeloma and the road to personalised medicine. *Lancet Oncol*. 2011;12(7):617-9.
74. Palumbo A, Bringhen S, Mateos MV, Larocca A, Facon T, Kumar SK, et al. Geriatric assessment predicts survival and toxicities in elderly myeloma patients: an International Myeloma Working Group report. *Blood*. 2015;125(13):2068-74.

75. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975;36(3):842-54.
76. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3412-20.
77. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009;23(12):2210-21.
78. Dimopoulos MA, Barlogie B, Smith TL, Alexanian R. High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma. *Ann Intern Med*. 1991;115(12):931-5.
79. Terpos E, Katodritou E, Roussou M, Pouli A, Michalis E, Delimpasi S, et al. High serum lactate dehydrogenase adds prognostic value to the international myeloma staging system even in the era of novel agents. *Eur J Haematol*. 2010;85(2):114-9.
80. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2863-9.
81. Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, Mateos MV, Zweegman S, Cook G, et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up(dagger). *Ann Oncol*. 2021;32(3):309-22.
82. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):e328-e46.
83. Cavo M, Terpos E, Nanni C, Moreau P, Lentzsch S, Zweegman S, et al. Role of (18)F-FDG PET/CT in the diagnosis and management of multiple myeloma and other plasma cell disorders: a consensus statement by the International Myeloma Working Group. *Lancet Oncol*. 2017;18(4):e206-e17.
84. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, Owen RG, Child JA, Thakurta A, et al. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2017;3(1):28-35.
85. van de Donk N, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma. *Lancet*. 2021;397(10272):410-27.

86. Kotla V, Goel S, Nischal S, Heuck C, Vivek K, Das B, et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 2009;2:36.
87. Anderson KC. Lenalidomide and thalidomide: mechanisms of action--similarities and differences. *Semin Hematol*. 2005;42(4 Suppl 4):S3-8.
88. Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*. 2010;327(5971):1345-50.
89. Zhu YX, Braggio E, Shi CX, Kortuem KM, Bruins LA, Schmidt JE, et al. Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood*. 2014;124(4):536-45.
90. Lagrue K, Carisey A, Morgan DJ, Chopra R, Davis DM. Lenalidomide augments actin remodeling and lowers NK-cell activation thresholds. *Blood*. 2015;126(1):50-60.
91. Zhu YX, Kortuem KM, Stewart AK. Molecular mechanism of action of immunomodulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(4):683-7.
92. Richardson PG, Siegel DS, Vij R, Hofmeister CC, Baz R, Jagannath S, et al. Pomalidomide alone or in combination with low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma: a randomized phase 2 study. *Blood*. 2014;123(12):1826-32.
93. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Jr., Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*. 2006;107(12):4907-16.
94. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2005;352(24):2487-98.
95. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med*. 2003;348(26):2609-17.
96. Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou QP. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011;11(3):239-53.

97. Mohty M, Malard F, Mohty B, Savani B, Moreau P, Terpos E. The effects of bortezomib on bone disease in patients with multiple myeloma. *Cancer*. 2014;120(5):618-23.
98. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood*. 2007;110(9):3281-90.
99. Siegel DS, Martin T, Wang M, Vij R, Jakubowiak AJ, Lonial S, et al. A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*. 2012;120(14):2817-25.
100. Stewart AK, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Masszi T, Spicka I, Oriol A, et al. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2015;372(2):142-52.
101. Dimopoulos MA, Moreau P, Palumbo A, Joshua D, Pour L, Hajek R, et al. Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol*. 2016;17(1):27-38.
102. Jakubowiak AJ, Dytfeld D, Griffith KA, Lebovic D, Vesole DH, Jagannath S, et al. A phase 1/2 study of carfilzomib in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone as a frontline treatment for multiple myeloma. *Blood*. 2012;120(9):1801-9.
103. Zhai Y, Ye X, Hu F, Xu J, Guo X, Cao Y, et al. Cardiovascular Toxicity of Carfilzomib: The Real-World Evidence Based on the Adverse Event Reporting System Database of the FDA, the United States. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:735466.
104. Fotiou D, Roussou M, Gakiopoulou C, Psimenou E, Gavriatopoulou M, Migkou M, et al. Carfilzomib-associated renal toxicity is common and unpredictable: a comprehensive analysis of 114 multiple myeloma patients. *Blood Cancer J*. 2020;10(11):109.
105. Kubickova L, Pour L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *J Cell Mol Med*. 2014;18(6):947-61.

106. Moreau P, Masszi T, Grzasko N, Bahlis NJ, Hansson M, Pour L, et al. Oral ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;374(17):1621-34.
107. Kumar SK, Berdeja JG, Niesvizky R, Lonial S, Laubach JP, Hamadani M, et al. Safety and tolerability of ixazomib, an oral proteasome inhibitor, in combination with lenalidomide and dexamethasone in patients with previously untreated multiple myeloma: an open-label phase 1/2 study. *Lancet Oncol*. 2014;15(13):1503-12.
108. van de Donk NW, Moreau P, Plesner T, Palumbo A, Gay F, Laubach JP, et al. Clinical efficacy and management of monoclonal antibodies targeting CD38 and SLAMF7 in multiple myeloma. *Blood*. 2016;127(6):681-95.
109. Krejcik J, Casneuf T, Nijhof IS, Verbist B, Bald J, Plesner T, et al. Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(3):384-94.
110. Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, Nahi H, Gimsing P, Hansson M, et al. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2015;373(13):1207-19.
111. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, San-Miguel J, Bahlis NJ, Usmani SZ, et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(14):1319-31.
112. Chari A, Suvannasankha A, Fay JW, Arnulf B, Kaufman JL, Ifthikharuddin JJ, et al. Daratumumab plus pomalidomide and dexamethasone in relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2017;130(8):974-81.
113. Moreau P, Attal M, Hulin C, Arnulf B, Belhadj K, Benboubker L, et al. Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019;394(10192):29-38.
114. Jiang H, Acharya C, An G, Zhong M, Feng X, Wang L, et al. SAR650984 directly induces multiple myeloma cell death via lysosomal-associated and apoptotic pathways, which is further enhanced by pomalidomide. *Leukemia*. 2016;30(2):399-408.

115. Richardson PG, Attal M, Campana F, Le-Guenneec S, Hui AM, Risse ML, et al. Isatuximab plus pomalidomide/dexamethasone versus pomalidomide/dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: ICARIA Phase III study design. *Future Oncol.* 2018;14(11):1035-47.
116. Orłowski RZ, Goldschmidt H, Cavo M, Martin TG, Paux G, Oprea C, et al. Phase III (IMROZ) study design: Isatuximab plus bortezomib (V), lenalidomide (R), and dexamethasone (d) vs VRd in transplant-ineligible patients (pts) with newly diagnosed multiple myeloma (NDMM). *Journal of Clinical Oncology.* 2018;36(15_suppl):TPS8055-TPS.
117. Collins SM, Bakan CE, Swartzel GD, Hofmeister CC, Efebera YA, Kwon H, et al. Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation: evidence for augmented NK cell function complementing ADCC. *Cancer Immunol Immunother.* 2013;62(12):1841-9.
118. Richardson PG, Jagannath S, Moreau P, Jakubowiak AJ, Raab MS, Facon T, et al. Elotuzumab in combination with lenalidomide and dexamethasone in patients with relapsed multiple myeloma: final phase 2 results from the randomised, open-label, phase 1b-2 dose-escalation study. *Lancet Haematol.* 2015;2(12):e516-27.
119. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, White D, Grosicki S, Spicka I, et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2015;373(7):621-31.
120. Laubach JP, Moreau P, San-Miguel JF, Richardson PG. Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res.* 2015;21(21):4767-73.
121. San-Miguel JF, Hungria VT, Yoon SS, Beksac M, Dimopoulos MA, Elghandour A, et al. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(11):1195-206.
122. Chari A, Vogl DT, Gavriatopoulou M, Nooka AK, Yee AJ, Huff CA, et al. Oral Selinexor-Dexamethasone for Triple-Class Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2019;381(8):727-38.

123. Lee L, Bounds D, Paterson J, Herledan G, Sully K, Seestaller-Wehr LM, et al. Evaluation of B cell maturation antigen as a target for antibody drug conjugate mediated cytotoxicity in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2016;174(6):911-22.
124. Tai YT, Mayes PA, Acharya C, Zhong MY, Cea M, Cagnetta A, et al. Novel anti-B-cell maturation antigen antibody-drug conjugate (GSK2857916) selectively induces killing of multiple myeloma. *Blood*. 2014;123(20):3128-38.
125. Montes de Oca R, Alavi AS, Vitali N, Bhattacharya S, Blackwell C, Patel K, et al. Belantamab Mafodotin (GSK2857916) Drives Immunogenic Cell Death and Immune-mediated Antitumor Responses In Vivo. *Mol Cancer Ther*. 2021;20(10):1941-55.
126. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*. 2016;126(6):2123-38.
127. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang M, Arnason J, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet*. 2020;396(10254):839-52.
128. Teoh PJ, Chng WJ. CAR T-cell therapy in multiple myeloma: more room for improvement. *Blood Cancer J*. 2021;11(4):84.
129. Munshi NC, Anderson LD, Jr., Shah N, Madduri D, Berdeja J, Lonial S, et al. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2021;384(8):705-16.
130. Lakshman A, Rajkumar SV, Buadi FK, Binder M, Gertz MA, Lacy MQ, et al. Risk stratification of smoldering multiple myeloma incorporating revised IMWG diagnostic criteria. *Blood Cancer J*. 2018;8(6):59.
131. Mateos MV, Hernandez MT, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, Corral LL, et al. Lenalidomide plus dexamethasone versus observation in patients with high-risk smouldering multiple myeloma (QuiRedex): long-term follow-up of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):1127-36.
132. Lonial S, Jacobus S, Fonseca R, Weiss M, Kumar S, Orlowski RZ, et al. Randomized Trial of Lenalidomide Versus Observation in Smoldering Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2020;38(11):1126-37.

133. Landgren CO, Chari A, Cohen YC, Spencer A, Voorhees P, Estell JA, et al. Daratumumab monotherapy for patients with intermediate-risk or high-risk smoldering multiple myeloma: a randomized, open-label, multicenter, phase 2 study (CENTAURUS). *Leukemia*. 2020;34(7):1840-52.
134. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, Leleu X, Caillot D, Escoffre M, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Engl J Med*. 2017;376(14):1311-20.
135. Cavo M, Gay F, Beksac M, Pantani L, Petrucci MT, Dimopoulos MA, et al. Autologous haematopoietic stem-cell transplantation versus bortezomib-melphalan-prednisone, with or without bortezomib-lenalidomide-dexamethasone consolidation therapy, and lenalidomide maintenance for newly diagnosed multiple myeloma (EMN02/HO95): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Haematol*. 2020;7(6):e456-e68.
136. Sonneveld P, Goldschmidt H, Rosinol L, Blade J, Lahuerta JJ, Cavo M, et al. Bortezomib-based versus nonbortezomib-based induction treatment before autologous stem-cell transplantation in patients with previously untreated multiple myeloma: a meta-analysis of phase III randomized, controlled trials. *J Clin Oncol*. 2013;31(26):3279-87.
137. Moreau P, Hulin C, Macro M, Caillot D, Chaletteix C, Roussel M, et al. VTD is superior to VCD prior to intensive therapy in multiple myeloma: results of the prospective IFM2013-04 trial. *Blood*. 2016;127(21):2569-74.
138. Rosinol L, Oriol A, Rios R, Sureda A, Blanchard MJ, Hernandez MT, et al. Bortezomib, lenalidomide, and dexamethasone as induction therapy prior to autologous transplant in multiple myeloma. *Blood*. 2019;134(16):1337-45.
139. Joseph NS, Kaufman JL, Dhodapkar MV, Hofmeister CC, Almaula DK, Heffner LT, et al. Long-Term Follow-Up Results of Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone Induction Therapy and Risk-Adapted Maintenance Approach in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2020;38(17):1928-37.
140. Laura Rosinol BH, Albert Oriol, Anne-Laurène Colin, Rafael Ríos Tamayo, Cyrille Hulin, Maria Jesús Blanchard, Denis Caillot, Anna Sureda Balari, Miguel T. Hernandez, Bertrand Arnulf, Maria-Victoria Mateos, Margaret Macro, Jesus San-Miguel, Karim Belhadj, Juan-Jose Lahuerta, M. Brigid Garelik, Joan Blade, Philippe Moreau, Michel

Attal. Integrated Analysis of Bortezomib-Lenalidomide-Dexamethasone vs Bortezomib-Thalidomide-Dexamethasone in Transplant-Eligible Newly Diagnosed Myeloma. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2019;19(10):e1-e2.

141. Moreau P, Attal M, Hulin C, Béné M-C, Broijl A, Caillot D, et al. Phase 3 randomized study of daratumumab (DARA) + bortezomib/thalidomide/dexamethasone (D-VTd) vs VTd in transplant-eligible (TE) newly diagnosed multiple myeloma (NDMM): CASSIOPEIA Part 1 results. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(15_suppl):8003-.

142. Voorhees PM, Kaufman JL, Laubach J, Sborov DW, Reeves B, Rodriguez C, et al. Daratumumab, lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone for transplant-eligible newly diagnosed multiple myeloma: the GRIFFIN trial. *Blood*. 2020;136(8):936-45.

143. Gay F, Cerrato C, Petrucci MT, Zambello R, Gamberi B, Ballanti S, et al. Efficacy of carfilzomib lenalidomide dexamethasone (KRd) with or without transplantation in newly diagnosed myeloma according to risk status: Results from the FORTE trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(15_suppl):8002-.

144. Blanes M, Lahuerta JJ, Gonzalez JD, Ribas P, Solano C, Alegre A, et al. Intravenous busulfan and melphalan as a conditioning regimen for autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a matched comparison to a melphalan-only approach. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(1):69-74.

145. Roussel M, Moreau P, Huynh A, Mary JY, Danho C, Caillot D, et al. Bortezomib and high-dose melphalan as conditioning regimen before autologous stem cell transplantation in patients with de novo multiple myeloma: a phase 2 study of the Intergroupe Francophone du Myelome (IFM). *Blood*. 2010;115(1):32-7.

146. Stadtmauer EA, Pasquini MC, Blackwell B, Hari P, Bashey A, Devine S, et al. Autologous Transplantation, Consolidation, and Maintenance Therapy in Multiple Myeloma: Results of the BMT CTN 0702 Trial. *J Clin Oncol*. 2019;37(7):589-97.

147. Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, Caillot D, Moreau P, Facon T, et al. Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2012;366(19):1782-91.

148. McCarthy PL, Owzar K, Hofmeister CC, Hurd DD, Hassoun H, Richardson PG, et al. Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2012;366(19):1770-81.
149. Goldschmidt H, Lokhorst HM, Mai EK, van der Holt B, Blau IW, Zweegman S, et al. Bortezomib before and after high-dose therapy in myeloma: long-term results from the phase III HOVON-65/GMMG-HD4 trial. *Leukemia*. 2018;32(2):383-90.
150. Dimopoulos MA, Gay F, Schjesvold F, Beksac M, Hajek R, Weisel KC, et al. Oral ixazomib maintenance following autologous stem cell transplantation (TOURMALINE-MM3): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2019;393(10168):253-64.
151. Durie BGM, Hoering A, Abidi MH, Rajkumar SV, Epstein J, Kahanic SP, et al. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2017;389(10068):519-27.
152. Mateos MV, Cavo M, Blade J, Dimopoulos MA, Suzuki K, Jakubowiak A, et al. Overall survival with daratumumab, bortezomib, melphalan, and prednisone in newly diagnosed multiple myeloma (ALCYONE): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2020;395(10218):132-41.
153. Facon T, Kumar S, Plesner T, Orłowski RZ, Moreau P, Bahlis N, et al. Daratumumab plus Lenalidomide and Dexamethasone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med*. 2019;380(22):2104-15.
154. Dimopoulos MA, Spicka I, Quach H, Oriol A, Hajek R, Garg M, et al. Ixazomib as Postinduction Maintenance for Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma Not Undergoing Autologous Stem Cell Transplantation: The Phase III TOURMALINE-MM4 Trial. *J Clin Oncol*. 2020;38(34):4030-41.
155. Cook G, Ashcroft AJ, Cairns DA, Williams CD, Brown JM, Cavenagh JD, et al. The effect of salvage autologous stem-cell transplantation on overall survival in patients with relapsed multiple myeloma (final results from BSBMT/UKMF Myeloma X Relapse [Intensive]): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2016;3(7):e340-51.

156. Siegel DS, Dimopoulos MA, Ludwig H, Facon T, Goldschmidt H, Jakubowiak A, et al. Improvement in Overall Survival With Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2018;36(8):728-34.
157. Dimopoulos MA, Lonial S, Betts KA, Chen C, Zichlin ML, Brun A, et al. Elotuzumab plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: Extended 4-year follow-up and analysis of relative progression-free survival from the randomized ELOQUENT-2 trial. *Cancer*. 2018;124(20):4032-43.
158. Dimopoulos M, Oriol A, Nahi H, San-Miguel J, Bahlis N, Usmani S, et al. P05: DARATUMUMAB PLUS LENALIDOMIDE AND DEXAMETHASONE VERSUS LENALIDOMIDE AND DEXAMETHASONE ALONE IN PATIENTS WITH PREVIOUSLY TREATED MULTIPLE MYELOMA: OVERALL SURVIVAL RESULTS FROM THE PHASE 3 POLLUX TRIAL. *HemaSphere*. 2022;6:13.
159. Richardson PG, Oriol A, Beksac M, Liberati AM, Galli M, Schjesvold F, et al. Pomalidomide, bortezomib, and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma previously treated with lenalidomide (OPTIMISMM): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(6):781-94.
160. Moreau P, Dimopoulos MA, Mikhael J, Yong K, Capra M, Facon T, et al. Isatuximab, carfilzomib, and dexamethasone in relapsed multiple myeloma (IKEMA): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2021;397(10292):2361-71.
161. Dimopoulos M, Quach H, Mateos MV, Landgren O, Leleu X, Siegel D, et al. Carfilzomib, dexamethasone, and daratumumab versus carfilzomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CANDOR): results from a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2020;396(10245):186-97.
162. Kumar SK, Harrison SJ, Cavo M, de la Rubia J, Popat R, Gasparetto C, et al. Venetoclax or placebo in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (BELLINI): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(12):1630-42.

163. Dimopoulos MA, Dytfeld D, Grosicki S, Moreau P, Takezako N, Hori M, et al. Elotuzumab plus Pomalidomide and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2018;379(19):1811-22.
164. Attal M, Richardson PG, Rajkumar SV, San-Miguel J, Beksac M, Spicka I, et al. Isatuximab plus pomalidomide and low-dose dexamethasone versus pomalidomide and low-dose dexamethasone in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (ICARIA-MM): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019;394(10214):2096-107.
165. Dimopoulos MA, Terpos E, Boccadoro M, Delimpasi S, Beksac M, Katodritou E, et al. Daratumumab plus pomalidomide and dexamethasone versus pomalidomide and dexamethasone alone in previously treated multiple myeloma (APOLLO): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021;22(6):801-12.
166. Inamura K. Major Tumor Suppressor and Oncogenic Non-Coding RNAs: Clinical Relevance in Lung Cancer. *Cells*. 2017;6(2).
167. Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(3):209-20.
168. Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Adv Exp Med Biol*. 2016;937:3-17.
169. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
170. Choudhuri S. Small noncoding RNAs: biogenesis, function, and emerging significance in toxicology. *J Biochem Mol Toxicol*. 2010;24(3):195-216.
171. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 2009;10(3):155-9.
172. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-9.
173. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.

174. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-62.
175. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.
176. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*. 2003;35(3):215-7.
177. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23(20):4051-60.
178. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(2):126-39.
179. Berezikov E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat Rev Genet*. 2011;12(12):846-60.
180. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014):231-5.
181. Nguyen TA, Jo MH, Choi YG, Park J, Kwon SC, Hohng S, et al. Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell*. 2015;161(6):1374-87.
182. Nicholson AW. Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2014;5(1):31-48.
183. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, et al. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science*. 2009;326(5957):1275-9.
184. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science*. 2001;293(5531):834-8.
185. Park JE, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, et al. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*. 2011;475(7355):201-5.
186. Lau PW, Guiley KZ, De N, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ. The molecular architecture of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(4):436-40.
187. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*. 2004;118(1):57-68.

188. Lee HY, Zhou K, Smith AM, Noland CL, Doudna JA. Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(13):6568-76.
189. Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA. Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Mol Cell.* 2015;57(3):397-407.
190. Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell.* 2005;123(4):621-9.
191. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(1):21-37.
192. John B, Sander C, Marks DS. Prediction of human microRNA targets. *Methods Mol Biol.* 2006;342:101-13.
193. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(2):215-33.
194. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(11):1231-43.
195. Lages E, Ipas H, Guttin A, Nesr H, Berger F, Issartel JP. MicroRNAs: molecular features and role in cancer. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012;17(7):2508-40.
196. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics.* 2015;16(7):421-33.
197. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell.* 2008;132(1):9-14.
198. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15524-9.
199. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(39):13944-9.
200. Calin GA, Croce CM. MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene.* 2006;25(46):6202-10.
201. Tagawa H, Seto M. A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia.* 2005;19(11):2013-6.

202. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 2005;65(21):9628-32.
203. Mavrakis KJ, Wolfe AL, Oricchio E, Palomero T, de Keersmaecker K, McJunkin K, et al. Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Cell Biol.* 2010;12(4):372-9.
204. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature.* 2005;435(7043):839-43.
205. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet.* 2008;40(1):43-50.
206. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, Blanco D, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(36):13556-61.
207. Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* 2005;96(2):111-5.
208. Walker SC, Engelke DR. Ribonuclease P: the evolution of an ancient RNA enzyme. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2006;41(2):77-102.
209. Rijal K, Maraia RJ, Arimbasseri AG. A methods review on use of nonsense suppression to study 3' end formation and other aspects of tRNA biogenesis. *Gene.* 2015;556(1):35-50.
210. Boccaletto P, Machnicka MA, Purta E, Piatkowski P, Baginski B, Wirecki TK, et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D303-D7.
211. Li H. Complexes of tRNA and maturation enzymes: shaping up for translation. *Curr Opin Struct Biol.* 2007;17(3):293-301.
212. Saikia M, Hatzoglou M. The Many Virtues of tRNA-derived Stress-induced RNAs (tiRNAs): Discovering Novel Mechanisms of Stress Response and Effect on Human Health. *J Biol Chem.* 2015;290(50):29761-8.
213. Lee SR, Collins K. Starvation-induced cleavage of the tRNA anticodon loop in *Tetrahymena thermophila*. *J Biol Chem.* 2005;280(52):42744-9.

214. Thompson DM, Lu C, Green PJ, Parker R. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *RNA*. 2008;14(10):2095-103.
215. Sun C, Fu Z, Wang S, Li J, Li Y, Zhang Y, et al. Roles of tRNA-derived fragments in human cancers. *Cancer Lett*. 2018;414:16-25.
216. Fu Y, Lee I, Lee YS, Bao X. Small Non-coding Transfer RNA-Derived RNA Fragments (tRFs): Their Biogenesis, Function and Implication in Human Diseases. *Genomics Inform*. 2015;13(4):94-101.
217. Kumar P, Kuscu C, Dutta A. Biogenesis and Function of Transfer RNA-Related Fragments (tRFs). *Trends Biochem Sci*. 2016;41(8):679-89.
218. Lee YS, Shibata Y, Malhotra A, Dutta A. A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev*. 2009;23(22):2639-49.
219. Haussecker D, Huang Y, Lau A, Parameswaran P, Fire AZ, Kay MA. Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA*. 2010;16(4):673-95.
220. Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev*. 2008;22(20):2773-85.
221. Yeung ML, Bennasser Y, Watashi K, Le SY, Houzet L, Jeang KT. Pyrosequencing of small non-coding RNAs in HIV-1 infected cells: evidence for the processing of a viral-cellular double-stranded RNA hybrid. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(19):6575-86.
222. Li S, Hu GF. Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. *J Cell Physiol*. 2012;227(7):2822-6.
223. Elbarbary RA, Takaku H, Uchiumi N, Tamiya H, Abe M, Nishida H, et al. Human cytosolic tRNase ZL can downregulate gene expression through miRNA. *FEBS Lett*. 2009;583(19):3241-6.
224. Martinez G, Choudury SG, Slotkin RK. tRNA-derived small RNAs target transposable element transcripts. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(9):5142-52.
225. Ivanov P, Emara MM, Villen J, Gygi SP, Anderson P. Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol Cell*. 2011;43(4):613-23.
226. Gebetsberger J, Zywicki M, Kunzi A, Polacek N. tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii*. *Archaea*. 2012;2012:260909.

227. Kim HK, Fuchs G, Wang S, Wei W, Zhang Y, Park H, et al. A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis. *Nature*. 2017;552(7683):57-62.
228. Saikia M, Jobava R, Parisien M, Putnam A, Krokowski D, Gao XH, et al. Angiogenin-cleaved tRNA halves interact with cytochrome c, protecting cells from apoptosis during osmotic stress. *Mol Cell Biol*. 2014;34(13):2450-63.
229. Tello-Montoliu A, Patel JV, Lip GY. Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *J Thromb Haemost*. 2006;4(9):1864-74.
230. Goodarzi H, Nguyen HCB, Zhang S, Dill BD, Molina H, Tavazoie SF. Modulated Expression of Specific tRNAs Drives Gene Expression and Cancer Progression. *Cell*. 2016;165(6):1416-27.
231. Martens-Uzunova ES, Olvedy M, Jenster G. Beyond microRNA--novel RNAs derived from small non-coding RNA and their implication in cancer. *Cancer Lett*. 2013;340(2):201-11.
232. Guzman N, Agarwal K, Asthagiri D, Yu L, Saji M, Ringel MD, et al. Breast Cancer-Specific miR Signature Unique to Extracellular Vesicles Includes "microRNA-like" tRNA Fragments. *Mol Cancer Res*. 2015;13(5):891-901.
233. Goodarzi H, Liu X, Nguyen HC, Zhang S, Fish L, Tavazoie SF. Endogenous tRNA-Derived Fragments Suppress Breast Cancer Progression via YBX1 Displacement. *Cell*. 2015;161(4):790-802.
234. Huang B, Yang H, Cheng X, Wang D, Fu S, Shen W, et al. tRF/miR-1280 Suppresses Stem Cell-like Cells and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancer Res*. 2017;77(12):3194-206.
235. Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, Leleu X, Azab AK, Azab F, et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood*. 2009;113(26):6669-80.
236. Pitari MR, Rossi M, Amodio N, Botta C, Morelli E, Federico C, et al. Inhibition of miR-21 restores RANKL/OPG ratio in multiple myeloma-derived bone marrow stromal cells and impairs the resorbing activity of mature osteoclasts. *Oncotarget*. 2015;6(29):27343-58.
237. Fan FY, Deng R, Qiu L, Wen Q, Zeng Y, Gao L, et al. miR-203a-3p.1 is involved in the regulation of osteogenic differentiation by directly targeting Smad9 in MM-MSCs. *Oncol Lett*. 2019;18(6):6339-46.

238. Xu C, Fu Y. Expression Profiles of tRNA-Derived Fragments and Their Potential Roles in Multiple Myeloma. *Onco Targets Ther.* 2021;14:2805-14.
239. Xu C, Liang T, Zhang F, Liu J, Fu Y. tRNA-derived fragments as novel potential biomarkers for relapsed/refractory multiple myeloma. *BMC Bioinformatics.* 2021;22(1):238.
240. Pliatsika V, Loher P, Magee R, Telonis AG, Londin E, Shigematsu M, et al. MINTbase v2.0: a comprehensive database for tRNA-derived fragments that includes nuclear and mitochondrial fragments from all The Cancer Genome Atlas projects. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D152-D9.
241. Hillengass J, Usmani S, Rajkumar SV, Durie BGM, Mateos MV, Lonial S, et al. International myeloma working group consensus recommendations on imaging in monoclonal plasma cell disorders. *Lancet Oncol.* 2019;20(6):e302-e12.
242. Ridley RC, Xiao H, Hata H, Woodliff J, Epstein J, Sanderson RD. Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. *Blood.* 1993;81(3):767-74.
243. Kawano Y, Fujiwara S, Wada N, Izaki M, Yuki H, Okuno Y, et al. Multiple myeloma cells expressing low levels of CD138 have an immature phenotype and reduced sensitivity to lenalidomide. *Int J Oncol.* 2012;41(3):876-84.
244. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
245. Zollner H, Hahn SA, Maghnouj A. Quantitative RT-PCR specific for precursor and mature miRNAs. *Methods Mol Biol.* 2014;1095:121-34.
246. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001;25(4):386-401.
247. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.
248. Friedlander MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(1):37-52.

249. Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL. X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization. *Clin Cancer Res.* 2004;10(21):7252-9.
250. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric observation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53:457-81.
251. Terpos E, Kanellias N, Kastritis E, Gavriatopoulou M, Koutoulidis V, Ntanasis-Stathopoulos I, et al. Natural History of Skeletal Related Events in Patients with Multiple Myeloma Who Received First- and Second- Line Therapy with Novel Agents: Results from a Single Center Analysis in 620 Patients. *Blood.* 2019;134(Supplement_1):4326-.
252. Lerner M, Harada M, Loven J, Castro J, Davis Z, Oscier D, et al. DLEU2, frequently deleted in malignancy, functions as a critical host gene of the cell cycle inhibitory microRNAs miR-15a and miR-16-1. *Exp Cell Res.* 2009;315(17):2941-52.
253. Binder M, Rajkumar SV, Ketterling RP, Greipp PT, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Prognostic implications of abnormalities of chromosome 13 and the presence of multiple cytogenetic high-risk abnormalities in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2017;7(9):e600.
254. Li F, Xu Y, Deng S, Li Z, Zou D, Yi S, et al. MicroRNA-15a/16-1 cluster located at chromosome 13q14 is down-regulated but displays different expression pattern and prognostic significance in multiple myeloma. *Oncotarget.* 2015;6(35):38270-82.
255. Gao X, Zhang R, Qu X, Zhao M, Zhang S, Wu H, et al. MiR-15a, miR-16-1 and miR-17-92 cluster expression are linked to poor prognosis in multiple myeloma. *Leuk Res.* 2012;36(12):1505-9.
256. Wang W, Corrigan-Cummins M, Barber EA, Saleh LM, Zingone A, Ghafoor A, et al. Aberrant Levels of miRNAs in Bone Marrow Microenvironment and Peripheral Blood of Myeloma Patients and Disease Progression. *J Mol Diagn.* 2015;17(6):669-78.
257. Sun CY, She XM, Qin Y, Chu ZB, Chen L, Ai LS, et al. miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF. *Carcinogenesis.* 2013;34(2):426-35.
258. Krzeminski P, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, Corral R, Corchete LA, Martin AA, et al. Insights into epigenetic regulation of microRNA-155 expression in multiple myeloma. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1849(3):353-66.

259. Gutierrez NC, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, Delgado M, De Las Rivas J, Ticona FV, et al. Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia*. 2010;24(3):629-37.
260. Amodio N, Gallo Cantafio ME, Botta C, Agosti V, Federico C, Caracciolo D, et al. Replacement of miR-155 Elicits Tumor Suppressive Activity and Antagonizes Bortezomib Resistance in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2).
261. Katsaraki K, Adamopoulos PG, Papageorgiou SG, Pappa V, Scorilas A, Kontos CK. A 3' tRNA-derived fragment produced by tRNA(LeuAAG) and tRNA(LeuTAG) is associated with poor prognosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia, independently of classical prognostic factors. *Eur J Haematol*. 2021;106(6):821-30.
262. Misso G, Zarone MR, Lombardi A, Grimaldi A, Cossu AM, Ferri C, et al. miR-125b Upregulates miR-34a and Sequentially Activates Stress Adaption and Cell Death Mechanisms in Multiple Myeloma. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;16:391-406.
263. Di Martino MT, Gulla A, Cantafio ME, Lionetti M, Leone E, Amodio N, et al. In vitro and in vivo anti-tumor activity of miR-221/222 inhibitors in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2013;4(2):242-55.
264. Zhang WL, Chi CT, Meng XH, Liang SD. miRNA15a5p facilitates the bone marrow stem cell apoptosis of femoral head necrosis through the Wnt/betacatenin/PPARgamma signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2019;19(6):4779-87.
265. Duan L, Zhao H, Xiong Y, Tang X, Yang Y, Hu Z, et al. miR-16-2* Interferes with WNT5A to Regulate Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(3):1087-102.
266. Yu T, You X, Zhou H, He W, Li Z, Li B, et al. MiR-16-5p regulates postmenopausal osteoporosis by directly targeting VEGFA. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(10):9500-14.
267. Wang G, Zhang L, Yan C, Wang F, Zhang Y. Overexpression of miR125b Promotes Osteoporosis Through miR-125b-TRAF6 Pathway in Postmenopausal Ovariectomized Rats. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021;14:671-82.
268. Karousi P, Adamopoulos PG, Papageorgiou SG, Pappa V, Scorilas A, Kontos CK. A novel, mitochondrial, internal tRNA-derived RNA fragment possesses clinical utility as a molecular prognostic biomarker in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Biochem*. 2020;85:20-6.

269. Kumar S, Kimlinger T, Morice W. Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(3):433-51.
270. Reid S, Yang S, Brown R, Kabani K, Aklilu E, Ho PJ, et al. Characterisation and relevance of CD138-negative plasma cells in plasma cell myeloma. *Int J Lab Hematol*. 2010;32(6 Pt 1):e190-6.
271. Harada H, Kawano MM, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood*. 1993;81(10):2658-63.
272. Paiva B, Almeida J, Perez-Andres M, Mateo G, Lopez A, Rasillo A, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78(4):239-52.
273. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdickova L, Brooimans RA, Bumbea H, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008;93(3):431-8.
274. Beasley AB, Acheampong E, Lin W, Gray ES. Multi-Marker Immunomagnetic Enrichment of Circulating Melanoma Cells. *Methods Mol Biol*. 2021;2265:213-22.
275. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-75.
276. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 2004;303(5654):83-6.
277. Emming S, Chirichella M, Monticelli S. MicroRNAs as modulators of T cell functions in cancer. *Cancer Lett*. 2018;430:172-8.
278. Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(35):12885-90.
279. Li Y, Li D, Yan Z, Qi K, Chen L, Zhang Z, et al. Potential relationship and clinical significance of miRNAs and Th17 cytokines in patients with multiple myeloma. *Leuk Res*. 2014;38(9):1130-5.

280. Peng J, Thakur A, Zhang S, Dong Y, Wang X, Yuan R, et al. Expressions of miR-181a and miR-20a in RPMI8226 cell line and their potential as biomarkers for multiple myeloma. *Tumour Biol.* 2015;36(11):8545-52.
281. Liu N, Yang J, Yuan R, Peng J, Liu L, Guo X. Effects of miR181a on the biological function of multiple myeloma. *Oncol Rep.* 2019;42(1):291-300.
282. Shen X, Bai H, Zhu H, Yan Q, Yang Y, Yu W, et al. Long Non-Coding RNA MEG3 Functions as a Competing Endogenous RNA to Regulate HOXA11 Expression by Sponging miR-181a in Multiple Myeloma. *Cell Physiol Biochem.* 2018;49(1):87-100.
283. Panoutsopoulou K, Avgeris M, Magkou P, Mavridis K, Dreyer T, Dorn J, et al. miR-181a overexpression predicts the poor treatment response and early-progression of serous ovarian cancer patients. *Int J Cancer.* 2020;147(12):3560-73.
284. Taylor MA, Sossey-Alaoui K, Thompson CL, Danielpour D, Schiemann WP. TGF-beta upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis. *J Clin Invest.* 2013;123(1):150-63.
285. Nishimura J, Handa R, Yamamoto H, Tanaka F, Shibata K, Mimori K, et al. microRNA-181a is associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2012;28(6):2221-6.
286. Lyu X, Li J, Yun X, Huang R, Deng X, Wang Y, et al. miR-181a-5p, an inducer of Wnt-signaling, facilitates cell proliferation in acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep.* 2017;37(3):1469-76.
287. Liu X, Liao W, Peng H, Luo X, Luo Z, Jiang H, et al. miR-181a promotes G1/S transition and cell proliferation in pediatric acute myeloid leukemia by targeting ATM. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016;142(1):77-87.
288. Haque S, Vaiselbuh SR. Silencing of Exosomal miR-181a Reverses Pediatric Acute Lymphocytic Leukemia Cell Proliferation. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13(9).
289. Giri S, Huntington SF, Wang R, Zeidan AM, Podoltsev N, Gore SD, et al. Chromosome 1 abnormalities and survival of patients with multiple myeloma in the era of novel agents. *Blood Adv.* 2020;4(10):2245-53.
290. Abdallah N, Greipp P, Kapoor P, Gertz MA, Dispenzieri A, Baughn LB, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of newly diagnosed multiple myeloma with chromosome 1q abnormalities. *Blood Adv.* 2020;4(15):3509-19.

291. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells*. 2020;9(2).
292. Papanota AM, Karousi P, Kontos CK, Ntanasis-Stathopoulos I, Scorilas A, Terpos E. Multiple Myeloma Bone Disease: Implication of MicroRNAs in Its Molecular Background. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5).
293. Wang X, Guo B, Li Q, Peng J, Yang Z, Wang A, et al. miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat Med*. 2013;19(1):93-100.
294. Shi K, Lu J, Zhao Y, Wang L, Li J, Qi B, et al. MicroRNA-214 suppresses osteogenic differentiation of C2C12 myoblast cells by targeting Osterix. *Bone*. 2013;55(2):487-94.
295. Yang L, Ge D, Cao X, Ge Y, Chen H, Wang W, et al. MiR-214 Attenuates Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells via Targeting FGFR1. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(2):809-20.
296. Zhao C, Sun W, Zhang P, Ling S, Li Y, Zhao D, et al. miR-214 promotes osteoclastogenesis by targeting Pten/PI3k/Akt pathway. *RNA Biol*. 2015;12(3):343-53.
297. Hao M, Zang M, Zhao L, Deng S, Xu Y, Qi F, et al. Serum high expression of miR-214 and miR-135b as novel predictor for myeloma bone disease development and prognosis. *Oncotarget*. 2016;7(15):19589-600.
298. Zhao H, Yan P, Wang J, Zhang Y, Zhang M, Wang Z, et al. Clinical significance of tumor miR-21, miR-221, miR-143, and miR-106a as biomarkers in patients with osteosarcoma. *Int J Biol Markers*. 2019;34(2):184-93.
299. Li E, Zhang J, Yuan T, Ma B. MiR-143 suppresses osteogenic differentiation by targeting Osterix. *Mol Cell Biochem*. 2014;390(1-2):69-74.
300. Wang R, Zhang H, Ding W, Fan Z, Ji B, Ding C, et al. miR-143 promotes angiogenesis and osteoblast differentiation by targeting HDAC7. *Cell Death Dis*. 2020;11(3):179.
301. He X, Zhu L, An L, Zhang J. MiR-143 Inhibits Osteoclastogenesis by Targeting RANK and NF-kappaB and MAPK Signaling Pathways. *Curr Mol Pharmacol*. 2020;13(3):224-32.
302. Ma W, Dou Q, Ha X. Let-7a-5p inhibits BMSCs osteogenesis in postmenopausal osteoporosis mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;510(1):53-8.

303. Papatsirou M, Artemaki PI, Karousi P, Scorilas A, Kontos CK. Circular RNAs: Emerging Regulators of the Major Signaling Pathways Involved in Cancer Progression. *Cancers (Basel)*. 2021;13(11).
304. Zhang J, Tu Q, Bonewald LF, He X, Stein G, Lian J, et al. Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically downregulating Wnt antagonist DKK1. *J Bone Miner Res*. 2011;26(8):1953-63.
305. Kocijan R, Muschitz C, Geiger E, Skalicky S, Baierl A, Dormann R, et al. Circulating microRNA Signatures in Patients With Idiopathic and Postmenopausal Osteoporosis and Fragility Fractures. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(11):4125-34.
306. Zarecki P, Hackl M, Grillari J, Debono M, Eastell R. Serum microRNAs as novel biomarkers for osteoporotic vertebral fractures. *Bone*. 2020;130:115105.
307. Fang T, Wu Q, Zhou L, Mu S, Fu Q. miR-106b-5p and miR-17-5p suppress osteogenic differentiation by targeting Smad5 and inhibit bone formation. *Exp Cell Res*. 2016;347(1):74-82.
308. Li H, Li T, Wang S, Wei J, Fan J, Li J, et al. miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res*. 2013;10(3):313-24.
309. Wu M, Chen G, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res*. 2016;4:16009.
310. Wang R, Lu A, Liu W, Yue J, Sun Q, Chen J, et al. Searching for valuable differentially expressed miRNAs in postmenopausal osteoporosis by RNA sequencing. *J Obstet Gynaecol Res*. 2020;46(7):1183-92.
311. Xu H, Liu C, Zhang Y, Guo X, Liu Z, Luo Z, et al. Let-7b-5p regulates proliferation and apoptosis in multiple myeloma by targeting IGF1R. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014;46(11):965-72.
312. Manier S, Powers JT, Sacco A, Glavey SV, Huynh D, Reagan MR, et al. The LIN28B/let-7 axis is a novel therapeutic pathway in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017;31(4):853-60.
313. Manier S, Liu CJ, Avet-Loiseau H, Park J, Shi J, Campigotto F, et al. Prognostic role of circulating exosomal miRNAs in multiple myeloma. *Blood*. 2017;129(17):2429-36.

314. Qi J, Shi LY, Wu Y, Shen XJ, Yuan J, Jin CJ, et al. Epigenetic silencing of miR-335 induces migration by targeting insulin-like growth factor-1 receptor in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(13):3188-98.