



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА**

**ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
ВТОРА КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ
УС ПО ХЕМАТОЛОГИЯ**

Д-р Владимир Тодоров Геров

БИОМАРКЕРИ ЗА ОЦЕНКА НА КОСТНАТА БОЛЕСТ ПРИ МУЛТИПЛЕН МИЕЛОМ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на научна и образователна степен „Доктор“

Докторска програма „Хематология и преливане на кръв“

Научен ръководител:

Проф. д-р Илина Димитрова Мичева, д.м.

Варна, 2024 г.

Дисертационният труд съдържа общо 184 страници и е онагледен с 50 таблици и 52 фигури. Библиографията съдържа 424 литературни източника, от тях 1 на кирилица и 421 на латиница и 2 интернет сайта.

Дисертационният труд е обсъден на открито заседание на Катедрен съвет на Втора катедра по вътрешни болести при МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна (протокол на № 3/12.03.2024 г.). Приет е и насочен за защита пред **Научно жури** в състав:

Външни членове:

1. Проф. Веселина Горанова, МУ Пловдив
2. Проф. Красимира Икономова, София
3. Доц. Ваня Славчева, МУ Плевен

Вътрешни членове:

4. Проф. Валерия Калева, МУ Варна
5. Доц. Елеонора Димитрова, МУ Варна

Резервни членове:

1. Доц. Антонио Антонов (външен член)
2. Доц. Трифон Червенков (вътрешен член)

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 10.06.2024 г. в УМБАЛ „Света Марина“ Варна.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на МУ Варна и са публикувани на интернет страницата на МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна

Забележка: В автореферата номерата на таблиците и фигурите съответстват на тези в дисертационния труд (не са представени единствено таблиците и фигурите от литературния обзор).

„Животът е дълъг, ако е пълен... Нека го измерваме с постъпки, а не с време“

*Луций Аней
Сенека*

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	Въведение	6
II.	Цел и задачи	8
III.	Материали и методи	9
IV.	Резултати	18
	1. Демографски и клинико-лабораторни характеристики на изследваните лица	18
	2. Dickopf-1 (Dkk-1)	22
	3. Склеростин	33
	4. sRANKL	44
	5. Остеопонтин	55
	6. Периостин	65
	7. Диагностична надеждност и прогностична стойност на Dkk-1, склеростин, sRANKL, остеопонтин и периостин като маркери за оценка на миеломната костна болест	75
V.	Дискусия на резултатите	81
	1. Маркери за нарушена остеобластна активност – Dkk-1 и склеростин	81
	2. Маркери за нарушена остеокластна активност и променено костномозъчно микрообкръжение – sRANKL, остеопонтин и периостин	95
	3. Диагностична надеждност на изследваните костни биомаркери ...	108
VI.	Изводи	112
VII.	Приноси	113
VIII.	Научни публикации, свързани с дисертационния труд	114
IX.	Участия в научни форуми, свързани с дисертационния труд	114
X.	Благодарности	115

СЪКРАЩЕНИЯ

ASCT	автоложна стволово-клетъчна терапия (autologous stem cell transplantation)
bALP	костна алкална фосфатаза (bone alkaline phosphatase)
β2MG	бета-2 микроглобулин (beta-2 Microglobulin)
BMI	инфилтрация на костен мозък (bone marrow infiltration)
BMP	костен морфогенен протеин (bone morphogenetic protein)
BMSCs	костно-мозъчни мезенхимни стромални клетки (bone marrow mesenchymal stromal cells)
CR	пълнен отговор (complete response)
Dkk-1	Dickkopf-1
ECM	екстрацелуларен матрикс (extracellular matrix)
FDG-PET/CT	флуородеоксиглюкоза позитронно емисионната томография / компютърна томография (fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography)
ISS	Международна стадираща система (International staging system for multiple myeloma)
LRP	белтък, свързан с рецептора за LDL (low-density lipoprotein receptor-related protein)
MBD	миелом-индуцирана костна болест (myeloma-induced bone disease)
MGUS	моноклонална гамапатия с неопределено значение (monoclonal gammopathy of undetermined significance)
MM	множествен миелом (multiple myeloma)
MMP	матриксни металопроотеази (matrix metalloproteases)
MPCs	миеломни плазматични клетки (myeloma plasma cells)
MRI	магнитно-резонансна томография (magnetic resonance imaging)
NDMM	новодиагностицирани пациенти с MM (newly diagnosed MM patients)
NF-kB	ядрен фактор капа В (nuclear factor kB)
NTX	N-terminal cross-linking telopeptide of type 1 collagen
OBs	остеобласти (osteoblasts)
OCs	остеокласти (osteoclasts)
OPG	остеопротегерин (osteoprotegerin)
OPN	остеопонтин (osteopontin)
PON	периостин (periostin)
PR	парциален отговор (partial response)
PTH	паращитовиден хормон (parathyroid hormone)
RANK	рецептор-активатор на ядрения фактор капа В (receptor activator of NF-kB)
RANKL	лиганд за RANK
mRANKL	мембранен RANKL
sRANKL	разтворим (soluble) RANKL
Scl	склеростин (sclerostin)
SCID	тежък комбиниран имунодефицит (severe combined immunodeficiency)
SD	стабилно заболяване (stable disease)
SMM	„тлеещ“ (асимптомнен) мултиплен миелом (smoldering multiple myeloma)
TNF	тумор некротизиращ фактор (tumor necrosis factor)
VGPR	много добър парциален отговор (very good partial response)
WBLDCT	целотелесна нискодозова компютърна томография (whole-body low-dose computed tomography)

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Мултипленият миелом (ММ) е едно от най-разпространените хематологични злокачествени заболявания, чиято честота непрекъснато нараства в последните десетилетия, както в световен мащаб, така и в България. Причините за регистрираната тенденция към нарастване честотата на ММ не са напълно изяснени. Вероятно е те да са свързани от една страна с подобрената диагностика на заболяването, а от друга – с увеличеното разпространение на рискови фактори, най-важен от които е възрастта. Характерното за ММ натрупване на мутации вероятно изисква десетилетия, което, при липса на други предразполагащи рискови фактори, прави заболяването клинично изявено основно сред по-възрастните хора. Като се вземе предвид факта, че застаряването на населението се очертава като обща тенденция за целия свят, то заболяемостта от ММ ще продължава да нараства в бъдеще.

Миелом-индуцираната костна болест (МБД) е една от най-съществените клинични прояви на ММ. Въпреки че са разработени и се използват нови медикаменти и терапевтични протоколи, които значително удължават преживяемостта на пациентите, МБД все още остава основна причина за тежката заболяемост и повишена смъртност при ММ пациентите. Приблизително при 80% от новодиагностицираните пациенти с ММ се установява поне една или повече остеолитични костни лезии, често придружени с компресионни фрактури. При 25% от останалите пациенти, костни нарушения ще се появят в хода на развитието на болестта. Прогресията на заболяването се придружава със задълбочаване на МБД, проявяващо се с мъчителни костни болки, патологични фрактури, колапс на прешлените и компресия на гръбначния мозък, както и симптоматична хиперкалциемия. Всички те влошават качеството на живот на ММ пациентите и влияят отрицателно на общата преживяемост. Изясняването на патофизиологията и патогенезата на МБД предоставя възможности за проучване и внедряване в клиничната практика на нови биомаркери, с чиято помощ би могло ефективно да се мониторира развитието и прогресията на костната болест, като една от най-тежките прояви на ММ. Освен това с помощта на костните биомаркери би могло да се проследява ефекта от прилаганата терапия – дали тя подобрява и възстановява тежко нарушения баланс между остеокластогенезата и остеобластогенезата. Изучаването на специфичните сигнални пътища, участващи в костната дисрегулация при ММ, спомага за разработване на нови медикаменти, насочени към възстановяване баланса между двата основни процеса, осъществяващи костното ремоделиране. Това би могло да блокира прогресията или дори да обърне хода на МБД.

В рутинната клинична практика се използват разнообразни биомаркери, оценяващи туморния товар или служещи за стратификация на риска на пациентите с ММ, но липсват такива, които да дават представа за степента на костното засягане. Към настоящия момент златен стандарт за оценка на MBD си остават образните изследвания. Въвеждането на серумни биомаркери за мониториране на костния метаболизъм представлява истинско предизвикателство, но като по-динамично променящи се показатели те биха могли да предоставят важна допълнителна информация към образните изследвания, за които се счита, че значително по-бавно отразяват метаболитните промени в костта.

Всичко това налага необходимостта от търсене на подходящи биомаркери, с които ефективно да се мониторира MBD. В дългосрочен план това е предпоставка за разработване на нови биологични агенти за таргетна терапия и адекватно лечение на костната болест, което би подобрило качеството на живот на пациентите с ММ и би удължило тяхната преживяемост.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел:

Да се оцени ролята на костните биомаркери склеростин, Dkk-1, sRANKL, остеопонтин и периостин за развитие на костната болест при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом и проследи тяхната динамика в хода на провежданото лечение.

Задачи:

1. Да се определят серумните нива на склеростин, Dkk-1, sRANKL, остеопонтин и периостин при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом преди започване на лечението.
2. Да се анализират серумните нива на склеростин, Dkk-1, sRANKL, остеопонтин и периостин при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом в зависимост от стадия на заболяването, определен според ISS.
3. Да се анализират серумните нива на склеростин, Dkk-1, sRANKL, остеопонтин и периостин при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом в зависимост от тежестта на миеломната костна болест.
4. Да се анализират серумните нива на склеростин, Dkk-1, sRANKL, остеопонтин и периостин при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом в зависимост от плазмоклетъчната костномозъчна инфилтрация.
5. Да се изследват взаимовръзките между серумните нива на склеростин, Dkk-1, sRANKL, остеопонтин и периостин с рутинни хематологични, морфологични и биохимични показатели.
6. Да се определят серумните нива на склеростин, Dkk-1, sRANKL, остеопонтин и периостин при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом в хода на тяхното лечение.
7. Да се анализират серумните нива на склеростин, Dkk-1, sRANKL, остеопонтин и периостин в зависимост от постигнатия отговор към терапията и да се оцени предиктивната им роля като независими маркери за отговор и изход от лечението.
8. Да се изясни диагностичната надеждност на склеростин, Dkk-1, RANKL, остеопонтин и периостин като маркери за оценка на миеломната костна болест и да се оцени индивидуалното им значение за прогресията на миеломната костна болест.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Изследвани лица

Извършеното научно проучване е едноцентрово и проспективно, проведено в Клиниката по Хематология, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна за периода 01.06.2021 – 31.12.2022 година. Изследвани са общо 74 лица – 41 новодиагностицирани пациента с множествен миелом и 33 здрави лица, формиращи контролната група.

В съответствие с изискванията на Комисията по етика на научните изследвания (КЕНИ) към МУ – Варна, всички участници, след подробно разясняване на целите и задачите на проучването, са получили и подписали напълно доброволно информирано съгласие за участие в проучването. Личните данни на изследваните лица, както и резултатите от изследванията им са получавани, обработвани и съхранявани съгласно изискванията на КЕНИ и Закона за защита на личните данни и Кодекса на професионалната етика.

1.1. Подбор на пациентите

Пациентите са подбрани според критериите за включване и изключване в проучването.

1.1.1. Включващи критерии:

- Възраст над 18 години
- Новодиагностицирани пациенти с потвърдена диагноза ММ, поставена според критериите на международната работна група по миелом (International Myeloma Working Group, IMWG) [277]
- Наличие на поне един от CRAB (HyperCalcemia, Renal insufficiency, Anemia, Bone lesions) критериите за започване на лечение
- Подписано информирано съгласие

1.1.2. Изключващи критерии:

- Възраст над 80 години
- Пациенти с установени други злокачествени заболявания
- Пациенти с автоимунни заболявания
- Пациенти с остри системни или локални инфекции
- Пациенти с трудно контролирани неврологични и психически заболявания
- Прием на стероидни медикаменти през предходните 6 месеца
- Прием на бифосфонати и денозумаб през предходните 6 месеца

1.2. Подбор на контролната група

Контролната група включва 33 клинично здрави индивиди, сходни по демографски характеристики с пациентите и подбрани според критериите за включване и изключване в проучването.

1.2.1. Включващи критерии:

- Възраст над 18 години
- Подписали информирано съгласие

1.2.2. Изключващи критерии:

- Възраст над 80 години
- Лица с установени злокачествени заболявания
- Лица с автоимунни заболявания
- Лица с остри системни или локални инфекции
- Лица с трудно контролирани неврологични и психически заболявания
- Прием на стероидни медикаменти през предходните 6 месеца
- Прием на бифосфонати и денозумаб през предходните 6 месеца

Набирането и подборът на контролните индивиди започва още със стартирането на проучването и приключва най-късно до средата на проучвателния период. От тях е взета еднократно венозна кръв за определяне на серумните нива на склеростин, Dkk-1, sRANKL, остеопонтин и периостин.

2. Дизайн на научното проучване

Обект на изследването са новодиагностицирани пациенти с множествен миелом, отговарящи на всички включващи и изключващи критерии. Дизайнът на проучването включва следните етапи T0 (преди започване на лечението), T1 (след проведени 4 курса химиотерапия), T2 (след проведени допълнителни 4 курса химиотерапия) и TA (три месеца след проведена ASCT).

2.1. Етап T0

На всички пациенти при диагнозата и преди започване на лечението са взети венозна кръв и урина за изследване на рутинни лабораторни параметри (ПМК, ДМК, биохимични показатели), серумен парапротеин, леки вериги на имуноглобулини в серум и урина, както и за определяне на базисни серумни нива на склеростин, Dkk-1, sRANKL, остеопонтин и периостин (T0). Осъществена е костно-мозъчна пункция. Костно-мозъчният аспират е използван за морфологична оценка на костния мозък, за установяване процента на плазмоклетъчна инфилтрация, както и за флоуцитометрично установяване на клоналност. Въз основа на резултатите от базисното изследване, пациентите са стадирани според критериите на Международната стадираща система

(International Staging System, ISS) и разпределени в три групи – ISS-1, ISS-2 и ISS-3. Оценката за налична или отсъстваща костна болест е извършена посредством целотелесна нискодозна компютърна томография (Whole-Body Low-Dose Computed Tomography, WBLDCT) и пациентите са стратифицирани в две групи: група G1 – с липсващи и до 3 остеолитични лезии и група G2 – с над 3 остеолитични лезии и/или наличие на патологична/и фрактура/и. След поставяне на диагнозата, всички пациенти започват лечение по протокол VCD: Bortezomib (Velcade) – 1.3 mg/m² D1, D4, D8, D11; Cyclophosphamide – 400 mg/m² D1, D8, D15; Dexamethasone – 40 mg D1-D4, D8-D11 (при пациенти над 75 години – 20 mg D1, D8, D15, D22). Цикълът се повтаря през 28 дни. Всички пациенти получават бифосфонат (Zoledronic acid) еднократно месечно, съобразен със серумния креатинин. При пациенти със стойности на серумния креатинин >265 µmol/L, бифосфонат не е прилаган.

2.2. Етап T1

След приключване на първите четири цикъла химиотерапия, се оценява ефекта от проведеното лечение според унифицираните критерии на IMWG за оценка на отговор. Вzeti са венозна кръв и урина за изследване на рутинни лабораторни параметри (ПКК, ДКК, биохимични показатели), серумен парапротеин, леки вериги на имуноглобулини в серум и урина, както и за определяне на серумни нива на склеростин, Dkk-1, sRANKL, остеопонтин и периостин (T1). Осъществена е аспирация на костен мозък за морфологична оценка и установяване процента на плазмоклетъчна инфилтрация. Отговорът към терапията е оценен като – пълен отговор (CR), много добър парциален отговор (VGPR), парциален отговор (PR) и в стабилно заболяване (SD). Пациентите с установена прогресия на заболяването отпадат от проучването. На този етап пациентите се разделят на две рамена: тези под 65 години и постигнали CR и VGPR се насочват за провеждане на автоложна стволово-клетъчна терапия (ASCT), а всички останали продължават лечението си с допълнителни 4 курса химиотерапия по протокол VCD.

2.3. Етап T2

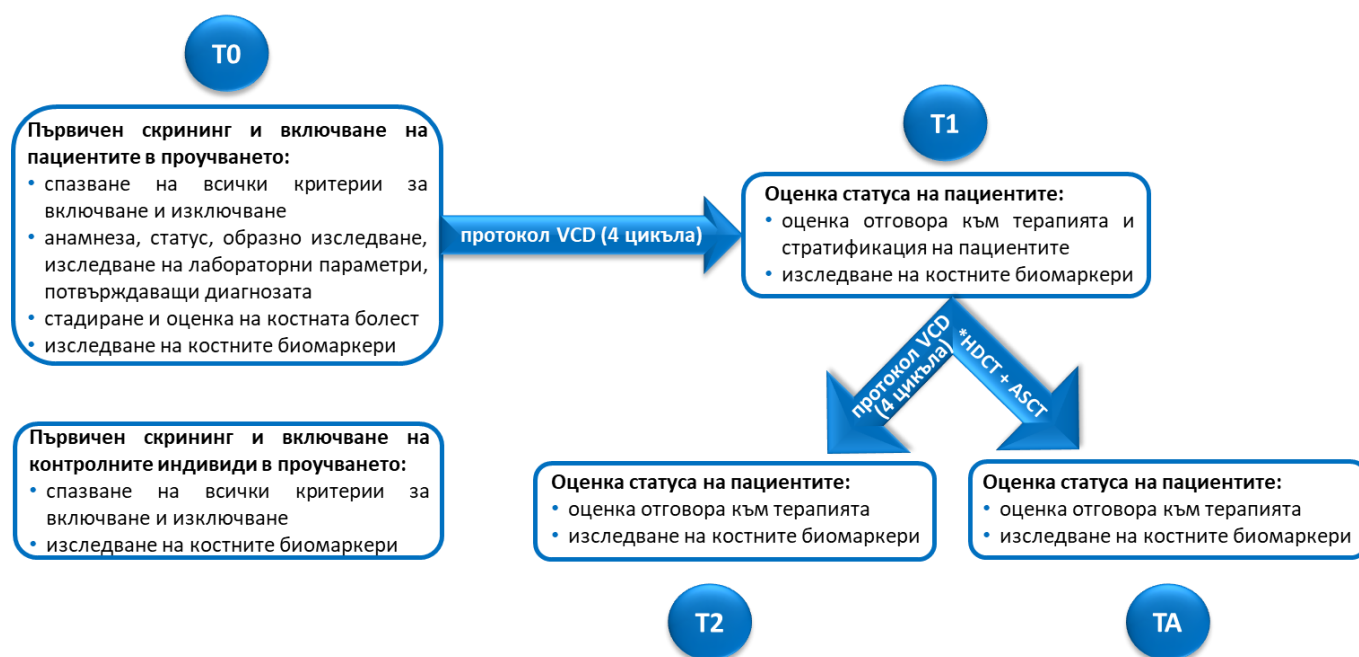
Крайната точка за проследяване на пациентите, неподлежащи за ASCT, е след приключване на вторите четири цикъла (общо 8 цикъла) химиотерапия. Вzeti са венозна кръв и урина за изследване на рутинни лабораторни параметри (ПКК, ДКК, биохимични показатели), серумен парапротеин, леки вериги на имуноглобулини в серум и урина, както и за определяне на серумни нива на склеростин, Dkk-1, sRANKL, остеопонтин и периостин (T2). Осъществена е аспирация на костен мозък за морфологична оценка и установяване процента на

плазмоклетъчна инфилтрация. Пациентите отново се стратифицират според постигнатия отговор [194].

2.4. Етап ТА

Крайната точка за проследяване на пациентите, подлежащи за трансплантация, е три месеца след провеждане на високодозова химиотерапия и последваща ASCT. Вzeti са венозна кръв и урина за изследване на рутинни лабораторни параметри (ПКК, ДКК, биохимични показатели), серумен парапротеин, леки вериги на имуноглобулини в серум и урина, както и за определяне на серумни нива на склеростин, Dkk-1, sRANKL, остеопонтин и периостин (ТА). Осъществена е костно-мозъчна пункция. Костно-мозъчният аспират е използван за морфологична оценка на костния мозък и за установяване процента на плазматична инфилтрация. Пациентите отново се стратифицират според постигнатия отговор [194].

Дизайнът на проучването е представен схематично на фигура 5.



Фигура 5. Дизайн на проучването.

(*HDCT + ASCT – високодозова химиотерапия, последвана от автоложна стволово-клетъчна трансплантация)

3. Клиничен преглед

Всички изследвани лица са подложени на обстоен първичен клиничен преглед, включващ анамнеза и статус, с оглед установяване наличие/отсъствие на критерии за включване в проучването или критерии за изключване от него.

4. Лабораторни методи

4.1 Биологичен материал, получаване и съхраняване на пробите

В настоящото проучване е взимана кръв при стандартизирани условия – сутрин на гладно, след 12 часова хранителна пауза. Пациентите са инструктирани за събиране на 24-часова урина. В рамките на половин час взетият биологичен материал е изпратен в Клинична лаборатория към УМБАЛ „Света Марина“-Варна за определяне на рутинните лабораторни показатели. За определяне на костните биомаркери са взети допълнително два серумни вакутейнера от 5 ml с гел сепаратор и са обработени на територията на Клиниката по Хематология. След 20 минутен престой и центрофугиране при 3000 оборота за минута, серумът е отделен и аликвотиран в равни количества в пет полипропиленови епруветки тип „Епендорф“, които са предадени веднага в лабораторията по Клинична имунология за съхранение при -80°C до извършване на анализа.

Костно-мозъчна аспирация е провеждана на типично място (второ-трето междуреброе на стерналната кост) след предварително приложение на локална анестезия с лидокаин. Част от костно-мозъчния материал, поставен във вакутейнер с антикоагулант K₂EDTA, е изпращан в лабораторията по Клинична имунология на УМБАЛ „Света Марина“-Варна за флуоцитометрично изследване. С част от материала е изготвена костно-мозъчна натривка за морфологично изследване. Натривките са оцветявани по метода на Giemsa в Клинична лаборатория на УМБАЛ „Света Марина“-Варна, а морфологичната оценка е осъществявана в Клиниката по хематология.

4.2. Рутинни показатели

- Пълна кръвна картина с диференциално броене е изработена от вакутейнер с антикоагулант K₂EDTA на автоматичен хематологичен анализатор Sysmex XN 1000, Sysmex Corporation, Kobe, Japan
- Биохимичните показатели общ белтък, албумин, глюкоза, урея, креатинин, пикочна киселина, ЛДХ, електролити, общ калций, бета 2 микроглобулин (B2МГ) са изработени от серумен вакутейнер с гел сепаратор на автоматичен биохимичен анализатор ADVIA 1800 Chemistry System, Siemens Healthineers, Germany.

- Капилярна електрофореза е осъществена с напълно автоматизираната система Sebia Capillarys 2 Flex Piercing, Sebia, France за разделяне на М-протеина от останалите серумните протеини и определяне на вида му чрез имунофиксация с реактиви на Sebia, France.
- Латекс усилен имунотурбидиметричен метод (Diazyme's Human Kappa (κ) and Lambda (λ) Free Light Chain assays, Diazyme Laboratories, Inc., USA) е използван за определяне количеството и типа на леките вериги в серум и 24-часова урина на автоматичен биохимичен анализатор Roche Cobas C 501, Roche Diagnostics GmbH, Germany.

4.3. Специфични показатели

Костните биомаркери са изследвани в серум с помощта на ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) методи с готови търговски китове на Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd, China. Базирани са на некомпетитивен „сандвичев“ принцип. Измерванията са извършени в Катедрата по биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика към Фармацевтичен факултет на МУ-Варна при стриктно спазване инструкциите на производителя. Резултатите са отчитани на Biotek Synergy 2 Multi-Mode Plate Reader, USA. Всички стандарти и пробите на изследваните лица са накапвани двукратно в две съседни кладенчета на ELISA плаката и е изчислена средно-аритметичната стойност от измерванията.

Кратко описание на процедурата (идентична за всеки един от изследваните белтъци). Към кладенчетата на ELISA плаката, фабрично покрити със захващащо моноклонално антитяло срещу човешки склеростин / Dkk-1 / sRANKL / остеопонтин / периостин се накапват по 40 μ l от пробите, съдържащи търсения антиген (склеростин / Dkk-1/ sRANKL / остеопонтин / периостин). Към тях последователно се накапват по 10 μ l разтвор на откриващото антитяло (съответното анти-склеростин / анти-Dkk-1 / анти-sRANKL / анти-остеопонтин / анти-периостин антитяло), свързано с биотин и 50 μ l разтвор на анти-имуноглобулиново антитяло, белязано с ензим (Streptavidin-Horseradish peroxidase), което се свързва с откриващото антитяло. Плаката се инкубира за 60 минути при 37°C за формиране на имунните комплекси. След изтичане на инкубационния период излишната течност се отстранява и плаките се промиват петкратно с 350 μ l разреден промиващ разтвор. Към всяко кладенче се добавят по 50 μ l от хомогенния разтвор А и хомогенния разтвор В и след внимателно разклащане, плаката се инкубира на тъмно за още 10 минути при 37°C. Цветът на съдържимото в кладенчетата се променя в синьо, като интензитетът му зависи от концентрацията на антигена. Точно в края на инкубационния период

към всяко кладенче се накапват по 50 µl стоп разтвор, за да се преустанови ензимната реакция, при което цветът се променя от син в жълт. В рамките на 15 минути се отчита екстинкцията на всяко кладенче на автоматичен ELISA reader при дължина на вълната 450 nm. Концентрацията на търсения антиген (склеростин / Dkk-1/ sRANKL / остеопонтин / периостин) за всяка проба се изчислява с помощта на 5-параметрична, логистична, нелинейна регресия, изведена от стандартната крива, построена въз основа на отчетените екстинкции на стандартните разтвори, паралелно накапани с пробите на изследваните лица в отделни кладенчета от ELISA плаката.

Параметрите на аналитична надеждност на използваните ELISA методи, гарантирани от производителя, за всеки един от изследваните костни биомаркери са представени на таблица 3.

Таблица 3. Аналитична надеждност на използваните ELISA методи.

Показател	LOD*	Кръстосана реактивност	Линейност	Възпроизводимост (CV%)
Склеростин	37.5 ng/mL	непосочена	62.5 – 4000 ng/mL	непосочена
Dkk-1	0.979 ng/mL	непосочена	12.51 – 400 ng/mL	в серия (intra-assay): CV<9% междусерийна (inter-assay): CV<11%
sRANKL	1.56 pg/mL	непосочена	0 – 60 pg/mL	в серия (intra-assay): CV<9% междусерийна (inter-assay): CV<11%
Остеопонтин	46.9 ng/mL	Значима кръстосана реактивност с аналози на остеопонтин не е установена	78 – 5000 ng/mL	в серия (intra-assay): CV<9% междусерийна (inter-assay): CV<11%
Периостин	31.0 pg/mL	непосочена	78 – 5000 pg/mL	в серия (intra-assay): CV<10% междусерийна (inter-assay): CV<12%

*LOD (limit of detection) – най-малкото количество от определяемия компонент в пробата, което може да бъде открито

5. Образно изследване

Изследванията са проведени на КТ апарат Siemens Somatom Force, dual source 384 срезов (2x192). Протоколът включва топограма с дължина 1800мм, сканиране с FOV 500 mm и дебелина на среза 3 мм. Използва се алгоритъм за реконструкция на костни структури с Кернел Br 59 и втори – мекотъканен с Кернел Br 32. Реконструкцията на костен прозорец се правят в трите равнини, като за удобство и подобряване на видимостта на находките се разделят на няколко сегмента – глава и шия; гръдна клетка и горни крайници; абдомен и малък таз; долни крайници. Реконструкцията на мекотъканен прозорец са само в аксиалната равнина.

6. Статистически методи

За статистическата обработка на данните са използвана статистическите програми GraphPad Prism, version 8.0.2 for Windows, USA и IBM®SPSS® Statistics v. 23. Приложени са следните методи:

- Дескриптивен анализ за представяне на честотното разпределение на качествени променливи величини, като са включени абсолютни стойности (n) и относителни честоти (%).
- Тест на Shapiro–Wilk’s за оценка нормалността на разпределението на непрекъснатите променливи. Резултатите са нормално разпределени, когато се открива липса на статистическа значимост според теста на Shapiro–Wilk’s ($p > 0.05$) и стойностите на асиметричност (skewness) са в рамките на допустимия диапазон (-1/+1). Счита се, че ексцесът (kurtosis) не влияе на резултатите от статистическите тестове и затова не съществува правило как да се интерпретира.
- Вариационен анализ на количествените променливи за оценка характеристиките на централната тенденция и разсейване на резултатите. Данните, отразяващи непрекъснатите променливи с нормално разпределение, са представени като средна стойност (mean) $\pm$ стандартно отклонение (SD). Непрекъснатите променливи с не-Гаусово разпределение са представени с помощта на позиционната средна величина медиана (median) и интерквартилен интервал (IQR), разпростиращ се между 25-ия и 75-ия персентил.
- Сравнителен анализ – използвани са параметричният t-test на Student-Fisher за съпоставка на две независими групи, чиито резултати са с нормално разпределение и непараметричните Mann–Whitney тест и Kruskal–Wallis тест за съпоставка съответно на две и повече независими групи, чиито резултати се характеризират с не-Гаусово разпределение.

- Chi-Square (χ^2) test for goodness of fit (Хи-квадрат тест за съгласуваност) – непараметричен статистически тест за сравнение на пропорционалното разпределение в наблюдаваните извадки или за сравнение на пропорцията на наблюденията за една извадка с хипотетичните (теоретичните) стойности.
- Корелационен анализ за търсене на зависимост между два количествени признака – при нормално разпределение на резултатите е използван корелационния анализ на Pearson, а при не-Гаусово разпределение – рангов корелационен анализ на Spearman. Степента на корелационна зависимост е оценена според стойността на корелационния коефициент по 5-степенна скала:
 - $0 < R < 0.3$ – слаба корелация
 - $0.3 < R < 0.5$ – умерена корелация
 - $0.5 < R < 0.7$ – значителна корелация
 - $0.7 < R < 0.9$ – висока корелация
 - $0.9 < R < 1$ – много висока корелация
- Линеен регресионен анализ за определяне степента на зависимост и за прогнозиране стойностите на зависимата променлива.
- Receiver-Operating Characteristic (ROC) анализ за оценка на диагностичната надеждност на изследваните показатели и за определяне на праговете им (cut-off) стойности.
- Графичен анализ за визуално представяне на получените резултати.

При проведените статистически анализи за критичното ниво на грешката се приема $\alpha=0.05$. Нулевата хипотеза се отхвърля и се установява статистическа значимост, когато $p<0.05$.

Дисертационният труд е изготвен като резултат от дейностите по научен проект №19009 към Фонд Наука към МУ „Проф. Д-р Параскев Стоянов“ Варна на тема „Нови молекулни биомаркери за оценка на костната болест при мултиплен миелом“. Протоколът за провеждане на проучването е одобрен от Комисията по етика на научните изследвания (КЕНИ) към МУ-Варна (протокол № 94/25.06.2020).

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Демографски и клинико-лабораторни характеристики на изследваните лица

1.1 Демографски характеристики

В контролната група са включени 33 здрави доброволци, отговарящи на критериите за включване в проучването. Осемнадесет от тях са мъже, а петнадесет – жени. Възрастовите и полови характеристики са посочени в таблица 4.

Таблица 4. Демографски характеристики на контролната група.

Контролна група	Възрастов диапазон (години)	Mean + SD (години)	Median (IQR) (години)
Мъже (n=18)	49.00 – 79.00	61.94 ± 8.633	61.50 (56.00 – 67.00)
Жени (n=15)	51.00 – 74.00	59.07 ± 6.065	60.00 (54.00 – 61.00)
Общо (n=33)	49.00 – 79.00	60.64 ± 7.56	60.00 (53.00 – 64.50)

В настоящото проучване са изследвани 41 новодиагностицирани пациента с множествен миелом. Двадесет от тях са мъже, а 21 – жени. Възрастовите и полови характеристики са посочени в таблица 5.

Таблица 5. Демографски характеристики на пациентската група.

Пациентска група	Възрастов диапазон (години)	Mean + SD (години)	Median (IQR) (години)
Мъже (n=20)	40 – 80	64.08 ± 12.40	63.50 (56.50 – 74.75)
Жени (n=21)	36 – 80	63.93 ± 11.30	62.00 (57.50 – 73.50)
Общо (n=41)	36 – 80	64.02 ± 12.14	63.00 (57.50 – 74.50)

Извършен е Chi square анализ, за да се установи дали има различно разпределение по пол в двете изследвани групи (пациентска и контролна). Анализът установи липса на различие в честотното разпределение по пол ($\chi^2=0.2432$, $df=1$, $p=0.6219$). Посредством t- test на Student-Fisher не се открива сигнификантна разлика във възрастта между здравите контроли и изследваните пациенти ($p=0.1040$).

1.2 Клинико-лабораторни характеристики на изследваните лица, формиращи пациентската група

Пациентите са стадираны според критериите на ISS (International staging system for multiple myeloma) [119]. Шестнадесет от пациентите (39.02%) са в първи клиничен стадий, шест (14.63%) са във втори клиничен стадий и деветнадесет (46.34%) са в трети клиничен стадий.

Оценката на костното увреждане, свързано с ММ, е извършена с помощта на целотелесна ниско-дозовова компютърна томография (WBLDCT). За стратифициране на пациентите въз основа на костните лезии е използвана стадиращата система на Durie-Salmon [94]. При поставяне на диагнозата, шест от пациентите са с установени от една до три остеолитични лезии и само трима са без остеолитични лезии. Тези девет пациента (21.95%) формират групата с липсващо до лекостепенно засягане на костната тъкан (G1). Всички останали 32 пациента (78.05%) са включени в група G2 (групата на тежко-степенно засягане на костната тъкан). При 21 от тях (65.7%) са установени над 3 остеолитични лезии, а при 11 пациента (34.3%) са установени и патологични фрактури, освен съществуващите остеолитични лезии. Само при един пациент от група G2 има и една мекотъканна лезия на ниво L1.

При 23-ма пациента (56.10%) видът на секретирания М-протеин е IgG (κ, n=14 и λ, n=9), при шестима (14.63%) е IgA (κ, n=5 и λ, n=1). Дванадесет от пациентите (29.27%) са с лековерижен миелом (FLCκ, n=8 и FLCλ, n=4).

При морфологичното изследване на костномозъчен аспират се установява плазмоклетъчна инфилтрация на костния мозък под 60% при 17 от пациентите (41.46%), а при останалите 24 пациента (58.54%) инфилтрацията е над 60%.

При диагнозата 12 от пациентите са с креатинин над горна референтна граница. От тях 4-ма са с креатинин до 176 μmol/L, като при двама от тях стойностите на креатинин се нормализират в хода на лечението. При 8 пациента креатининът е над 176 μmol/L, като при двама от тях се налага включване и на диализни процедури (креатинин над 400 μmol/L). В хода на лечението не се наблюдава подобрене на бъбречната им функция и до края на проследяването те остават на диализно лечение.

До етап T1 достигнаха 22 пациента. Причините за отпадане на останалите пациенти от проучването са следните:

- Отказ от участие в проучването – 4 пациента
- Настъпил смъртен изход – 4 пациента в резултат на COVID 19 инфекция и 4 пациента в резултат на прогресираща бъбречна недостатъчност
- Прогресия на заболяването – 5 пациента
- Промяна в терапевтичния протокол – 2 пациента

На етапи T1, T2 и TA, в зависимост от постигнатия отговор, пациентите са подразделени на две групи: (1) – постигнали CR и VGPR и (2) – постигнали PR или са в SD. Пациентите, при които се установява прогресия на заболяването, се изключват от проучването. На таблица 6 е посочено разпределението на пациентите според отговора им към лечението.

Таблица 6. Честотно разпределение на пациентите според отговора им към терапията.

Етапи	CR + VGPR	PR + SD	PD
T1 – n/N (%)	10/22 (45.5)	11/22 (50.0)	1/22 (4.5)
T2 – n/N (%)	3/11 (27.3)	8/11 (72.7)	0
TA – n/N (%)	10/10 (100.0)	0	0

n – брой пациенти, постигнали съответния отговор; N – общ брой пациенти, достигнали до съответния етап на лечение

На етап T1 са изследвани общо 22-ма пациента. От тях шестима (27.3%) са с CR и четирима (18.2%) с VGPR. Осем пациента (36.4%) са с PR, а трима (13.6%) остават в SD. При един пациент (4.5%) се установява прогресия на заболяването (PD). До етап T2 и TA достигат общо 21 пациента (11 са в етап T2 и 10 – в етап TA). На етап T2 трима (27.3%) постигат VGPR, петима (45.5%) са с PR и трима (27.2%) са в SD. На етап TA девет пациента (90.0%) достигат до CR и само един (10.0%) е с VGPR. Клинико-лабораторните характеристики на пациентите към момента на тяхното включване в проучването са представени в обобщен вид в таблица 7.

Таблица 7. Клинико-лабораторни характеристики на пациентите към момента на тяхното включване в проучването.

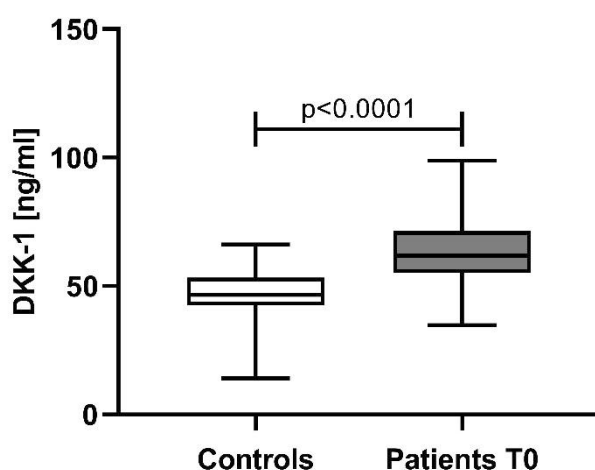
Показател	N (%) / Mean $\pm$ SD (Range)
ISS стадий:	
I	16 (39.02%)
II	6 (14.63%)
III	19 (46.34%)
Костна болест:	
G1	9 (21.95%)
G2	32 (78.05%)
Тип на М-протеин:	
IgG κ/λ	23 (56.10%)
IgA κ/λ	6 (14.63%)
FLC κ/λ	12 (29.27%)
ВМІ:	
<60%	17 (41.46%)
>60%	24 (58.54%)
Hb (g/l)	100.75 $\pm$ 25.36 (55 – 151)
WBC ($\times 10^9/L$)	6.39 $\pm$ 2.95 (2.03 – 14.58)
PLT ($\times 10^9/L$)	208.41 $\pm$ 103.31 (32 – 461)
Креатинин ($\mu\text{mol/L}$)	126.05 $\pm$ 91.53 (53 – 449)
ЛДХ (U/L)	425.75 $\pm$ 370.34 (200 – 2571)
Общ белтък (g/L)	92.70 $\pm$ 20.99 (54.5 – 133.1)
Албумин (g/L)	36.89 $\pm$ 7.58 (18.8 – 51.0)
B2MG (mg/L)	5.14 $\pm$ 3.13 (1.8 – 14.0)
Калций (mmol/L)	2.42 $\pm$ 0.47 (1.8 – 4.01)

2. DICKOPFT-1 (Dkk-1)

2.1 Базисни серумни нива на Dkk-1 при новодиагностицирани пациенти с мултиплен миелом (NDMM)

Серумните нива на Dkk-1 при NDMM пациенти са изследвани веднага след поставяне на диагнозата и преди започване на лечението. При използване на теста на Shapiro-Wilk's се установи не-Гаусовото разпределение на резултатите, което обосновава използването на непараметрични методи за статистически анализ на изследвания параметър.

Медианата и съответният интерквартилен обхват на серумните нива на Dkk-1 за пациентската група са 61.75 ng/mL (IQR: 55.11 – 71.45 ng/mL), а за контролната група са 46.62 ng/mL (IQR: 42.43 – 53.32 ng/mL). Така серумните нива на Dkk-1 в пациентската група надвишават с над 30% тези, наблюдавани в контролната група. С помощта на Mann-Whitney тест се установява сигнификантно различие между двете изследвани групи ($p < 0.0001$, фигура 6).



Фигура 6. Сравнение на серумните нива на Dkk-1 в двете изследвани групи.
(Приложен е Mann-Whitney тест)

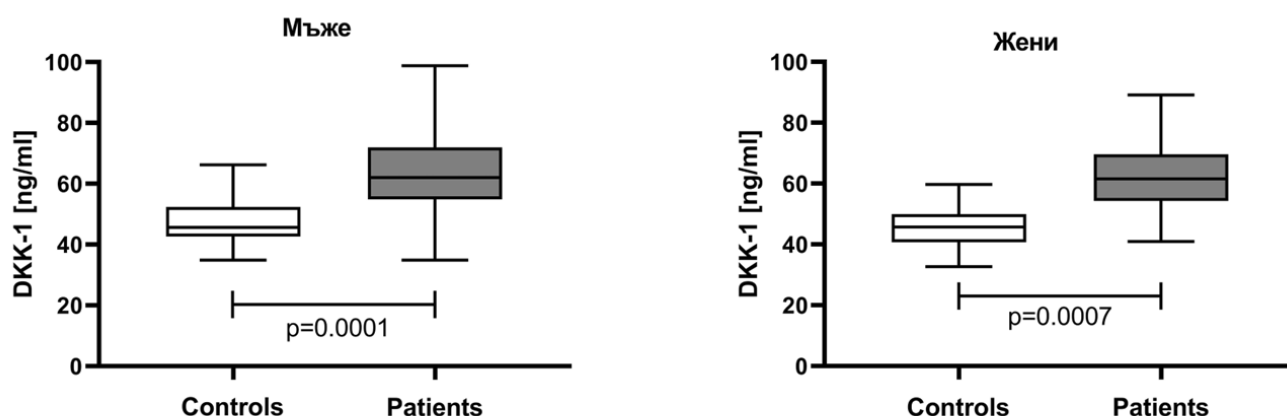
Изследвано е влиянието на пола върху серумните нива на Dkk-1. И в двете групи (пациентска и контролна) не се откриват статистически значими различия в зависимост от пола (таблица 8).

Таблица 8. Влияние на пола върху серумните нива на Dkk-1 в пациентската и контролна групи.

Изследвана група	Пол	N	DKK-1 [ng/ml]		P value
			Медиана	IQR	
NDMM пациенти	Мъже	20	62.05	54.84 – 71.98	0.7916
	Жени	21	61.53	54.29 – 69.59	
Контролни индивиди	Мъже	18	44.64	41.96 – 51.51	0.2354
	Жени	15	49.41	43.49 – 61.21	

(Приложен е Mann-Whitney тест)

Разделянето по пол не променя установеното за общата група значимо различие между болни и здрави индивиди. Както болните мъже, така и болните жени са със значимо по-високи нива на Dkk-1 в сравнение със здравите мъже и жени съответно (фигура 7).



Фигура 7. Сравнение на серумните нива на Dkk-1 в двете изследвани групи в зависимост от пола. (Mann-Whitney тест)

Интересно е все пак да се отбележи, че докато в групата на NDMM пациентите, мъжете са с пренебрежимо малко по-високи стойности на Dkk-1 в сравнение с жените, то в контролната група обратно, жените са с по-високи стойности отколкото мъжете и макар и да не достигат до статистическа значимост стойностите се различават с около 11%.

Изследвано е и влиянието на фактора възраст върху нивата на Dkk-1. Пациентската и контролна групи са подразделени в две допълнителни

възрастови подгрупи. Група А включва пациентите под 65 годишна възраст, а в група В са включени пациентите над 65 годишна възраст. И в двете изследвани групи не са установени статистически значими различия в зависимост от възрастта (таблица 9).

Таблица 9. Влияние на възрастта върху серумните нива на Dkk-1 в пациентската и контролна групи.

Изследвана група	Възраст	N	DKK-1 [ng/ml]		P value
			Медиана	IQR	
NDMM пациенти	Група А (<65 години)	24	62.05	56.47 – 71.63	0.5600
	Група В (>65 години)	17	56.36	51.41 – 71.45	
Контролни индивиди	Група А (<65 години)	25	45.66	41.96 – 54.58	0.7359
	Група В (>65 години)	8	48.29	41.43 – 55.72	

(Приложен е Mann-Whitney тест)

Оценено е и влиянието на бъбречната функция върху серумните нива на Dkk-1, като пациентите са подразделени на две групи – с креатинин под и над 177 $\mu\text{mol/L}$. Медианата и съответния IQR за първата група са 61.04 ng/ml (54.84 – 67.90), а за втората – 72.06 ng/ml (50.27 – 81.18). При провеждане на Mann-Whitney сравнителния тест не се установи значимо различие между двете изследвани групи ($p=0.2275$).

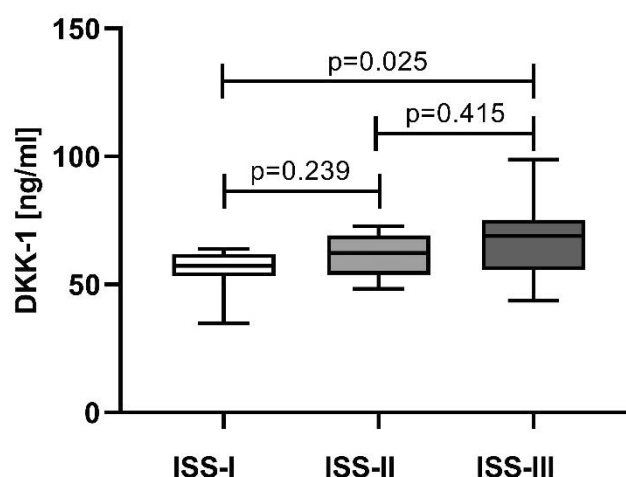
2.2 Серумни нива на Dkk-1 при NDMM пациентите в зависимост от стадия на заболяването

В таблица 10 са представени резултатите за серумните нива на Dkk-1 при пациентите, стратифицирани в три подгрупи според стадия на заболяването, определен според критериите на IMWG.

Таблица 10. Серумни нива на Dkk-1 при пациенти, стратифицирани в зависимост от стадия на заболяването.

Стадий на заболяването	N	DKK-1 [ng/ml]	
		Медиана	IQR
ISS-I	16	57.7	53.29-61.9
ISS-II	6	62.32	53.82-69.24
ISS-III	19	68.94	55.72-75.34

Наблюдава се постепенно нарастване на стойностите на Dkk-1 с напредване на стадия на заболяването, като статистически значима разлика е установена между първи и трети стадий на мултипления миелом ($p=0.025$). Стойностите на Dkk-1 в стадий ISS-II са по-високи от тези в първи стадий и по-ниски от тези в трети стадий, но до статистическа значимост не се достига. Резултатите от сравнителния анализ са показани на фигура 8.



Фигура 8. Сравнение на серумните нива на Dkk-1 на пациентите, стратифицирани в три групи според стадия на заболяването им.

(Приложен е Mann-Whitney тест)

2.3 Серумни нива на Dkk-1 при NDMM пациентите в зависимост от костната болест

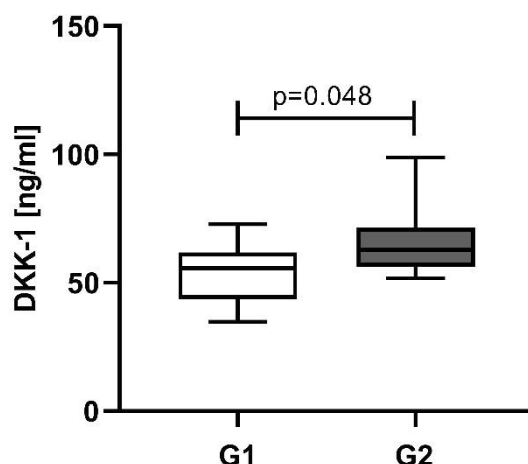
В зависимост от наличието на костни лезии пациентите са разделени в две подгрупи (G1 и G2). В таблица 11 са представени резултатите за серумните нива на Dkk-1 в така дефинираните две подгрупи.

Таблица 11. Серумни нива на Dkk-1 при пациенти, стратифицирани в подгрупи в зависимост от костната болест.

Костна болест	N	DKK-1 [ng/ml]	
		Медиана	IQR
G1	9	55.68	43.71–61.75
G2	32	62.86	56.36–71.45

(G1 – група пациенти с нула до три остеолитични лезии; G2 – група пациенти с над три остеолитични лезии и/или налична/и патологична/и фрактура/и)

При провеждане на Mann-Whitney теста е установено статистически значимо различие ($p=0.048$) между пациентските подгрупи, подразделени в зависимост от тежестта на засягане на скелетната им система (фигура 9).



Фигура 9. Сравнение на серумните нива на Dkk-1 в двете изследвани групи. (Приложен е Mann-Whitney тест)

Пациентите от подгрупа G1 имат по-високи стойности на Dkk-1 в сравнение с контролната група, но до статистически значимо различие не се достига (55.68 ng/ml vs 46.62 ng/ml съответно, $p=0.3479$).

2.4 Серумни нива на Dkk-1 при NDMM пациентите в зависимост от костно-мозъчната инфилтрация с плазматични клетки

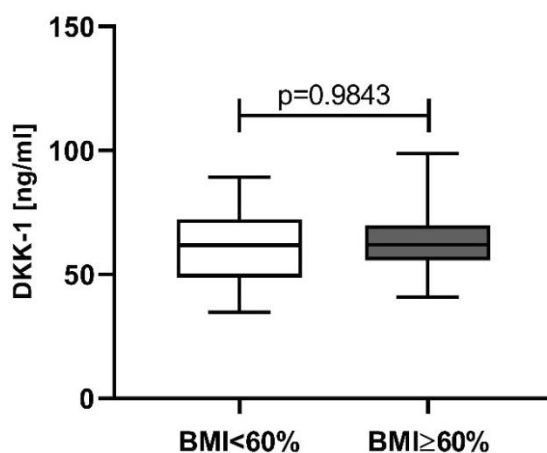
За да се оцени въздействието на туморния товар върху серумните нива на Dkk-1, пациентите са разделени на две подгрупи в зависимост от костно-мозъчната инфилтрация с плазматични клетки. За разграничаване на подгрупите е използван cut-off от 60%. Резултатите са представени в таблица 12.

Таблица 12. Серумни нива на Dkk-1 при пациенти, стратифицирани в зависимост от костно-мозъчната инфилтрация с плазматични клетки.

BMI	N	DKK-1 [ng/ml]	
		Медиана	IQR
PCs <60%	17	61.75	48.76 – 72.30
PCs ≥60%	24	62.08	55.67–69.7

(BMI – костно-мозъчната инфилтрация, PCs – плазматични клетки)

При провеждане на Mann-Whitney теста не е установено статистически значимо различие ($p=0.9843$) между двете изследвани подгрупи (фигура 10).



Фигура 10. Сравнение на серумните нива на Dkk-1 в двете изследвани групи. (Приложен е Mann-Whitney тест)

2.5 Изследване на корелационните взаимовръзки между серумните нива на Dkk-1 с рутинни хематологични, морфологични и биохимични показатели

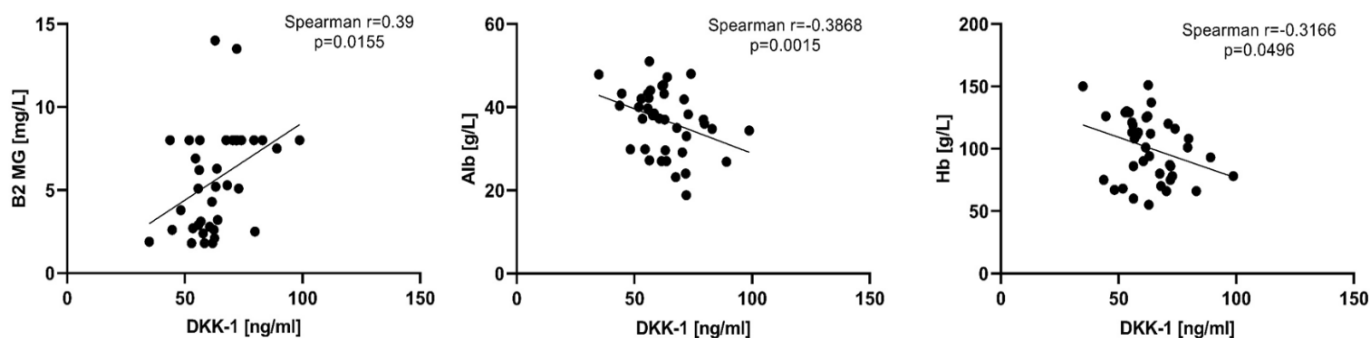
На таблица 13 са представени резултатите от проведения Spearman корелационен анализ за установяване на взаимовръзки между серумните нива на DKK-1 с рутинни хематологични, морфологични и биохимични показатели.

Таблица 13. Взаимовръзки между серумните нива на Dkk-1 с рутинни хематологични, морфологични и биохимични показатели.

Изследван параметър	Spearman rho	P value
Hb	– 0.3166	0.0496
WBC	– 0.0439	0.7906
PLT	– 0.0139	0.9327
BMI	0.05109	0.7574
β2MG	0.3902	0.0155
Creatinine	0.2228	0.1728
LDH	0.0046	0.9778
TP	0.2010	0.2198
Alb	-0.3868	0.0150
Ca²⁺	0.3117	0.0824

Hb – хемоглобин, WBC – левкоцити, PLT – тромбоцити, Alb – албумин, TP – общ белтък, LDH – лактатдехидрогеназа, β2MG – β2-микроглобулин, BMI – костно-мозъчна инфилтрация

Отрицателна и умерена по сила статистически значима корелация се установява между Dkk-1 и параметрите хемоглобин и албумин, а положителна и умерена по сила статистически значима корелация се открива единствено с β2-микроглобулин. Значимите корелационни зависимости са илюстрирани на фигура 11.



Фигура 11. Корелационни зависимости между Dkk-1 и β2-микроглобулин, хемоглобин и албумин.

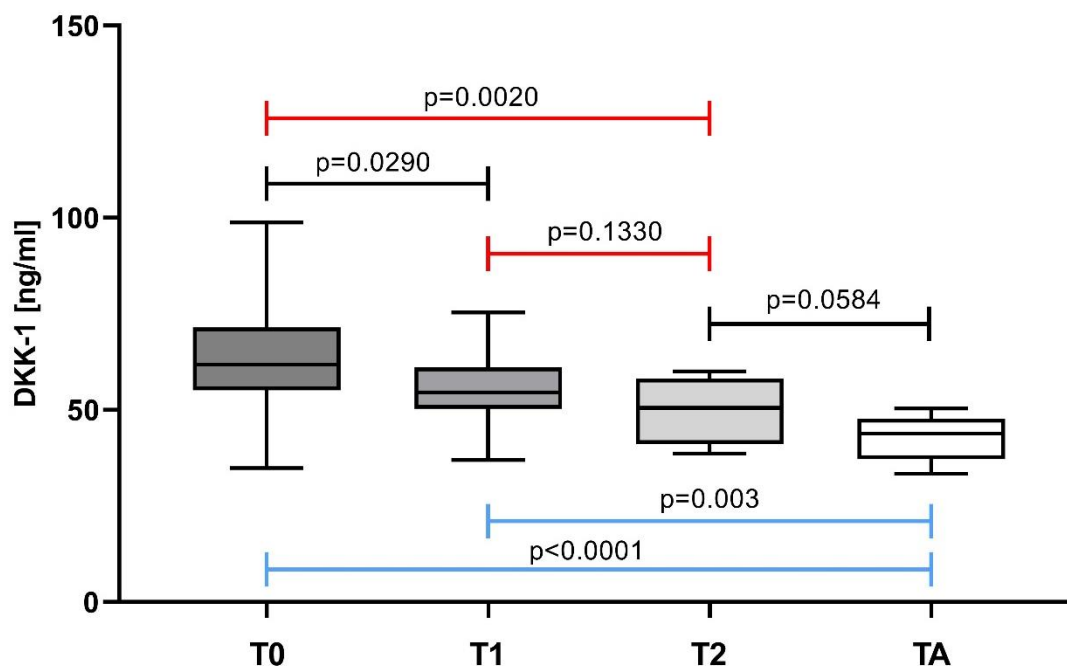
2.6 Серумни нива на Dkk-1 при NDMM пациентите в хода на тяхното лечение

За да се проучи дали в хода на лечението настъпват промени в серумните нива на Dkk- 1, те са изследвани според дизайна на проучването трикратно, през трите предварително дефинирани етапа (T0, T1, T2 или TA). Резултатите са посочени в таблица 14.

Таблица 14. Промени в серумните нива на Dkk-1 в хода на терапията.

Етапи	N	DKK-1 [ng/ml]	
		Медиана	IQR
T0	41	61.75	55.11 – 71.45
T1	22	54.57	50.32 – 61.04
T2	11	50.55	41.09 – 58.13
TA	10	43.90	37.20 – 47.74

Проведен е тестът на Kruskal-Wallis, за да се съпоставят не-Гаусово разпределените резултати на повече от две независими групи. С помощта на този тест се установява, че съществува статистически значимо различие между нивата на Dkk-1, изследвани в различните етапи на проучването ($\chi^2=24.34$, $p<0.0001$). Допълнително със сравнителния анализ на Mann-Whitney се уточнява между кои етапи има статистически значимо различие. На фигура 12 са посочени резултатите от този анализ.

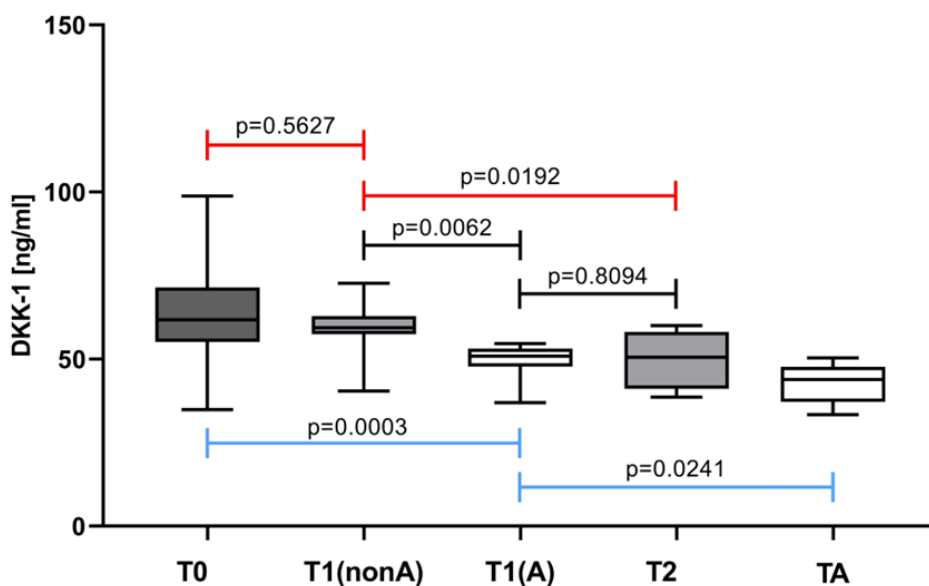


Фигура 12. Различия в серумните нива на Dkk-1 в хода на терапията на NDMM пациентите. (Приложен е Mann-Whitney тест)

Базисните серумни нива на Dkk-1 (T0) се отличават значимо в сравнение с тези, определени във всички останали етапи от проучването, като степента на значимост постепенно нараства. Още след провеждането на първите 4 цикъла химиотерапия нивата значимо спадат ($p < 0.0290$). При нетрансплантираните пациенти след допълнителните 4 цикъла химиотерапия се открива още по-значимо спадане ($p < 0.0020$), докато при трансплантираните пациенти се наблюдава най-значимото снижаване на серумните нива на Dkk-1 ($p < 0.0001$). Нивата в етап T1 не се различават значимо от тези на нетрансплантираните в края на проучвания период (T1 vs T2: $p = 0.1330$), докато при трансплантираните пациенти е постигнато значимо по-ниско снижение (T1 vs TA, $p = 0.003$). В края на проучвания период (етапи T2 и TA) нивата между двете групи пациенти (нетрансплантирани / трансплантирани) показват тенденция за статистическо значимо различие помежду си (T2 vs TA: $p = 0.0584$), като нивата на нетрансплантираните са по-високи от тези на трансплантираните пациенти. Въпреки това нивата им се доближават до тези на контролната група и не показват значимо различие с нея (TA vs Controls: $p = 0.4561$; T2 vs Controls: $p = 0.2104$). Подобно доближаване до стойностите на контролната група не се установява на етап T1 (T1 vs Controls: $p = 0.0043$).

Достигналите до етап T1 пациенти са подразделени в две допълнителни подгрупи: T1(A) субгрупа, формирана от пациентите, които ще се трансплантират и T1(nonA) субгрупа, в която са включени всички останали

пациенти. Медианата и съответният IQR за T1(nonA) са 59.36 ng/ml (57.50 – 62.85), а за T1(A) са 50.86 ng/ml (47.76 – 53.09). С теста на Kruskal-Wallis се установява, че съществува статистически значимо различие между нивата на Dkk-1, изследвани в различните етапи на проучването ($\chi^2=30.76$, $p<0.0001$). Чрез Mann-Whitney теста е изследвано различието в нивата на Dkk-1 както между T1(A) и T1(nonA), така и при сравнението им с нивата, измерени в останалите етапи от проучването (фигура 13).



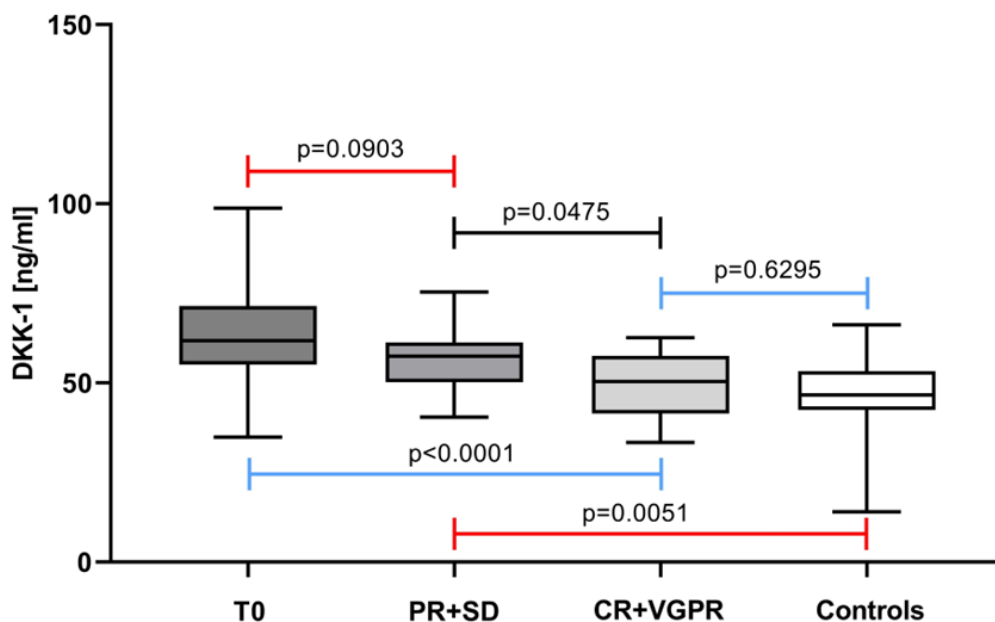
Фигура 13. Сравнение между серумните нива на Dkk-1 в T1(A) и T1(nonA) субгрупите с тези, измерени във всички останали етапи от изследването. (Приложен е Mann-Whitney тест)

Тъй като T1(A) пациентите са постигнали CR и VGPR още на този етап (етап T1), техните нива се различават значимо от базисните нива преди започване на лечението (T1(A) vs T0, $p=0.0003$), но все още са значимо по-високи от нивата, които са постигнали три месеца след трансплантацията (T1(A) vs TA, $p=0.0241$). На този етап от лечението, T1(nonA) пациентите задържат високи серумни нива на Dkk-1, неразличаващи се от базисните нива ($p=0.5627$). На етап T2 нетрансплантираните пациенти постигат вече значимо понижение на нивата си спрямо T1(nonA), $p=0.0192$ (фигура 13).

При сравнение между T1(A) и T1(nonA) субгрупите се установява, че още на този начален етап от лечението (T1) те се различават значимо по своите Dkk-1 нива ($p=0.0062$). Нивата в субгрупа T1(A) спадат толкова значимо, че достигат и не се отличават от нивата на нетрансплантираните пациенти, наблюдавани на етап T2, $p=0.8094$ (фигура 13).

2.7 Серумни нива на Dkk-1 в зависимост от терапевтичния отговор

За да се оценят вариациите в серумните нива на Dkk-1 според отговора към лечението, пациентите са категоризирани в две групи: (1) пациенти с CR и VGPR и (2) пациенти с постигнат PR и SD, независимо от етапа на лечение, в който са го постигнали (T1 + T2 + TA). Наблюдават се значимо по-ниски стойности ($p=0.0475$) за серумните нива на Dkk-1 в групата с CR и VGPR (медиана 50.39 ng/mL и IQR 41.48 – 57.57) в сравнение с тези в групата с PR и SD (медиана 57.72 ng/mL и IQR 50.37 – 61.04). Освен това пациентите с CR и VGPR имат значително по-ниски нива за тествания параметър спрямо неговите изходни нива ($p<0.0001$) и неразличаващи се от тези на контролната група ($p=0.6295$). Обратни са наблюденията за групата с по-лошия отговор към терапията. Нивата на Dkk-1 при пациентите с PR и SD не се различават от базисните нива в етап T0 ($p=0.0903$) и са значимо по-високи от тези в контролната група ($p=0.0051$) (фигура 14).



Фигура 14. Различия в серумните нива на Dkk-1 според отговора към терапията.

(Приложен е Mann-Whitney тест)

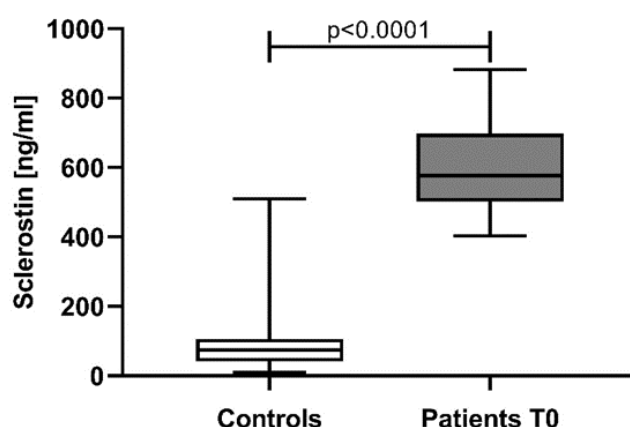
Проследиха се изходните нива на етап T0 за двете групи пациенти. При пациентите с постигнат CR и VGPR медианата и съответният IQR са 59.46 ng/ml (50.97 – 62.96), а при тези с PR и SD медианата и съответният IQR са 65.83 ng/ml (54.24 – 77.78). С Mann-Whitney теста не се установи значимо различие между тях ($p=0.1655$).

3. СКЛЕРОСТИН

3.1 Базисни серумни нива на склеростин (Scl) при новодиагностицирани пациенти с мултиплен миелом (NDMM)

Серумните нива на Scl при NDMM пациенти са изследвани веднага след поставяне на диагнозата и преди започване на лечението. При използване на теста на Shapiro-Wilk's се установи не-Гаусовото разпределение на резултатите, което обосновава използването на непараметрични методи за статистически анализ на изследвания параметър.

Медианата и съответният интерквартилен обхват на серумните нива на Scl за пациентската група са 576.8 ng/mL (IQR: 502.1–697.8 ng/mL), а за контролната група са 74.76 ng/mL (IQR: 41.83–106.2 ng/mL). Видно е, че серумните нива на Scl в пациентската група са значително по-високи и надвишават многократно тези, наблюдавани в контролната група. При провеждане на Mann-Whitney сравнителния анализ се установява сигнификантно различие между двете изследвани групи ($p < 0.0001$, фигура 15).



Фигура 15. Сравнение на серумните нива на Scl в двете изследвани групи.
(Приложен е Mann-Whitney тест)

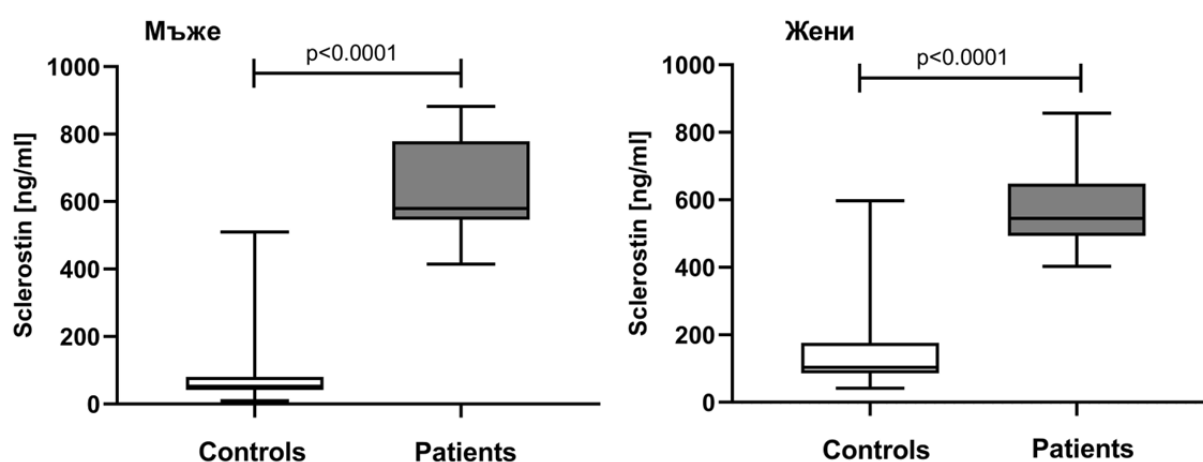
Изследвано е влиянието на пола върху серумните нива на Scl. В контролната група се установява статистически значимо по-високи стойности на показателя при мъжете в сравнение с жените, докато в пациентската група такова различие не се открива (таблица 15).

Таблица 15. Влияние на пола върху серумните нива на Scl в пациентската и контролна групи.

Изследвана група	Пол	N	Склеростин [ng/ml]		P value
			Медиана	IQR	
NDMM пациенти	Мъже	20	580.1	546.4 – 779.1	0.2083
	Жени	21	544.9	493.1 – 647.8	
Контролни индивиди	Мъже	18	103.3	86.06 – 176.9	0.0148
	Жени	15	52.65	41.83 – 80.41	

(Приложен е Mann-Whitney тест)

Разделянето по пол не променя установеното за общата група значимо различие между болни и здрави индивиди. Както болните мъже, така и болните жени са със значимо по-високи нива на Scl в сравнение със здравите мъже и жени съответно (фигура 16).



Фигура 16. Сравнение на серумните нива на Scl в двете изследвани групи в зависимост от пола. (Приложен е Mann-Whitney тест)

Изследвано е и влиянието на фактора възраст върху нивата на Scl. Пациентската и контролна групи са подразделени в две допълнителни възрастови подгрупи. Група А включва пациентите под 65 годишна възраст, а в група В са включени пациентите над 65 годишна възраст. И в двете изследвани групи не са установени статистически значими различия в зависимост от възрастта (таблица 16).

Таблица 16. Влияние на възрастта върху серумните нива на Scl в пациентската и контролна групи.

Изследвана група	Възраст	N	Склеростин [ng/ml]		P value
			Медиана	IQR	
NDMM пациенти	Група А (<65 години)	24	565.7	490.5 – 639.2	0.3939
	Група В (>65 години)	17	579.6	544.6 – 754.0	
Контролни индивиди	Група А (<65 години)	25	47.24	41.83 – 77.59	0.1068
	Група В (>65 години)	8	86.06	49.95 – 112.1	

(Приложен е Mann-Whitney тест)

Оценено е и влиянието на бъбречната функция върху серумните нива на Scl, като пациентите са подразделени на две групи – с креатинин под и над 177 $\mu\text{mol/L}$. Медианата и съответния IQR за първата група са 576.0 ng/ml (490.5 – 649.9), а за втората – 585.1 ng/ml (548.7 – 754.0). При провеждане на Mann-Whitney сравнителния тест не се установи значимо различие между двете изследвани групи ($p=0.3118$).

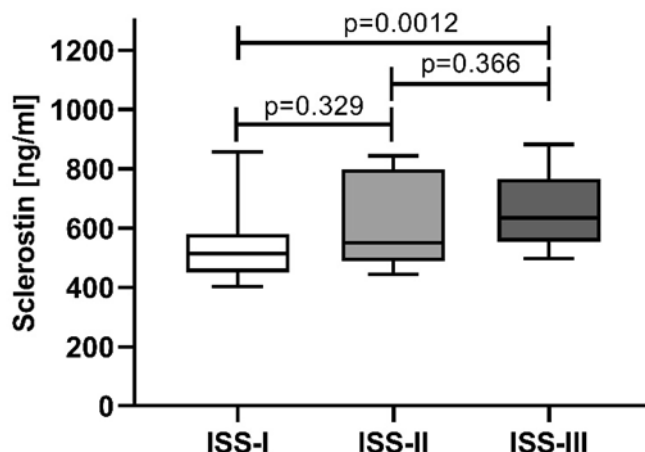
3.2 Серумни нива на Scl при NDMM пациентите в зависимост от стадия на заболяването

В таблица 17 са представени резултатите за серумните нива на Scl при пациентите, стратифицирани в три подгрупи според стадия на заболяването, определен според критериите на IMWG.

Таблица 17. Серумни нива на Scl при пациенти, стратифицирани в зависимост от стадия на заболяването.

Стадий на заболяването	N	Склеростин [ng/ml]	
		Медиана	IQR
ISS-I	16	513.7	451.5 – 579.6
ISS-II	6	550.1	488.0 – 798.4
ISS-III	19	634.7	554.4 – 765.9

Наблюдава се постепенно нарастване на стойностите на Scl с напредване на стадия на заболяването, като статистически значима разлика е установена между първи и трети стадий на мултипления миелом ($p=0.0012$). Стойностите на Scl в стадий ISS-II са по-високи от тези в първи стадий и по-ниски от тези в трети стадий, но до статистическа значимост не се достига. Резултатите от сравнителния анализ са показани на фигура 17.



Фигура 17. Сравнение на серумните нива на Scl на пациентите, стратифицирани в три групи според стадия на заболяването им.
(Приложен е Mann-Whitney тест)

3.3 Серумни нива на Scl при NDMM пациентите в зависимост от костната болест

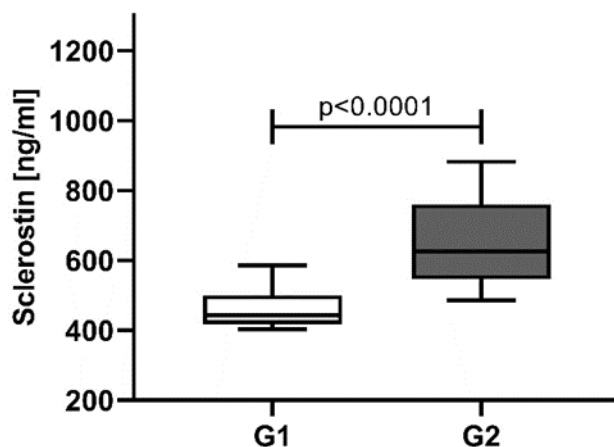
В зависимост от наличието на костни лезии пациентите са разделени в две подгрупи (G1 и G2). В таблица 18 са представени резултатите за серумните нива на Scl в така дефинираните две подгрупи.

Таблица 18. Серумни нива на Scl при пациенти, стратифицирани в подгрупи в зависимост от костната болест.

Костна болест	N	Склеростин [ng/ml]	
		Медиана	IQR
G1	9	443.6	417.7– 499.8
G2	32	625.50	547.0 – 760.0

(G1 – група пациенти с нула до три остеолитични лезии; G2 – група пациенти с над три остеолитични лезии и/или налична/и патологична/и фрактура/и).

При провеждане на Mann-Whitney теста е установено статистически значимо различие ($p < 0.0001$) между пациентските подгрупи, подразделени в зависимост от тежестта на засягане на скелетната им система (фигура 18).



Фигура 18. Сравнение на серумните нива на Scl в двете изследвани групи.
(Приложен е Mann-Whitney тест)

Пациентите от подгрупа G1 имат значимо по-високи стойности на Scl и в сравнение с контролната група (443.6 ng/ml vs 74.76 ng/ml съответно, $p < 0.0001$).

3.4 Серумни нива на Scl при NDMM пациентите в зависимост от костно-мозъчната инфилтрация с плазматични клетки

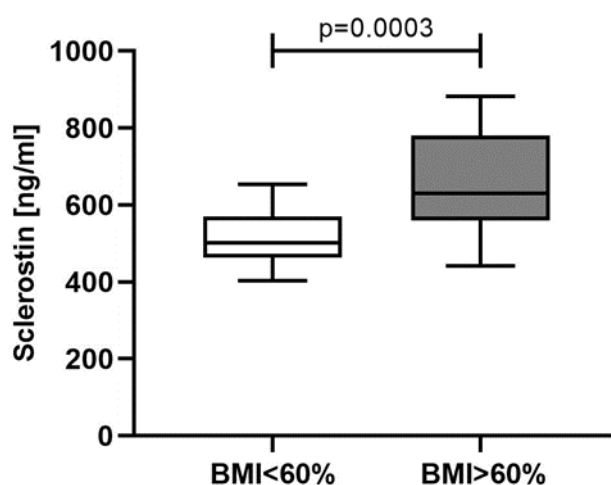
За да се оцени въздействието на туморния товар върху серумните нива на Scl, пациентите са разделени на две подгрупи в зависимост от BMI с плазматични клетки. За разграничаване на подгрупите е използван cut-off от 60%. Резултатите са представени в таблица 19.

Таблица 19. Серумни нива на Scl при пациенти, стратифицирани в зависимост от костно-мозъчната инфилтрация с плазматични клетки.

BMI	N	Склеростин [ng/ml]	
		Медиана	IQR
PCs <60%	17	501.4	462.9 – 569.0
PCs ≥60%	24	630.5	559.6 – 781.2

(BMI – костно-мозъчната инфилтрация, PCs – плазматични клетки)

При провеждане на Mann-Whitney теста е установено статистически значимо различие ($p=0.0003$) между двете изследвани подгрупи (фигура 19).



Фигура 19. Сравнение на серумните нива на Scl в двете изследвани групи (Приложен е Mann-Whitney тест)

3.5 Изследване на корелационните взаимосвързки между серумните нива на Scl с рутинни хематологични, морфологични и биохимични показатели

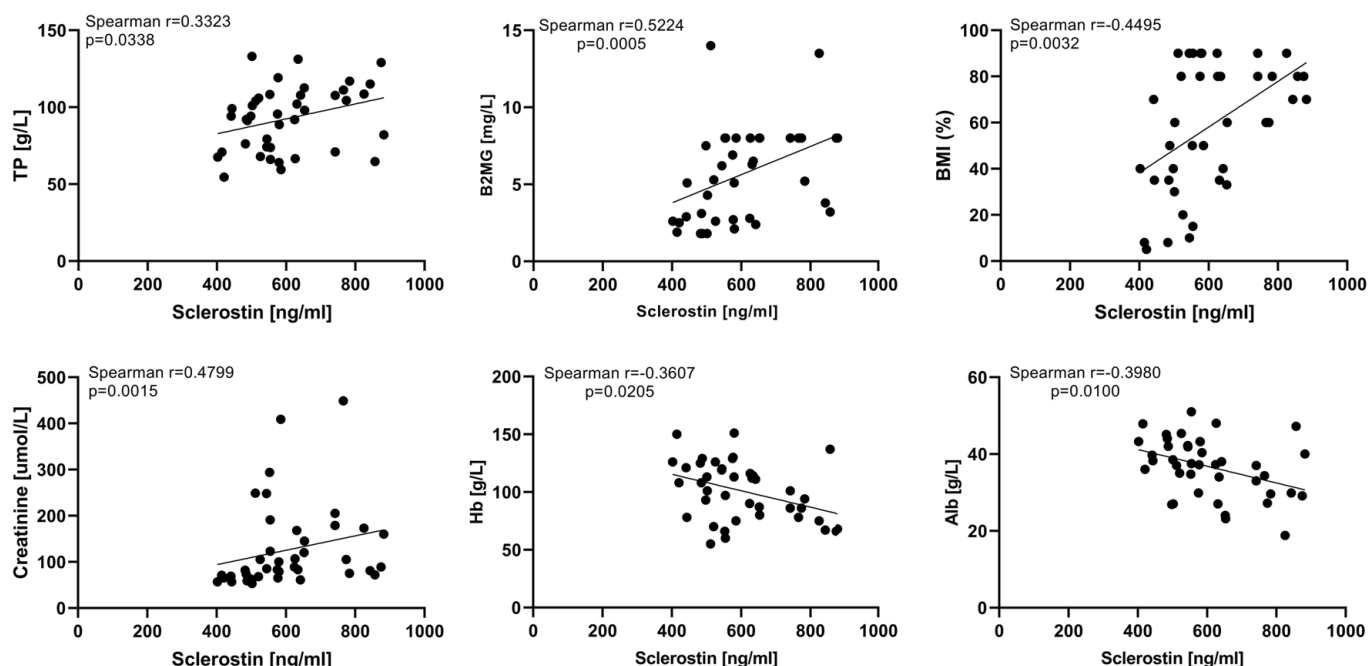
На таблица 20 са представени резултатите от проведения Spearman корелационен анализ за установяване на взаимосвързки между серумните нива на Scl с рутинни хематологични, морфологични и биохимични показатели.

Таблица 20. Взаимовръзки между серумните нива на Dkk-1 с рутинни хематологични, морфологични и биохимични показатели.

Изследван параметър	Spearman rho	P value
Hb	-0.3607	0.0205
WBC	-0.06986	0.6643
PLT	-0.4024	0.0091
BMI	0.4495	0.0032
β2MG	0.5224	0.0005
Creatinine	0.4799	0.0015
LDH	-0.1755	0.2723
TP	0.3323	0.0338
Alb	-0.3980	0.0100
Ca²⁺	-0.08124	0.6531

Hb – хемоглобин, WBC – левкоцити, PLT – тромбоцити, Alb – албумин, TP – общ белтък, LDH – лактатдехидрогеназа, β 2MG – β 2-микроглобулин, BMI – костно-мозъчна инфилтрация

Отрицателна и умерена по сила статистически значима корелация се установява между Scl и параметрите хемоглобин, тромбоцити и албумин, а положителна и значителна по сила статистически значима корелация се открива с β 2-микроглобулин. С костно-мозъчната инфилтрация, креатинин и общия белтък връзката е позитивна и умерена по сила. С останалите изследвани показатели взаимозависимост не се наблюдава. Значимите корелационни зависимости са илюстрирани на фигура 20.



Фигура 20. Корелационни зависимости между Scl и β 2-микроглобулин, хемоглобин, албумин, общ белтък, BMI, креатинин.

3.6 Серумни нива на Scl при NDMM пациентите в хода на тяхното лечение

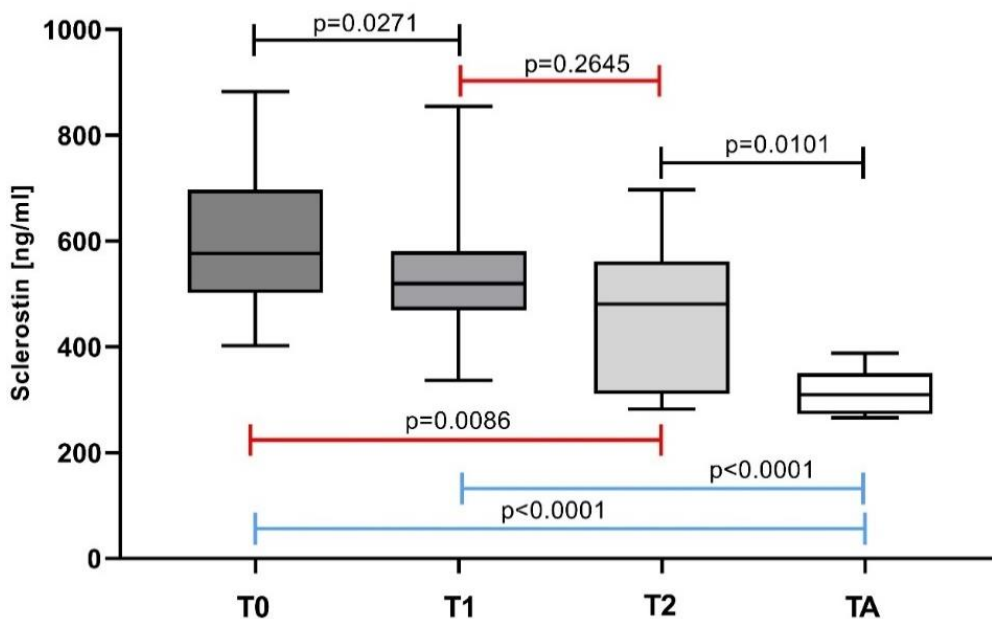
За да се проучи дали в хода на лечението настъпват промени в серумните нива на Scl, те са изследвани според дизайна на проучването трикратно, през трите предварително дефинирани етапа (T0, T1, T2 или TA). Резултатите са посочени в таблица 21.

Таблица 21. Промени в серумните нива на Scl в хода на терапията.

Етапи	N	Склеростин [ng/ml]	
		Медиана	IQR
T0	41	576.8	502.1 – 697.8
T1	22	519.5	469.1 – 580.6
T2	11	481.6	311.3 – 561.5
TA	10	309.8	273.0 – 350.1

Проведен е тестът на Kruskal–Wallis, за да се съпоставят не-Гаусово разпределените резултати на повече от две независими групи. С помощта на този тест се установява, че съществува статистически значимо различие между нивата на Scl, изследвани в различните етапи на проучването ($\chi^2=31.40$, $p<0.0001$). Допълнително със сравнителния анализ на Mann-Whitney се

уточнява между кои етапи има статистически значимо различие. На фигура 21 са посочени резултатите от този анализ.

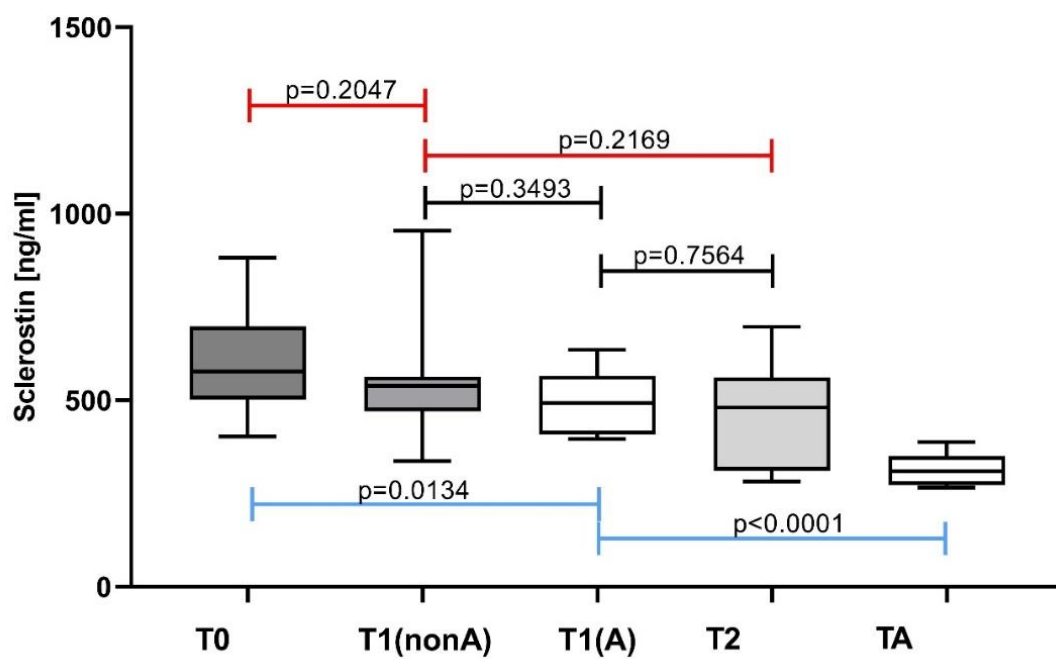


Фигура 21. Различия в серумните нива на Scl в хода на терапията на NDMM пациентите. (Приложен е Mann-Whitney тест)

Базисните серумни нива на Scl (T0) се отличават значимо в сравнение с тези, определени във всички останали етапи от проучването, като степента на значимост постепенно нараства: още след провеждането на първите 4 цикъла химиотерапия нивата значимо спадат ($p < 0.0271$). При нетрансплантираните пациенти след допълнителните 4 цикъла химиотерапия се открива още по-значимо спадане ($p < 0.0086$), докато при трансплантираните пациенти се наблюдава най-значимото снижаване на серумните нива на Scl ($p < 0.0001$). Нивата в етап T1 не се различават значимо от тези на нетрансплантираните в края на проучвания период (T1 vs T2: $p = 0.2645$), докато при трансплантираните пациенти е постигнато значимо по-ниско снижение (T1 vs TA, $p < 0.0001$). Но на етап T1 серумните нива на Scl са значимо по-високи от тези в контролната група ($p < 0.0001$). В края на проучвания период (етапи T2 и TA) нивата между двете групи пациенти (нетрансплантирани / трансплантирани) показват статистическо значимо различие помежду си (T2 vs TA: $p = 0.0101$), като нивата на нетрансплантираните са по-високи от тези на трансплантираните пациенти. Установява се, че нивата им се различават значимо от тези на контролната група (TA vs Controls: $p < 0.0001$; T2 vs Controls: $p < 0.0001$).

Достигналите до етап T1 пациенти се преоценяват, за да се вземе решение кои от тях ще бъдат трансплантирани – T1(A) субгрупа и кои няма да бъдат трансплантирани – T1(nonA) субгрупа. Медианата и съответният IQR за T1(nonA) са 539.1 ng/ml (470.0 – 562.6), а за T1(A) са 493.2 ng/ml (408.3 – 565.6).

С теста на Kruskal–Wallis се установява, че съществува статистически значимо различие между нивата на Scl, изследвани в различните етапи на проучването ($\chi^2=18.27$, $p<0.0004$). Чрез Mann-Whitney теста е изследвано наличието на статистически значимо различие в нивата на Scl между T1(A) и T1(nonA), както и при сравнението им с нивата, измерени в останалите етапи от проучването (фигура 22).



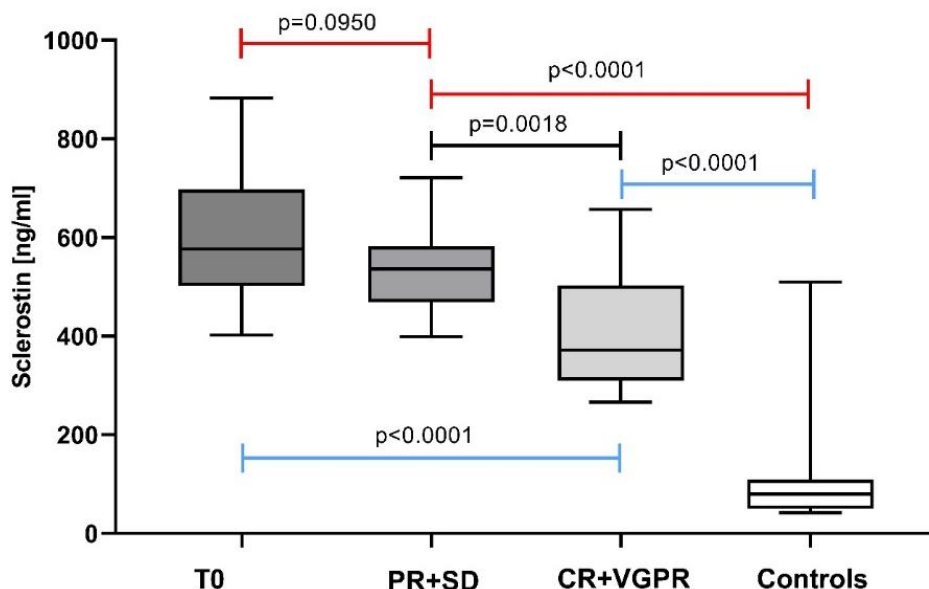
Фигура 22. Различия в серумните нива на Scl на субгрупите в хода на терапията (Приложен е Mann-Whitney тест)

Тъй като T1(A) пациентите са постигнали CR и VGPR още на този етап (етап T1), техните нива се различават значимо от базисните нива преди започване на лечението (T1(A) vs T0, $p=0.0134$), но все още са значимо по-високи от нивата, които са постигнали три месеца след трансплантацията (T1(A) vs TA, $p<0.0001$). На този етап от лечението, T1(nonA) пациентите задържат високи серумни нива на Scl, неразличаващи се от базисните нива ($p=0.2047$). На етап T2 нетрансплантираните пациенти не постигат значимо понижение на нивата си спрямо T1(nonA), $p=0.2169$ (фигура 22).

При сравнение между T1(A) и T1(nonA) субгрупите се установява, че на този начален етап от лечението (T1) те не се различават значимо по своите Scl нива ($p=0.3494$). Нивата в субгрупа T1(A) не се отличават от нивата на нетрансплантираните пациенти, наблюдавани на етап T2, $p=0.7564$, но се различават от тези в T0, $p=0.0134$ (фигура 22).

3.7 Серумни нива на Scl в зависимост от терапевтичния отговор

За да се оценят вариациите в Scl нивата според отговора на лечението, пациентите бяха категоризирани в две групи: (1) пациенти с постигнат CR и VGPR, независимо от етапа на лечение (T1 + T2 + TA), в който са го постигнали и (2) пациенти с постигнат PR и SD. Наблюдават се значимо по-ниски стойности ($p=0.0018$) за серумните нива на Scl в групата с CR и VGPR (медиана 372.2 ng/mL и IQR 310.1 – 503.2) в сравнение с тези в групата с PR и SD (медиана 536.4 ng/mL и IQR 469.1 – 582.7). Освен това пациентите с CR и VGPR имат значително по-ниски нива за тествания параметър спрямо неговите изходни нива ($p<0.0001$) но се различават от тези на контролната група ($p<0.0001$). Обратни са наблюденията за групата с по-лош отговор. Нивата на Scl при пациентите с PR и SD не се различават от базисните нива в етап T0 ($p=0.0950$) и са значимо по-високи от тези в контролната група ($p<0.0001$) (фигура 23).



Фигура 23. Различия в серумните нива на Scl според отговора към терапията.
(Приложен е Mann-Whitney тест)

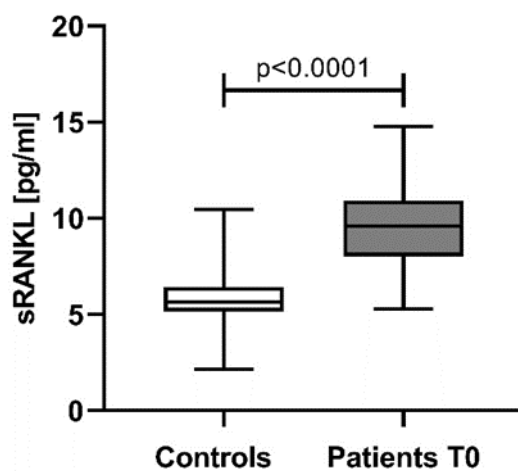
Проследиха се изходните нива на етап T0 за двете групи пациенти. При пациентите с постигнат CR и VGPR медианата и съответният IQR са 562.7 ng/ml (498.0 – 846.6), а при тези с PR и SD медианата и съответният IQR са 605.7 ng/ml (501.6 – 636.5). С Mann-Whitney теста не се установи значимо различие между тях ($p>0.9999$).

4. sRANKL

4.1 Базисни серумни нива на sRANKL при новодиагностицирани пациенти с мултиплен миелом (NDMM)

Серумните нива на sRANKL при NDMM пациенти са изследвани веднага след поставяне на диагнозата и преди започване на лечението. При използване на теста на Shapiro-Wilk's се установи не-Гаусовото разпределение на резултатите, което обосновава използването на непараметрични методи за статистически анализ на изследвания параметър.

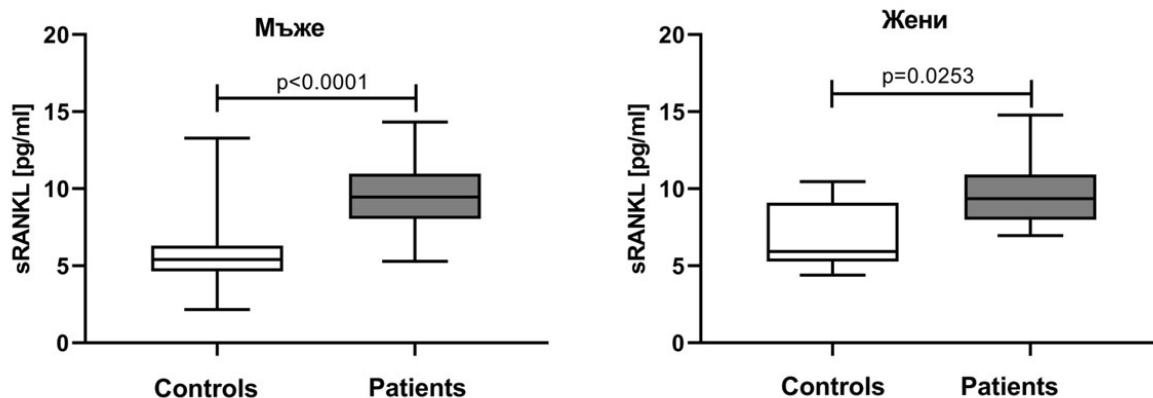
Медианата и съответният интерквартилен обхват на серумните нива на sRANKL за пациентската група са 9.592 pg/mL (IQR: 8.033 – 10.92 pg/mL), а за контролната група са 5.665 pg/mL (IQR: 5.153 – 6.441 pg/mL). Така серумните нива на sRANKL в пациентската група надвишават с близо 70% тези, наблюдавани в контролната група. Mann-Whitney сравнителният анализ установява сигнификантно различие между двете изследвани групи ($p < 0.0001$, фигура 24).



Фигура 24. Сравнение на серумните нива на sRANKL в двете изследвани групи.

(Приложен е Mann-Whitney тест)

Изследвано е влиянието на пола върху серумните нива на sRANKL. И в двете групи (пациентска и контролна) не се откриват статистически значими различия в зависимост от пола (таблица 22), но се запазва значимото различие между болните и здрави мъже, както и между болните и здрави жени (фигура 25).



Фигура 25. Сравнение на серумните нива на sRANKL в двете изследвани групи в зависимост от пола. (Mann-Whitney тест)

Таблица 23. Влияние на пола върху серумните нива на sRANKL в пациентската и контролна групи.

Изследвана група	Пол	N	sRANKL [ng/ml]		P value
			Медиана	IQR	
NDMM пациенти	Мъже	20	9.456	8.050 – 10.98	0.7914
	Жени	21	9.650	8.022 – 10.92	
Контролни индивиди	Мъже	18	5.409	4.519 – 6.181	0.1007
	Жени	15	5.923	5.281 – 9.099	

При сравнителния анализ е приложен Mann-Whitney тест.

Интересно е да се отбележи, че в групата на NDMM пациентите и в контролната група мъжете са с малко по-ниски стойности на sRANKL в сравнение с жените.

Изследвано е и влиянието на фактора възраст върху нивата на sRANKL. Пациентската и контролна групи са подразделени в две допълнителни възрастови подгрупи. Група А включва пациентите под 65 годишна възраст, а в група В са включени пациентите над 65 годишна възраст. И в двете изследвани групи не са установени статистически значими различия в зависимост от възрастта (таблица 24).

Таблица 24. Влияние на възрастта върху серумните нива на Dkk-1 в пациентската и контролна групи.

Изследвана група	Възраст	N	sRANKL [ng/ml]		P value
			Медиана	IQR	
NDMM пациенти	Група А (<65 години)	24	9.226	7.189 – 10.55	0.1603
	Група В (>65 години)	17	9.650	8.676 – 11.54	
Контролни индивиди	Група А (<65 години)	25	5.665	4.772 – 7.625	0.7323
	Група В (>65 години)	8	5.923	5.345 – 6.246	

(Приложен е Mann-Whitney тест)

Оценено е и влиянието на бъбречната функция върху серумните нива на sRANKL, като пациентите са подразделени на две групи – с креатинин под и над 177 $\mu\text{mol/L}$. Медианата и съответния IQR за първата група са 9.341 ng/ml (8.016 – 10.73), а за втората – 10.55 ng/ml (9.362 – 12. 67). При провеждане на Mann-Whitney сравнителния тест не се установи значимо различие между двете изследвани групи ($p=0.1037$).

4.2 Серумни нива на sRANKL при NDMM пациентите в зависимост от стадия на заболяването

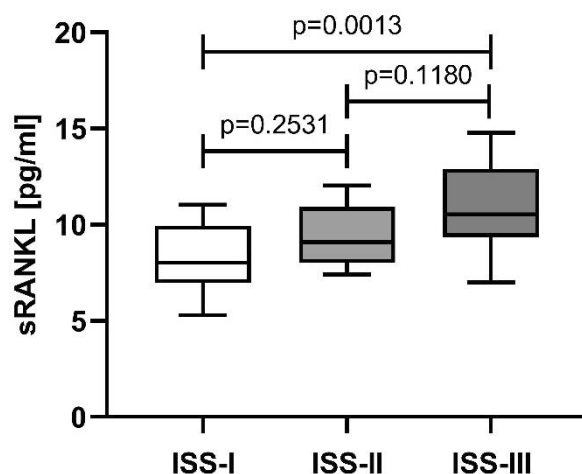
В таблица 25 са представени резултатите за серумните нива на sRANKL при пациентите, стратифицирани в три подгрупи според стадия на заболяването, определен според критериите на IMWG.

Таблица 25. Серумни нива на sRANKL при пациенти, стратифицирани в зависимост от стадия на заболяването.

Стадий на заболяването	N	sRANKL [ng/ml]	
		Медиана	IQR
ISS-I	16	8.033	6.967 – 9.935
ISS-II	6	9.093	8.017 – 10.92
ISS-III	19	10.28	9.320 – 12.89

Наблюдава се постепенно нарастване на стойностите на sRANKL с напредване на стадия на заболяването, като статистически значима разлика е

установена между първи и трети стадий на ММ ($p=0.0013$). Стойностите на sRANKL в стадий ISS-II са по-високи от тези в първи стадий и по-ниски от тези в трети стадий, но до статистическа значимост не се достига. Резултатите от сравнителния анализ са показани на фигура 26.



Фигура 26. Сравнение на серумните нива на sRANKL на пациентите, стратифицирани в три групи според стадия на заболяването им. (Приложен е Mann-Whitney тест)

4.3 Серумни нива на sRANKL при NDMM пациентите в зависимост от костната болест

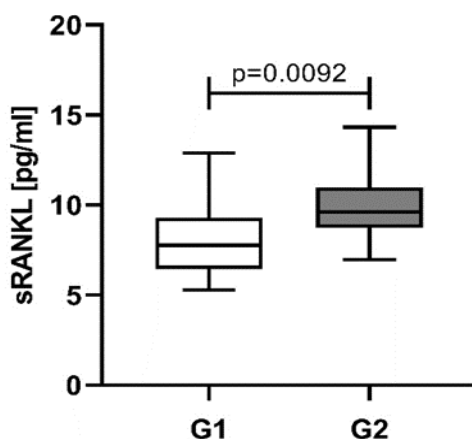
В зависимост от наличието на костни лезии пациентите са разделени в две подгрупи (G1 и G2). В таблица 26 са представени резултатите за серумните нива на sRANKL в така дефинираните две подгрупи.

Таблица 26. Серумни нива на sRANKL при пациенти, стратифицирани в подгрупи в зависимост от костната болест.

Костна болест	N	sRANKL [pg/ml]	
		Медиана	IQR
G1	9	7.754	6.442 – 9.290
G2	32	9.625	8.720 – 10.98

(G1 – група пациенти с нула до три остеолитични лезии; G2 – група пациенти с над три остеолитични лезии и/или налична/и патологична/и фрактура/и).

При провеждане на Mann-Whitney теста са установени статистически значимо по-високи стойности за пациентите от група G2 в сравнение с тези от група G1 ($p=0.0092$) (фигура 27).



Фигура 27. Сравнение на серумните нива на sRANKL в зависимост от степента на засягане на костната система. (Приложен е Mann-Whitney тест)

Освен това, пациентите от подгрупа G1 имат значимо по-високи стойности на sRANKL, когато се сравняват с контролната група (7.754pg/ml vs 5.665 pg/ml съответно, $p=0.0102$).

4.4 Серумни нива на sRANKL при NDMМ пациентите в зависимост от костно-мозъчната инфилтрация с плазматични клетки

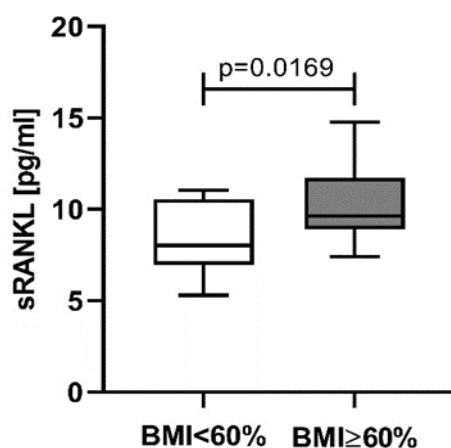
За да се оцени въздействието на туморния товар върху серумните нива на sRANKL, пациентите са разделени на две подгрупи в зависимост от костно-мозъчната инфилтрация с плазматични клетки. За разграничаване на подгрупите е използван cut-off от 60%. Резултатите са представени в таблица 27.

Таблица 27. Серумни нива на sRANKL при пациенти, стратифицирани в зависимост от костно-мозъчната инфилтрация с плазматични клетки.

BMI	N	sRANKL [pg/ml]	
		Медиана	IQR
PCs <60%	17	8.033	6.963 – 10.55
PCs ≥60%	24	9.625	8.900 – 11.73

(BMI – костно-мозъчната инфилтрация, PCs – плазматични клетки)

При провеждане на Mann-Whitney теста е установено статистически значимо различие ($p=0.0169$) между двете изследвани подгрупи (фигура 28).



Фигура 28. Сравнение на серумните нива на sRANKL в двете изследвани групи (Приложен е Mann-Whitney тест)

4.5 Изследване на корелационните взаимовръзки между серумните нива на sRANKL с рутинни хематологични, морфологични и биохимични показатели.

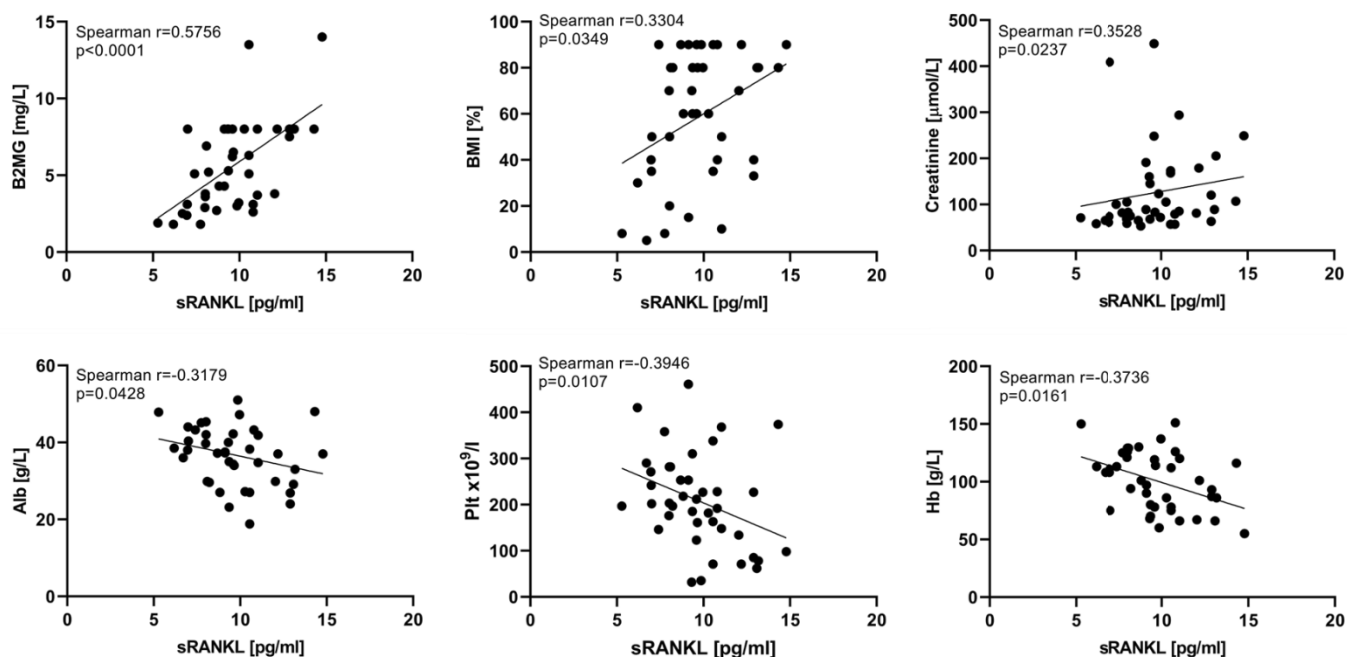
На таблица 28 са представени резултатите от проведения Spearman корелационен анализ.

Таблица 28. Взаимовръзки между серумните нива на sRANKL с рутинни хематологични, морфологични и биохимични показатели.

Изследван параметър	Spearman rho	P value
Hb	-0.3736	0.0161
WBC	-0.2237	0.1597
PLT	-0.3946	0.0107
BMI	0.3304	0.0349
β2MG	0.5756	<0.0001
Creatinine	0.3528	0.0237
LDH	0.05015	0.7555
TP	0.2089	0.1899
Alb	-0.3179	0.0428
Ca ²⁺	0.1890	0.2921

Hb – хемоглобин, WBC – левкоцити, PLT – тромбоцити, Alb – албумин, TP – общ белтък, LDH – лактатдехидрогеназа, β2MG – β2-микроглобулин, BMI – костно-мозъчна инфилтрация

Отрицателна и умерена по сила статистически значима корелация се установява между sRANKL и параметрите хемоглобин, тромбоцити и албумин, а положителна и значителна по сила корелация се открива с $\beta 2$ -микроглобулин, докато с креатинина и костно-мозъчната инфилтрация корелацията е положителна и умерена по сила. С останалите изследвани показатели взаимозависимост не се наблюдава. Значимите корелационни зависимости са илюстрирани на фигура 29.



Фигура 29. Корелационни зависимости между sRANKL и $\beta 2$ -микроглобулин, хемоглобин албумин, креатинин, тромбоцити и костно-мозъчна инфилтрация

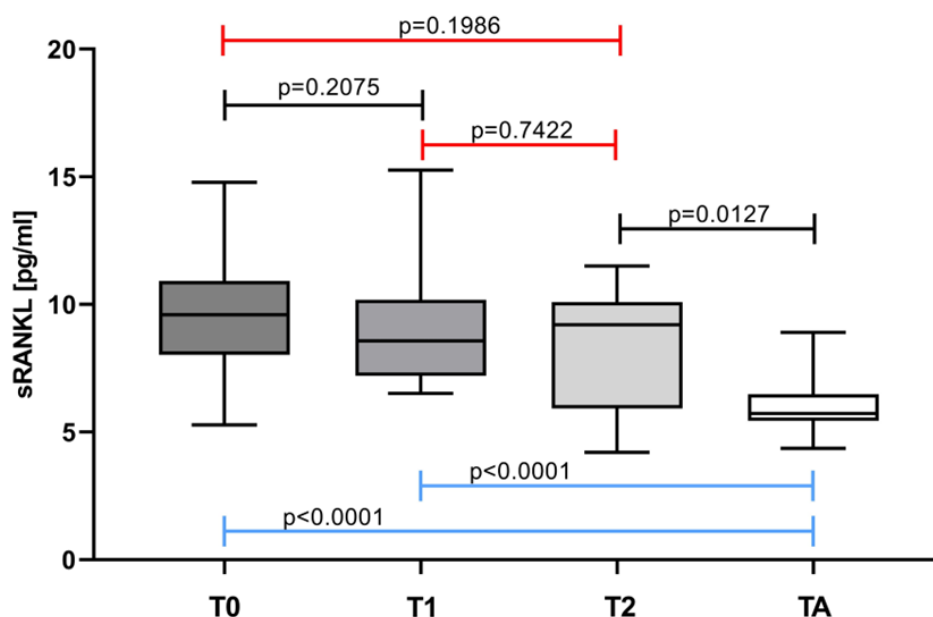
4.6 Серумни нива на sRANKL при NDMM пациентите в хода на тяхното лечение

За да се проучи дали в хода на лечението настъпват промени в серумните нива на sRANKL, те са изследвани според дизайна на проучването трикратно, през трите предварително дефинирани етапа (T0, T1, T2 или TA). Резултатите са посочени в таблица 29.

Таблица 29. Промени в серумните нива на sRANKL в хода на терапията.

Етапи	N	sRANKL [pg/ml]	
		Медиана	IQR
T0	41	9.592	8.033 – 10.92
T1	22	8.575	7.201 – 10.18
T2	11	9.210	5.925 – 10.09
TA	10	5.733	5.441 – 6.479

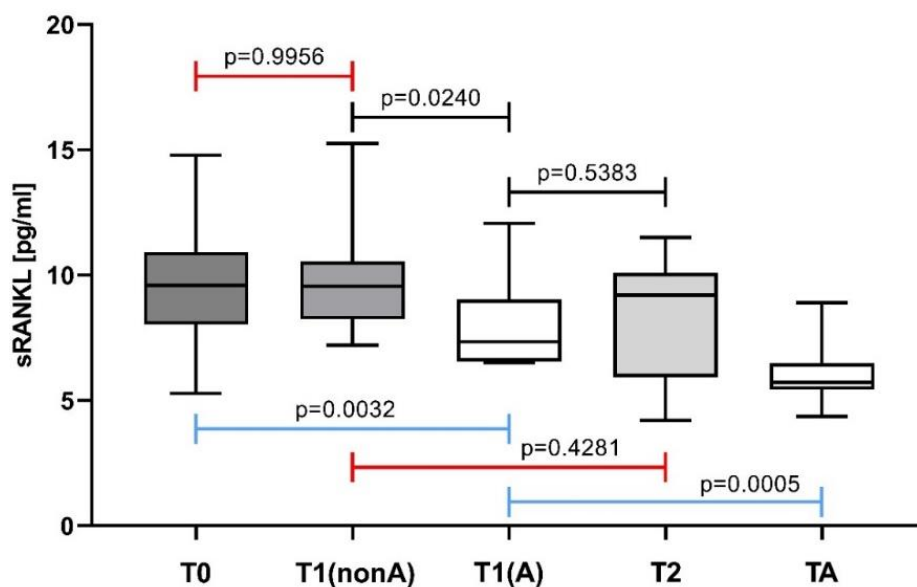
Проведен е тестът на Kruskal–Wallis, за да се съпоставят едновременно повече от две независими групи (T0, T1, T2 и TA) с не-Гаусово разпределени резултати за sRANKL. С помощта на този тест се установява, че съществува статистически значимо различие между тях ($\chi^2=20.45$, $p<0.0001$). Допълнително с помощта на Mann-Whitney теста се уточнява какво е различието между отделните групи. На фигура 30 са посочени резултатите от този анализ.



Фигура 30. Различия в серумните нива на sRANKL в хода на терапията на NDMM пациентите.

След провеждането на първите 4 курса химиотерапия серумните нива на sRANKL не се различават от базисните (T1 vs T0: $p=0.2075$). След допълнителния цикъл от 4 курса химиотерапия, отново не се достига до значимо различие от базисните нива (T2 vs T0: $p=0.1986$). В сравнение с T1, нивата на sRANKL при нетрансплантираните пациенти в края на проучвания период (T2) не се различават (T2 vs T1: $p=0.7422$), докато нивата при трансплантираните пациенти в ТА значително се понижават (ТА vs T1: $p<0.0001$). В края на проучвания период (етапи T2 и ТА) нивата между двете групи пациенти (нетрансплантирани / трансплантирани) показват статистическо значимо различие помежду си (T2 vs ТА: $p=0.0127$). В сравнение с T0, нивата на sRANKL при нетрансплантираните пациенти спадат незначимо (T2 vs T0: $p=0.1986$), докато тези на трансплантираните пациенти показват значимо понижение (ТА vs T0: $p<0.0001$). Нивата на sRANKL в ТА се доближават до тези на контролната група (ТА vs Controls: $p=0.5614$), а тези в T2 и T1 остават значимо по-високи от нея (T2 vs Controls: $p=0.0060$ и T1 vs Controls: $p<0.0001$).

Достигналите до етап T1 пациенти се преоценяват, за да се вземе решение кои от тях ще бъдат трансплантирани – T1(A) субгрупа и кои няма да бъдат трансплантирани – T1(nonA) субгрупа. Медианата и съответният IQR за T1(nonA) са 9.560 pg/ml (8.248 – 10.550), а за T1(A) са 7.692 pg/ml (6.580 – 8.854). ($\chi^2=25.93$, $p<0.0001$). С теста на Kruskal–Wallis, сравняващ така сформирани групи едновременно, се установява, че съществува статистически значимо различие в нивата на sRANKL. Допълнително с Mann-Whitney теста се уточняват различията поотделно между групите (фигура 31).

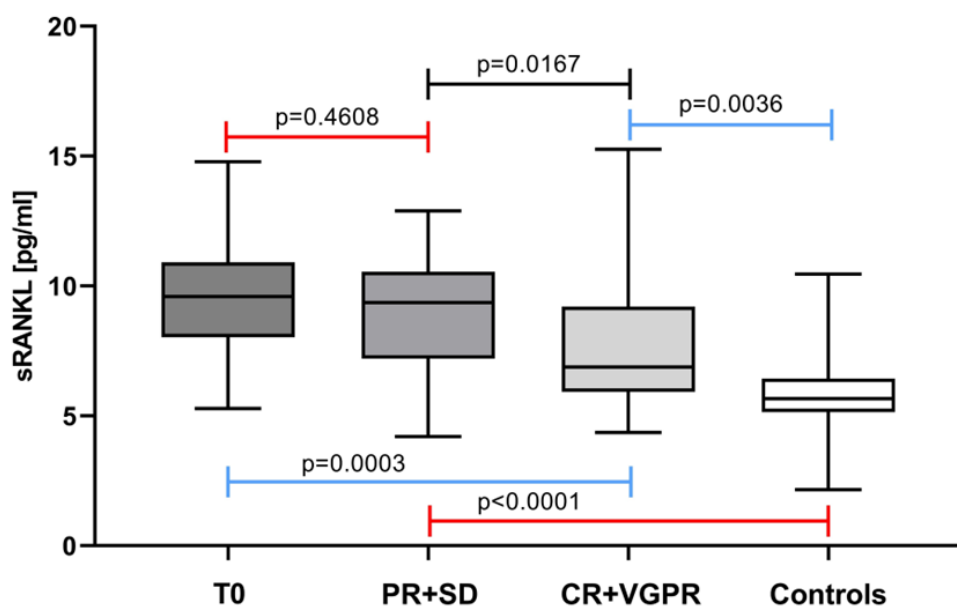


Фигура 31. Различия в серумните нива на sRANKL на субгрупите в хода на терапията.

Тъй като T1(A) пациентите са постигнали CR и VGPR още на този етап (етап T1), техните нива се различават значимо от базисните нива преди започване на лечението (T1(A) vs T0: $p=0.0032$), но все още са значимо по-високи от нивата, които постигат три месеца след трансплантацията (T1(A) vs TA: $p=0.0005$). На този етап от лечението, нетрансплантираните пациенти задържат високи серумни нива на sRANKL, неразличаващи се от базисните нива ($p=0.9956$). На етап T2 нивата на sRANKL се задържат все още високи и не се различават от тези в група T1(nonA) (T2 vs T1(nonA): $p=0.4281$). При сравнение между T1(A) и T1(nonA) субгрупите се установява, че още на този начален етап от лечението (T1) те се различават значимо по своите sRANKL нива ($p=0.0240$). Въпреки значимото снижение на sRANKL нивата в субгрупа T1(A) при сравнението им с тези от етап T2 статистически значима разлика не се установява (T1(A) vs T2: $p=0.5383$) (фигура 31).

4.7 Серумни нива на sRANKL в зависимост от терапевтичния отговор

За да се оценят вариациите в нивата на sRANKL според отговора на лечението, пациентите бяха категоризирани в две групи: (1) пациенти с постигнат CR и VGPR, независимо от етапа на лечение (T1 + T2 + TA), в който са го постигнали и (2) пациенти с постигнат PR и SD. Наблюдават се значимо по-ниски стойности ($p=0.0167$) за серумните нива на sRANKL в групата с CR и VGPR (медиана 6.880 pg/mL и IQR 5.923 – 9.210) в сравнение с тези в групата с PR и SD (медиана 9.361 pg/mL и IQR 7.201 – 10.55). Освен това пациентите с CR и VGPR имат значително по-ниски нива за тествания параметър спрямо неговите изходни нива ($p=0.0003$), но все още се различават от тези на контролната група ($p=0.0036$). Обратни са наблюденията за групата с по-лош отговор. Нивата на sRANKL при пациентите с PR и SD не се различават от базисните нива в етап T0 ($p=0.4608$) и са значимо по-високи от тези в контролната група ($p<0.0001$) (фигура 32).



Фигура 32. Различия в серумните нива на sRANKL според отговора към терапията.

(Приложен е Mann-Whitney тест)

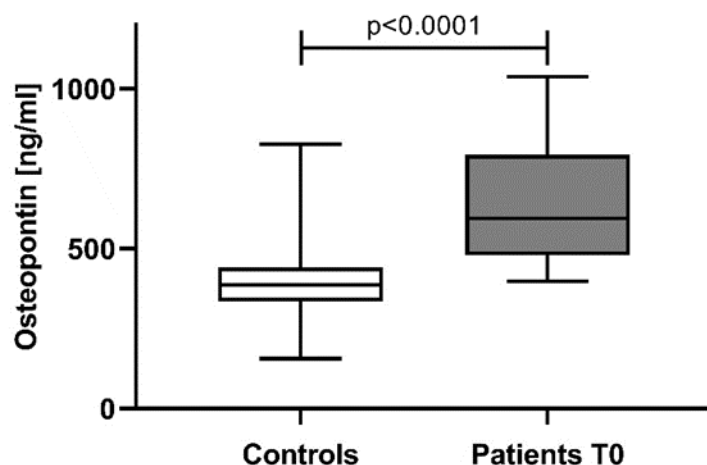
Проследиха се изходните нива на етап T0 за двете групи пациенти. При пациентите с постигнат CR и VGPR медианата и съответният IQR са 9.226 pg/ml (7.570 – 10.860), а при тези с PR и SD медианата и съответният IQR са 9.621 pg/ml (8.367 – 11.130). С Mann-Whitney теста не се установи значимо различие между тях ($p=0.4693$).

5. ОСТЕОПОНТИН

5.1 Базисни серумни нива на остеопонтин при новодиагностицирани пациенти с мултиплен миелом (NDMM)

Серумните нива на остеопонтин (OPN) при NDMM пациенти са изследвани веднага след поставяне на диагнозата и преди започване на лечението. При използване на теста на Shapiro-Wilk's се установи не-Гаусовото разпределение на резултатите, което обосновава използването на непараметрични методи за статистически анализ на изследвания параметър.

Медианата и съответният интерквартилен обхват на серумните нива на OPN за пациентската група са 596.0 ng/mL (IQR: 479.7 – 793.8 ng/mL), а за контролната група са 387.0 ng/mL (IQR: 335.9 – 441.9 ng/mL). Така серумните нива на OPN в пациентската група надвишават с над 54% тези, наблюдавани в контролната група. Mann-Whitney сравнителният анализ установява сигнификантно различие между двете изследвани групи ($p < 0.0001$, фигура 33).



Фигура 33. Сравнение на серумните нива на OPN в двете изследвани групи.
(Приложен е Mann-Whitney тест)

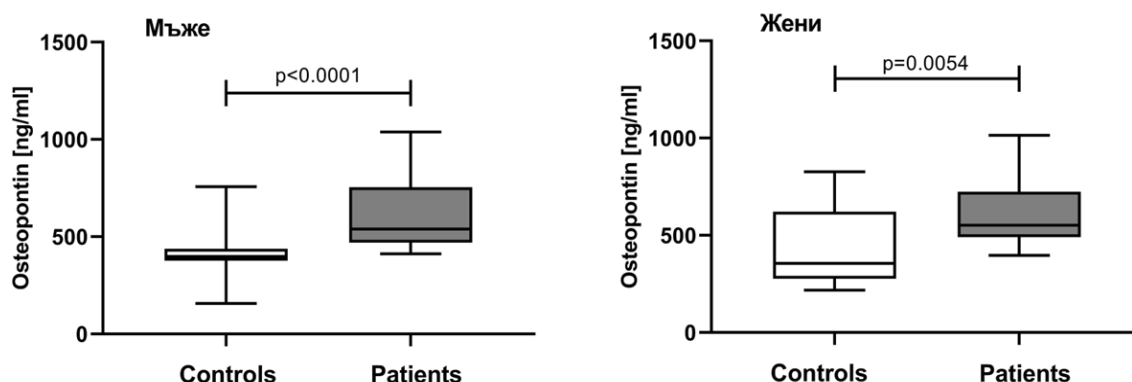
Изследвано е влиянието на пола върху серумните нива на OPN. И в двете групи (пациентска и контролна) не се откриват статистически значими различия в зависимост от пола (таблица 30).

Таблица 30. Влияние на пола върху серумните нива на OPN в пациентската и контролна групи.

Изследвана група	Пол	N	OPN [ng/ml]		P value
			Медиана	IQR	
NDMM пациенти	Мъже	20	539.1	469.3 – 754.9	0.5439
	Жени	21	552.0	490.6 – 724.0	
Контролни индивиди	Мъже	18	397.5	377.1 – 438.3	0.4296
	Жени	15	355.8	276.3 - 622.2	

(При сравнителния анализ е приложен Mann-Whitney тест.)

Разделянето по пол не променя установеното за общата група значимо различие между болни и здрави индивиди. Както болните мъже, така и болните жени са със значимо по-високи нива на OPN в сравнение със здравите мъже и жени съответно (фигура 34).



Фигура 34. Сравнение на серумните нива на OPN в двете изследвани групи в зависимост от пола. (Mann-Whitney тест)

Интересно е все пак да се отбележи, че докато в групата на NDMM пациентите, мъжете са с малко по-ниски стойности на OPN в сравнение с жените, то в контролната група обратно, жените са с около 11% по-ниски стойности отколкото мъжете.

Изследвано е и влиянието на фактора възраст върху нивата на OPN. Пациентската и контролна групи са подразделени във: възрастова подгрупа А, включваща пациентите под 65 годишна възраст, и във подгрупа В, включваща пациентите над 65 годишна възраст. И в двете изследвани групи не са установени статистически значими различия в зависимост от възрастта (таблица 31).

Таблица 31. Влияние на възрастта върху серумните нива на OPN в пациентската и контролна групи.

Изследвана група	Възраст	N	OPN [ng/ml]		P value
			Медиана	IQR	
NDMM пациенти	Група А (<65 години)	24	555.5	479.4 – 754.5	0.7635
	Група В (>65 години)	17	551.2	468.1 – 712.0	
Контролни индивиди	Група А (<65 години)	25	396.9	355.8 – 460.0	0.3162
	Група В (>65 години)	8	333.6	271.7 – 442.2	

(Приложен е Mann-Whitney тест)

Оценено е и влиянието на бъбречната функция върху серумните нива на OPN, като пациентите са подразделени на две групи – с креатинин под и над 177 μ mol/L. Медианата и съответния IQR за първата група са 551.5 ng/ml (472.0 – 701.0), а за втората – 715.0 ng/ml (577.7 – 920.1). При провеждане на Mann-Whitney сравнителния тест се установи значимо различие между двете изследвани групи ($p=0.0407$).

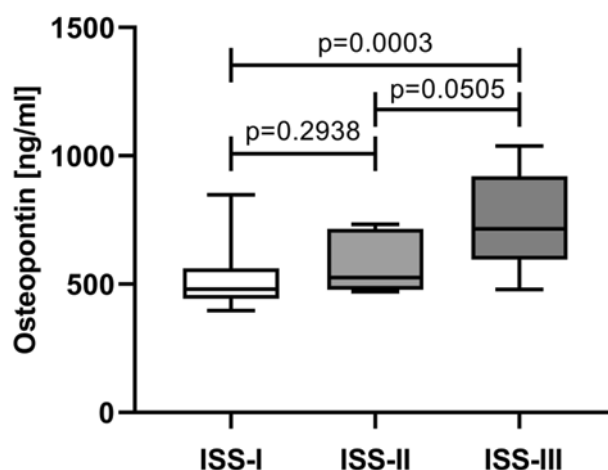
5.2 Серумни нива на OPN при NDMM пациентите в зависимост от стадия на заболяването

В таблица 32 са представени резултатите за серумните нива на OPN при пациентите, стратифицирани в три подгрупи според стадия на заболяването, определен според критериите на IMWG.

Таблица 32. Серумни нива на OPN при пациенти, стратифицирани в зависимост от стадия на заболяването.

Стадий на заболяването	N	OPN [ng/ml]	
		Медиана	IQR
ISS-I	16	480.0	442.8 – 562.0
ISS-II	6	526.2	477.7 – 715.0
ISS-III	19	715.0	596.0 – 920.1

Наблюдава се постепенно нарастване на стойностите на OPN с напредване на стадия на заболяването, като статистически значима разлика е установена между първи и трети стадий на MM ($p=0.0003$). Стойностите на OPN в стадий ISS-II са по-високи от тези в първи стадий без да се достига до значимо различие ($p=0.2938$), докато сравнени със стадий ISS-III са значимо по-ниски ($p=0.0505$). Резултатите от сравнителния анализ са показани на фигура 35.



Фигура 35. Сравнение на серумните нива на OPN на пациентите, стратифицирани в три групи според стадия на заболяването им. (Приложен е Mann-Whitney тест)

5.3 Серумни нива на OPN при NDMM пациентите в зависимост от костната болест

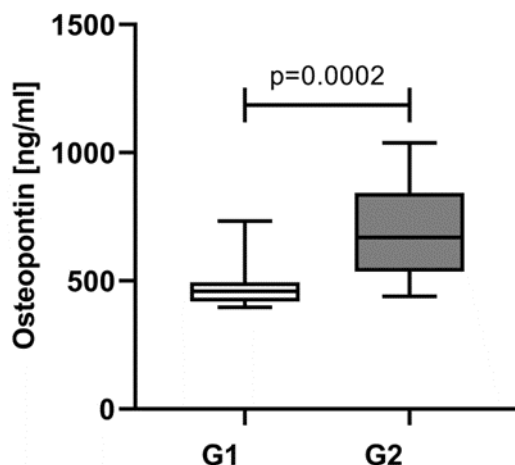
В зависимост от наличието на костни лезии пациентите са разделени в две подгрупи (G1 и G2). В таблица 33 са представени резултатите за серумните нива на OPN на пациентите в така дефинираните две подгрупи.

Таблица 33. Серумни нива на OPN при пациенти, стратифицирани в подгрупи в зависимост от костната болест.

Костна болест	N	OPN [ng/ml]	
		Медиана	IQR
G1	9	460.0	419.1 – 494.8
G2	32	669.8	535.5 – 843.1

(G1 – група пациенти с нула до три остеолитични лезии; G2 – група пациенти с над три остеолитични лезии и/или налична/и патологична/и фрактура/и).

При провеждане на Mann-Whitney теста е установено статистически значимо различие ($p=0.0002$) между пациентските подгрупи, подразделени в зависимост от тежестта на засягане на скелетната им система (фигура 36).



Фигура 36. Сравнение на серумните нива на OPN в двете изследвани групи. (Приложен е Mann-Whitney тест)

Пациентите от подгрупа G1 имат значимо по-високи стойности на OPN и в сравнение с контролната група (460.0 ng/ml vs 387.0 ng/ml съответно, $p=0.0146$).

5.4 Серумни нива на OPN при NDMМ пациентите в зависимост от костно-мозъчната инфилтрация с плазматични клетки

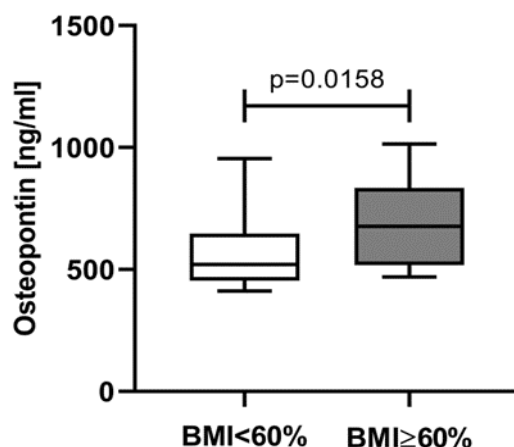
За да се оцени въздействието на туморния товар върху серумните нива на OPN, пациентите са разделени на две подгрупи в зависимост от костно-мозъчната инфилтрация с плазматични клетки. За разграничаване на подгрупите е използван cut-off от 60%. Резултатите са представени в таблица 34.

Таблица 34. Серумни нива на OPN при пациенти, стратифицирани в зависимост от костно-мозъчната инфилтрация с плазматични клетки.

BMI	N	OPN [ng/ml]	
		Медиана	IQR
PCs <60%	17	521.2	453.9 – 646.5
PCs ≥60%	24	676.7	517.7 – 834.3

(BMI – костно-мозъчната инфилтрация, PCs – плазматични клетки)

При провеждане на Mann-Whitney теста е установено статистически значимо различие ($p=0.0158$) между двете изследвани подгрупи (фигура 37).



Фигура 37. Сравнение на серумните нива на OPN в двете изследвани групи.

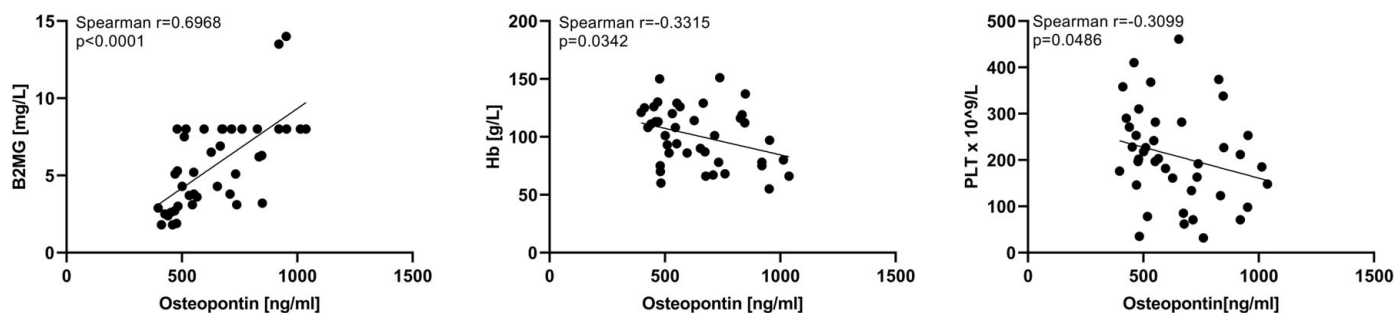
5.5 Изследване на корелационните взаимовръзки между серумните нива на OPN с рутинни хематологични, морфологични и биохимични показатели

На таблица 35 са представени резултатите от проведения Spearman корелационен анализ за установяване на взаимовръзки между серумните нива на OPN с рутинни хематологични, морфологични и биохимични показатели.

Таблица 35. Взаимовръзки между серумните нива на OPN с рутинни хематологични, морфологични и биохимични показатели.

Изследван параметър	Spearman rho	P value
Hb	-0.3315	0.0342
WBC	-0.1774	0.2673
PLT	-0.3099	0.0486
BMI	0.2607	0.0997
β 2MG	0.6968	<0.0001
Creatinine	0.6047	<0.0001
LDH	0.1802	0.2597
TP	0.1461	0.3621
Alb	-0.2791	0.0773
Ca ²⁺	0.08910	0.6219

Отрицателна и умерена по сила статистически значима корелация се установява между OPN и параметрите хемоглобин и тромбоцити, а положителна и значителна по сила статистически значима корелация се открива с β 2-микроглобулин и креатинин. С останалите изследвани показатели взаимозависимост не се наблюдава. Значимите корелационни зависимости са илюстрирани на фигура 38.



Фигура 38. Корелационни зависимости между OPN и β 2-микроглобулин, хемоглобин и тромбоцити.

5.6 Серумни нива на OPN при NDMM пациентите в хода на тяхното лечение

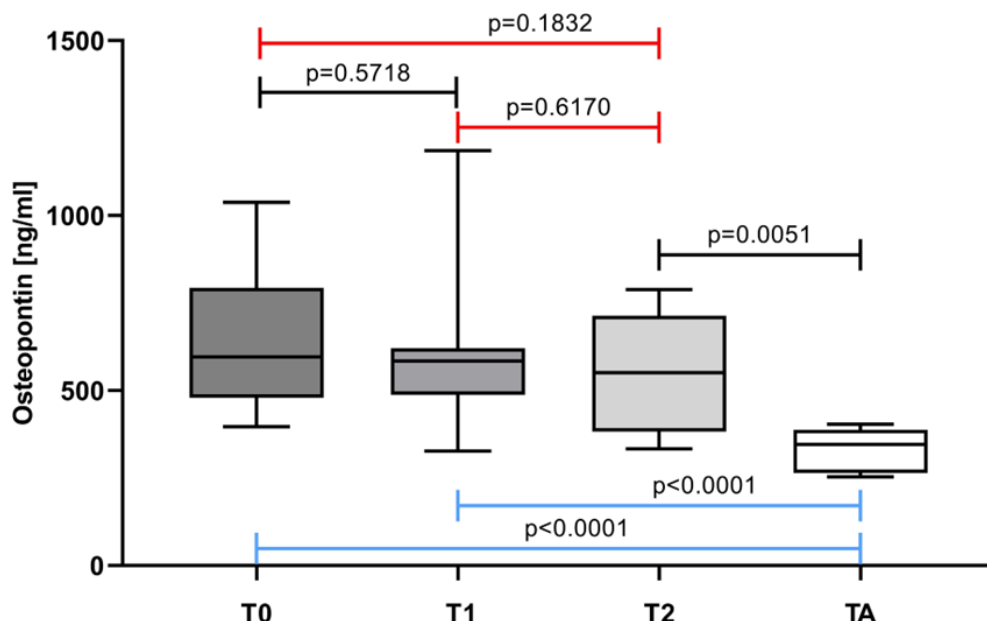
За да се проучи дали в хода на лечението настъпват промени в серумните нива на OPN, те са изследвани според дизайна на проучването трикратно през трите предварително дефинирани етапа (T0, T1, T2 или TA). Резултатите са посочени в таблица 36.

Таблица 36. Промени в серумните нива на OPN в хода на терапията.

Етапи	N	OPN [ng/ml]	
		Медиана	IQR
T0	41	596.0	479.7 – 793.8
T1	22	584.9	487.9 – 621.1
T2	11	551.0	383.2 – 714.1
TA	10	346.6	264.9 – 387.9

Проведен е тестът на Kruskal–Wallis, за да се съпоставят не-Гаусово разпределените резултати на повече от две независими групи. С помощта на този тест се установява, че съществува статистически значимо различие между нивата на OPN, изследвани в различните етапи на проучването ($\chi^2=24.7$,

$p < 0.0001$). Допълнително със сравнителния анализ на Mann-Whitney се уточнява между кои етапи има статистически значимо различие. На фигура 39 са посочени резултатите от този анализ.

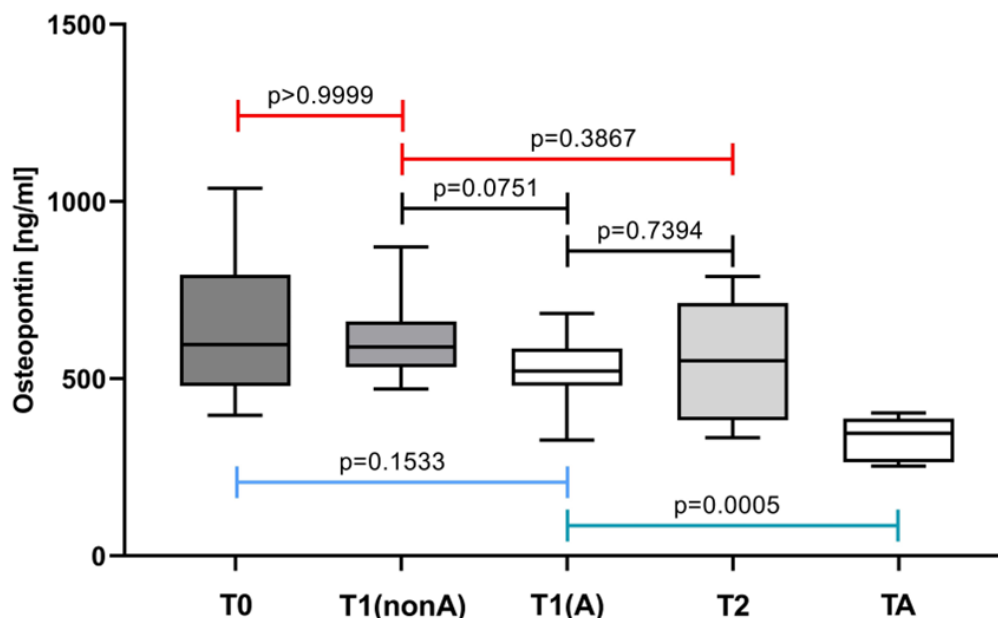


Фигура 39. Различия в серумните нива на OPN в хода на терапията на NDMM пациентите. (Приложен е Mann-Whitney тест)

Базисните серумни нива на OPN (T0) се понижават в отделните етапи от проучването, като както на етап T1, така и на етап T2 не се достига до статистическа значимост при сравнение на нивата им с тези на етап T0 ($p < 0.5718$ и $p = 0.1832$ съответно). При трансплантираните пациенти се наблюдава най-значимото снижаване на серумните нива на OPN спрямо T0 ($p < 0.0001$). Нивата в етап T1 не се различават значимо от тези на нетрансплантираните в края на проучвания период (T1 vs T2: $p = 0.6170$), докато при трансплантираните пациенти е постигнато значимо по-ниско понижаване на нивата (TA vs T1, $p < 0.0001$). В края на проучвания период (етапи T2 и TA) нивата между двете групи пациенти (нетрансплантирани / трансплантирани) показват статистически значимо различие помежду си (T2 vs TA: $p = 0.0051$), като нивата на нетрансплантираните са по-високи от тези на трансплантираните пациенти. При сравнение с контролната група трансплантираните пациенти постигат стойности неотличаващи се от тези на контролните индивиди (TA vs Controls: $p = 0.0996$), докато нивата в T2 са по-скоро значимо различни (T2 vs Controls: $p = 0.0506$). Подобно доближаване до стойностите на контролната група не се установява на етап T1 (T1 vs Controls: $p < 0.0001$).

Достигналите до етап T1 пациенти се преоценяват, за да се вземе решение кои от тях ще бъдат трансплантирани – T1(A) субгрупа и кои няма да бъдат

трансплантирани – T1(nonA) субгрупа. Медианата и съответният IQR за T1(nonA) са 589.5 ng/ml (533.0 – 662.3), а за T1(A) са 522.1 ng/ml (480.3 – 585.7). С теста на Kruskal–Wallis, сравняващ така сформирани групи едновременно, се установява, че съществува статистически значимо различие в нивата на OPN ($\chi^2=26.57$, $p<0.0001$). Допълнително с Mann-Whitney теста се уточняват различията поотделно между групите (фигура 40).



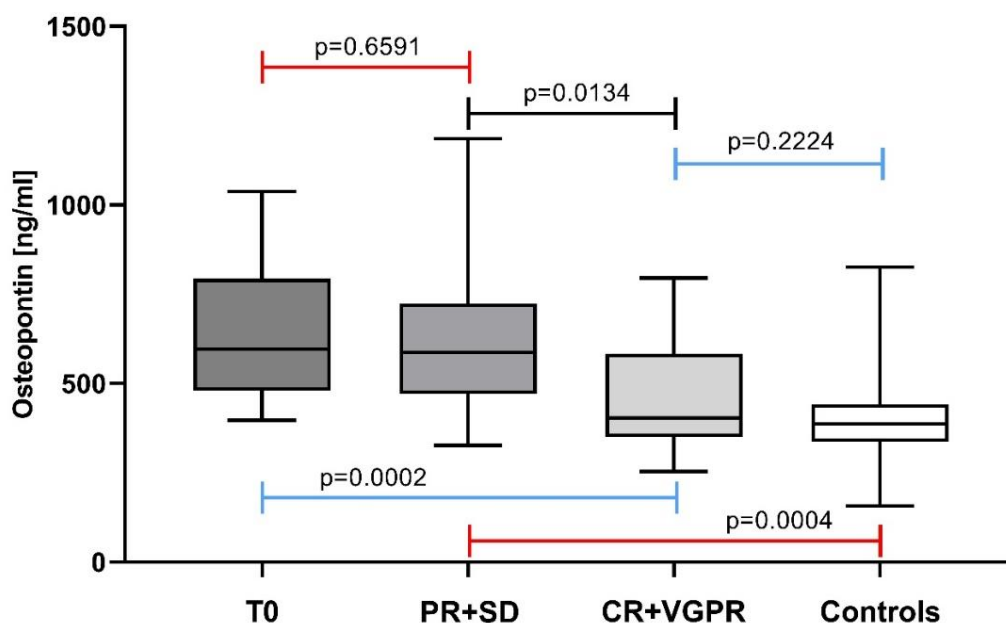
Фигура 40. Различия в серумните нива на OPN на субгрупите в хода на терапията. (Приложен е Mann-Whitney тест)

Серумните нива на OPN при пациентите, постигнали CR и VGPR на етап T1(A) не се различават значимо от базисните нива преди започване на лечението (T1(A) vs T0, $p=0.1533$), но все още са значимо по-високи от нивата, които са постигнали три месеца след трансплантацията (T1(A) vs TA, $p=0.0005$). На този етап от лечението, T1(nonA) пациентите задържат високи серумни нива на OPN, неразличаващи се от базисните нива ($p>0.9999$). На етап T2 нетрансплантираните пациенти не показват значимо понижение на нивата си спрямо T1(nonA), $p=0.3867$. При сравнение между T1(A) и T1(nonA) субгрупите се установява, че на този начален етап от лечението (T1) те не се различават значимо по своите OPN нива ($p=0.0751$). Нивата в субгрупа T1(A) не се отличават от нивата на нетрансплантираните пациенти, наблюдавани на етап T2, $p=0.7394$ (фигура 40).

5.7 Серумни нива на OPN в зависимост от терапевтичния отговор

За да се оценят вариациите в OPN нивата според отговора на лечението, пациентите бяха категоризирани в две групи: (1) пациенти с постигнат CR и VGPR, независимо от етапа на лечение (T1 + T2 + TA), в който са го постигнали

и (2) пациенти с постигнат PR и SD. Наблюдават се значимо по-ниски стойности ($p=0.0134$) за серумните нива на OPN в групата с CR и VGPR (медиана 403.8ng/mL и IQR 350.2 – 583.4) в сравнение с тези в групата с PR и SD (медиана 586.9ng/mL и IQR 471.4 – 724.1). Освен това пациентите с CR и VGPR имат значително по-ниски нива за тествания параметър спрямо неговите изходни нива ($p=0.0002$), които не се различават от тези на контролната група ($p=0.2224$). Обратни са наблюденията за групата с по-лош отговор. Нивата на OPN при пациентите с PR и SD не се различават от базисните нива в етап T0 ($p=0.6591$) и са значимо по-високи от тези в контролната група ($p=0.0004$) (фигура 41).



Фигура 41. Различия в серумните нива на OPN според отговора към терапията. (Приложен е Mann-Whitney тест)

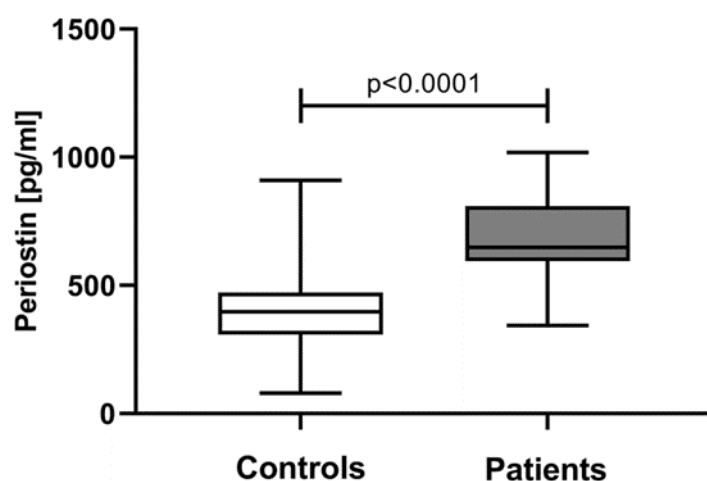
Проследиха се изходните нива на етап T0 за двете групи пациенти. При пациентите с постигнат CR и VGPR медианата и съответният IQR са 609.6 ng/ml (518.4 – 743.8), а при тези с PR и SD медианата и съответният IQR са 568.8 ng/ml (479.9 – 831.9). С Mann-Whitney теста не се установи значимо различие между тях ($p=0.9118$).

6. ПЕРИОСТИН

6.1 Базисни серумни нива на периостин при новодиагностицирани пациенти с мултиплен миелом (NDMM)

Серумните нива на периостин (PON) при NDMM пациенти са изследвани веднага след поставяне на диагнозата и преди започване на лечението. При използване на теста на Shapiro-Wilk's се установи не-Гаусовото разпределение на резултатите, което обосновава използването на непараметрични методи за статистически анализ на изследвания параметър.

Медианата и съответният интерквартилен обхват на серумните нива на PON за пациентската група са 648.4 pg/mL (IQR: 594.4 – 809.9 pg/mL), а за контролната група са 396.9 pg/mL (IQR: 308.6 – 471.9 pg/mL). Така серумните нива на PON в пациентската група надвишават с над 63% тези, наблюдавани в контролната група. Mann-Whitney сравнителният анализ установява сигнификантно различие между двете изследвани групи ($p < 0.0001$, фигура 42).



Фигура 42. Сравнение на серумните нива на PON в двете изследвани групи.
(Приложен е Mann-Whitney тест)

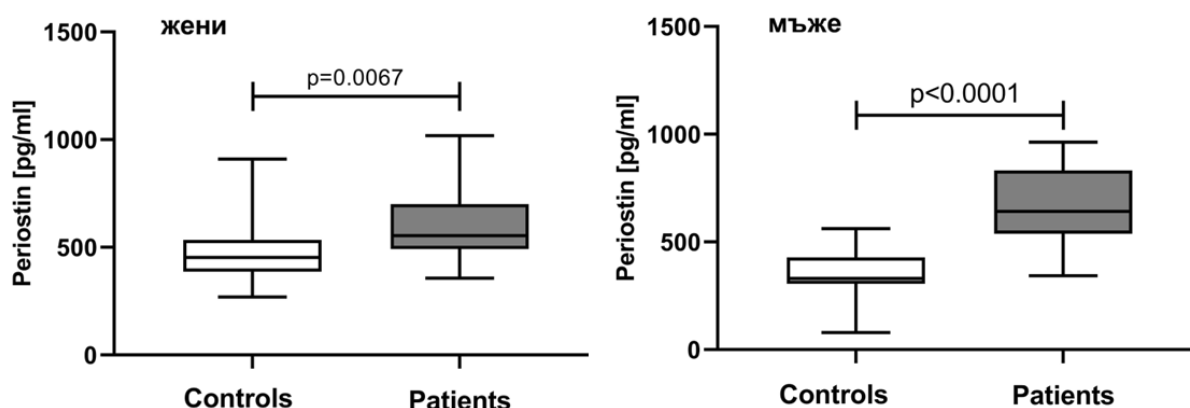
Изследвано е влиянието на пола върху серумните нива на PON. Докато в пациентската група не се открива полово различие ($p = 0.2680$), то в контролната група жените имат статистически значимо по-високи стойности в сравнение с мъжете ($p = 0.0176$) (таблица 37).

Таблица 37. Влияние на пола върху серумните нива на PON в пациентската и контролна групи.

Изследвана група	Пол	N	PON [pg/ml]		P value
			Медиана	IQR	
NDMM пациенти	Мъже	20	641.8	538.7 – 832.5	0.2680
	Жени	21	554.7	492.0 – 700.2	
Контролни индивиди	Мъже	18	330.6	305.5 – 456.1	0.0176
	Жени	15	453.6	386.6 – 534.0	

При сравнителния анализ е приложен Mann-Whitney тест.

Разделянето по пол не променя установеното за общата група значимо различие между болни и здрави индивиди. Както болните мъже, така и болните жени са със значимо по-високи нива на PON в сравнение със здравите мъже и жени съответно (фигура 43).



Фигура 43. Сравнение на серумните нива на PON в двете изследвани групи в зависимост от пола. (Mann-Whitney тест)

Изследвано е и влиянието на фактора възраст върху нивата на PON. Пациентската и контролна групи са подразделени в две допълнителни възрастови подгрупи. Група А включва пациентите под 65 годишна възраст, а в група В са включени пациентите над 65 годишна възраст. И в двете изследвани групи не са установени статистически значими различия в зависимост от възрастта (таблица 38).

Таблица 38. Влияние на възрастта върху серумните нива на PON в пациентската и контролна групи.

Изследвана група	Възраст	N	PON [pg/ml]		P value
			Медиана	IQR	
NDMM пациенти	Група А (<65 години)	24	619.7	492.4 – 720.6	0.8291
	Група В (>65 години)	17	638.1	511.4 – 820.3	
Контролни индивиди	Група А (<65 години)	25	383.2	305.5 – 446.4	0.1668
	Група В (>65 години)	8	468.4	396.9- 498.6	

(Приложен е Mann-Whitney тест)

Оценено е и влиянието на бъбречната функция върху серумните нива на PON, като пациентите са подразделени на две групи – с креатинин под и над 177 μ mol/L. Медианата и съответния IQR за първата група са 616.1 pg/ml (523.2 – 716.8), а за втората – 645.5 pg/ml (492.0 – 833.4). При провеждане на Mann-Whitney сравнителния тест не се установи значимо различие между двете изследвани групи ($p=0.7745$).

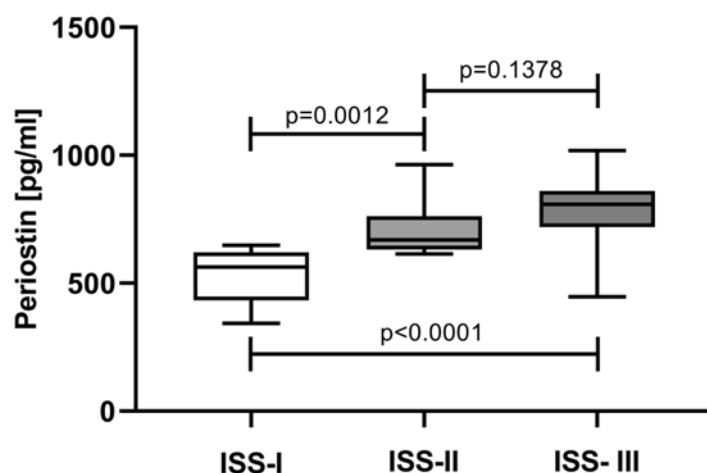
6.2 Серумни нива на PON при NDMM пациентите в зависимост от стадия на заболяването

В таблица 39 са представени резултатите за серумните нива на PON при пациентите, стратифицирани в три подгрупи според стадия на заболяването, определен според критериите на IMWG.

Таблица 39. Серумни нива на PON при пациенти, стратифицирани в зависимост от стадия на заболяването.

Стадий на заболяването	N	PON [pg/ml]	
		Медиана	IQR
ISS-I	16	563.2	432.8 – 620.6
ISS-II	6	669.0	632.3 – 761.4
ISS-III	19	807.6	719.6 – 860.5

Наблюдава се постепенно нарастване на стойностите на PON с напредване на стадия на заболяването, като статистически значима разлика е установена както между първи и втори стадий на ММ ($p=0.0012$), така и между първи и трети стадий ($p<0.0001$). Стойностите на PON в стадий ISS-III са по-високи от тези в ISS-II, но до статистическа значимост не се достига. Резултатите от сравнителния анализ са показани на фигура 44.



Фигура 44. Сравнение на серумните нива на PON на пациентите, стратифицирани в три групи според стадия на заболяването им. (Приложен е Mann-Whitney тест)

6.3 Серумни нива на PON при NDMM пациентите в зависимост от костната болест

В зависимост от наличието на костни лезии пациентите са разделени в две подгрупи –G1 и G2. В таблица 40 са представени резултатите за серумните нива на PON на пациентите в така дефинираните две подгрупи.

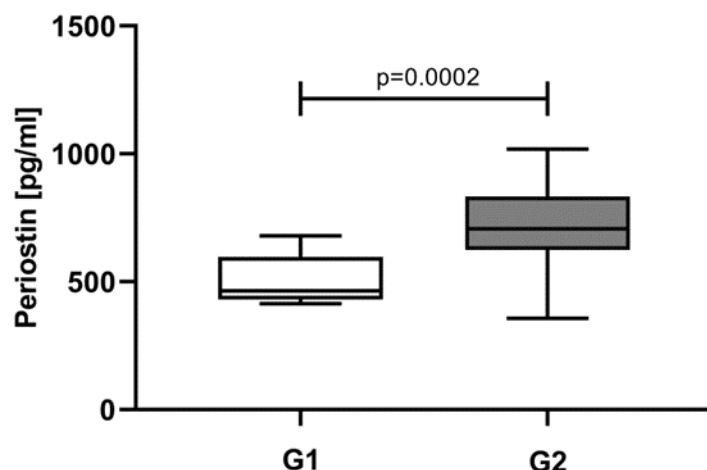
Таблица 40. Серумни нива на PON при NDMM пациенти, стратифицирани в подгрупи в зависимост от костната болест.

Костна болест	N	PON [pg/ml]	
		Медиана	IQR
G1	9	463.8	431.0 – 596.4
G2	32	706.8	624.0 – 833.6

(G1 – група пациенти с нула до три остеолитични лезии; G2 – група пациенти с над три остеолитични лезии и/или налична/и патологична/и фрактура/и)

Вижда се, че пациентите от група G2 са с много по-високи стойности на PON в сравнение с тези на пациентите от G1 и при провеждане на Mann-

Whitney сравнителния анализ се установява статистически значимо различие между тях ($p=0.0002$) (фигура 45).



Фигура 45. Сравнение на серумните нива на PON в двете изследвани групи, подразделени в зависимост от тежестта на засягане на костната система. (Приложен е Mann-Whitney тест)

Важно е да се отбележи, че пациентите от подгрупа G1 имат значимо по-високи стойности на PON в сравнение с контролната група (463.8 pg/ml vs 396.9 pg/ml съответно, $p=0.0231$).

6.4 Серумни нива на PON при NDMM пациентите в зависимост от костно-мозъчната инфилтрация с плазматични клетки

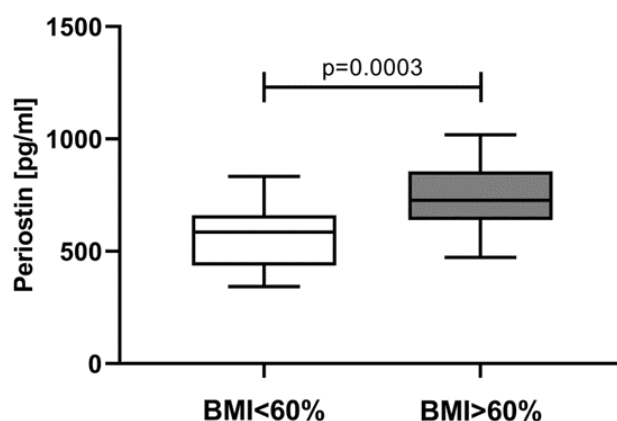
За да се оцени въздействието на туморния товар върху серумните нива на PON, пациентите са разделени на две подгрупи в зависимост от костно-мозъчната инфилтрация с плазматични клетки. За разграничаване на подгрупите е използван cut-off от 60%. Резултатите са представени в таблица 41.

Таблица 41. Серумни нива на PON при пациенти, стратифицирани в зависимост от костно-мозъчната инфилтрация с плазматични клетки.

BMI	N	PON [pg/ml]	
		Медиана	IQR
PCs <60%	17	585.6	436.3 – 660.1
PCs ≥60%	24	726.9	639.9 – 855.1

(BMI – костно-мозъчната инфилтрация, PCs – плазматични клетки)

При провеждане на Mann-Whitney теста е установено статистически значимо различие ($p=0.0003$) между двете изследвани подгрупи (фигура 46).



Фигура 46. Сравнение на серумните нива на PON в двете изследвани групи.
(Приложен е Mann-Whitney тест)

6.5 Изследване на корелационните взаимовръзки между серумните нива на PON с рутинни хематологични, морфологични и биохимични показатели

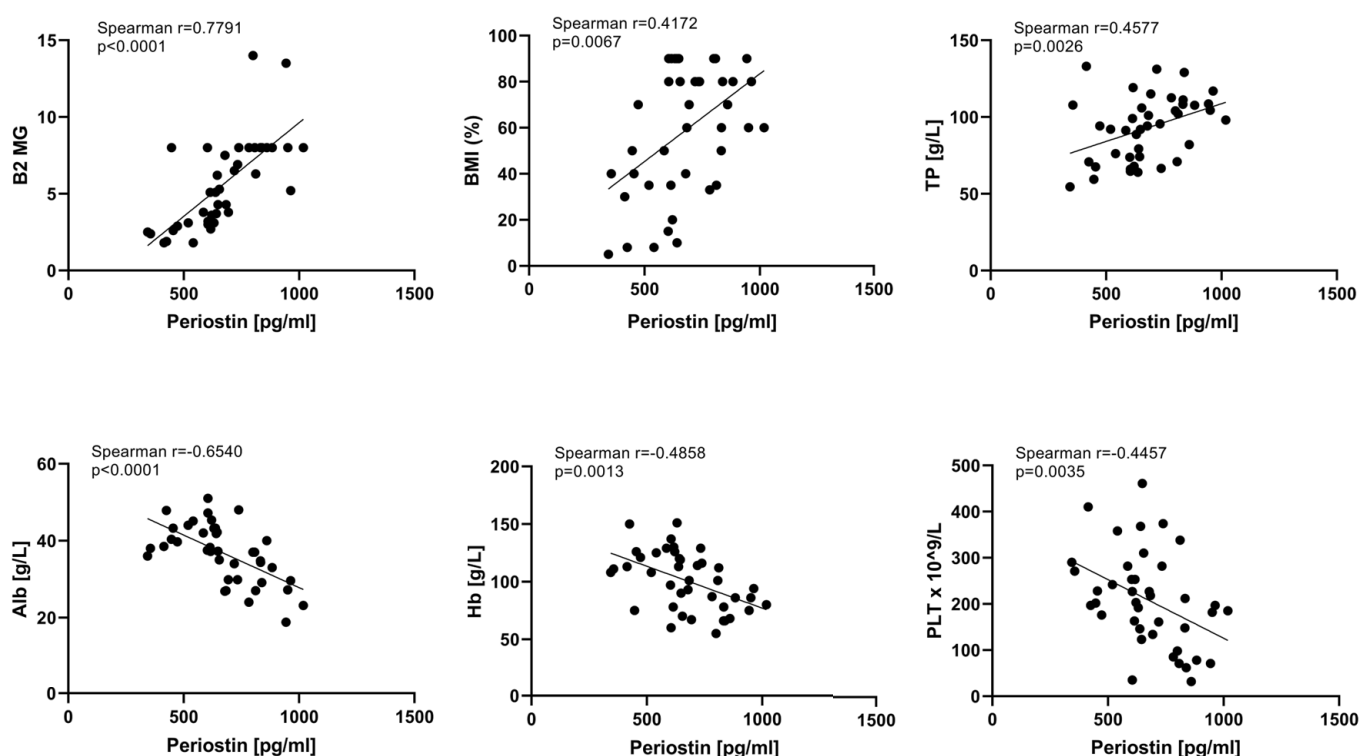
На таблица 42 са представени резултатите от проведения Spearman корелационен анализ.

Таблица 42. Взаимовръзки между серумните нива на PON с рутинни хематологични, морфологични и биохимични показатели.

Изследван параметър	Spearman rho	P value
Hb	-0.4858	0.0013
WBC	-0.1474	0.3578
PLT	-0.4457	0.0035
BMI	0.4172	0.0067
β 2MG	0.7791	<0.0001
Creatinine	0.5311	0.0004
LDH	0.08372	0.6028
TP	0.4577	0.0026
Alb	-0.6540	<0.0001
Ca ²⁺	-0.1451	0.4204

Hb – хемоглобин, WBC – левкоцити, PLT – тромбоцити, Alb – албумин, TP – общ белтък, LDH – лактатдехидрогеназа, β 2MG – β 2-микроглобулин, BMI – костно-мозъчна инфилтрация

Отрицателна и умерена по сила статистически значима корелация се установява между PON и параметрите хемоглобин и тромбоцити, а с албумин – отрицателна и значителна корелация. Положителна и умерена по сила статистически значима корелация се открива между PON и BMI, а с $\beta 2$ -микроглобулин и креатинин – положителна и значителна по сила корелация. С останалите изследвани показатели взаимозависимост не се наблюдава. Значимите корелационни зависимости са илюстрирани на фигура 47.



Фигура 47. Корелационни зависимости между PON и $\beta 2$ -микроглобулин, хемоглобин, тромбоцити, BMI, общ белтък и албумин.

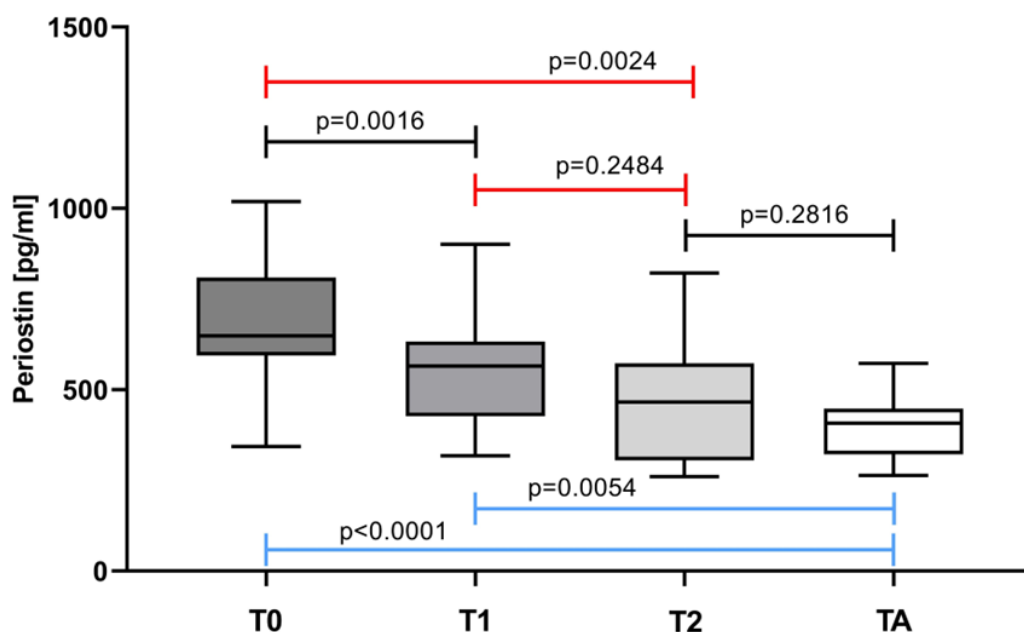
6.6 Серумни нива на PON при NDMM пациентите в хода на тяхното лечение

Освен при диагнозата (T0), серумните нива на PON са изследвани и в края на всеки един от трите предварително дефинирани етапа (T1, T2 или TA), за да се проучи дали в хода на лечението настъпват промени в нивата му. Резултатите са посочени в таблица 43.

Таблица 43. Промени в серумните нива на PON в хода на терапията.

Етапи	N	PON [pg/ml]	
		Медиана	IQR
T0	41	648.4	594.4 – 809.9
T1	22	565.4	426.9 – 633.2
T2	11	466.2	305.5 – 573.2
TA	10	407.9	322.4– 447.6

Проведен е тестът на Kruskal–Wallis, за да се съпоставят едновременно повече от две независими групи (T0, T1, T2 и TA) с не-Гаусово разпределени резултати за PON. С помощта на този тест се установява, че съществува статистически значимо различие между тях ($\chi^2=25.49$, $p<0.0001$). Допълнително с помощта на Mann-Whitney теста се уточнява какво е различието между отделните групи. На фигура 48 са посочени резултатите от този анализ.

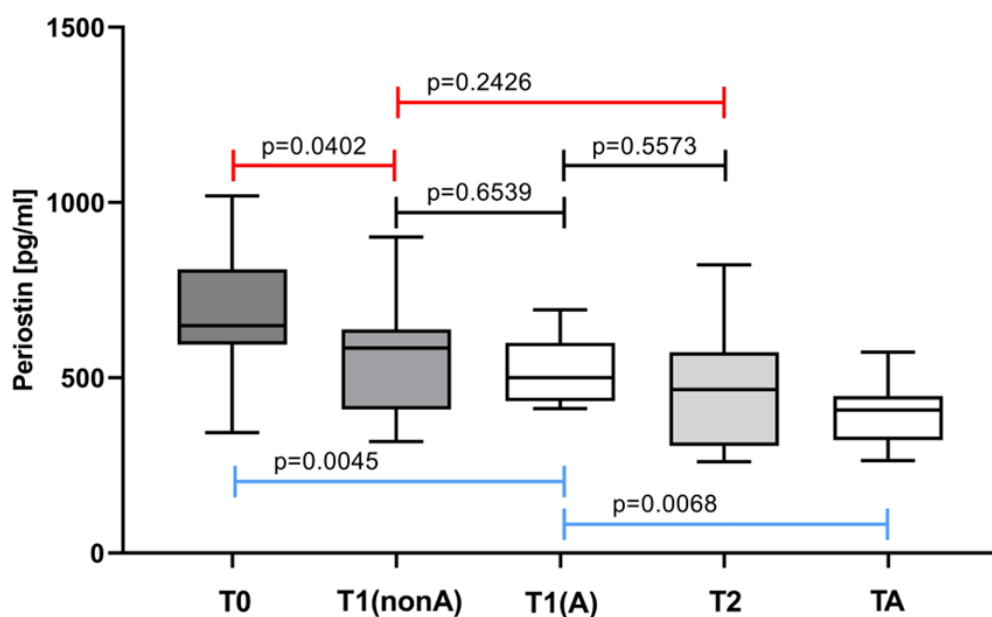


Фигура 48. Различия в серумните нива на PON в хода на терапията на NDMM пациентите. (Приложен е Mann-Whitney сравнителен анализ)

Базисните серумни нива на PON (T0) са статистически значимо по-високи в сравнение с тези, определени във всеки един следващ етап от проучването. Още в T1, след провеждането на първите 4 цикъла химиотерапия, нивата на белтъка значимо спадат (T1 vs T0: $p<0.0016$). В сравнение с T1, нивата на PON в T2, след допълнителните 4 цикъла химиотерапия, спадат, но незначимо

(T1 vs T2: $p=0.2484$), докато нивата при трансплантираните пациенти в ТА значимо се понижават (T1 vs TA, $p=0.0054$). Стойностите на PON в двете рамена не се различават помежду си (T2 vs TA: $p=0.2816$), значимо по-ниски са от изходните (T2 vs T0: $p=0.0024$ и TA vs T0: $p<0.0001$) и неотличаващи се от тези в контролната група (T2 vs Controls: $p=0.1899$ и TA vs Controls: $p>0.9999$). Доближаване до стойностите на контролните индивиди не се установява за етап T1 (T1 vs Controls: $p=0.0005$) (фигура 48).

Достигналите до етап T1 пациенти се преоценяват, за да се вземе решение кои от тях ще бъдат трансплантирани – T1(A) субгрупа и кои няма да бъдат трансплантирани – T1(nonA) субгрупа. Медианата и съответният IQR за T1(nonA) са 584.8 pg/ml (409.4 – 638.1), а за T1(A) са 500.4 pg/ml (432.5 – 559.6). С теста на Kruskal–Wallis, сравняващ така сформирани групи едновременно, се установява, че съществува статистически значимо различие в нивата на PON ($\chi^2=27.15$, $p<0.0001$). Допълнително с Mann-Whitney теста се уточняват различията поотделно между групите (фигура 49).



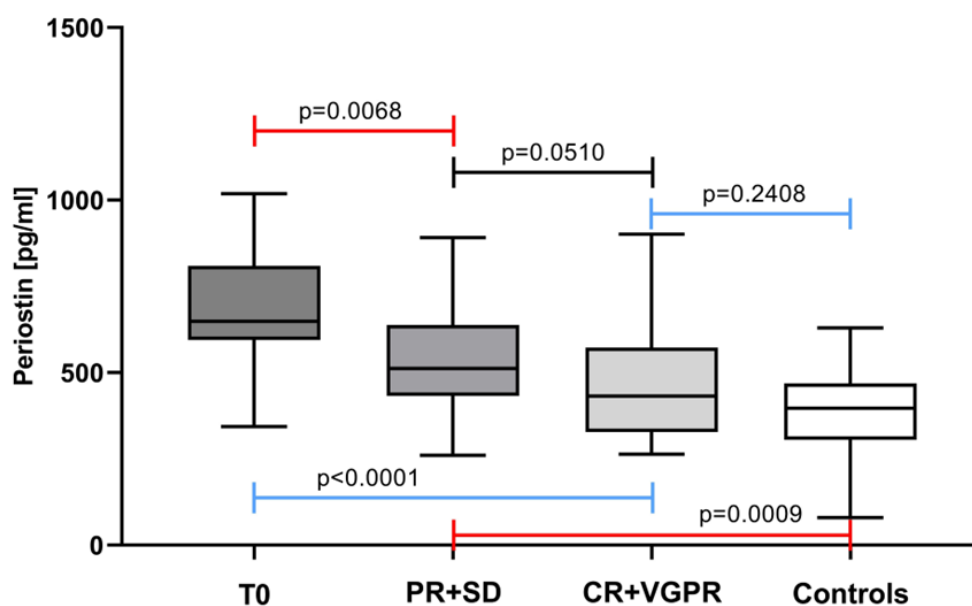
Фигура 49. Различия в серумните нива на PON на T1(A) и T1(nonA) субгрупите в сравнение с нивата, определени в останалите етапи от проучването. (Приложен е Mann-Whitney тест)

Тъй като T1(A) пациентите са постигнали CR и VGPR още на този етап (етап T1), техните нива се различават значимо от базисните нива преди започване на лечението (T1(A) vs T0: $p=0.0045$), но все още са значимо по-високи от нивата, които са постигнали три месеца след трансплантацията (T1(A) vs TA, $p=0.0068$). Въпреки че серумните нива на PON при T1(nonA) пациентите са по-високи от тези в T1(A), до статистическо различие между тях не се достига ($p=0.6539$). Съществено е да се отбележи, че още на този етап от

лечението T1(nonA) нивата се различават също значимо от базисните нива ($p=0.0402$). На етап T2 нетрансплантираните пациенти не постигат значимо понижение на нивата си спрямо T1(nonA), $p=0.2426$. Нивата в субгрупа T1(A) спадат толкова значимо, че достигат и не се отличават от нивата на нетрансплантираните пациенти, наблюдавани на по-късния етап T2, $p=0.5573$ (фигура 49).

6.7 Серумни нива на PON в зависимост от терапевтичния отговор

Пациентите са категоризирани в две групи: (1) пациенти с постигнат CR и VGPR, независимо от етапа на лечение (T1 + T2 + TA), в който са го постигнали, и (2) пациенти с постигнат PR и SD. Наблюдават се значимо по-ниски стойности ($p=0.0510$) за серумните нива на PON в групата с CR и VGPR (медиана 432.0 pg/mL и IQR 327.8 – 572.5) в сравнение с тези в групата с PR и SD (медиана 511.9 pg/mL и IQR 432.7 – 638.1). Освен това пациентите с CR и VGPR имат значително по-ниски нива за тествания параметър спрямо неговите изходни нива ($p<0.0001$), и в същото време неразличаващи се от тези на контролната група ($p=0.2408$). Относно нивата на PON при пациентите с PR и SD, те също се различават значимо от базисните нива в етап T0 ($p=0.0068$), но остават значимо по-високи от тези в контролната група ($p=0.0009$) (фигура 50).



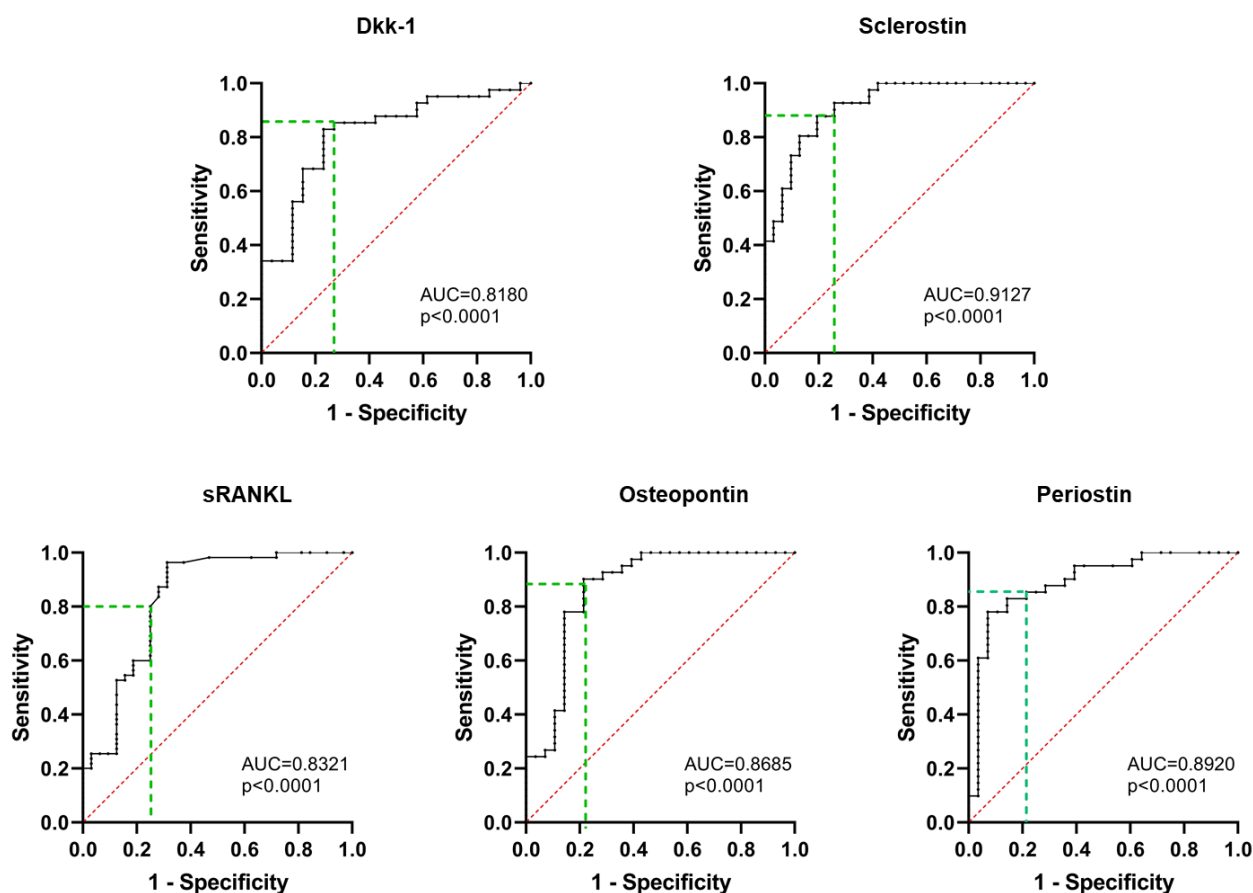
Фигура 50. Различия в серумните нива на PON според отговора към терапията. (Приложен е Mann-Whitney тест)

Проследиха се изходните нива на етап T0 за двете групи пациенти. При пациентите с постигнат CR и VGPR медианата и съответният IQR са 685.4 pg/ml (585.7 – 819.0), а при тези с PR и SD медианата и съответният IQR са 546.6 pg/ml (474.3 – 739.2). С Mann-Whitney теста не се установи значимо различие между тях ($p=0.1655$).

7. ДИАГНОСТИЧНА НАДЕЖДНОСТ И ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ НА DKK-1, СКЛЕРОСТИН, sRANKL, ОСТЕОПОНТИН И ПЕРИОСТИН КАТО МАРКЕРИ ЗА ОЦЕНКА НА МИЕЛОМНАТА КОСТНА БОЛЕСТ

7.1 Диагностична надеждност на изследваните костни биомаркери

Проведен е ROC-анализ (receiver operating characteristic – операционни характеристични криви на наблюдателя) за оценка на диагностичната надеждност на изследваните лабораторни показатели, т.е. доколко те са в състояние надеждно да отдиференцират здравите индивиди (контролната група) от NDMM пациентите. На фигура 51 са представени резултатите от проведения анализ.



Фигура 51. Диагностична надеждност на Dkk-1, склеростин, sRANKL, остеопонтин и периостин.

За всички изследвани показатели площта под кривата (AUC) е със стойност над 0.8 при $p < 0.0001$. За два от показателите (склеростин и периостин) се достига до стойност близка до 0.9 (за склеростин $AUC = 0.9127$, а за

периостин AUC=0.8920). Тези близки до единицата стойности красноречиво говорят, че изследваните показатели се отличават с висока диагностична надеждност.

Въз основа на изчислените чрез ROC анализа двойки чувствителност и специфичност, за всеки един от изследваните костни биомаркери е определена и cut-off стойността, която надеждно отдиференцира здрави от болни индивиди със съответните им диагностична чувствителност и диагностична специфичност (таблица 44).

Таблица 44. Cut-off стойности на костните биомаркери, оценени чрез ROC анализ.

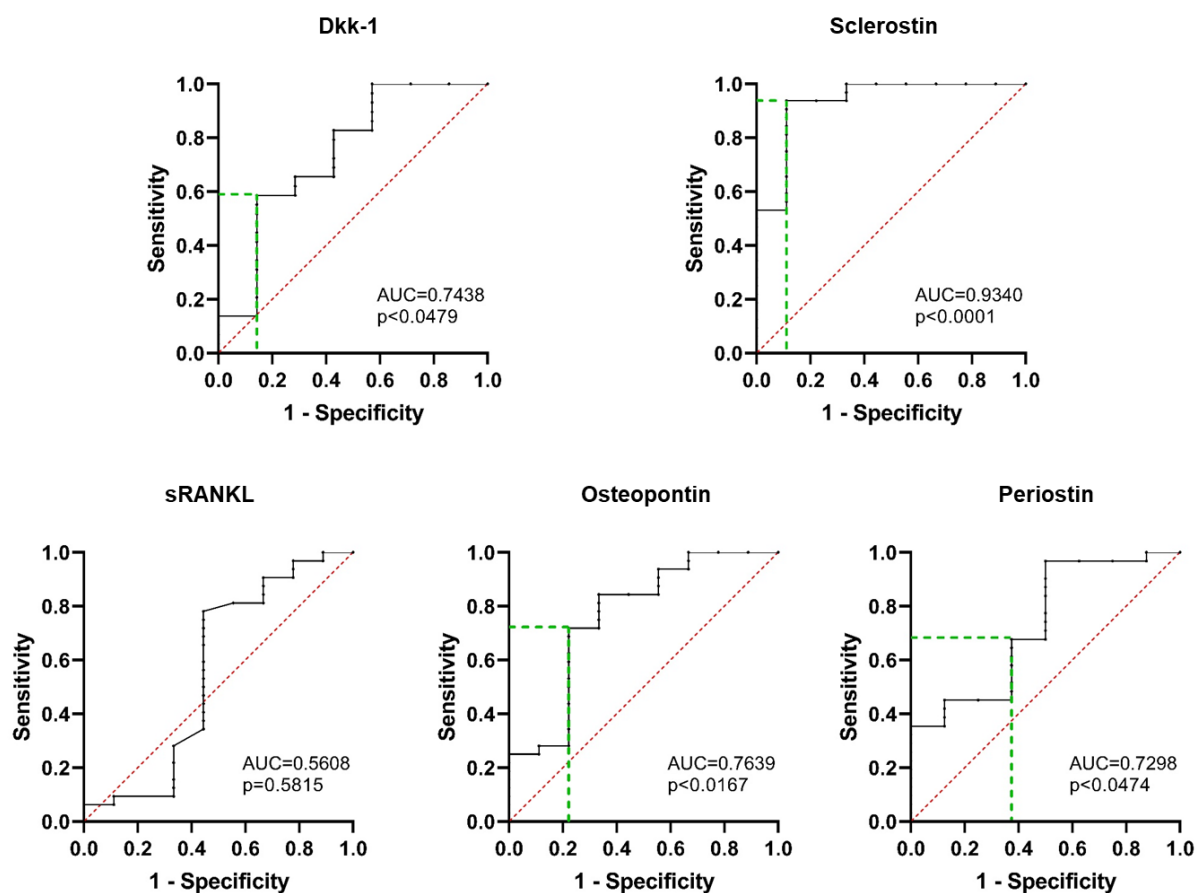
Параметър [unit]	Cut-off стойност	Чувствителност	95% CI	Специфичност	95% CI	Likelihood ratio (LR)
Dkk-1 [ng/mL]	52.64	0.8293	0.6874 to 0.9147	0.7692	0.5795 to 0.8897	3.593
Склеростин [ng/mL]	472.1	0.8780	0.7446 to 0.9468	0.8065	0.6372 to 0.9081	4.537
sRANKL [pg/ml]	8.067	0.8000	0.6764 to 0.8845	0.7500	0.5789 to 0.8675	3.200
Остеопонтин [ng/ml]	447.1	0.9024	0.7745 to 0.9614	0.7857	0.6046 to 0.8979	4.211
Периостин [pg/ml]	473.1	0.8537	0.7156 to 0.9312	0.7857	0.6046 to 0.8979	3.984

Позитивният коефициент на вероятност ($LR = \frac{\text{сензитивност}}{1 - \text{специфичност}}$) за всички изследвани биомаркери е над единица (между 3.2 и 4.5) и показва колко пъти е по-голям шансът изследваният индивид да е болен, ако резултатът му е над определената cut-off стойност.

7.2 Dkk-1, склеростин, sRANKL, остеопонтин и периостин като предиктори за развитие на миеломната костна болест

За всички изследвани показатели е установена статистически значима промяна на стойностите в зависимост от степента на изява на костната болест. Това ни даде основание да изследваме прогностичната стойност на всеки един от параметрите и възможността им правилно да отдиференцират пациентите с

леко засягане на скелетната система (G1) от тези с тежко засягане (G2) чрез провеждане на допълнителен ROC анализ (фигура 52).



Фигура 52. Dkk-1, склеростин, sRANKL, остеопонтин и периостин като предиктори за развитие на костната болест при ММ.

Проведеният ROC анализ показва най-висока AUC стойност за склеростин (0.9340, $p < 0.0001$), следвана от тези за остеопонтин (AUC=0.7639, $p = 0.0167$), Dkk-1 (AUC=0.7438, $p = 0.0479$) и периостин (AUC=0.7298, $p = 0.0474$). За sRANKL AUC се доближава до 0.5 при $p > 0.5$, което го прави непригоден за надеждно отдиференциране на пациентите с различна степен на костно засягане. За всички останали показатели е изчислена cut-off стойност със съответните ѝ диагностична специфичност и диагностична чувствителност (таблица 45).

Таблица 45. Cut-off стойности на Dkk-1, склеростин, остеопонтин и периостин за предикция на костната болест при ММ.

Параметър [unit]	Cut-off стойност	Чувствителност	95% CI	Специфичност	95% CI	Likelihood ratio
Dkk-1 [ng/mL]	62.05	0.5862	0.4074 to 0.7449	0.8571	0.4869 to 0.9927	4.103
Склеростин [ng/mL]	502.1	0.9375	0.7985 to 0.9889	0.8889	0.5650 to 0.9943	8.438
Остеопонтин [ng/ml]	514.0	0.7188	0.5463 to 0.8444	0.7778	0.4526 to 0.9605	3.234
Периостин [pg/ml]	545.9	0.6774	0.5014 to 0.8143	0.6250	0.3057 to 0.8632	1.806

Допълнително е приложен логистичен регресионен анализ, за да се оцени индивидуалният ефект на изследваните биомаркери за прогресията на миеломната костна болест. Поради незадоволителния резултат от ROC анализа, единствено sRANKL не е включен в логистичната регресия. Първоначално е анализирано влиянието на всеки един отделен показател като независим предиктор за успешно прогнозиране прогресията на костната болест. Резултатите от проведените анализи са обобщени в таблица 46.

Таблица 46. Обобщени резултати от логистичния регресионен анализ, проведен за всеки един показател поотделно.

Параметър [unit]	χ^2	df	P value	% правилно разпределение на пациентите според MBD (Overall Percentage)
Dkk-1 [ng/mL]	10.020	1	0.002	87.8
Склеростин [ng/mL]	23.239	1	<0.001	87.8
Остеопонтин [ng/ml]	13.077	1	<0.001	87.8
Периостин [pg/ml]	23.677	1	<0.001	87.8

За всеки един независим показател регресионният модел е статистически значим по отношение на прогнозата. Конструирани са и регресионни модели,

при които се комбинират два по два предиктора, отразяващи инхибирането на остеобластната активност или активирането на остеокластната активност. Резултатите от тези анализи са посочени в таблица 47.

Таблица 47. Обобщени резултати от регресионните анализи при комбиниране на предикторите.

Параметри	χ^2	df	P value	% правилно разпределение на пациентите според MBD (Overall Percentage)
Dkk-1 + Склеростин	25.924	2	0.002	87.8
Остеопонтин + Периостин	24.007	2	<0.001	92.7

Когато две независими променливи се отчитат едновременно, те статистически значимо прогнозираят правилното разпределение на пациентите според степента на костното засягане. При разглеждане критерия на Wald в така конструирани модели едната от двете независими променливи не е статистически значима – остеопонтин за остеокластните маркери и Dkk-1 за остеобластните маркери (таблица 48 и таблица 49).

Таблица 48. Остеокластни независими променливи в регресионното уравнение.

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% CI for EXP(B)	
							Lower	Upper
OPN	-.003	.005	.290	1	.590	.997	.988	1.007
PON	-.020	.009	5.548	1	.019	.980	.964	.997
Constant	12.299	4.523	7.393	1	.007	219483.286		

a. Variable(s) entered: OPN, PON.

Таблица 49. Остеобластни независими променливи в регресионното уравнение.

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% CI for EXP(B)	
							Lower	Upper
Scl	-.041	.018	5.073	1	.024	.960	.927	.995
Dkk-1	-.152	.109	1.957	1	.162	.859	.694	1.063
Constant	29.081	13.891	4.383	1	.036	4263891672629.099		

a. Variable(s) entered: Scl, Dkk-1.

Конструира се нов двуфакторен регресионен модел, включващ статистически значимите независими променливи от предходните анализи (склеростин и периостин). Новият регресионен модел е статистически значим: $\chi^2=29.465$, $df=2$ и $p<0.001$. Моделът обяснява 51.3% (Cox & Snell R²) и 78.7%

(Nadelkerkes R2) от дисперсията за костната болест и коректно класифицира 90.2% от наблюденията (93.8% за G2 и 77.7% за G1). При разглеждане критерия на Wald в така конструирания модел и двете независими променливи са статистически значими и влияят съществено прогнозата относно степента на костно засягане. Стойностите на техните регресионни коефициенти са: за периостин – -0.019, за склеростин – - 0.028, а стойността на регресионната константа е 24.675 (таблица 50).

Таблица 50. Остеокластни и остеобластни променливи в регресионното уравнение.

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
PON	-.019	.009	4.056	1	.044	.982	.964	1.000
Scl	-.028	.015	3.574	1	.050	.972	.944	1.001
Constant	24.675	10.028	6.054	1	.014	520105313 48.956		

a. Variable(s) entered: PON, Scl.

От така постъпково проведените регресионни анализи най-значим е последният. От изчислените с негова помощ коефициенти може да се състави регресионно уравнение, което с много голяма вероятност може да даде правилен отговор при конкретни стойности на биомаркерите периостин и склеростин за даден пациент с каква степен на костно засягане би бил той, т.е. дали би попаднал в група G1 или G2. Уравнението има следния вид:

$$p = \frac{e^{24.675 - 0.019[PON] - 0.028[Scl]}}{1 + e^{24.675 - 0.019[PON] - 0.028[Scl]}}$$

Проведените ROC анализи потвърждават високата диагностична значимост на изследваните костни биомаркери, а регресионният анализ откроява два от тях, които с най-голяма степен на вероятност биха могли да прогнозират костното заболяване.

V. ДИСКУСИЯ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Като метаболитно активна и динамична структура, костната тъкан непрекъснато се обновява през индивидуалния живот на човека посредством процесите на физиологично костно ремоделиране. Тези процеси са строго регулирани и са от съществено значение за запазване целостта на костта и поддържане на минералната хомеостаза. Дисбаланс в процесите на костното ремоделиране с превалиране на костната резорбция над костното формиране стои в патогенезата на MBD. От множеството патогенетични фактори, определящи нарушения баланс на процесите на костно ремоделиране, ние проучихме няколко от тях, с цел да характеризираме основните аспекти на MBD, а именно Dkk-1 и склеростин, като инхибитори на остеобластната активност, sRANKL като основен остеокластен активатор, както и на остеопонтин и периостин като важни белтъци от ЕСМ, осигуряващи благоприятна среда в костномозъчното микроокръжение за заселване, пролиферация и експанзия на клоналните миеломни плазматични клетки.

1. Маркери за нарушена остеобластна активност – Dkk-1 и склеростин

Wnt сигналният път е ключов за регулирането на остеобластното костообразуване. Разтворимите антагонисти на Wnt пътя, Dkk-1 и Scl, са критични компоненти на тази система и играят важна роля за потиснатата остеобластна функция, наблюдавана при MBD [20]. Dkk-1, секретирани от OBs, BMSCs и MPCs, чрез конкурентно свързване с Wnt рецепторите потиска диференциацията на BMSCs в зрели OBs, както и блокира по-нататъшното узряване на OBs [113, 363]. Другият разтворим Wnt инхибитор, Scl, който също контролира костообразуването, е интересен с факта, че не се синтезира от туморните MPCs, а единствено от остеоцити и техните прекурсори [226]. Colucci и сътр. в *in vitro* експериментален модел откриват значително намаление на bALP, остеокалцин и сиалопротеин II, както и формирането на колонио-образуващи единици на OBs, което доказва важната супресираща функция на Scl върху OBs диференциация [64]. Инхибираната остеобластогенеза предопределя потиснатото образуване на костния органичен матрикс и неговото минерализиране [109, 417].

1.1 Базисни серумни нива на Dkk-1 и Scl при NDMM пациенти

Тъй като в литературата има данни за влияние на пола и възрастта върху серумните стойности на Dkk-1 и Scl, ние подразделихме двете основни групи (пациентска и контролна) в подгрупи в зависимост от тези биологични фактори. За Dkk-1 не са установени статистически значими различия в зависимост от

пола както при пациентската група, така и при контролната група. Прави впечатление обаче, че в контролната група стойностите на Dkk-1 при жените са по-високи от тези на мъжете с около 11%, въпреки че не достигат до статистически значимо различие. В литературата има данни за естрогените като отрицателни регулатори на експресията на гена за Dkk-1. Така например повишена експресия на Dkk-1 е установена при овариектомирани плъхове [304]. При проучване с хора също се доказват по-високи нива на Dkk-1 при жените в сравнение с мъжете [92]. Наблюдаваната тенденция за леко по-високи стойности при изследваните от нас жени би могла да се обясни с факта, че повечето от тях са в менопауза, при което отпада възможността естрогените да потискат Dkk-1 експресията. По отношение на Scl, в пациентската група не се установяват значими полови разлики, докато в контролната група при мъжете се наблюдават значимо по-високи стойности отколкото при жените. Подобно различие с по-високи серумни нива на Scl при мъже се описват и от други автори [9, 92]. Трябва да се отбележи, че разделянето по пол не променя установеното за общата група значимо различие между болни и здрави индивиди. Както болните мъже, така болните жени са със значимо по-високи стойности както за Scl, така и за Dkk-1 в сравнение със здравите мъже и жени съответно.

Според повечето литературни източници с нарастване на възрастта нарастват стойностите и на двата изследвани параметъра [9, 13, 25, 92, 284]. В нашето проучване не се открива подобна зависимост както в пациентската група, така и в контролната група. Това най-вероятно се дължи на факта, че двете възрастови подгрупи обхващат само възрастовия диапазон над 50 годишна възраст, докато в посочените изследвания са обхванати индивиди, покриващи много по-широк възрастов диапазон, което е предпоставка за наличие на възрастови различия.

Може да се заключи, че патологичният процес при изследваната от нас кохорта NDMM пациенти надвишава по сила влиянието на биологичните фактори възраст и пол и има решаващо значение за наблюдаваните значимо по-високите нива на Dkk-1 и Scl при поставянето на диагнозата. Това ни дава основание да не се съобразяваме с пола и възрастта при по-нататъшните обсъждания на промените в серумните нива на изследваните белтъци.

При поставяне на диагнозата и за двата изследвани параметъра са установени значимо по-високи стойности в пациентската група в сравнение с контролната група. Така Dkk-1 стойностите при пациентите надвишават с над 30% тези в контролната група ($p < 0.0001$), а стойностите на Scl са дори многократно по-високи (около 8 пъти) спрямо контролните индивиди

($p < 0.0001$). През 2010 г. Heiland и сътр., изучавайки патогенезата на костна загуба при възпалителни състояния, доказват в експериментален модел ролята на проинфламаторния цитокин TNF- α за потиснатото образуване на костна тъкан. Тъй като TNF- α е важен индуктор на експресията и на двата Wnt инхибитора Dkk-1 и Scl, авторите анализират взаимодействията между тези три цитокина – TNF- α , Dkk-1 и Scl. При въздействие върху първични остеобласти с TNF- α значително се увеличава експресията на склеростиновата mRNA, както и на самия белтък. Освен това блокирането на Dkk-1 чрез приложение на анти-Dkk-1 антитяло напълно неутрализира индуцираната от TNF- α синтеза на Scl, което предполага, че Dkk-1 вероятно участва в индуцирането на експресията на SOST гена (гена за Scl). От друга страна, добавянето на рекомбинантен Dkk-1 към OBs драстично увеличава нивата на Scl и този ефект се предотвратява чрез добавяне на анти-Dkk-1 антитяло [131]. По-късно тези наблюдения се потвърждават от Ede и сътр. вече в експериментален миши модел на ММ. Имунодефицитни ксенографт мишки са инжектирани интравенозно с човешки MPCs, с което се предизвиква развитие на ММ. В кръвната плазма на мишките е установено значимо нарастване на миши склеростин, а не на човешки, което предполага, че костно-мозъчната миша микросреда е източникът на склеростин, а не установените в нея човешки MPCs. Известно е, че Scl се синтезира от остеоцитите, въпреки това жизнеспособните остеоцити и зрели OBs значително намаляват на брой при ММ. Следователно едва ли остеоцитите биха били единственият вероятен източник на повишения Scl. Проучвайки източника на склеростиновата секреция, авторите доказват, че OBs предшественици са основен източник на протеина. В посоченото проучване е изследвано въздействието на MPCs върху OBs диференциация. Установено е, че тя е инхибирана в резултат на стимулираната експресия на склеростиновата mRNA в OBs, без това да се дължи на клетка-клетка взаимодействие с MPCs. Това предполага наличие на цитокин медиран механизъм. Тъй като Dkk-1 стимулира склеростиновата mRNA в зрелите OBs и като се има предвид, че Dkk-1 се секретира от MPCs, се изказва хипотезата, че Dkk-1 е цитокинът, отговорен за регулацията на синтеза на Scl от OBs. Използвано е анти Dkk-1 неутрализиращо антитяло, което инхибира ефекта на MPCs върху експресията на склеростиновата mRNA в OBs. Така е установен механизъм за стимулиране на Scl секреция от незрелите OBs с участието на Dkk-1, продуциран от MPCs [95]. Резултатите от тези експериментални разработки са в подкрепа на установените от нас многократно по-високи серумни стойности на Scl в сравнение със стойностите на Dkk-1 при NDMM пациенти. Твърде вероятно е първоначално леко повишеният Dkk-1 да е важен стимулатор на биосинтезата на Scl както от зрелите, но вследствие на заболяването намаляващи остеоцити,

така и от незрелите OBs. При прогресия на заболяването и увеличен биосинтез на Dkk-1 от MPCs, би могло да се предположи експоненциално нарастване на Scl. Така се оформя един самоподдържащ се порочен цикъл, осигуряващ благоприятна среда за растежа и пролиферацията на MPCs в костно-мозъчните ниши, допринасящ за прогресията на заболяването.

Откритите от нас значимо по-високи серумни нива на Dkk-1 в пациентската група в сравнение с контролните индивиди потвърждават данните за патологично повишени серумни нива на Dkk-1 при NDMM пациенти, посочени в по-ранни научни изследвания [104, 164, 265, 343]. Така напр. Politou и сътр. установяват, че серумните нива на Dkk-1 при 32 NDMM пациенти са значително по-високи не само от тези в контролната група, но и от нивата на MGUS пациентите. Въз основа на тези констатации авторите предполагат, че повишената OCs активност при пациентите с MGUS се компенсира от все още нормалната функция на OBs и затова в този начален стадий на заболяването не се развиват остеолитични лезии. Авторите също предполагат, че не е изключено, локалните костномозъчни нива на Dkk-1, които не са проследени в това проучване, да започват да се покачват на този ранен етап, но леките им промени да не могат да доведат до промени в серумните нива [265]. Така Keiser и сътр. използват MGUS пациенти като контролна група и установяват също значимо по-високи серумни нива на Dkk-1 при NDMM пациенти спрямо MGUS контролите [164]. По-късно Terpos и сътр. демонстрират в клинично проучване по-високи нива на Dkk-1 при симптоматичен MM спрямо MGUS пациенти, но и спрямо контролна група от здрави индивиди. В последните две групи съществено различие в Dkk-1 нивата не е установено [344].

Относно Scl, данните от литературата са значително по-оскъдни. Въпреки това, установеното от нас значимо различие в серумните нива на Scl между пациенти и контроли е в съгласие с повечето проучвания, публикувани до момента. Terpos и сътр. първи инициират клинично проучване за ролята на Scl при MM. Авторите установяват, че нивата на циркулиращия Scl са значимо по-високи при NDMM пациенти в сравнение с контроли и MGUS пациенти, без да са налични значими разлики за Scl между MGUS и контролната група [344]. В по-късно проучване се потвърждава наблюдението, че Scl се повишава едва при активен MM, но не и при по-ранните стадии на заболяването [95]. За разлика от тях, Brunetti и сътр. не доказват различие в серумните нива на Scl между MGUS пациенти, приети като контроли, и тези със симптоматичен MM, като изказват предположението, че вероятно малкият брой на изследваните пациенти/контроли е предопределил липсата на статистическо различие [33].

В настоящото проучване установихме постепенно нарастване на стойностите и на двата Wnt инхибитора с прогресията на заболяването, т.е. с напредване на стадия на MM се наблюдават все по-високи стойности на двата изследвани параметъра. Стойностите в трети клиничен стадий по ISS достигат статистически значимо различие в сравнение с тези в първи клиничен стадий, като за Dkk-1 те са нараснали с около 19.5% ($p=0.025$), а за Scl – с 23.6% ($p=0.0012$). Това наше наблюдение съответства на получените резултати в проучвания, изследващи зависимостта на Wnt инхибиторите от стадия на MM. Така напр. в проучванията [164, 265, 343] са установени значимо по-високи нива на Dkk-1 в стадии ISS-3 и ISS-2 спрямо стадий ISS-1.

В малък на брой клинични проучвания е изследвана връзката между клиничния стадий на MM и склеростин. Съответствие на нашите данни откриваме в проучване на Terpos и сътр. В него също се доказва, че серумните Scl нива при пациентите в ISS-3 стадий са значимо по-високи от тези в ISS-1 и ISS-2 стадии [344]. В проучването на Wang и сътр. е открито значимо различие в серумните нива на Scl между пациентите в ISS-3 и ISS-2, както и между тях и контролните индивиди [387].

Едно от често срещаните и тежките усложнения на MM е бъбречното засягане (т. нар. миеломен бъбрек), като се счита, че още при поставяне на диагнозата MM около 50 % от пациентите са и с бъбречно увреждане [115, 376]. В нашето проучване, от всички NDMM пациенти 22% (9 пациента) са с креатинин над 177 $\mu\text{mol/L}$. Сравнявайки двете групи пациенти (с креатинин съответно под и над 177 $\mu\text{mol/L}$) не установихме значимо различие както за серумните стойности на Dkk-1 ($p=0.2275$), така и за тези на Scl ($p=0.3118$). В проучване, изучаващо циркулиращите серумни нива на Scl и Dkk-1 при пациенти с хронично бъбречно заболяване (ХБЗ), се установява, че само Scl се увеличава, но не и Dkk-1, с напредване на бъбречното заболяване. Авторите заключават, че Scl би могъл да се използва като биомаркер за мониториране на ХБЗ, докато Dkk-1 не е подходящ за тази цел [23]. Основавайки се на това проучване, ние считаме, че е вероятно по-високите нива на Dkk-1 в стадий ISS-3 да отразяват единствено прогресията на MM и са независими от бъбречната функция. Що се касае до Scl, в проучването на Terpos и сътр. е установена значима разлика в серумните нива на Scl между пациентите в III-B стадий по Durie-Salmon (с креатинин $>2 \text{ mg/dl}$ или 177 $\mu\text{mol/L}$) и тези в III-A стадий (с креатинин $<2 \text{ mg/dl}$) [340]. В нашето проучване, за разлика от това на Terpos, не се открива различие в стойностите на Scl между двете групи, вероятно дължащо се и на малкия брой пациенти с креатинин над 177 $\mu\text{mol/L}$ (9 пациента). Въпреки това различие, е важно да се подчертае, че както в нашето проучване,

така и в това на Terpos има значимо различие в стойностите на Scl в зависимост от стадия на MM, т.е. твърде вероятно серумните нива на Scl да отразяват адекватно в по-голяма степен стадия на MM, отколкото нарушената бъбречната функция.

И за двата параметъра в нашето проучване се установяват значимо по-високи серумни нива в група G2 (>3 остеолитични лезии) в сравнение с група G1 (≤ 3 остеолитични лезии). Интересно е, че докато Dkk-1 стойностите на пациентите от подгрупа G1 са по-високи от тези на контролните индивиди, но въпреки това до статистически значимо различие не се достига ($p=0.3479$), то за Scl, пациентите от G1 подгрупа се различават значимо от контролите ($p<0.0001$). В едно от първите клинични проучвания, изследващи Dkk-1 при MM, Politou и сътр. не откриват корелация между серумните нива на DKK-1 и степента на костното заболяване. Според авторите, този резултат би могъл да се обясни с относително малкия брой пациенти, както и с ограниченията на образната техника (стандартна рентгенография), използвана за откриване на остеолитичните лезии [265]. В последвалите изследвания, обаче, се открива ясна зависимост между Dkk-1 и степента на костно засягане. Така например в проучването на Kaiser и сътр. е установено, че пациентите без костни лезии имат значимо по-ниски нива от тези с налични такива ($p=0.003$). Освен това, когато се сравняват пациентите с ≤ 3 и >3 остеолитични лезии, също се откриват значимо по-високи нива на Dkk-1 при пациентите с тежко засягане на костната система ($p=0.002$) [164]. И в проучването на Terpos и сътр. е констатирана същата корелация с костната болест – пациентите с ≤ 3 лезии имат значимо по-ниски нива на Dkk-1 в сравнение с тези над >3 остеолитични лезии [357]. Така можем да заключим, че нашите резултати за Dkk-1 не се различават от повечето резултати, публикувани в научната литература. В малкото публикации относно Scl и MBD откриваме също подобни на нашите резултати. В проучването на Terpos и сътр., резултатите не са така категорични, тъй като при пациентите им с напреднала костна болест (>3 остеолитични лезии и/или патологични фрактури) Scl нива показват тенденция за покачване, но не достигат до статистически значима разлика спрямо останалите пациенти ($p=0.078$). При допълнителен субанализ, обаче, се установява, че пациентите с налични фрактури при диагностицирането имат значимо по-високи нива на циркулиращия Scl в сравнение с всички останали ($p<0.01$) [344]. В проучването на Wang и сътр. са получени по-категорични данни. По отношение на MBD техните пациенти също са подразделени на такива с ≤ 3 и >3 остеолитични лезии, като двете групи се различават значимо помежду си ($p<0.001$) – регистрирани са по-високи Scl нива във втората подгрупа. Интересно е, че Scl

нива в първата подгрупа са значимо по-високи и от тези, наблюдавани в контролната група, така както е и в нашето проучване [388].

Наблюдаваните промени в нивата на Wnt инхибиторите както в посочените проучвания, така и в нашето, са доказателство за патогенетичната им роля по отношение на възникване и прогресия на MBD. Като инхибитори на ОБ диференциация, те препятстват нормалните процеси на костното ремоделиране и създават условия за превалиране на остеокластогенезата над остеобластогенезата. Често в клиничните проучвания, паралелно с повишените нива на Wnt инхибиторите, се установяват повишени нива на рутинните лабораторни биомаркери за костно разграждане (напр. СТХ) и понижени нива на биомаркерите за костно изграждане (напр. bALP и остеокалцин), с което допълнително се потвърждава инхибиторната им роля по отношение на ОБ диференциация [343, 357, 388]. Така може да се заключи, че изследваните Wnt инхибитори Dkk-1 и Scl точно отразяват степента на костното засягане и биха могли да се въведат и в рутинната лабораторна практика за мониториране на MBD.

В настоящото проучване са изследвани и взаимовръзките на Dkk-1 и Scl с важните хематологични, морфологични и биохимични показатели, използвани за поставяне на диагнозата ММ, както и за мониториране на нейния ход. За Dkk-1 са установени отрицателна и умерена по сила статистически значима корелация с хемоглобин и албумин, а положителна и умерена по сила статистически значима корелация се открива единствено с $\beta 2$ -микроглобулин. За Scl са установени отрицателна и умерена по сила статистически значима корелация с хемоглобин и албумин, а положителна и умерена по сила статистически значима корелация се открива с $\beta 2$ -микроглобулин, костномозъчната инфилтрация, креатинин и общия белтък. В литературата не открихме проучвания, които да изследват връзката между костномозъчната инфилтрация (ВМІ) при диагнозата на ММ и инхибиторите на Wnt сигналния път. До скоро прогностичното значение на ВМІ не беше добре определено. В 2020 година Al Saleh показва, че MPC>60% при диагнозата е надежден прогностичен маркер за PFS и OS при пациентите с нисък и висок риск [5]. Ние установихме значимо по-ниски Scl нива при ВМІ<60% и по-високи при ВМІ>60%, докато за Dkk-1 различие в нивата липсва ($p=0.9843$). Освен това, за разлика от Scl, при който намерихме умерена позитивна корелация с ВМІ, за Dkk-1 корелационна зависимост не се установява. Отношенията между костномозъчната среда и MPCs се медира чрез клетъчно-клетъчни взаимодействия и паракринни/автокринни медиатори. В своите изследвания Eda и сътр. показват, че MPCs имат способността да стимулират експресията на Scl

в OBs чрез секреция на DKK-1 [95]. Може да се предположи, че минималното локално увеличение на DKK-1 в костен мозък може да ускори биосинтезата на склеростин по един експоненциален начин, което да доведе и до по-изразеното му повишаване в кръвта, респективно в серума, което да обясни поне частично доказаната корелационна връзка за единия белтък и липсващата такава за другия. С така получените резултати безспорно се доказва, че промените в серумните нива на Dkk-1 и Scl, добре отразяват съществените характеристики на миеломната болест, а именно анемията, продукцията на парапротеин, костно мозъчната инфилтрация с MPCs и бъбречната увреда.

1.2 Серумни нива на Dkk-1 и Scl, установени в хода на провежданото лечение

Според дизайна на проучването, изследваните пациенти са мониторирани в рамките на около осем месеца. За да се проучи каква е динамиката в циркулиращите нива на изследваните костните биомаркери, Dkk-1 и Scl, серум е взиман трикратно – преди започване на лечението (етап T0); при приключване на първите 4 курса терапия по протокол VCD (етап T1); след приключване на допълнителните 4 курса по протокол VCD за нетрансплантираните пациенти (етап T2), а за трансплантираните пациенти – три месеца след проведената ASCT.

Един от медикаментите от индукционния протокол, използван за лечението на пациентите от настоящото проучване, е бортезомиб, който се отличава с доказана антитуморна ефикасност [330]. Интересното при този протеазомен инхибитор е, че той не само ефективно унищожава MPCs, но също така подобрява и костното ремоделиране чрез индуциране на OBs диференциация. По този начин инхибира остеолитичната прогресия при пациенти с ММ [274, 367].

И за двата изследвани параметъра, с помощта на Kruskal-Wallis теста се установи, че съществува статистически значимо различие между нивата им, изследвани в хода на провежданото лечение (Dkk-1: $\chi^2=24.34$, $p<0.0001$; Scl: $\chi^2=31.40$, $p<0.0001$). За да се установи между кои етапи точно е различието са проведени няколко допълнителни *post hoc* теста на Mann-Whitney. На всеки един етап от мониторирането се установява значимо понижение на серумните нива на Dkk-1 и Scl спрямо базисните им нива, като степента на значимост се увеличава (T1 vs T0: $p=0.0290$; T2 vs T0: $p=0.0020$ и TA vs T0: $p<0.0001$ за Dkk-1 и T1 vs T0: $p=0.0271$; T2 vs T0: $p=0.0086$ и TA vs T0: $p<0.0001$ за Scl). Когато се сравнят нивата в края на проучвания период в двете рамена спрямо тези, измерени на етап T1, се вижда че при трансплантираните пациенти снижението

им е по-голямо и достига до статистическа значимост (TA vs T1: $p=0.003$ за Dkk-1 и $p<0.0001$ Scl), докато при нетрансплантираните пациенти след втория курс на лечение нивата продължават да спадат, но не в такава степен, че да достигат до статистически значимо различие (T2 vs T1: $p=0.1330$ за Dkk-1 и $p=0.2645$ за Scl). Стойностите на Dkk-1 на етап TA не се различават статистически от стойностите в контролната група ($p=0.4561$), дължащо се вероятно на значителното намаление на туморната маса, постигнато чрез високодозовата химиотерапия. Въпреки, че снижението на Dkk-1 на етап T2 не е значимо спрямо цялата изследвана група в T1, то е достатъчно, за да се достигнат нива близки до тези в контролната група ($p=0.2104$). Динамиката на снижение на Scl е подобна на тази на Dkk-1, но в края на проучването нивата му както в TA, така и в T2 продължават да са значимо по-високи от тези на контролните индивиди. Трябва да се отбележи, че първоначалните нива на Scl в T0 са почти осем пъти по-високи от тези на контролната група. Като се има предвид този факт, както и факта, че вече дефинитивно е доказано, че не MPCs, а остеоцитите и OBs прекурсори са отговорни за синтезата на Scl [226] изказваме следната хипотеза – тъй като терапията таргетира най-вече туморните клетки, намалението на Scl вероятно се дължи не толкова на директния ефект на медикаментите върху MPCs, колкото на регулаторни сигнали, идващи от костномозъчното обкръжение, които вероятно се индуцират от лечението по непряк начин и съответно по-трудно и бавно биха могли да се понижат тези първоначално многократно повишени стойности на Scl спрямо контролните нива.

Тъй като на етап T1 се определя кои пациенти ще се подложат на трансплантация и кои не, е извършен и допълнителен субанализ чрез разделянето на пациентите на две субгрупи T1(A) и T1(nonA). Установено е значимо различие на стойностите между двете субгрупи за Dkk-1 ($p=0.0062$). Още след първия цикъл на лечение, част от пациентите, тези от субгрупа T1(A), постигат CR и VGPR и техните Dkk-1 нива значимо се различават от базисните им нива преди започване на лечението (T1(A) vs T0, $p=0.0003$) и се доближават до тези постигнати от нетрансплантираните пациенти на по-късния етап T2 (T1(A) vs T2: $p=0.8094$). Въпреки това те са все още значимо по-високи от нивата, които се постигат три месеца след трансплантацията (T1(A) vs TA, $p=0.0241$). За разлика от тях, T1(nonA) пациентите, които не показват добър отговор при завършване на първия цикъл от лечение, задържат високи серумни нива на Dkk-1, статистически неразличими от базисните им нива (T1(nonA) vs T0: $p=0.5627$). Допълнителните четири курса VCD обаче благоприятстват нетрансплантираните пациенти на етап T2 да достигнат до значимо понижение

на Dkk-1 нивата спрямо тези, установени на етап T1 (T2 vs T1(nonA): $p=0.0192$). Динамиката на Scl нива следват малко по-различен ход. Така, въпреки че T1(A) пациентите са достигнали до CR и VGPR, техните Scl нива не се различават значимо от тези на T1(nonA) ($p=0.3493$), но пък се различават значимо от базисните им нива ($p=0.0134$). За разлика от тях, Scl нива на T1(nonA) пациентите не достигат до значимо различие от базисните нива ($p=0.2047$). Допълнителните четири курса VCD снижават нивата на Scl, но все още те не се различават от тези, постигнати на етап T1 (T2 vs T1(nonA): $p=0.2169$). Отново се вижда, че спадането на Scl нива следва един по-плавен и забавен ход.

Като обобщение, и за двата белтъка, Dkk-1 и Scl, би могло да се заключи, че както броят на терапевтичните курсове, така и индивидуалните особености на пациентите, обуславящи постигането на по-добър или по-лош отговор спрямо терапията допринасят за значимото понижение на нивата им в хода на лечението.

В литературата има нееднозначни резултати относно ефекта от лечението на ММ върху серумните нива на Dkk-1. Така например в проучване на Terpos и сътр. се установява, че пациенти, лекувани с леналидомид и дексаметазон (RD) и постигнали над парциален терапевтичен отговор, имат дори леко повишение на Dkk-1 нивата с 9%, докато при неотговорилите на терапията пациенти повишението е с 91% [343]. Тези резултати, несъответни на нашите, биха могли да се обяснят с различния механизъм на действие на имуномодулиращите медикаменти (IMiDs). В експериментални модели с пилешки ембриони и с човешки ембрионални фибробласти е установено, че талидомид индуцира Dkk-1 експресията [186]. В друго проучване също се доказва, че талидомид и леналидомид повишават експресията на Dkk-1 чрез активиране на JNK сигналния път в клетъчни култури с първични човешки миеломни плазматични клетки [62]. През 2014-та година Terpos и сътр. отново потвърждават резултатите за Dkk-1 при пациенти с рефрактерен ММ или релапс на болестта и лекувани с RD. Както в ретроспективната им, така и в проспективната им част от изследването след три и шест цикъла на лечение на пациентите не са констатирани значими различия в серумните нива на Dkk-1. В същото време, когато към терапевтичния протокол се прибави и протеазомния инхибитор бортезомиб (VRD) се достига до статистически значима редукция на Dkk-1. След 3-ти цикъл понижението е почти двукратно (44% намаление на стойностите). След 6-ти цикъл Dkk-1 нивата продължават да спадат и са значимо по-ниски спрямо базисните нива (59% понижение), а спрямо нивата от 3-ти цикъл са с 26% по-ниски. Тези промени в Dkk-1 стойностите се съпровождат и със значимо повишаване на нивата на биомаркерите за

изграждане на костта (остеокалцин – повишението е статистически значимо още на трети месец, а за bALP – след шестия месец) [357]. Резултатите от това проучване са в пълно съответствие с нашите резултати, установяващи непрекъснато понижаване на Dkk-1 нивата в хода на лечението.

Относно Scl, резултатите от няколко проучвания, изследващи влиянието на провежданото лечение върху нивата му са също така нееднозначни. Terpos и сътр. изследва промените в нивата на Scl при MM пациенти след лечение с терапевтични режими, включващи бортезомиб или талидомид, в плато фазата на заболяването, дефинирана като състояние със стабилен M-протеин най-малко за 6 месеца и без критерии за прогресия. В тази фаза стойностите на Scl са значимо по-високи не само от контролната група, но и от тези, установени преди започване на лечението ($p=0.02$). Обратно, нивата на Dkk-1 в тази фаза са значимо по-ниски ($p<0.001$) спрямо стойностите при диагнозата и не се отличават от тези в контролната група. Авторите правят извод, че увеличените Scl нива в тази фаза е причина за продължителната OBs дисфункция, установявана дълго време след проведено лечение [352]. Не е възможно да сравним тези резултати с нашите, които са получени при изследване на серум, получен веднага след приключване на терапевтичния протокол. В друго проучване на Terpos и сътр. се показва, че лечение с четири курса бортезомиб като монотерапия при пациенти с рецидив на MM, водят до значимо понижение на нивата на Scl както при отговорилите, така и при неотговорилите на това лечение почти в еднаква степен и не се установява разлика между тях ($p=0.67$). Според авторите намаляването на Scl нива са доказателство за наличие и на друг механизъм на действие на бортезомиб, важен за преодоляване на остеобластната дисфункция при MM. Вероятно е този ефект на бортезомиб да се дължи на неговия инхибиращ ефект върху Dkk-1 експресията, за който е доказано, че повишава Scl експресия, а от друга, това може да е независим ефект на бортезомиб върху остецитите [346].

В по-ранно проучване на Heider и сътр. са изследвани серумните нива на Dkk-1 при пациенти с MM, лекувани с различни терапевтични режими: с adriamycin / idarubicin и dexamethasone (ADID); с bortezomib; с lenalidomide; с thalidomide; както и с високодозова химиотерапия, последвана от ASCT. Три месеца след приложеното лечение, всички терапевтични режими водят до сигнификантно понижение на серумните нива на Dkk-1 с изключение на пациентите, лекувани с талидомид, чието понижение е несигнификантно [130]. Авторите посочват, че в тяхното проучване лечението с талидомид не води до очакваното повишаване на нивата на Dkk-1, което е в разрез с доказаната в други изследвания повишена експресия на белтъка под действието на

талидомид, но те не дават възможно обяснение на факта. По-същественото е, че в това проучване се доказва значението на високодозовата химиотерапия, последвана от ASCT за постигане на най-добри терапевтични ефекти за пациента, включително и за костната болест. Този вид терапевтичен подход води до най-значимо понижение в стойностите на Dkk-1, което е предпоставка за възстановяване на OBs пролиферация, диференциация и на нормалните механизми на регулация на костното ремоделиране. Тези конкретни резултати са в пълно съответствие с нашите резултати, които също демонстрират най-силно понижение на Dkk-1 нивата след проведена автоложна костномозъчна трансплантация. Освен в проучването на Heider, в редица други проучвания е установена ролята на високо-дозовата химиотерапия за значимото намаление на Dkk-1. Така например в проучването на Politou и сътр. стойностите на Dkk-1 три месеца след ASCT достигат до тези в контролната група. Освен това, авторите установяват, че считаните за рутинни биомаркери за изграждане на костта остеокалцин и bALP, започват да се нормализират едва от 8-мия месец след трансплантацията, а маркерите за костна резорбция, NTX и TRACP5, остават повишени до третия месец [265]. Така би могло да се заключи, че промените в серумните нива на Dkk-1 са по-динамични и по-рано отразяват промените в костната структура, в сравнение с рутинните биомаркери. В интересно проучване, проследяващо костни биомаркери в 12 месечен период след ASCT, след която е проведено и консолидиращо лечение по протокол VTD, не се регистрира допълнително понижаване на серумните нива на Dkk-1. В това проучване, за разлика от нашето, достигнатите нива на Dkk-1 след трансплантация се различават от тези, наблюдавани в контролната им група [359].

Доколкото ни е известно, досега в световната база данни има публикувани резултати само от едно проучване, визиращо ефекта на ASCT с последвало консолидиращо лечение с бортезомиб и леналидомид (VR) без дексаметазон и бифосфонати върху серумните нива на Scl. Изследвани са нивата на Scl непосредствено преди трансплантацията, три месеца след нея и след приключване на консолидиращата терапия. Установено е значимо понижение на Scl нива на всеки един етап от изследването ($p < 0.001$). В същото време не е наблюдавано намаляване на серумните нива на маркерите за костна резорбция, както и не са установени промени в нивата на Dkk-1, bALP и остеокалцин за изследвания период. Важно е да се отбележи, че при проследяване на пациентите в рамките на средно 62 месечен период след проведената консолидираща терапия не са наблюдавани патологични костни събития, въпреки липсата на приложение на бифосфонати [341].

1.3 Серумни нива на Dkk-1 и Scl в зависимост от терапевтичния отговор

Освен че Dkk-1 и Scl нива се променят в хода на лечението, в нашето проучване се доказва, че те са в пряка зависимост и от постигнатия отговор спрямо терапията. Така например стойностите на Dkk-1 в групата пациенти с постигнат CR и VGPR са значимо по-ниски в сравнение с тези на пациентите с PR и SD ($p=0.0475$), не се различават от тези на контролната група ($p=0.6295$) и са значимо по-ниски спрямо изходните им нива ($p<0.0001$). Точно обратни са наблюденията ни за групата пациенти с лош отговор към терапията – нивата на Dkk-1 при пациентите с PR и SD не се различават от базисните нива ($p=0.0903$) и са значимо по-високи от тези в контролната група ($p=0.0051$). Подобни са резултатите ни и за Scl. Пациентите с постигнат CR и VGPR имат значимо по-ниски нива на Scl в сравнение с пациентите с PR и SD ($p=0.0018$), но поради вече дискутираните причини се задържат по-високи и се различават от тези на контролната група ($p<0.0001$). В същото време те са значимо по-ниски спрямо изходните им нива в T0 ($p<0.0001$). Пациентите с лош отговор към терапията (PR и SD) са със Scl нива неразличаващи се от базисните им нива ($p=0.0950$) и разбира се са значимо по-високи от тези в контролната група ($p=0.0051$).

Нашите резултати са съответни на резултатите от проучването на Heider, при което независимо от приложения терапевтичен режим, дори и при лечението с талидомид, единствено т.нар. респондери (т.е. тези с CR и VGPR) имат значимо по-ниски нива на Dkk-1 три месеца след започване на лечението в сравнение с изходните нива, докато нон-респондерите (с частичен отговор и прогресия на заболяването) не достигат до статистически значимо понижение [130]. Интересни са и резултатите от проучването на Lemaire и сътр., които не установяват значимо намаление на Dkk-1 на шести месец след ASCT при пациентите с по-малко от 75% намаление на М-протеина, установено непосредствено след приключване на индукционната терапия и посочени от авторите като bad responders. Значимо намаление на шести месец се постига само при тези пациенти, които са с над 75% намаление на М-протеина след индукционната терапия (good responders). Тъй като пациентите са проследявани в рамките на три години след трансплантацията, авторите определят наблюдаваните рецидиви като ранни, настъпващи до 18-я месец, и късни – възникващи след 18-я месец. Серумните нива на Dkk-1 са определени и на 12-я месец, като при пациентите с късен рецидив е установено незначимо намаление на стойностите спрямо изходните, докато при пациентите с ранен рецидив е наблюдавано многократно увеличение на Dkk-1 нивата ($p<0.02$). На този етап от проследяването са установени незначимо по-ниски нива на М-протеина спрямо изходните стойности и за двете групи. Значима разлика в нивата му между

пациентите с ранен и късен рецидив няма. Авторите правят извода, че измерването на Dkk-1 на 12-тия месец след ASCT може да служи като добър предиктор за предстоящ ранен или късен рецидив на MM [200]. В друго проучване са проследени пациенти с постигнат CR до поява на рецидив на заболяването. Изследвани са Dkk-1 и Scl нива към момента на постигане на CR, четири месеца преди рецидива и при установяването на рецидива. Серумните нива на Dkk-1 и Scl се повишават значимо при проследяването на пациентите, като авторите подчертават, че четири месеца преди рецидива, са повишени нивата на Dkk-1 и Scl при всички пациенти, докато М-протеинът все още не се открива при повече от половината пациенти [219]. Този факт отново е в потвърждение на извода, че Dkk-1 и Scl са динамични и ранни показатели, които биха могли да се използват за предсказване на рецидив. В нашето проучване трансплантираните пациенти са проследени на третия месец след ASCT, когато те са все още в CR и техните Dkk-1 и Scl стойности са все още ниски.

Както вече беше споменато, данните относно Scl са твърде оскъдни. В проучване, включващо хетерогенна група от MM пациенти (новодиагностицирани, с MGUS и с рецидив на заболяването) има данни за нивата на Scl в зависимост от постигнатия отговор само за тези с рецидив и на монотерапия с бортезомиб. За разлика от нашето проучване, снижението на Scl нива е в еднаква степен (около 50%) както при отговорилите, така и при неотговорилите на това лечение ($p=0.67$) [346]. В по-късно проучване, визиращо ефекта на пост-ASCT консолидиращата терапия върху Scl нива, авторите са регистрирали по-изразено намаление на изследвания биомаркер при пациентите с и над VGPR [341].

Освен че Dkk-1 и Scl нива се променят в хода на лечението и са зависими от постигнатия отговор, беше любопитно да се установи дали базисните нива на белтъците биха могли да предскажат отговора спрямо терапията. За целта се проследи изходните нива на етап T0 за пациентите, които на по-късен етап постигат CR и VGPR, както и тези, които постигат PR или са в SD. Понеже не се установи значимо различие в Dkk-1 и Scl нива между двете групи ($p=0.1655$ и $p>0.9999$, респективно), считаме че изходните стойности не биха могли да предскажат отговора към терапията. В съгласие с нашите данни са и тези на Heider и сътр., които твърдят, че серумните нива на Dkk-1 преди лечението не са предиктори за постигнатия терапевтичен резултат (не е установена статистическа разлика в Dkk-1 нивата, измерени преди лечението, на отговорилите и неотговорили пациенти, $p=0.696$) [130].

2. Маркери за нарушена остеокластна активност и променено костномозъчно микрообкръжение – sRANKL, OPN, PON

Характерен белег на MBD е патологично активираната остеокластогенеза и потиснатата остеобластогенеза, обуславящи активни огнища с изявиени остеолитични процеси в костната тъкан. Осигурявайки благоприятна среда за взаимодействие на MPCs с клетъчните и неклетъчни елементи чрез директни и индиректни механизми, костномозъчното микрообкръжение играе ключова роля за прогресията на ММ и развитието на MBD.

2.1 Базисни серумни нива на sRANKL, OPN, PON при NDMM пациенти

Ние подразделихме както пациентската група, така и групата на контролните индивиди по пол и възраст (под и над 65 години), за да определим влиянието на тези биологичните фактори върху серумните концентрации на sRANKL, OPN, PON.

За sRANKL не установихме значими различия по пол и възраст, както в пациентската група, така и в контролната група. Прави впечатление обаче, че в контролната група стойностите на sRANKL при жените са по-високи от тези на мъжете с 9.5%, въпреки че не достигат до статистически значимо различие. Трудно е да съпоставим нашите данни с тези от литературата, тъй като в нея се откриват противоречиви резултати. Така например някои автори не откриват възрастово обусловени разлики [162, 370], докато други доказват, че sRANKL намалява с възрастта [175, 210]. Повечето автори доказват по-високи серумни нива на sRANKL при мъже [162, 175, 187]. Общоприето е разбирането, че естрогените потискат експресията на RANKL [239], поради което се очакват по-високи серумни нива на sRANKL при постменопаузални жени. Въпреки това, Liu и сътр., в свое проучване установяват, че китайски постменопаузални жени се характеризират с по-ниски серумни нива на този цитокин в сравнение с жените във фертилна възраст [210]. Твърде вероятно е това да се дължи на расови особености, обуславящи по-различна регулация на sRANKL експресията.

При проведения анализ не установихме значими полови и възрастови различия и за OPN. Литературните източници, в които е разгледано влиянието на биологични фактори върху серумните концентрации на OPN са твърде ограничени. В голямо датско проучване са изследвани 300 здрави индивида, за да се проучат различни фактори, които биха могли да водят до вариации при определянето на OPN. В това проучване, както и в нашето, не е установено значимо различие в зависимост от пола. Възрастовите групи, разпределени по декади, също не се отличават помежду си според серумните стойности на

OPN. Освен това е изследвано и влиянието на менструалния цикъл, както и на физическата активност, които също не водят до съществени разлики между групите [308].

За третия изследван в нашето проучване белтък, PON, се установи различие единствено между жени и мъже в контролната ни група ($p=0.0176$), като стойностите при жените са по-високи от тези при мъжете. Освен това в контролната ни група се забелязват по-високи стойности на белтъка с около 19% във възрастовата група над 65 години. Тъй като не се достига до статистическа значимост, считаме че данните съответстват на тези от литературата, защото повечето автори не откриват влияние на възрастта върху серумните концентрации на PON при здрави индивиди [42, 335]. Walsh и сътр. сравняват три възрастови групи: 16-18, 30-32 и >70 години. Авторите установяват значимо по-високи стойности за PON при лицата на 16-18 годишна възраст, когато има активно нарастване на костната маса, в сравнение с възрастовата група 30-32, когато е достигнат пикът на костната маса и нивата са най-ниски. Във възрастова група >70 години нивата имат тенденция да се повишават спрямо възрастова група 30-32, но до статистическо различие не се достига ($p=0.08$). По тази причина, определеният от тези автори референтен интервал е с голям диапазон [383]. По отношение на пола, нашите данни съвпадат с тези на Тан и сътр., които откриват по-високи стойности на PON при жени, докато други изследователи не установяват полови различия [42, 335, 383].

И при трите изследвани от нас белтъка разделянето по пол не променя установеното за общата група значимо различие между болни и здрави индивиди. Болните мъже, както и болните жени са съответно със значимо по-високи стойности от здравите за всеки един от изследваните параметри. Подразделянето на групите по възраст също не доведе до откриване на значими различия и за трите параметъра, вероятно поради сравнително тесния възрастов диапазон, характеризиращ изследваните групи. Може да се заключи, че патологичният процес при изследваната от нас кохорта NDMM пациенти надвишава по сила влиянието на биологичните фактори възраст и пол и има решаващо значение за наблюдаваните значимо по-високите стойности на sRANKL, OPN, PON при поставянето на диагнозата. Това ни дава основание да не се съобразяваме с пола и възрастта при по-нататъшните обсъждания на промените в серумните нива на тези белтъци.

Както вече беше споменато, и за трите изследвани параметъра установихме значимо по-високи серумни стойности за пациентската група в сравнение с

контролната група. Така нивата на sRANKL надвишават със 69% ($p < 0.0001$) тези на контролните индивиди. Ролята на sRANKL като основен активиращ фактор за OCs при MM е добре проучена в различни животински модели и клетъчни култури [34, 80, 263, 324]. С тези първоначални изследвания се доказват патогенетичните механизми, с помощта на които MPCs се оказват главните фактори, водещи до ъпрегулация на синтеза на sRANKL – първо те усилват експресията на sRANKL от костномозъчните стромални клетки, с които тясно взаимодействат, и така стимулират остеокластогенезата по един непряк начин; второ, MPCs могат сами да секретират sRANKL и директно, независимо от стромалните клетки, да инициират образуването на OCs. Не на последно място, MPCs потискат синтеза на разтворимия рецептор-примамка за sRANKL, OPG, в костномозъчната микросредата и така не му позволяват ефективно да контролира процесите на костно ремоделиране. В оригинална разработка на Schmiedel и сътр., се доказва, че както MPCs, така и CLL малигнените клетки експресират mRANKL (мембранно локализиран), но разтворимият sRANKL се секретира само от MPCs, с което се доказва уникалната роля на този протеин в патогенезата на MM и костната болест, каквато не се наблюдава при CLL [300]. Доказана е и корелация между костномозъчната концентрация на sRANKL със серумната му концентрация както при MM [190], така и при някои карциноми с характерно костно метастазиране [366]. Всичко това доказва неслучайното увеличение на този белтък в серума на пациенти с MM. В съгласие с нашите данни за увеличени нива на sRANKL при NDMM са и тези от редица проучвания, в някои от които увеличението е дори повече от два пъти [118, 264, 310, 354]. Още повече, че Politou и сътр. установяват повишени нива на sRANKL и при MGUS в сравнение с контролите, което предполага, че активираната остеокластогенеза е ранно събитие при моноклоналните гамопатии [264]. За разлика от всички тези проучвания, Kraj и сътр. не само, че не доказват статистически значимо повишени нива на sRANKL, но обратно, установяват значимо повишение на серумния OPG. Въпреки наблюдаваната от тях липса на статистическа значимост, когато се вгледаме обстойно в данните, се вижда, че пациентите имат по-високи стойности на sRANKL в сравнение с контролите (mean $\pm$ SD: 19.75 ± 53.42 и 4.47 ± 8.03 , съответно) [190]. Вероятно до статистическа значимост не се е достигнало, поради голямата вариация на резултатите в пациентската група. Друг колектив, изследвайки серумни нива на sRANKL при MM, доказват повишени стойности на параметъра над горна референтна граница за кита, който са използвали, при 43% от изследваните пациенти. Понеже липсва контролна група, авторите не са в състояние да уточнят дали това увеличение е

значимо [303]. Така би могло да се заключи, че е възможно методични проблеми да обуславят различията в последно цитираните проучвания.

В настоящото проучване, освен sRANKL и серумният OPN при NDMM пациентите надвишава този, измерен в контролната група, с 54% ($p < 0.0001$). При физиологични условия, в костите OPN се експресира основно в OBs и BMSCs. В основополагащо проучване на Saeki и сътр., изследващо клетъчни култури от различни В-клетъчни малигнени линии е доказана експресия и продукция на OPN единствено от MM клетъчните линии. Заключават се, че MPCs произвеждат *in vivo* OPN, който допълнително усилва костната резорбция, резултат от усилената активност на OCs [291]. От друга страна, MPCs индуцират стромалните клетки да продуцират допълнително OPN, с което вероятно се създава благоприятна среда за задържане и растеж на миеломните клетки и оформянето на един самоподдържащ се порочен кръг [326]. Полученият от нас резултат за OPN е в съгласие с тези експериментални проучвания, както и с повечето клинични проучвания, при които изходните нива на OPN при симптоматичните пациенти са значително по-високи от тези на контролите [88, 232, 291, 326, 378]. Любопитно е, че някои автори откриват повишени нива на OPN дори в ранните етапи на болестта, още в стадия на MGUS [326], а други не доказват подобно различие [232, 291]. За разлика от тези проучвания, Kang и сътр. не откриват значителна разлика в нивата на OPN между пациентската и контролната група, но това е извод, направен изследвайки само 13 NDMM пациента и 14 здрави индивида [168]. Нещо повече, Maaroufi и сътр. в скорошно свое проучване с MM пациенти в I-ви клиничен стадий установяват дори значително по-ниски нива на OPN спрямо контролите. Интересен е фактът, че в същото това проучване паралелно е изследван и BSP (bone sialoprotein), който е значимо по-висок в пациентската група, без авторите да дискутират тези озадачаващи резултати [217]. Известно е, че BSP и OPN принадлежат към SIBLING фамилията. Като матрицелуларни протеини проявяват селективен афинитет към раковите клетки, метастазиращи в костите, и обуславят различен тип костни лезии – OPN стои в основата на остеолитичните лезии, докато BSP предопределя остеосклеротичен тип на лезиите [41].

Ролята на PON в патогенезата на MM е слабо изяснена. В едно експериментално проучване се предполага, че фибробластоподобните клетки от костномозъчната микросреда участват в ремоделирането на ECM и водят до повишена синтеза на различни матриксни протеини, включително и на PON. По този начин се създава благоприятна среда за развитието на MPCs. Чрез протеомен анализ на супернатант от фибробластоподобни клетки, изолирани от

костен мозък на пациенти с MGUS и такива с активен ММ е установена по-висока концентрация на PON в супернатанта, произхождащ от пациентите с активен ММ [320]. От тази гледна точка нашите данни, установяващи значимо повишени стойности на PON с 63% ($p<0.0001$) при пациентите в сравнение с контролните индивиди, са в съгласие с експерименталните резултати от горепосоченото проучване. По отношение на сравнение с резултати от клинични проучвания, нямаме особено голям избор, защото доколкото ни е известно само един научен колектив е работил по този проблем и е публикувал данни. Независимо от различните по брой NDMM пациенти, посочени в отделните им публикации, винаги се получават значимо по-високи стойности за PON с около 70% ($p<0.001$) при пациентите в сравнение с контролната група. Авторите са изследвали и група пациентите с рецидив на заболяването, при които също е наблюдавано повишение с около 75% ($p=0.016$) на PON в сравнение с контролите [340, 347–349].

Освен сравнението с контролната група, проучихме и как се променят изследваните показатели в зависимост от характеристиките на миеломната болест. Първоначално изследвахме зависимостта на серумните им концентрации от стадия на ММ. С напредване на стадия на заболяването се наблюдава прогресивно нарастване на серумните нива на sRANKL. Стойностите на sRANKL в стадий ISS-II заемат едно междинно място между установените в ISS-I стадий и тези в ISS-III стадий, без да има статистически значимо различие между тях. Постепенното нарастване с по 13% при всяко едно преминаване от стадий в стадий, води до общо нарастване на стойностите с 28% между ISS-I и ISS-III и достигане на значима разлика между тях ($p=0.0013$). Оста RANK/RANKL се намесва в патогенезата на ММ още от ранните етапи на заболяването. Така например Roux и сътр. изследват имунохистохимично костен мозък от здрави индивиди, MGUS пациенти и от такива с активен ММ. Установена е нарастваща експресия на белтъка от стромалните клетки – почти липсваща в контролните биопсични материали, по-високи в тези от MGUS пациентите и значимо по-високи в костния мозък на ММ пациентите [287]. В допълнение Heider и сътр. доказват флуоцитометрично, че и MPCs в костния мозък експресират RANKL [129]. Като се има предвид, че костномозъчната инфилтрация с MPCs нараства с прогресията на заболяването, не е изненадващо, че откриваме постепенно нарастващи стойности на sRANKL от ISS-I стадий към ISS-III стадий. Още повече, че данните ни съответстват на повечето, открити в литературата. Така напр. Politou и сътр. установяват значимо по-високи стойности за sRANKL при MGUS пациенти в сравнение с контролни индивиди ($p<0.0001$), които от своя

страна са значимо по-ниски от тези при MM пациенти в стадий ISS-I/ISS-II ($p=0.042$) [264], а Goranova-Marinova и сътр. откриват значима разлика в sRANKL нивата между ISS-I/ISS-II и ISS-III ($p<0.05$) [118]. Въпреки, че Jakob и сътр. измерват tRANKL (параметър, измерващ общо свободния и свързания с OPG RANKL), авторите докладват резултати почти идентични с нашите резултати (ISS-I vs ISS-II: $p=0.091$; ISS-II vs ISS-III: $p=0.029$ и ISS-I vs ISS-III: $p=0.004$) [155].

И за OPN се наблюдава прогресивно нарастване на серумните му нива с напредване на стадия на заболяването. OPN се повишава с около 10% между ISS-I и ISS-II стадий без значимо различие между тях ($p=0.293$). Между ISS-II и ISS-III стадий, обаче, покачването на стойностите е по-стръмно (36%), като почти се достига до статистическо значимо различие ($p=0.0505$). Това предопределя и значимата разлика между ISS-I и ISS-III стадий ($p=0.0003$), чиито стойности се различават помежду си с 49%. Вероятно това се дължи на факта, че OPN създава благоприятна среда за адхезия и пролиферация на миеломните клетки, които също продуцират OPN и обуславят по-високи нива на протеина в по-късните етапи на заболяването. Minarik и сътр., изследвайки серумни нива на хепатоцитния растежен фактор (HGF), сидекан-1/CD138 (SYN) и OPN при MM пациенти откриват тенденция към нарастване на стойностите на OPN с напредване стадия на заболяването [232]. По-категорични са резултатите, публикувани от Saeki и сътр. Техните пациенти са стадирани по системата Durie-Salmon от 1975 г. и при тях са наблюдавани следните резултати за OPN (ng/ml): SMM vs Stage III (MM, inactive) – 383 ± 43 vs 816 ± 134 , $p<0.05$; Stage III (MM, inactive) vs Stage III (MM, active) – 816 ± 134 vs 1991 ± 406 , $p<0.01$ [291].

В нашето проучване зависимостта на серумните концентрации на PON от стадия на MM следва тези, описани вече за sRANKL и OPN. Нарастването на PON между ISS-I и ISS-II стадий е с 19% ($p=0.0012$), а между ISS-II и ISS-III стадий е с 21% ($p=0.1378$), като отново се наблюдава значимо различие между ISS-I и ISS-III стадий ($p<0.0001$), чиито стойности се различават помежду си с 44%. Единственият колектив, изследвал PON при MM, чрез ANOVA анализ доказва статистически значима разлика ($p<0.01$) в концентрациите на PON (ng/ml) с постепенно нарастване на стойностите с прогресията на заболяването – ISS-I vs ISS-II vs ISS-III: 542 ± 196 vs 775 ± 500 vs 1036 ± 801 [347]. Посредством взаимодействието на PON с интегриновите рецептори на MPCs се осигурява благоприятна среда за тяхната пролиферация и преживяемост. Взаимодействията на MPCs с костномозъчната микросреда водят до повишена секреция на PON както от миеломните, така и от стромалните клетки. Този

самоподдържащ се порочен цикъл води до непрекъснатото нарастване на белтъка с напредване на заболяването.

Увеличената костна резорбция е отличителен белег на ММ. Остеолитичните лезии се откриват в близост до MPCs, което е основание да се предполага, че те вземат участие в производство на цитокини, които да стимулират диференциацията и пролиферацията на OCs. Heider и сътр. за първи път установяват значимо по-висока експресия на RANKL от MPCs, изолирани от костен мозък на ММ пациенти с остеолитични лезии в сравнение с тези без остеолитични лезии ($p < 0.0005$) [129]. Така не е изненадващо, че в настоящото проучване серумните стойности на sRANKL в група G1 (≤ 3 остеолитични лезии) са значимо по-ниски в сравнение с тези в група G2 (> 3 остеолитични лезии), $p = 0.0092$. Тези резултати съответстват на данни, публикувани от други автори. Terpos и сътр. първи изследват нивата на sRANKL, OPG и тяхното отношение при ММ пациенти с различна степен на изява на MBD и откриват значимо различие ($p < 0.0001$) между серумните нива както на отделно изследваните sRANKL и OPG, така и на тяхното отношение в трите дефинирани групи (без остеолитични лезии, с 1-3 лезии и > 3 лезии) [354]. Значимо по-високи стойности ($p < 0.05$) за sRANKL установяват по-късно Goranova-Marinova и сътр. в групата пациенти с MBD степен „0+1“ спрямо MBD степен „2+3“, както и Sfiridaki и сътр., които при същия начин на оценка на MBD откриват почти шесткратно по-високи стойности при пациентите с тежко засягане на костната система ($p < 0.0001$) [118, 310]. Макар и изследващи tRANKL, Jakob и сътр. доказват почти трикратно по-високи серумни стойности при ММ пациентите с остеолитични лезии спрямо тези без лезии ($p < 0.001$) [155]. Всички тези данни подчертават значението на sRANKL като информативен биомаркер, корелиращ със степента на засягане на костната система, особено като се вземе предвид и доказаната от Terpos и сътр. силна корелация между sRANKL и утвърдените маркери за костно разграждане NTX и TRACP-5b ($r = 0.69$, $p < 0.0001$ и $r = 0.87$; $p < 0.0001$ съответно) [354].

Експериментални проучвания с мишки стоят в основата на разбирането за значимата роля на OPN в костната хомеостазата, като е доказано, че мишки с дефицит на OPN са защитени от загуба на костна маса [152, 410, 413]. Тези първоначални данни за OPN провокират интереса към белтъка и ролята му за костната болест при ММ. Повечето автори откриват значимо по-високи нива на OPN при ММ пациенти с напреднала костна болест, въз основа на което го посочват като потенциален биомаркер за мониториране на MBD. Данните от нашето проучване, сочейки значимо по-високи нива на OPN в група G2 спрямо група G1 ($p = 0.0002$) са в подкрепа на резултатите, посочени от Saeki и сътр.

[291], които разделяйки пациентите с и без остеолитични лезии, откриват значимо различие между тях ($p < 0.01$). Подобно на тях Sfiridaki и сътр. наблюдават значима разлика в OPN нивата ($p = 0.006$) в зависимост от степента на костната болест (по-високи при пациентите с MBD степен 2 и 3 в сравнение с тези със степен 0 – 1) [309]. Сравнявайки пациенти с и без остеолитични лезии Valković и сътр. също откриват значимо по-високи стойности на OPN за първата група ($p = 0.03$) [378]. Високите нива на OPN не винаги корелират с MBD. Така напр. Standal и сътр., въпреки че откриват повишени нива на OPN още в MGUS стадия, които освен това нарастват в по-напредналите стадии, не установяват връзка между степента на засягане на костната система и OPN. Независимо от този факт, авторите, основавайки се на добре известната функция на OPN да активират OCs, твърдят, че OPN е важен за патогенезата и прогресията на ММ [326]. Според Robbiani и сътр. потенциалната стойност на този маркер би трябвало да бъде оценявана и в съчетание с молекулярния тип на заболяването. Изследвайки OPN експресията в няколко различни човешки миеломни клетъчни линии и в първични MPCs, изолирани от костен мозък на NDMM пациенти, те установяват висока OPN експресия само в клетките, експресиращи едновременно и транскрипционните фактори *c-maf* или *mafB*. Интересен е фактът, че при пациенти, чиито костномозъчни MPCs експресират високи нива на OPN, липсват остеолитични лезии. Авторите предполагат, че в случаите на *maf* транслокация OPN противодейства на ефекта на остеолитичните фактори, генерирани от взаимодействието между MPCs и BMSCs. MPCs придобиват способност да свръхпроизвеждат OPN по автокринен механизъм. Изглежда че, богатата на OPN микросреда на костния мозък парадоксално потиска активирането на OCs, което води до по-слабо изразена MBD в тези случаи [283].

По отношение на PON и връзката му с MBD, ние установихме значимо по-високи стойности на белтъка в G2 групата ($p = 0.0002$) спрямо G1. Terpos и сътр. доказват, че серумните нива на PON адекватно отразяват повишена костна резорбция при ММ чрез установената значима корелационна връзка между PON и CTX ($r = 0.369$, $p = 0.005$). Освен това, пациентите с >3 остеолитични лезии и/или патологични фрактури имат значимо по-високи стойности на PON в сравнение с всички останали ($p = 0.01$) [340]. По-късно същият колектив установява близо два пъти по-високи нива на PON в костномозъчна плазма ($p < 0.001$) и серум ($p = 0.032$) при NDMM пациенти с патологични фрактури, спрямо всички останали [347].

При изследването на серумните концентрации на sRANKL, OPN и PON в зависимост от степента на засягане на костната система при ММ, ние

установихме също и статистически значима разлика между стойностите им в G1 и тези в контролната група ($p=0.0102$, $p=0.0146$ и $p=0.0231$, съответно). Тези резултати са в подкрепа на тезата, че изследваните биомаркери са достатъчно динамични и променят концентрацията си дори при минимални костни увреди, наблюдавани при активен ММ.

В настоящото проучване изследвахме и взаимовръзките на sRANKL, OPN и PON с важните хематологични, морфологични и биохимични показатели, използвани за поставяне на диагнозата и за мониториране на ММ. И за трите изследвани показателя установихме, че стойностите им са значимо по-високи при пациентите с BMI>60% от MPCs в сравнение с тези с <60% инфилтрация ($p=0.0169$, $p=0.0158$ и $p=0.0003$ съответно за sRANKL, OPN и PON). Доказахме и умерена по сила и статистически значима корелационна връзка между BMI и sRANKL ($r=-0.3304$ и $p=0.0349$), както и между BMI и PON ($r=-0.4172$ и $p=0.0067$). За разлика от тях, не установихме статистически значима взаимовръзка между OPN и BMI ($r=-0.2607$ и $p=0.0997$), въпреки 30% увеличение на OPN в групата пациенти с BMI>60%. Счита се за доказано, че OPN създава благоприятна среда за адхезия и растеж на туморните клетки [336] и от тази гледна точка е учудваща липсата на корелационна зависимост между BMI и OPN. Подобна липса на корелация откриваме и в проучването на Standal и сътр. [326]. $\beta 2$ -MG е важен серумен маркер, отразяващ туморния товар при различни неопластични заболявания, включително и ММ. Неслучайно именно той, а не BMI, е включен като един от факторите при стадиране на заболяването по ISS [76]. Спрямо $\beta 2$ -MG ние откриваме значителна положителна корелация с всеки един от трите изследвани показателя (sRANKL: $r=0.5756$, $p<0.0001$; OPN: $r=0.6968$, $p<0.0001$ и PON: $r=0.7791$, $p<0.0001$). Това доказва, че изследваните белтъци отразяват достатъчно добре основни характеристики на ММ, особено като се вземат предвид и останалите изследвани корелационни връзки: отрицателни с Hb, тромбоцити и албумин и положителни с общия белтък и креатинин.

Известно е, че бъбречната увреда в резултат на различни патологични процеси, индуцира и вторични нарушения в костта. Така увеличените нива на PTH при вторичния хиперпаратиреоидизъм индуцират активиране на OBs с последваща увеличена експресия на RANKL и намалена експресия на OPG. В *in vitro* проучване, проведено от Huang, е установено, че PTH значително повишава експресията на mRNA за RANKL от стромалните OBs и инхибира генната експресия на OPG на всички етапи от диференцирането на OBs [145]. В литературата съществуват противоречиви резултати за нивата на RANKL при хронична бъбречна болест (CKD), като се намират нормални, високи и ниски

нива на протеина спрямо контролни индивиди [6, 14, 91, 311]. В проучване на Goranova-Marinova и сътр. при пациенти с ММ е установено, че серумните нива на sRANKL в групите на пациенти с креатинин под и над 168 $\mu\text{mol/l}$ не се различават [118]. Ние също не установяваме значима разлика в серумните нива на sRANKL при пациентите с креатинин над 177 $\mu\text{mol/l}$ и под 177 $\mu\text{mol/l}$ ($p=0.1037$). Бъбречната тъкан е една от най-богатите на OPN [49]. OPN нормално се експресира във възходящото рамо на бримката на Хенле и в конволутните тубули на дисталните нефрони на бъбрека при физиологични условия. Има натрупани достатъчно експериментални данни за ролята на OPN в патогенезата на редица бъбречни заболявания, като експресията му значително се увеличава (до 18 пъти) във всички тубулни сегменти и в гломерулите след увреждане на бъбреците [403]. При пациенти с ХБН, особено при тези с диабетно бъбречно заболяване и гломерулонефрит, също е установена повишена експресия на OPN в бъбреци, както и на концентрацията му в кръв и урина [319]. В литературата не откриваме данни за остеоопонтин при бъбречна увреда като следствие от ММ. Въпреки различните патогенетични механизми, обуславящи бъбречната увреда при диабет и ММ, би могло да се предположи, че с напредване на ММ и неминуемото засягане на бъбречната тъкан, в нея би могло да се увеличи експресията на OPN. Вероятно е, установените от нас повисоки серумни нива на OPN при пациентите с креатинин над 177 $\mu\text{mol/l}$ в сравнение с тези под 177 $\mu\text{mol/l}$ ($p=0.0407$) да се дължат и на увредената бъбречна функция. При физиологични условия PON не се открива в бъбречната тъкан [153], но Satirapoj и сътр. установяват, че периостинът е силно експресиран в тубуло-интерстициалните зони при бъбречна увреда. Авторите намират, че PON в урината е мярка за загуба на бъбречните тубулни клетки и може да служи като ранен маркер за бъбречна увреда при диабетната нефропатия [294]. Доколкото ни е известно, в литературата не е изследвана връзката между тубуло-интерстициалните увреди при ММ и серумните нива на периостин. В нашето проучване ние не установяваме значима разлика в нивата на PON при NDMM пациенти с креатинин над 177 $\mu\text{mol/l}$ и под 177 $\mu\text{mol/l}$ ($p=0.7745$). От друга страна, установяваме значима положителна корелационна връзка между трите изследвани белтъка с креатинин – умерена по сила за sRANKL (Spearman $r=0.3528$, $p=0.0237$) и значителна по сила за OPN (Spearman $r=0.6047$, $p<0.0001$) и PON (Spearman $r=0.5311$, $p=0.0004$). В проучване на Горанов и сътр. са изследвани патогенетичните взаимоотношения между костните и бъбречни увреждания при пациенти с ММ. Авторите заключават, че те са изградени на принципа на порочния кръг и модулират взаимно своята клинична изява [1].

2.2 Серумни нива на sRANKL, OPN и PON, установени в хода на провежданото лечение

Освен при диагнозата (етап T0), серумните нива на sRANKL, OPN и PON са проучени и в динамика на етапи T1, T2 и TA при провеждане на лечението на NDMM пациентите. Наблюдава се постепенно намаление на стойностите при преминаване от един етап към следващ за всички изследвани белтъци. С помощта на Kruskal-Wallis теста се установи, че съществува статистически значимо различие и за трите изследвани белтъка, измерени в отделните етапи от проучването (sRANKL: $\gamma^2=20.45$, $p<0.0001$; OPN: $\gamma^2=24.7$, $p<0.0001$ и PON: $\gamma^2=25.49$, $p<0.0001$). За да се установи между кои етапи точно е различието са проведени няколко допълнителни *post hoc* теста на Mann-Whitney. При сравняване на концентрациите на белтъците на етапи T1 и T2 с изходните им нива се установява статистическо значимо различие само за PON (T1 vs T0: $p=0.0016$; T2 vs T0: $p=0.0024$), докато за sRANKL и OPN понижението на стойностите е незначимо. Съществено е понижението на нивата и за трите изследвани белтъка на етап TA както спрямо изходните нива, така и спрямо тези на етап T1 (sRANKL, OPN и PON – TA vs T0: $p<0.0001$, $p<0.0001$ и $p<0.0001$, съответно; TA vs T1: $p<0.0001$, $p<0.0001$ и $p=0.0054$, съответно). Трите белтъка се различават по степента на спадане на нивата им в хода на проведеното лечение, като най-динамично се променя PON. Серумните нива на sRANKL, PON и OPN три месеца след ASCT са толкова силно понижени, че не се различават от тези, наблюдавани в контролната група. При нетрансплантираните пациенти постигнатите нива на етап T2 се доближават до тези на контролната група само за PON ($p=0.1899$), докато за OPN се наблюдава тенденция за значимо различие от контролните стойности ($p=0.0506$), а за sRANKL се установява значимо различие ($p=0.006$). При извършването на субанализ на данните от етап T1 чрез допълнително разделяне на пациентите (подлежащи и неподлежащи за ASCT), се констатира, че пациентите в група T1(A) имат значимо по-ниски стойности спрямо T0 за sRANKL ($p=0.0032$) и за PON ($p=0.0042$), но не и за OPN ($p=0.1533$). При пациентите от група T1(nonA) различие на стойностите спрямо T0 се наблюдава единствено за PON ($p=0.0402$). Тези данни отново подчертават, че прилаганата терапия най-съществено повлиява стойностите на PON още на етап T1 и за двете субгрупи. За да се достигне до значимо понижение на sRANKL на етап T1 е необходимо пациентите да са постигнали CR или VGPR, докато за OPN типът отговор не е определящ. OPN се повлиява най-слабо от конвенционалната терапия и значимо понижаване на стойностите му се наблюдава единствено след ASCT.

Освен с доказаната си антитуморна активност [334] и индукция на OBs диференциация [367], бортезомиб би могъл да има инхибиращ ефект върху експресията на RANKL. В експериментално проучване на Lin и сътр. се установява намалена експресия на RANKL в човешка миеломна клетъчна линия RPMI 8226 при третиране с бортезомиб, която е дозо- и време зависима [205]. В друго експериментално проучване, макар и с немиеломни клетки, а с клетки от периодонтален лигамент, е установено, че бортезомиб увеличава експресията на мРНК на редица костобразуващи белтъци, включително и OPN чрез увеличаване на цитозолното натрупване и ядрената транслокация на β -катенин [184]. Доколкото ни е известно в литературата не се откриват данни за ефекта на бортезомиб върху периостиновата експресия. Резултатите от първото експериментално проучване обясняват поне частично наблюдаваното в нашето проучване постепенно намаление на серумните нива на sRANKL, като ефектът е най-изразен при пациенти, постигнали CR и VGPR и след ASCT. Повишената, а не потиснатата експресия на OPN, доказана във второто експериментално проучване, би могла да стои в основата на наблюдаваните от нас по-нединамични промени в серумните нива на OPN в хода на провежданото лечение.

Terpos и сътр. в две последователни проучвания установяват при пациенти с ММ рецидив значимо понижение на sRANKL в хода на монотерапия с бортезомиб при първото проучване или прилагане на VMDT протокол (бортезомиб, мелфалан, дексаметазон, талидомид) във второто. И в двете проучвания авторите доказват значимо понижение на sRANKL още на 4-ти курс ($p=0.01$), както и след 8-ми курс ($p<0.001$) [339, 355]. Любопитно е, че във второто проучване, авторите обвързват понижението на sRANKL и с отговора към терапията. За разлика от тях, ние наблюдаваме незначимо понижение на sRANKL на етап T1 и T2, но при допълнителния субанализ на данните от T1, установяваме също като тях значимо понижение на sRANKL при пациенти, постигнали CR или VGPR. Sfiridaki и сътр. при приложение на PAD протокол (бортезомиб, адриамицин и дексаметазон) също откриват значимо понижение на sRANKL само при пациентите постигнали CR и VGPR и провели ASCT ($p<0.005$) [310]. За разлика от нас, в по-късно проучване Terpos и сътр. установяват стойности на sRANKL при трансплантирани пациенти все още различни от стойностите в контролната им група ($p=0.037$) [359].

Проследяване ефекта от лечението върху стойностите на OPN откриваме в няколко проучвания. В проучване на Sfiridaki и сътр. се отчита значимо намаление на OPN след проведена химиотерапия ($p<0.05$). В статията не е посочен терапевтичният режим (медикаменти и брой курсове, както и

постигнатия отговор) [309]. В проучването на Minarik и сътр. отново са установени по-ниски стойности на OPN след проведена химиотерапия и постигната ремисия на заболяването ($p=0.0003$) в сравнение с тези при диагнозата. Използвани са различни протоколи, като 40% от пациентите са лекувани с протоколи, съдържащи талидомид и отново не е уточнен броят на курсовете [232]. Terpos и сътр. проследяват пациенти с рецидив на ММ в динамика (след 4-ти и 8-ми курс на лечение по протокол VMDT). За разлика от нас, авторите констатирали значимо понижаване на стойностите на OPN както след четвъртия цикъл, така и след осмия цикъл ($p<0.01$ и $p<0.0001$, съответно) [355]. Това по-значимо и бързо снижаване на серумните нива на OPN в посочените проучвания, според нас, би могло да се дължи на включения в протоколите талидомид. Установено е, че талидомид в миши модел на хепатоцелуларен карцином потиска синтеза на OPN и така намалява инфилтративната и метастатична активност на тумора [204]. Предполагаме, че талидомид би могъл да проявява подобен ефект и при ММ. Доколкото ни е известно само Minarik и сътр. проследяват ефекта от ASCT върху нивата на OPN и установяват значимо понижение спрямо изходните нива, независимо от постигнатия отговор [232].

В единственото проучване относно периостинови нива при ММ има оскъдни данни за ефекта от приложената терапия. Съобщени са серумните нива на PON при пациенти в плато фазата (6 месеца със стабилен М-протеин). Авторите говорят за „гранично“ намаляване на концентрацията на PON, но посочват значима стойност за p ($p=0.05$). В същото време PON продължава да е повишен в сравнение със здравите контроли ($p=0.013$) [347]. С други думи, е наблюдаван положителен ефект от терапията върху серумните нива на PON. В това отношение нашите резултати са сходни с тези от посоченото проучване. Липсват, обаче, данни за нивата на PON непосредствено след приключване на един или друг цикъл в хода на терапията, както и не е упоменат терапевтичният режим, с който са лекувани пациентите. При тези обстоятелства е трудно да се прецени динамиката в промяната на концентрацията на циркулиращия белтък в тяхното проучване, така както е установено в нашето.

2.3 Серумни нива на sRANKL, OPN и PON в зависимост от терапевтичния отговор

В настоящото проучване е проследена и зависимостта на серумните нива на sRANKL, OPN и PON от постигнатия отговор спрямо терапията. Пациентите, които постигат CR и VGPR, имат стойности значимо по-ниски от тези при пациентите с PR или в SD ($p=0.0167$, $p=0.0134$ и $p=0.0510$ съответно за sRANKL, OPN и PON). В първата група (CR и VGPR) стойностите на OPN и

PON са толкова значимо понижени, че не се различават от тези в контролната група. За разлика от тях, sRANKL нивата в тази пациентска група са все още значимо по-различни от контролите ($p=0.0036$). Отчитаме факта, че групата на пациентите, постигнали CR и VGPR, е нехомогенна. Тя е формирана от всички пациенти с такъв отговор, независимо на кой етап от лечението са го постигнали. Нивата на sRANKL при T1(A) пациентите, въпреки че са постигнатия CR и VGPR още на етап T1, имат значимо по-високи нива спрямо TA пациентите ($p=0.0005$), както и спрямо контролите ($p=0.0012$). Единствено TA пациентите са със стойности на sRANKL, неразличаващи се от тези на контролните индивиди. Така се оказва, че високодозовата химиотерапия, последвана от ASCT е в състояние да нормализира стойностите на sRANKL, важен елемент за подобряване на дисбаланса в процесите на костното ремоделиране. За разлика от нас, Terpos и сътр. установяват стойности на sRANKL при трансплантирани пациенти все още различни от стойностите в контролната им група. При провеждане на консолидираща терапия по протокол VTD (6 курса) авторите посочват значителна промяна единствено в нивата на CTX, достигащи тези на контролите, но не и за останалите изследвани костни биомаркери, включително и за sRANKL [359].

Доколкото ни е известно, в литературата не се откриват данни относно зависимостта на серумните нива на OPN и PON от постигнатия отговор при лечението на ММ.

3. Диагностична надеждност на изследваните костни биомаркери

В съвременната медицинска практика биомаркерите са важни инструменти, използвани в диагностичния процес, прогнозиране изхода от заболяването и/или мониториране на лечението. Биомаркерът се определя като характеристика, която обективно може да бъде измерена и служи като индикатор за нормални и патологични биологични процеси, както и за оценка на фармакологичния отговор към определена терапевтична интервенция [35]. Костта представлява метаболитно активна и динамична структура. Физиологичното костно ремоделиране е дълбоко дисрегулирано при ММ. Патологичните процеси, протичащи в костния мозък при заселването и пролиферацията на MPCs, водят до свръхекспресия на разнообразни цитокини и белтъци от ЕСМ, част от които навлизат в системното кръвообращение и биха могли да бъдат лесно измерими.

Като съществена клинична характеристика на ММ, костното засягане се обективизира основно с помощта на образни изследвания. Конвенционалната рентгенография, считана преди време като златен стандарт при откриване на

костни увреждания, поради редица недостатъци се замени с нови методи за визуализация, които включват WBLDCT, FDG-PET/CT и MRI. Понастоящем WBLDCT е широко достъпна, сравнително евтина и лесна за изпълнение методика с кратко време за сканиране, характеризираща се с висока чувствителност [267]. Европейската миеломна група (European Myeloma Network, EMN) и Европейското дружество по медицинска онкология (European Society to Medical Oncology, ESMO) препоръчват WBLDCT като метод на избор за първоначална оценка на литични костни увреждания, свързани с ММ [414]. Въпреки това, IMWG съветва, че трябва да се внимава със свръхинтерпретацията на двусмислени или малки (<5 mm) просветлявания [277]. Според Baffour и сътр. WBLDCT има сравнително ограничена роля при оценката на отговора към лечението [16]. Това обяснява и повишения интерес на научната общност към идентифициране на нови биомаркери, които биха могли да се използват в диагностичния процес и мониторирането на MBD.

Оценката на диагностичните тестове е важен въпрос в съвременната медицина не само за потвърждаване на наличието на заболяване, но и за изключване на заболяването при здрави хора. Диагностичната надеждност на даден лабораторен метод се измерва с вероятностни величини, които характеризират възможността му да разграничава надеждно състояние на болест от състояние на здраве. През последните четири десетилетия ROC анализът се превърна в популярен метод за оценка на точността на диагностичните тестове. Важна характеристика на ROC анализа е, че индексите му за точност не се изкривяват от произволно избрани критерии, изработени от изследователски групи. Изведената обобщена мярка за точност „площ под кривата“ (AUC), ефективна и комбинирана мярка за чувствителност и специфичност, определя присъщата способност на теста да разграничава болната от здравата популация [122].

В настоящото проучване проведохме ROC-анализ за оценка на диагностичната надеждност на Dkk-1, Scl, sRANKL, OPN и PON. За всички изследвани показатели AUC е със стойност над 0.8 при $p < 0.0001$, като за два от тях (склеростин и периостин) се достига дори до стойност близка до 0.9 (за склеростин $AUC = 0.9127$, а за периостин $AUC = 0.8920$). При ROC анализа е общоприето, че ако $AUC = 1$, то диагностичният тест е перфектен при разграничаването на болните от здравите. Стойност, равна на единица, се отнася единствено за случаите, когато резултатите на болните не се припокриват с тези на здравите. Така нашите резултати за AUC, близки до единицата, красноречиво говорят, че изследваните показатели се отличават с висока диагностична надеждност. Въз основа на проведения ROC анализ е

определена и cut-off стойност за всеки един от показателите, характеризираща се с висока чувствителност и специфичност и позитивен коефициент на вероятност (Likelihood ratio, LR) над единица, който показва колко пъти е по-голям шансът изследваният индивид да е болен, ако резултатът му е над определената cut-off стойност (таблица 44).

При изследване зависимостта на серумните нива на Dkk-1, Scl, sRANKL, OPN и PON от степента на изява на костната болест установихме статистически значима промяна за петте параметъра. Това ни даде основание да изследваме предиктивната стойност на всеки един от тях чрез допълнителен ROC анализ и възможността им правилно да отдиференцират пациентите с леко засягане на скелетната система (G1) от тези с тежко засягане (G2). Определихме най-висока AUC стойност за склеростин (0.9340, $p < 0.0001$), следвана от тези за остеопонтин (AUC=0.7639, $p = 0.0167$), Dkk-1 (AUC=0.7438, $p = 0.0479$) и периостин (AUC=0.7298, $p = 0.0474$). Стойността на AUC за sRANKL се доближава до 0.5 при $p > 0.5$. AUC=0.5 означава случайна дискриминация, при която кривата се намира на диагоналната линия в ROC пространството. Този резултат за sRANKL го прави непригоден за надеждно отдиференциране на пациентите с различна степен на костно засягане. За всички останали показатели, при които сме получили високи стойности на AUC, е изчислена и cut-off стойност със съответните ѝ диагностична специфичност и диагностична чувствителност, която би могла да се ползва за определяне тежестта на MBD (таблица 45). Доколкото ни е известно, в научната литература липсват данни за проведен ROC анализ за показателите, които са обект на настоящия дисертационен труд, което не ни дава възможност да направим сравнителен анализ на резултатите ни с други подобни.

Въз основа на резултатите от ROC анализа, бе приложен и логистичен регресионен анализ, за да се оцени индивидуалният ефект на изследваните биомаркери за прогресията на миеломната костна болест. От постъпково проведените регресионни анализи установихме, че най-значима е комбинацията от параметрите Scl и PON относно предикция прогресията на костната болест. Състави се и регресионно уравнение, което с много голяма вероятност може да даде правилен отговор при конкретни стойности на биомаркерите периостин и склеростин за даден пациент с каква степен на костно засягане би бил той, т.е. дали би попаднал в група G1 или G2. Уравнението има следния вид:

$$p = \frac{e^{24.675 - 0.019[PON] - 0.028[Scl]}}{1 + e^{24.675 - 0.019[PON] - 0.028[Scl]}}$$

Проведените ROC анализи потвърждават високата диагностична значимост на изследваните костни биомаркери, а регресионният анализ откроява два от тях, които с най-голяма степен на вероятност биха могли да прогнозират костното заболяване.

VI. ИЗВОДИ

1. Серумните нива на Dkk-1, склеростин, sRANKL, остеопонтин и периостин са значимо по-високи при NDMM пациентите в сравнение с контролните индивиди.
2. Серумните нива на Dkk-1 и склеростин при NDMM пациенти нарастват с напредване на клиничния стадий на ММ и отразяват потиснатата остеобластна активност в костен мозък.
3. Серумните нива на sRANKL, остеопонтин и периостин при NDMM пациенти нарастват с напредване на клиничния стадий на ММ и отразяват промененото костномозъчно микрообкръжение, предопределящо повишената остеокластна активност.
4. Серумните нива на Dkk-1, склеростин, sRANKL, остеопонтин и периостин при NDMM корелират с тежестта на миеломната костна болест.
5. Серумните нива на Dkk-1, склеростин, остеопонтин и периостин надеждно дискриминират пациентите с по-леко костно засягане от тези с по-тежко и биха могли да се използват като допълнителен елемент за оценка на костната болест.
6. Установената позитивна корелационна взаимозависимост на изследваните биомаркери с костномозъчната инфилтрация и В2МГ, както и отрицателната взаимовръзка с хемоглобин вероятно отразяват туморния растеж и прогресията на заболяването.
7. Изследваните биомаркери се отличават с много добър диагностичен потенциал като надеждно дискриминират болни от здрави индивиди, доказано посредством проведения ROC анализ.
8. Изследваните биомаркери са динамични показатели и се променят в хода на лечението, като намалението на серумните им нива е в зависимост от броя на проведените терапевтични курсове.
9. Бортезомиб базираната терапия има ефект не само за потискане на туморния процес, но е с потенциал да се намесва в процесите на костно ремоделиране и да подобрява дисбаланса между остеокластогенезата и остеобластогенезата.
10. Най-ниски серумни нива на Dkk-1, склеростин, sRANKL, остеопонтин и периостин в хода на провежданото лечение са установени след ASCT, доказващо ролята на високодозовата химиотерапия не само за редуциране на туморния обем, но и благотворния ѝ ефект по отношение на костния метаболизъм.
11. Нивата на изследваните биомаркери са зависими от постигнатия отговор към терапията и са значимо по-ниски при пациентите с CR и VGPR спрямо

останалите пациенти, отговорили на лечението. Те биха могли да служат като допълнителен елемент за оценка на отговора към терапията.

12. От всички изследвани биомаркери най-чувствителни и значими за прогресията на миеломната костна болест са склеростин и периостин.

VII. ПРИНОСИ

Приноси с оригинална научна стойност:

1. За първи път е изследвана оригинална комбинация от нови костни биомаркери, оценяващи едновременно потисната остеобластна активност, повишена остеокластна активност и променената костномозъчна среда, благоприятстваща заселването и пролиферацията на миеломните плазматични клетки.
2. За първи път е доказано, че изследваната оригинална комбинация от нови костни биомаркери отразява адекватно промените в костния мозък и клиничните характеристики на заболяването, което предоставя допълнителна възможност за оценка състоянието на пациентите с ММ при диагностицирането и проследяването им.
3. За първи път е изследвана динамиката в серумните нива на новите костни биомаркери в хода на терапевтичния процес и е анализирана зависимостта им от отговора към терапията.

Приноси с приложна научна стойност:

1. Новите костни биомаркери биха могли да се използват като допълнителни параметри за оценка на стадия и прогресията на ММ.
2. Новите костни биомаркери биха могли да се използват като допълнителни параметри за оценка на костната болест при ММ.
3. Новите костни биомаркери биха могли да служат като допълнителни параметри за оценка отговора на NDMM пациентите към приложената терапия.
4. Доказаният потенциал на новите биомаркери да отразяват добре патогенетичните механизми на костната болест дава основание те да бъдат валидирани сред по-голяма извадка болни с мултиплен миелом.
5. Резултатите от настоящия дисертационен труд могат да послужат като отправна точка за разработване на нови таргетни медикаменти, насочени срещу прогресията на костната болест, основна характеристика на ММ.

VIII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Геров В.**, Герова Д., Мичева И., Галунска Б. Костни биомаркери при множествен миелом. "Мединфо" 2022, 04;80-86.
2. **В. Геров**, Д. Герова, И. Мичева, Б. Галунска. Дисрегулация на костното ремоделиране – основен патогенетичен механизъм на костната болест при множествения миелом. Хематология, vol. LIX, 2022, № 3-4:12-21.
3. **Gerov V**, Gerova D, Micheva I, Nikolova M, Mihaylova G, Galunska B. Dynamics of Bone Disease Biomarkers Dickkopf-1 and Sclerostin in Patients with Multiple Myeloma. J Clin Med. 2023 Jul 1;12(13):4440 (**5-Year Impact Factor: 4.1**).
4. **Gerov V**, Gerova D, Micheva I, Nikolova M, Pasheva M, Nazifova N, Galunska B. Circulating sRANKL, Periostin, and Osteopontin as Biomarkers for the Assessment of Activated Osteoclastogenesis in Myeloma Related Bone Disease. Cancers 2023 Nov 24;15(23):5562 (**5-Year Impact Factor: 5.6**).

IX. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Gerov V.**, Gerova D., Micheva I., Mihaylova G., Nikolova M., Galunska B. Impaired Bone Metabolism in Multiple Myeloma Assessed by the Bone Markers Sclerostin and Dickkopf-1. The 8th World Congress on Controversies in Multiple Myeloma (COMy), 12-14 May, Paris, France (poster).
2. **Gerov V.**, Gerova D., Micheva I., Nazifova-Tasinova N., Nikolova M., Pasheva M., Galunska B. Evaluation of some serum proteins as markers for myeloma bone disease. XVI International Advances in Clinical Laboratory Science Conference, Dubrovnik, Croatia, October 06-07, 2022 (poster)
3. **Геров В.**, Мичева И., Галунска Б., Герова Д. Роля на периостин за костната болест при мултиплен миелом. Дванадесети национален конгрес по хематология, 05-08.10 2023 г., Казанлък (доклад).
4. **Геров В.**, Мичева И., Герова Д. Dickkopf-1 и склеростин – инхибитори на остеобластната функция при миеломната костна болест. Дванадесети национален конгрес по хематология, 05-08.10 2023 г., Казанлък (постер).
5. Gerova D., **Gerov V.**, Micheva I., Galunska B. Diagnostic reliability of Dkk-1, sclerostin, sRANKL, osteopontin and periostin as markers for assessing the myeloma bone disease. 26th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 26-30 May 2024, Dubai (poster).

X. БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам искрената си благодарност на всички, които допринесоха този труд да се осъществи:

- на научния ми ръководител проф. д-р Илина Мичева за дадените напътствия, помощта и подкрепата, оказвани на всеки един етап от разработването на дисертационния труд
- на доц. д-р Даниела Герова за оказаната всеотдайна помощ и навременно дадените ценни съвети при реализирането на дисертационния труд
- на всички колеги от Клиниката по Хематология за съдействието при събирането на клиничния материал
- на колегите от Катедрата по биохимия, молекулярна биология и нутригеномика, които участваха в съвместния научен проект №19009 към Фонд Наука на тема „Нови молекулни биомаркери за оценка на костната болест при мултиплен миелом“, стоящ в основата на разработване и реализиране на дисертационния труд
- и специално на проф. Бистра Цанева Галунска, д.ф., Катедра по биохимия, молекулярна биология и нутригеномика, ръководител на научния проект, както и на Ръководствата на МУ – Варна и УМБАЛ “Света Марина” – Варна, с чиято помощ се финансира и реализира този научен проект.

БЕЗКРАЙНО БЛАГОДАРЕМ НА СВОЕТО СЕМЕЙСТВО ЗА ПОДКРЕПАТА И ОБИЧТА!

