

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

ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА

КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ, ВТОРА ЧАСТ

УЧЕБЕН СЕКТОР ПО ХЕМАТОЛОГИЯ



Д-Р РАДИ ЕВГЕНИЕВ ЛУКАНОВ

**БИОМАРКЕРИ ЗА ПЕРСОНАЛИЗИРАН ПОДХОД ПРИ ПОДБОРА НА
ЛЕЧЕНИЕТО НА ПАЦИЕНТИ С МИЕЛОМНА БОЛЕСТ**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН

ДОКТОР

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

ПРОФ. Д-Р ИЛИНА ДИМИТРОВА МИЧЕВА, Д.М.

ВАРНА, 2025 г.

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 №2 /19.02.2025 г.). Приет е и насочен за защита пред Научно жури в състав:

Външни членове за Медицински университет – Варна:

Проф. д-р Веселина Стефанова Горанова - Маринова, д.м.

Доц. д-р Евгений Александров Хаджиев, д.м.

Доц. д-р Антонио Иванов Антонов, д.м.

Резервен външен член:

Доц. Иван Киндеков, д.м.

Вътрешни членове:

Доц. д-р Трифон Георгиев Червенков, д.м.

Проф. Николай Цонев д.м.

Резервен вътрешен член:

Доц. д-р Елеонора Георгиева Димитрова - Господинова, дм,

Заклучителното заседание на научното жури за защита на дисертационния труд на докторанта д-р Ради Евгениев Луканов да бъде проведено на 04.06.2025 г.

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

Съдържание

1. Използвани съкращения.....	5
2. Въведение	11
3. Изследвани групи и методи.....	12
3.1. Цел на изследването.....	12
3.2. Задачи:	12
4. Материали и методи	13
4.1. Материали	13
4.1.1. Материална база за реализиране на дисертационния труд	13
4.1.2. Пациентска популация	14
4.1.3. Биологичен материал.....	16
4.2. Методи.....	17
4.2.1. Лабораторни методи	17
4.2.2. Статистически методи	20
5. Резултати.....	22
5.1. Пациентски характеристики	22
5.2. Изследване на miR при пациентите с нелекуван, лекуван множествен миелом и здравите контроли.....	30
5.2.1. Сравнителен анализ на стойностите на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p при пациенти преди лечение, след лечение и здрави контроли	31
5.2.2. Сравнителен анализ на стойностите на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p при новодиагностицирани пациенти в зависимост от ISS, броя на остеолитични лезии, цитогенетичния профил и наличието на хиперкалциемия.....	34
5.2.3. Анализиране на корелационната връзка на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p със стойности от клинична лаборатория на пациентите	41
5.2.4. Оценка на нивата на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p при пациентите, които са достигнали до второ изследване, и чифтните им проби в хода на лечението и отговора от терапия и сравняване със здрави контроли.	46
5.2.5. Анализ на нивата на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p в хода на лечението спрямо отговора от терапия и сравняване със здрави контроли	48
5.2.6. Диагностична стойност на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p като биомаркер	52

5.2.7. Обща преживяемост (OS), преживяемост, свободна от прогресия (PFS) и предиктивна роля на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p като биомаркери	54
6. Дискусия	58
6. 1. Въведение	58
6.2. Понижение на miR-126-5p и miR-199a-5p при пациенти с ММ.....	58
6.2.1. MiR-126-5p като тумор супресорен агент.....	59
6.2.2. Протективната роля на miR-199a-5p.....	60
6.3. Корелация с клинични параметри	61
6.4. Промени в нивата на miR след лечение	63
6.5. MiR-214-3p и miR-497-5p като прогностични биомаркери.....	64
6.5.1. MiR-214-3p при прогресия на заболяването	64
6.5.2. MiR-497-5p и комплексната му изява	64
6.6. Липса на значими резултати с miR-373-3p	65
6.7. Диагностичен потенциал на miR-126-5p и miR-199a-5p	65
6.8. Терапевтичен потенциал на модулирането на експресията на miR	66
6.8.1. Възстановяване на miR-126-5p.....	66
6.8.2. Възстановяване на miR-199a-5p	66
6.8.3. Таргетиране на онкогенни miR	66
6.8.4. Предизвикателства и перспективи.....	67
6.9. Ограничения на проучването.....	67
6.10. Бъдещи направления.....	68
6.11. Заключение	68
6.12. Изводи.....	69
7. Приноси	70
7.1. Приноси с оригинален характер	70
7.2. Приноси с приложна научна стойност	70
8. Научни публикации по темата	71

1. Използвани съкращения

AKT – Ak strain transforming

ALCL – anaplastic large cell lymphoma

ALK – anaplastic lymphoma kinase

APP – amyloid beta precursor protein

ARID3B – AT-rich interactive domain 3B

ASF1B – anti-silencing function 1B histone chaperone

ASR – възрастово стандартизиран показател

ATG12 – autophagy-related gene 12

B2M (β 2- microglobulin) – β 2- микроглобулин

BAFF – B-cell activating factor

BAK1 – Bcl2 antagonist/killer 1

BBC3 – Bcl2 binding component 3

Bcl-2 – B-cell lymphoma 2

BCL2L2 – Bcl-2-like protein 2

Bcl-xL – B-cell lymphoma-extra large

BCMA (B-cell maturation antigen) – В-клетъчния матурационен антиген

BiTE – bispecific T-cell engager

BMF – Bcl2 modifying factor

BTRC – beta-transducin repeat containing E3

CAR-T – chimeric antigen receptor T-cel

CBFB – core-binding factor subunit beta

CCND3 – cyclin D3

CCNE1 – cyclin E1

ccRCC – clear-cell renal cell carcinoma

CDK6 – cyclin dependent kinase 6

CdkI – cycline dependent kinase

CDKN1C – cyclin dependent kinase inhibitor 1C

CR – complete response – пълен отговор

CRC – colorectal cancer

CT – компютърна томография

CXCR4 – chemokine receptor type 4

DAP – death-associated protein

DGCR8 – diGeorge syndrome critical region 8

DICER – РНК ендонуклеаза 3

DKK1 – Dickkopf-1

DNM3os – dynamin 3 opposite strand

DNMT1 – DNA methyltransferase 1

DROSHA – рибонуклеаза 3

DSS – Durie-Salmon система

E2F3 – early region 2 binding factor 3

EGFL7 – epidermal growth factor-like domain-containing gene 7

EGFR – epidermal growth factor receptor

eGFR – estimated glomerular filtration rate

EMD – екстрamedуларна болест

ERBB2/3 – erythroblastic oncogene B

EVL – enah/VASP-like

EZH2 – enhancer of zeste homolog 2

FAP – fibroblast activation protein-alpha

FAS – FS-7-associated surface antigen

FasL – Fas лиганди

FBXW7 – F-box and WD repeat domain containing 7

FDG – 18F (fluoro-deoxyglucose) – флудеоксиглюкоза

FISH (Fluorescence in-situ hybridization) – флуоресцентна ин-ситу хибридизация

FLC (free light chains) – свободни леки вериги

FRZB – frizzled related protein

GEM-PANC-1 – гемцитабин-резистентен панкреатичен карцином

HCC – hepatocellular carcinoma

Hepatocyte growth factor – хепатоцит растежен фактор

HHV-8 (Human herpesvirus 8) – човешки херпесен вирус 8

HIF-1 α /VEGF – hypoxia-inducible factor 1 α / vascular endothelial growth factor

IGF1R – insulin like growth factor 1 receptor

IgH – immunoglobulin heavy chains

IKK β – inhibitory kappa B kinase beta

IL10RA – interleukin 10 receptor subunit alpha

IL2RB – interleukin 2 receptor subunit beta

IL-3 (Interleukin-3) – интрелевкин-3

IL-6 (Interleukin-6) – интрелевкин-6

IL6R – interleukin 6 receptor

IRF4 – interferon regulatory factor 4

ISS (International staging system) – международна система за стадиране

JAK/STAT – Janus kinase/signal transducers and activators of transcription

JNK/SAPK – stress-activated protein kinase/c-Jun NH(2)-terminal kinase

LANA-1 (latency-associated nuclear antigen) – латентен-асоцииран нуклеарен антиген

LDH – лактатдехидрогеназа

LIN28B – cell lineage abnormal 28 B

MAF – musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog

MAF-B – (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncology family, protein B)

MAP kinase – mitogen activated protein kinase

MAP3K11 – mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11

Mcl-1 – myeloid cell leukemia-1

MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) – моноклонална гамапатия с неопределена значимост

MIP-1 alpha (macrophage inflammatory protein-1 alpha) – макрофагеален възпалителен протеин-1 алфа

MiR – микро-рибонуклеинова киселина

miRISC – miR-induced silencing complex

MLK3 – mixed lineage kinase 3

MMP13 – matrix metalloproteinase-13

MMSET – multiple myeloma set domain

MMSET/FGFR3 – multiple myeloma SET domain/ fibroblast growth factor receptor 3

MRI (magnetic resonance imaging) – ядрено-магнитен резонанс

mTOR – mammalian target of rapamycin

MYC – myelocytoma

MYCBP – c-Myc-binding protein

NF kappa B – nuclear factor-kappa B

NK – natural killer

OPG –osteoprotegerin

OS – overall survival

OSCC – oral squamous cell carcinoma

p27kip – cyclin dependent kinase inhibitor 1B

PAMPs – pathogen-associated molecular patterns

PDRG1 – p53 and DNA damage regulated 1

PET/CT – позитронно-емисионна томография

PFS – progression-free survival

PI3K – phosphatidylinositol 3-kinase

PIAS3 – protein inhibitor of activated STAT3

PR (partial response) – частичен отговор

PRC2 – polycomb repressive complex 2

PRDM1 –PR domain zinc finger protein 1

primary miRNA, pri-miRNA – първична микроРНК

PSMD10 – proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 10

PTEN – phosphatase and TENsin homolog

PTEN/AKT/GSK – PTEN/Akt/glycogen synthase kinase-3

RANKL – receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

R-ISS (revised international staging system) – ревизирана международна система за стадиране на множествен миелом

SD (stable disease) – стабилно заболяване

SDF-1 alpha – stromal derived factor 1 α

SFRP2 – secreted frizzled related protein 2

Smad9 – mothers against decapentaplegic homolog 9

SP1 – specificity protein 1

STARD13 – star-related lipid transfer domain protein 13

SMM (smoldering multiple myeloma) – тлеещ множествен миелом

TGF- β – transforming growth factor-beta

TKI – tyrosine kinase inhibitors

TLRs – toll-like receptors

TNFR (tumor necrosis factor receptor) – тумор-некротизиращ фактор

TNFSF11 – tumor necrosis factor superfamily member 11

Tr – tumor protein p53

TP53INP1 – tumour protein p53-induced nuclear protein 1

USP27X/Bim – ubiquitin specific peptidase 27 X-linked/ Bcl-2 interacting mediator of cell death

VEGF (vascular endothelial growth factor) – съдов ендотелен растежен фактор

VGPR – very good partial response - много добър частичен отговор

Wnt – wingless-type MMTV integration site family

WNT3A – wingless-type MMTV integration site family, member 3A

α SMA – alpha smooth muscle actin

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

иРНК – информационна рибонуклеинова киселина

ММ – множествен миелом

ПКК – пълна кръвна картина

РНК – рибонуклеинова киселина

ХБЗ – хронично бъбречно заболяване

ХЛЛ – хронична лимфоцитна левкемия

ЦНС – централна нервна система

2. Въведение

Множественият миелом (ММ) е второто по честота злокачествено хематологично заболяване, характеризиращо се с клонална пролиферация на плазматични клетки в костния мозък и многобройни системни прояви. Въпреки че през последното десетилетие се наблюдава значителен напредък в диагностичните методи и разработването на по-ефективни терапевтични схеми, ММ продължава да бъде заболяване с висока заболяемост и смъртност, особено във възрастовите групи над 65 години. Високата хетерогенност на заболяването обуславя разнообразни цитогенетични и молекулярни профили, клинична презентация и непостоянен отговор от терапията.

Традиционният диагностичен подход при ММ се базира върху комбинация от морфологични, цитогенетични, имунологични и образни методи. Въпреки това остават множество предизвикателства – от липсата на достатъчно чувствителни маркери за ранно откриване и стратифициране на риска до проследяване на отговора от лечението и навременно регистриране на релапс. През последните години вниманието в научната общност се насочва към микрорибонуклеиновите киселини (miR) – кратки некодиращи РНК (рибонуклеинови киселини) молекули, които имат критична роля в регулацията на генното експресиране, клетъчната пролиферация, апоптозата и взаимодействието с туморната микросреда. Различни проучвания показват, че определени miR са свръхекспресирани или потиснати в различни неоплазии, включително в ММ, което ги прави обещаващи диагностични и прогностични биомаркери, както и потенциални терапевтични цели.

В този контекст от все по-голямо значение стават новите подходи за по-прецизно разбиране на биологичните процеси при множествения миелом. Сред най-важните направления са проучванията, свързани с ролята на miR като ключови регулатори на генното експресиране, както и на различни епигенетични фактори, които влияят върху растежа на злокачествените клетки. От особена важност е и взаимодействието между миеломните клетки и туморната микросреда в костния мозък, включително процесите на имуномодулация и ангиогенеза. Подобни насоки могат да подпомогнат идентифицирането на нови биомаркери за ранна диагностика, по-точна прогноза и оптимално проследяване на терапевтичния отговор, с потенциал да доведат до по-прецизна стратификация на риска и подобрени клинични резултати.

Бъдещите проучвания при множествения миелом вероятно ще се развиват в посока на още по-задълбочено молекулярно профилиране и широко прилагане на

съвременни методи за анализ на циркулиращи биомаркери, включително различни профили на miR. Усъвършенстваните технологии и изкуственият интелект при обработката на големи бази данни откриват нови възможности за прецизна оценка на заболяването и за разработване на персонализирани терапевтични стратегии. По този начин може да се повиши ефективността на съществуващите терапевтични режими или да се създадат нови, по-селективни лекарствени средства, които да намалят честотата на рецидивите и да удължат трайно преживяемостта и качеството на живот на пациентите.

3. Изследвани групи и методи

3.1. Цел на изследването

В настоящото изследване се изследват нивата на експресия на подбрани циркулиращи miR-и при пациенти с новодиагностициран ММ и здрави контроли. Пациентската група ще се изследва повторно след 6 месеца. Основната цел е да се докаже специфична експресия на предварително избраните miR-и в момента на диагнозата и след 6 месеца лечение. Резултатите ще се съпоставят с отговора от лечение, промяната в клиничното състояние и лабораторните показатели.

3.2. Задачи:

1. Да се селектират пациенти с новодиагностициран множествен миелом, да се стратифицират по демографски и клиникопатологични показатели, да се проследи ходът на заболяването и да се оцени ефектът от проведеното лечение за срок от шест месеца.
2. Да се определят серумните нива на микрорибонуклеиновите киселини miR-214-3p, miR-199a-5p, miR-497-5p, miR-373-3p и miR-126-5p на пациентите, които са дали съгласие за участие в проучването на тези потенциални биологични маркери.
3. Да се изследват повторно серумните нива на miR-214-3p, miR-199a-5p, miR-497-5p, miR-373-3p и miR-126-5p при пациентите, които не са отпаднали от проучването след края на 6-месечния проследяващ период.
4. Да се анализират експресионните нива на микрорибонуклеиновите киселини miR-214-3p, miR-199a-5p, miR-497-5p, miR-373-3p и miR-126-5p при новодиагностицирани пациенти и при здрави контроли.
5. Да се анализират експресионните нива на микрорибонуклеиновите киселини miR-214-3p, miR-199a-5p, miR-497-5p, miR-373-3p и miR-126-5p при новодиагностицирани пациенти и при пациенти след 6 месеца лечение и да се сравнят със здрави контроли.

6. Да се изследват серумните нива на микрорибонуклеиновите киселини miR-214-3p, miR-199a-5p, miR- 497-5p, miR-373-3p и miR-126-5p на здрави доброволци, които имат сходни демографски характеристики.
7. Да се анализират серумните нива на miR-214-3p, miR-199a-5p, miR- 497-5p, miR-373-3p и miR- 126-5p при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом в зависимост от стадия на заболяването, определен според ISS.
8. Да се анализират серумните нива на miR-214-3p, miR-199a-5p, miR- 497-5p, miR-373-3p и miR-126-5p при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом в зависимост от тежестта на костната болест.
9. Да се анализират серумните нива на miR-214-3p, miR-199a-5p, miR- 497-5p, miR-373-3p и miR-126-5p при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом в зависимост от цитогенетичния профил.
10. Да се анализират серумните нива на miR-214-3p, miR-199a-5p, miR- 497-5p, miR-373-3p и miR-126-5p при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом в зависимост от наличието на хиперкалциемия.
11. Да се сравнят нивата на miR-214-3p, miR-199a-5p, miR- 497-5p, miR-373-3p и miR-126-5p при нелекувани, в хода на лечението спрямо отговора от терапия и здрави контроли.
12. Да се установят корелации между нивата на експресия на miR-214-3p, miR-199a-5p, miR- 497-5p, miR-373-3p и miR-126-5p и различни клиникопатологични показатели при наивни пациенти и след лечение.
13. Да се определи специфичността и сензитивността на микрорибонуклеиновите киселини като потенциални диагностични биомаркери.
14. Да се анализира предиктивната роля на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p като биомаркери в зависимост от OS (общата преживяемост) и PFS (преживяемост, свободна от прогресия).

4. Материали и методи

4.1. Материали

4.1.1. Материална база за реализиране на дисертационния труд

- Клиника по клинична хематология УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД – Варна
- Лаборатория по клинична имунология към Катедра по медицинска генетика, Медицински университет и Университетска болница „Света Марина“ – Варна

4.1.2. Пациентска популация

Проведе се проспективно неинтервенционално едноцентрово клинично изпитване. Изследването обхваща периода 2022 – 2024 г. с участници 56 пациенти, които отговарят на включващите критерии и нямат изключващи критерии, и 12 здрави доброволци.

Събрани са 100 проби:

- 56 първични (пациенти с новодиагностициран множествен миелом, наивни на лечение)
- 32 вторични (пациенти с новодиагностициран множествен миелом след 6 месеца лечение спрямо международните препоръки на NCCN и ESMO, при които е взета първична проба)
- 12 проби от здрави доброволци, подбрани по демографски характеристики сходни на пациентската популация.

Клиничното проучване е проведено след получено разрешение от Комисията по етика на научните изследвания при Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна с решение №129 от 06.04.2023г. в съответствие с изискванията на Хелзинкската декларация.

Критерии за включване:

- Възраст над 18 г.;
- Пациенти с поставена диагноза множествен миелом според критериите на IMWG от 2014 г.;
- Изявено желание за участие в изследването чрез подписан формуляр за информирано съгласие.

Критерии за изключване:

- Пациенти на възраст под 18 г.;
- Пациенти, не отговарящи на критериите за включване;
- Изявено нежелание за участие в изследването;
- Прогресия на заболяването след 6 месеца лечение.

Всички 56 пациенти, участващи в изследването, имат поставена диагноза множествен миелом според критериите на IMWG от 2014г.

Диагностиката и лечението на заболяването са проведени в клиниката по клинична хематология към МБАЛ „Света Марина“ – Варна и пациентите са включвани за период – май 2023-та до април 2024-та. Преди включване в клиничното изпитване всички пациенти са подписали информирано съгласие за участие и отделно информирано съгласие за събиране на биологичен материал (плазма/серум). Набирането на пациенти е осъществявано единствено в клиниката по клинична хематология към МБАЛ „Света Марина“ – Варна и в изпитването са взели участие всички съгласили се и подписали информирано съгласие за проследяване (общо 56) и информирано съгласие за събиране на биологичен материал (общо 56) - от май 2023 до април 2024 г.

На всички пациенти бе извършен

- Клиничен преглед, включващ анамнеза и статус
- Рутинни лабораторни изследвания – показатели на периферна кръвна картина, стандартен биохимичен панел – урея, креатинин, лактатдехидрогеназа (ЛДХ), ниво на общ белтък, чернодробни ензими, пикочна киселина и бета-2 микроглобулин, йонограма и серумно ниво на калций, периферна кръвна натривка
- Креатининов клирънс
- Количествена и качествена оценка на имуноглобулини, серумна електрофореза и имунофиксация на протеин, изследване на леки вериги в серум и в 24-часова урина
- Костно-мозъчна аспирация, морфологична оценка и флоуцитометрия на костно-мозъчен аспират, конвенционална метафазна цитогенетика и флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH)
- Нискодозово сканиране на цялото тяло (WBLDCT) или позитрон-емисионна томография (ПЕТ-КТ).

В изследването участват и 12 здрави доброволци, които се използват като контроли при изследване на биологичните маркери – miR-214-3p, miR-199a-5p, miR-497-5p, miR-373-3p и miR-126-5p.

Стадирането на пациентите се извърши по International staging system (ISS).

Медицинска история на пациентите

За всеки пациент в проучването е създадено медицинско досие, документиращо следната информация:

Демографски данни

- Имена (инициали)
- ID номер (номер на включване в изпитването)
- Възраст
- Пол: мъж/жена

Медицинска история

- Пърформанс статус/ECOG: Общото състояние на всеки пациент според ECOG е оценено изходно като 0, 1 или 2.
- Придружаващи болести

Информация на множествения миелом

- Тип множествен миелом
- Стадиране по ISS
- Цитогенетичен профил на заболяването чрез метафазна цитогенетика
- Наличие на del 17p, установен чрез FISH
- Наличие на екстрамедуларна формация, установена чрез PET-КТ или WBLDCT
- Дата на започване на първа линия лечение
- Преживяемост на 6-ти месец от лечението
- Отговор на 6-ти месец от лечението

4.1.3. Биологичен материал

На всички включени пациенти, които не са отпаднали от изследването, двукратно са взети – при диагнозата и след 6 месеца:

2 x EDTA-кръвни епруветки (всяка по 3 ml) за молекулярни анализи при скрининг.

1 x вакутейнер за серум (8 ml)

4.2. Методи

4.2.1. Лабораторни методи

Лабораторният метод, използван в настоящото проучване, е РНК изолация и Real-time PCR, осъществен чрез реактив miRNeasy Serum/plasma Kit(Qiagen).

Изследването е проведено в съответствие с протокола на производителя, който включва 2 етапа – изолация на РНК и полимерижна верижна реакция.

Етап 1 – изолация на малки РНК молекули

Протокол за изолация на малки РНК молекули.

Използваният материал за изследване на miR е кръвен серум. Кръвният серум е получен чрез венепункция със затворена система BD Vacutainer™ SST™ II Advance 5 ml, каталожен номер 367955 (Becton Dickinson, САЩ), като след пробовземането кръвта е оставена да се съсери на стайна температура за 30 минути, след което е центрофугирана при $1500 \times g$ за 15 минути на стайна температура и серумът е отделен и разпределен на порции от 500 μ l и съхранен до извършване на анализа при температура -80°C .

Изолиране на miR бе извършено от 200 μ l серум чрез готов търговски набор miRNeasy Serum/Plasma Kit (50), каталожен №217184 (QIAGEN, Германия) според протокола на производителя, като за нормализационен контрол към всяка серумна проба е прибавена 3,5 μ l ($1,6 \times 10^8$ копия на μ l) контролна miR C. elegans miR-39: miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control, каталожен №219610 (QIAGEN, Германия) и пробите са елуирани в 25 μ l свободна от РНКаз вода. За изолацията е следвана следната процедура:

1. Пробите се размразяват на стайна температура ($15-25^\circ\text{C}$).
2. Към 200 μ l проба се добавят 1000 μ l (5 обема) QIAzol Lysis Reagent. Пробите се размесват чрез лабораторен вортекс.
3. Епруветката, съдържаща лизата, се инкубира при стайна температура ($15-25^\circ\text{C}$) за 5 мин. Към всяка проба се прибавя 3,5 μ l ($1,6 \times 10^8$ копия на μ l) контролна miR C. elegans miR-39.
4. Към лизата се добавя 200 μ l хлороформ (обем, равен на обема на изходната проба). Вортексира се енергично в продължение на 15 s до пълно смесване.

5. Епруветката, съдържаща лизата, се инкубира при стайна температура за 2 – 3 минути.
6. Пробата се центрофугира за 15 минути при $12\ 000 \times g$ при 4 °C. След центрофугиране пробата се разделя на 3 фази: надстояща безцветна водна фаза, съдържаща РНК, бяла интерфаза и подстояща червена органична фаза.
7. 600 μ l от надстоящата водна фаза се прехвърля в нова епруветка, като се избягва прехвърлянето на материал от интерфазата. Добавят се 900 μ l (1,5 обема) 100% етанол и се размесва добре чрез пипетиране.
8. Прехвърлят се до 700 μ l от пробата, включително всяка утайка, която може да се е образувала, в RNeasy MinElute колонка в епруветка за събиране от 2 ml. Центрофугира се $8000 \times g$ за 15 s при стайна температура, след което промивната течност се изхвърля.
9. Стъпка 8 се повтаря, докато премине цялата проба, като промивната течност се изхвърля.
10. Добавя се 700 μ l буфер RWT към въртящата се колонка RNeasy MinElute. Центрофугира се за 15 s при $8000 \times g$, за да промиете колоната, след което промивната течност се изхвърля.
11. Добавя се 500 μ l буфер RPE върху колонката RNeasy MinElute. Центрофугира се за 15 s при $8000 \times g$, за промиване на колонката, след което промивната течност се изхвърля.
12. Добавя се 500 μ l 80% етанол върху колонката RNeasy MinElute. Центрофугира се в продължение на 2 минути при $8000 \times g$, за да се промие мембраната на спин-колонката. Събирателната епруветка се изхвърля.
13. Колонката RNeasy MinElute се поставя в нова епруветка за събиране от 2 ml. Капакът на въртящата се колонка се отваря и се центрофугира на максимална скорост ($25\ 000 \times g$) в продължение на 5 min, за да се изсуши мембраната. Събирателната епруветка се изхвърля.
14. Колонката RNeasy MinElute се поставя в нова 1,5 ml епруветка. Добавят се 25 μ l вода, свободна от РНКазы, директно в центъра на мембраната на спин-колонката.

Центрофугира се в продължение на 1 мин. на пълна скорост ($25\,000 \times g$) за елуиране на РНК. Етап 2 – полимеразна верижна реакция.

Протокол за PCR

След това всяка от пробите е подложена на обратна транскрипция чрез готов търговски набор miRCURY LNA RT Kit, каталожен №339340 (QIAGEN, Германия) според протокола на производителя от 1,0 µl елуирана miR в краен обем 10 µl, като се добавя 9,0 µl мастърмикс, съставен от 2,0 µl 5× реакционен буфер, 6,0 µl свободна от РНКаз вода и 1,0 µl 10× ензимен микс, след което пробата се инкубира при температура 42 °C за 60 минути и за инактивиране на ензима при температура 95 °C за 5 минути.

След това всяка от пробите е подложена на количествена полимеразна реакция в реално време (RealTime PCR) чрез готов търговски набор miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (200) и (600), каталожни номера №339345 (200) и №339346 (600) (QIAGEN, Германия) и готови праймери miRCURY LNA miRNA PCR Assay, каталожен номер №339306 (QIAGEN, Германия) според протокола на производителя: 3,0 µl комплементарна ДНК (cDNA), разредена 30 пъти, към която се добавят 7,0 µl мастърмикс (5,0 µl 2× miRCURY SYBR® Green Master Mix, 0,05 µl ROX багрило, 1,0 µl праймер микс и 0,95 µl свободна от РНКаз вода) в 10 µl реакции в трикратни повторения за 6 таргетни miR в 384 кладенчеви плаки. Използваните праймери miRCURY LNA miRNA PCR Assay, каталожен №339306 (QIAGEN, Германия) са както следва (в скоби е посочен референтният номер GeneGlobe на QIAGEN): cel-miR-39-3p (YP00203952), hsa-miR-214-3p (YP00204510), hsa-miR-199a-5p (YP00204494), hsa-miR-497-5p (YP00204354), hsa-miR-126-5p (YP00206010), hsa-miR-373-3p (YP00204604). Използваните температурни параметри са както следва: задържане за 2 минути при 95 °C за активиране на ензима; 40 цикъла от 10 секунди при 95 °C; 60 секунди при 56 °C с флуоресцентно отчитане; анализ на кривата на топене за доказване на специфичността на амплификацията: първоначална денатурация за 15 секунди при 95 °C и охлаждане до 60 °C за 60 секунди и повишаване до 95 °C със скорост +0,05 °C за секунда и флуоресцентно отчитане. Анализът е извършен на инструмент QuantStudio Dx на фирмата Applied Biosystems (USA) и е отчетен прагов цикъл (Ct) за всяка проба.

Относителната концентрация на изследваните таргетни miR е изчислена чрез $\Delta\Delta C_t$ метод [цитат] спрямо референтна miR – нормализационен контрол *C. elegans* miR-39 спрямо референтна проба – представена от средноаритметична стойност на C_t на всички индивиди е изчислена чрез Microsoft Office Excel 2016 и е представена като отношение спрямо референтна проба.

4.2.2. Статистически методи

За статистическата обработка на данните е използван специализиран софтуер за статистическа обработка (IBM SPSS Statistics, GraphPad Prism Windows).

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.

- Корелационен анализ за търсене на зависимост между два количествени признака – при нормално разпределение на резултатите е използван корелационният 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 7-степенна скала:

$0 < R < [0,1]$ – много слаба до пренебрежима корелация

$[0,1] < R < [0,3]$ – слаба корелация

$[0,3] < R < [0,5]$ – умерена корелация

$[0,5] < R < [0,7]$ – умерено силна корелация

$[0,7] < R < [0,9]$ – силна корелация

$[0,9] < R < [1]$ – много силна корелация

$[1]$ – перфектна 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.
- Каплан–Майер криви: използвани за оценка на времето до настъпване на събитие, като преживяемост или прогресия
- Графичен анализ за визуално представяне на получените резултати.

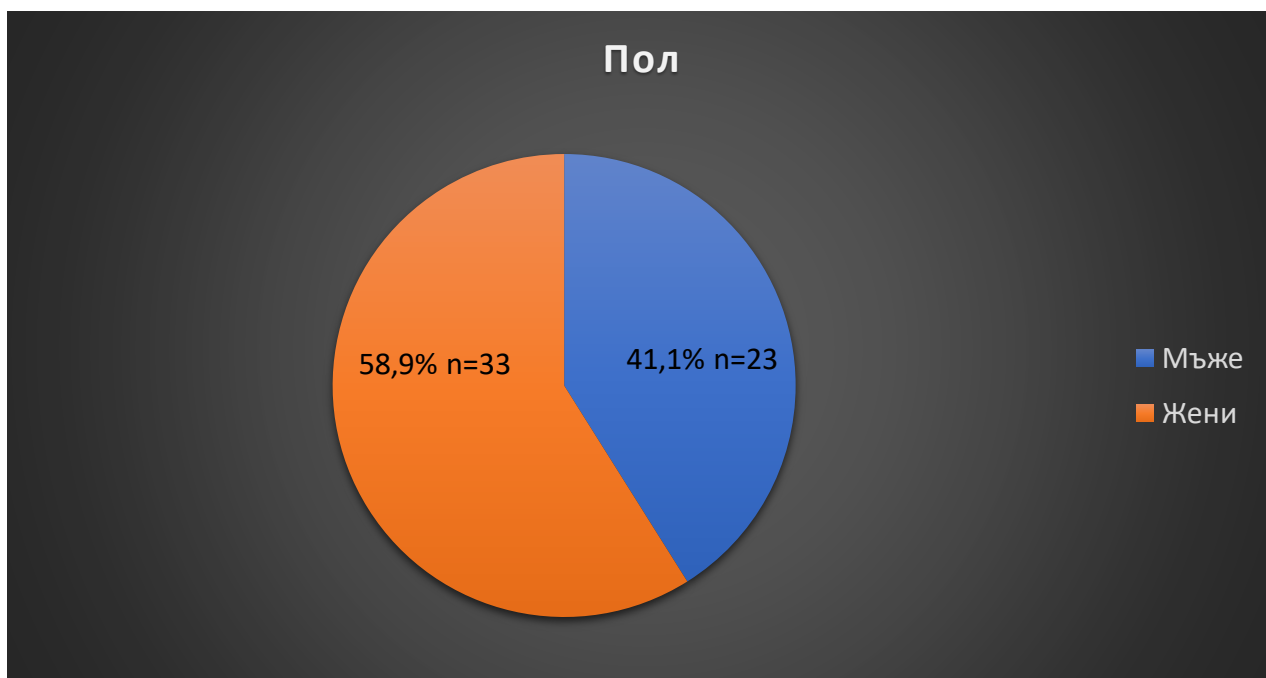
При проведените статистически анализи за критичното ниво на грешката се приема $\alpha=0.05$.

Нулевата хипотеза се отхвърля и се установява статистическа значимост, когато $p<0.05$.

5. Резултати

5.1. Пациентски характеристики

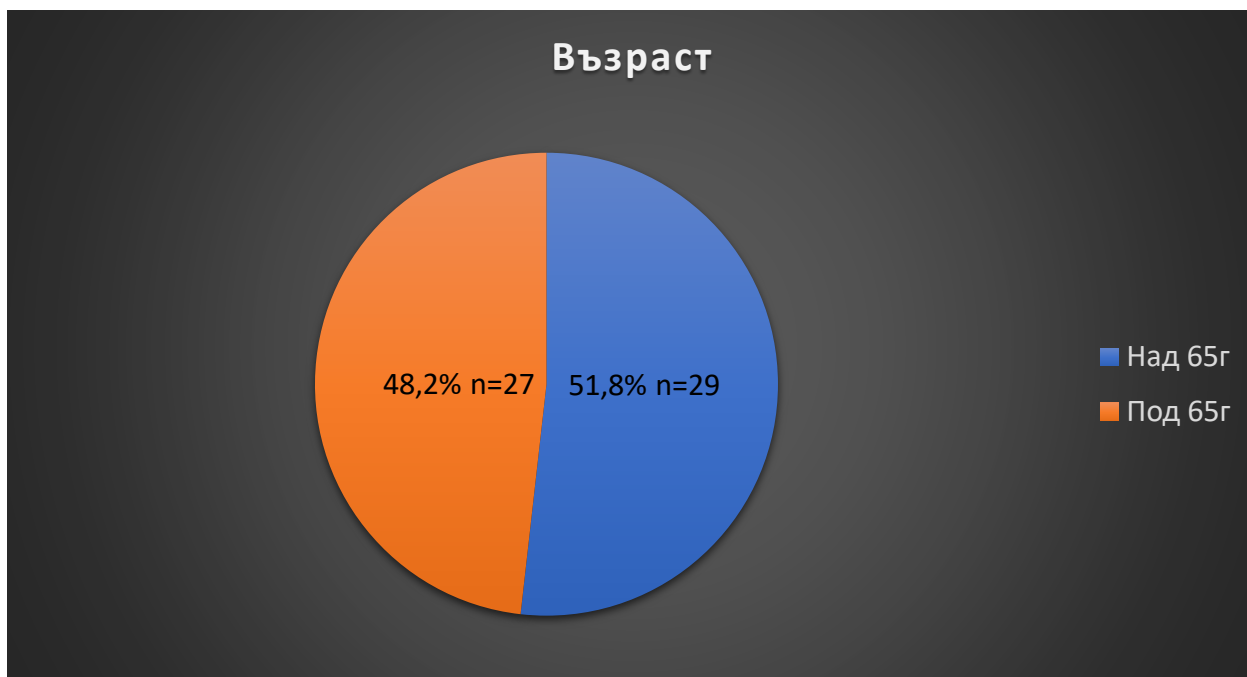
В проучването вземат участие 56 пациенти и 12 здрави контроли, като женският пол е леко по-застъпен: 33 жени (58,9%) спрямо 23 мъже (41,1%) (фиг.1). Съотношението мъже към жени 1:1,43, което е идентично с контролната група.



Фигура 1: Разпределение по пол

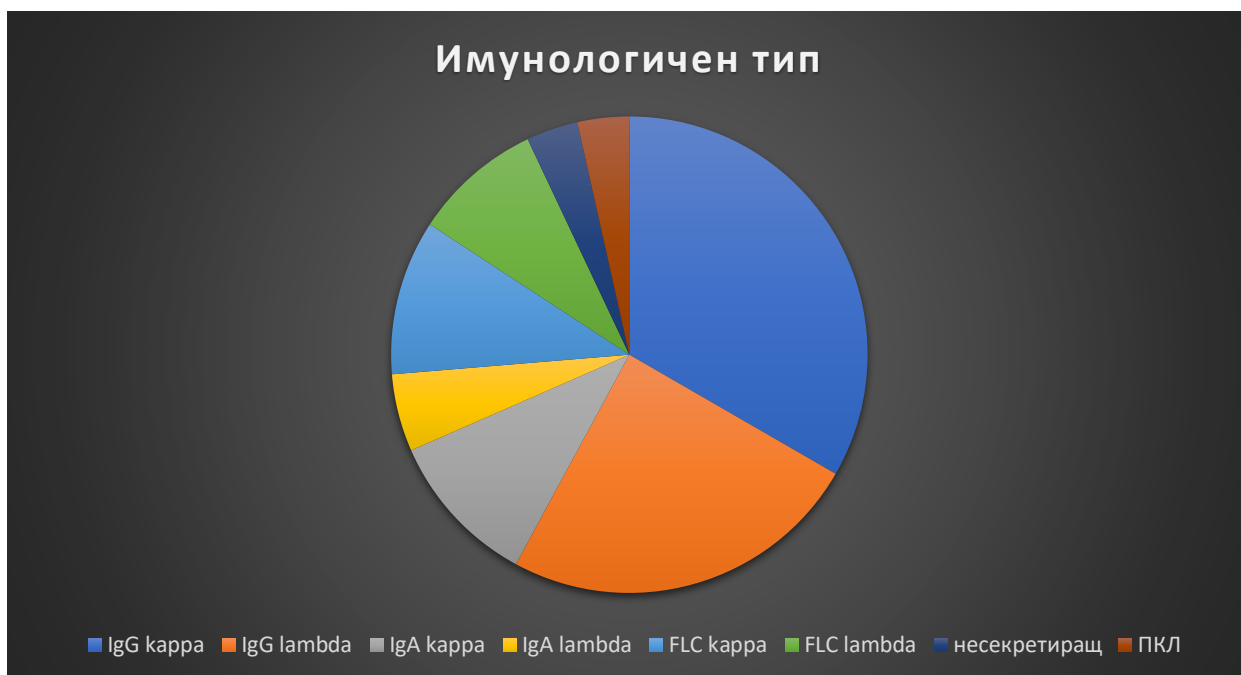
Средната възраст на изследваните пациенти е 66 години (36-90), като 51,8% (n=29) са над 65-годишна възраст (фиг. 1). Средната възраст на контролната група е съобразена със средната в пациентската популация.

Възрастовото разпределение е представено във фигура 2. Най-младият пациент е жена на 36 години, а най-възрастният – жена на 90 години. Най-голяма заболеваемост се отчита във възрастовата група 65-69 години (25,45%), като това се отнася и за двата пола. Средната възраст на изследваната група лица при поставяне на диагнозата е 66 години.



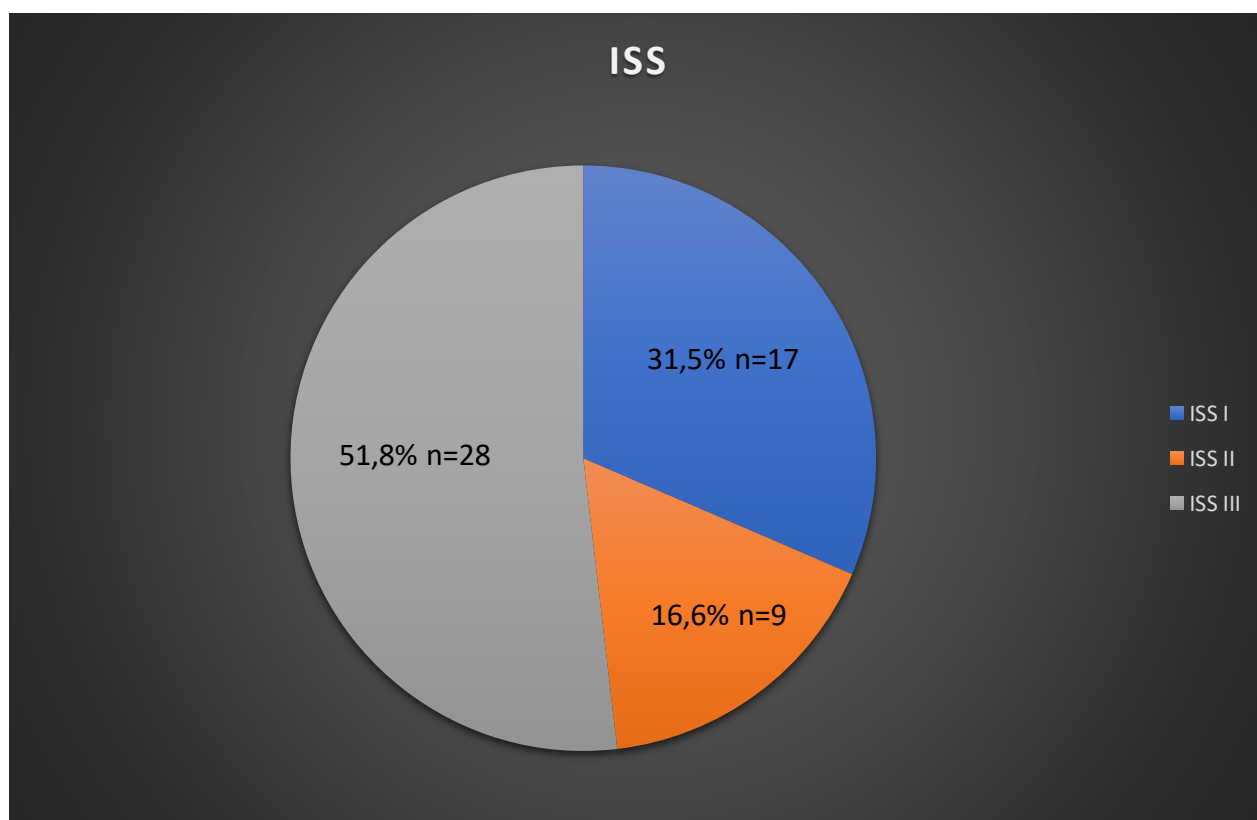
Фигура 2: Разпределение по възраст

Дистрибуцията относно имунологичния тип миелом (фиг.3): 33,9% (n=19) са представители от IgG kappa, 25% (n=14) – IgG lambda; 10,7% (n=6) – IgA kappa; 5,3% (n=3) – IgA lambda; 10,7% (n=6) – лековерижен kappa; 7,1% (n=4) – леки вериги lambda; 3,5% (n=2) са с несекретиращ множествен миелом и 3,5% (n=2) са с първична плазмоклетъчна левкемия.



Фигура 3: Разпределение по имунологичен тип

Пациентите са стадираны съгласно International staging system (ISS) на Международната работна група за множествен миелом (IMWG) от 2005 г. (фиг. 4): ISS I – 31,5% (n=17); ISS II – 16,6% (n=9) и ISS III са 51,8% (n=28) от пациентите.



Фигура 4: ISS разпределение

Съгласно клинико-лабораторните си характеристики пациентите са разделени по няколко показателя: с наличие на костна болест, дефинирана като 1 или повече остеолитични лезии, установени на рентгенография, компютърна томография или позитронна емисионна томография, са 82,1% (n=46) от изследваната популация (фиг. 5), с бъбречна недостатъчност (серумен креатинин >177 mmol/L или креатининов клирънс <40 mL/m) са 37% (n=17) (фиг. 6), хиперкалциемия (фиг. 7), по-висока от 2,75 mmol/L, е регистрирана при 19,6% (n=11) и 48,2% (n=27) са със симптоматична анемия (фиг. 8) (хемоглобин, по-нисък от 100g/L).



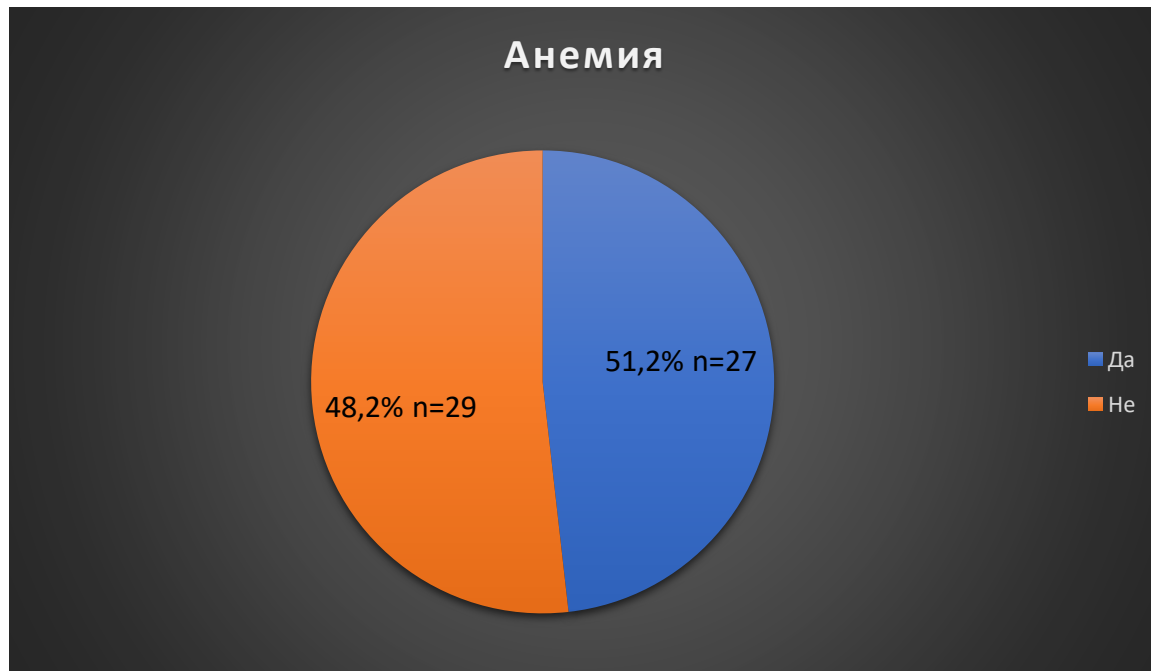
Фигура 5: Наличие на костна болест



Фигура 6: Пациенти с бъбречна недостатъчност

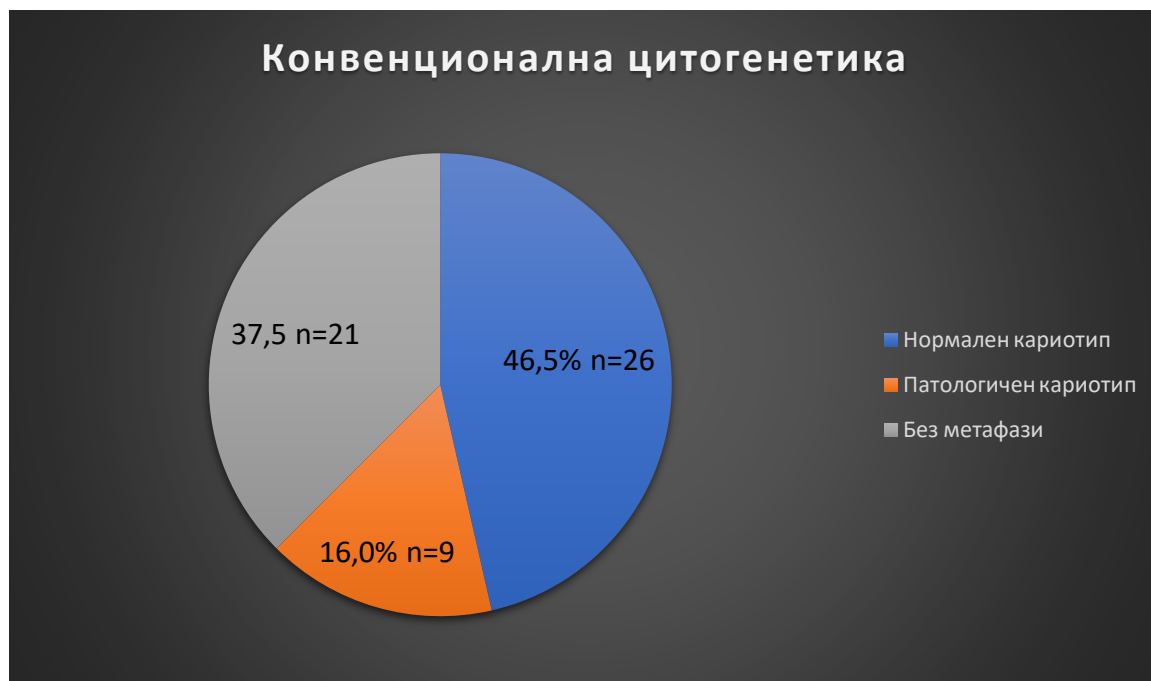


Фигура 7: Пациенти с хиперкалциемия



Фигура 8: Пациенти със симптоматична анемия

При всички пациенти се проведе конвенционален цитогенетичен анализ, като в 37,5% (n=21) от пациентите не се установяват метафази за анализ. От успешно проведените 35 74% (n=26) са с нормален кариотип и 26% (n= 9) са с патологичен.



Фигура 9: Цитогенетичен профил

От 56-мата пациенти, включени в проучването, 32-ма (57%) достигнаха до 2-ра (проследяваща проба) след 6 курса терапия по протокол VCD. Причините за отпадане на пациентите са:

- Настъпил смъртен изход – 13 пациенти
- Отказ от продължаване на участието в проучването – 5 пациенти
- Загуба на проследяване – 4 пациенти
- Прогресия на заболяването – 2 пациенти

Оставащите 32 пациенти са категоризирани в 2 групи: 20/32 (62,5%) попадат в пълен (Complete Response) или много добър парциален отговор (Very Good Partial Response) – група 1. При останалите 12/32 (37,5%) е постигнат частичен отговор (Partial Response) или е отчетена стабилност на заболяването (Stable Disease) – група 2.



Фигура 10: Отговор от терапия след 6 месеца лечение

Всички демографски и клинико-лабораторни характеристики на пациентите са представени в таблица 1.

Таблица 1. Демографски и клинико-лабораторни характеристики на пациентите

Показател		N (брой) / %
Възраст	Средна	66 (36-90)
	>65г.	29/51,8%
Пол	Мъже	23/41,1%
	Жени	33/58,9%
ISS	I	17/31,5%
	II	9/16,6%
	III	28/51,8%
Костна болест	да	46/82,1%
	не	10/17,9%
Бъбречна недостатъчност	да	17/37,0%
	не	29/63,0%
Хиперкалциемия	да	11/19,6%

	не	45/80,4%
Анемия	да	27/48,2%
	не	29/51,8%
Метафазна цитогенетика	Без метафази	21/37,5%
	Нормален кариотип	26/46,5%
	Патологичен кариотип	9/16%
Отговор от терапия	Отпаднали	24/42,8%
	CR+VGPR	20/35,7%
	PR+PD	12/21,4%
Хемоглобин (хб)	Mean $\pm$ CI (range)	103,0 $\pm$ 9,81
Креатинин	Mean $\pm$ CI (range)	117,4 $\pm$ 37,03
Бета 2 микроглобулин	Mean $\pm$ CI (range)	5,494 $\pm$ 1,244
Парапротеин	Mean $\pm$ CI (range)	40,56 $\pm$ 8,68
miR-214-3p		Mean $\pm$ CI (range)
	Първична проба	2,128 $\pm$ 1,078
	Вторична проба	1,276 $\pm$ 0,523
	Здрави контроли	1,448 $\pm$ 0,6709
miR-497-5p		Mean $\pm$ CI (range)
	Първична проба	1,360 $\pm$ 0,303
	Вторична проба	1,136 $\pm$ 0,365
	Здрави контроли	1,505 $\pm$ 0,485
miR-126-5p		Mean $\pm$ CI (range)
	Първична проба	0,9721 $\pm$ 0,1257
	Вторична проба	1,326 $\pm$ 0,272
	Здрави контроли	1,800 $\pm$ 0,78
miR-199a-5p		Mean $\pm$ CI (range)
	Първична проба	1,168 $\pm$ 0,2934
	Вторична проба	1,365 $\pm$ 0,348
	Здрави контроли	3,018 $\pm$ 1,513
miR-373-3p		Mean $\pm$ CI (range)
	Първична проба	N/A
	Вторична проба	N/A
	Здрави контроли	N/A

5.2. Изследване на miR при пациентите с нелекуван, лекуван множествен миелом и здравите контроли

Изследване на специфични miR се проведе при всички 56 пациенти с новодиагностициран множествен миелом, като при 32 от тях се взеха и проследяващи (чифтни проби) след 6 месеца лечение. Със същия панел се изследваха и всички 12 лица от здравите доброволци. Изследвани бяха 5 вида miR, асоциирани с различни типове злокачествени, автоимунни и възпалителни заболявания.

Поради експерименталния характер на изследването и липсата на достатъчно научна информация в световен мащаб относно нормалната експресия на miR в човешкия серум, не са описани референтни стойности. В настоящото проучване се използва осреднена безразмерна величина.

Относителното количество (RQ) на експресия на miR в серумните проби от пациентите е нормализирано към външна контрола – cel-miR-39. Стойността на RQ е определена по метода 2- $\Delta\Delta C_t$ чрез StepOne Software v2.0.

Установиха се реални стойности в 95% от пробите на 4 от изследваните miR. Единствено при miR-373-3p се документира подпрагова експресия и се доловиха стойности едва в 19% от пробите. Резултат, който не позволява статистическа обработка (Табл. 2).

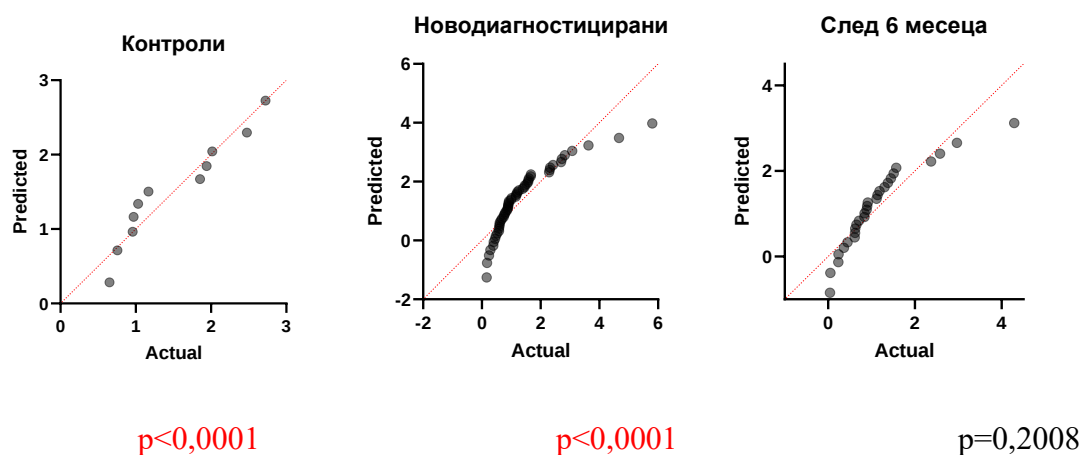
Таблица 2: Наличие на надпрогови нива на експресия в изследваните miR

	Първична проба (n / %)	Вторична проба (n / %)	Здрави контроли (n / %)
miR-214-3p	54/56 (96%)	30/32 (93,7%)	11/12 (91,6%)
miR-497-5p	54/56 (96%)	28/32 (87,5%)	12/12 (100%)
miR-126-5p	56/56 (100%)	31/32 (96,8%)	11/12 (91,6%)
miR-199a-5p	54/56 (96%)	29/32 (90%)	10/12 (83,3%)
miR-373-3p	13/56 (23,2%)	4/32 (12,5%)	2/12 (17,7%)

5.2.1. Сравнителен анализ на стойностите на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p при пациенти преди лечение, след лечение и здрави контроли

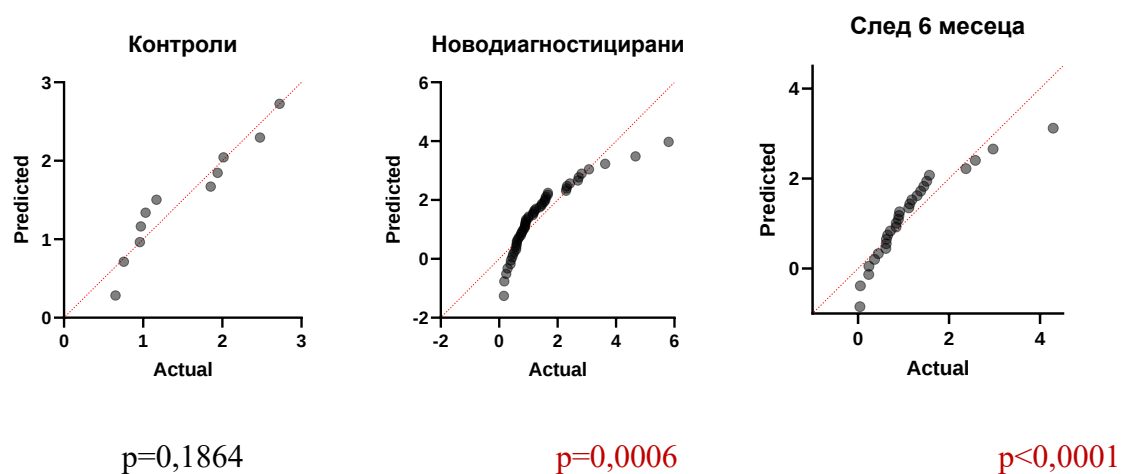
Проведе се Shapiro-Wilk тест за нормалност на 4-те miR. При нито една от анализираният, не се покрива тестът за нормалност за поне 2 от групите. Резултатите са изобразени на следните фигури:

MiR-214-3p



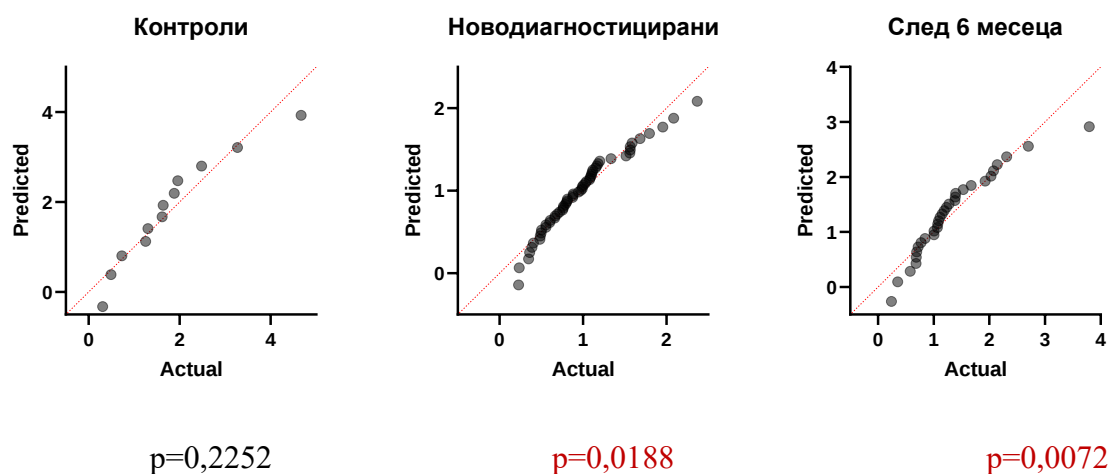
Фигура 11: Графика за нормалност на популацията при изследване на miR-214-3p

MiR-497-5p



Фигура 12: Графика за нормалност на популацията при изследване на miR-497-5p

MiR-126-5p



Фигура 13: Графика за нормалност на популацията при изследване на miR-126-5p

MiR-199a-5p



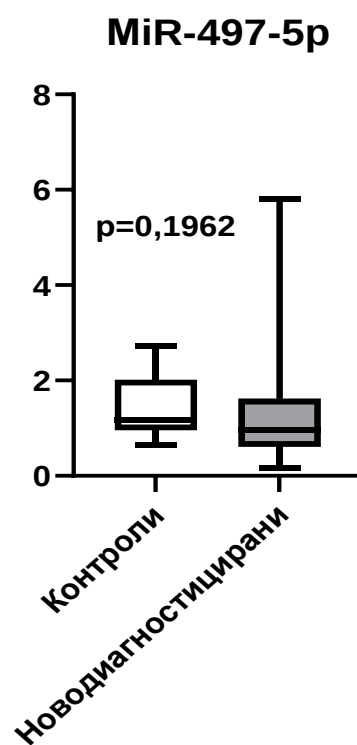
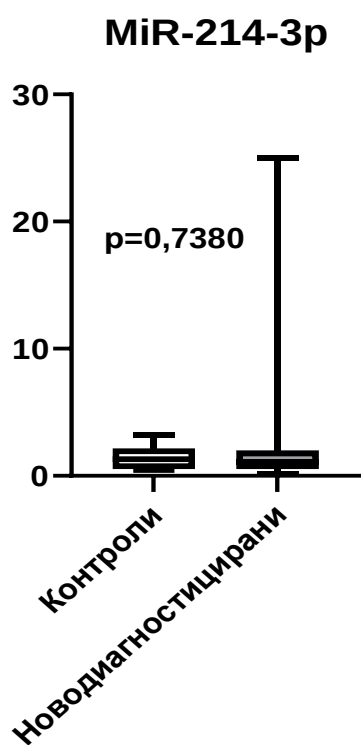
Фигура 14: Графика за нормалност на популацията при изследване на miR-199a-5p

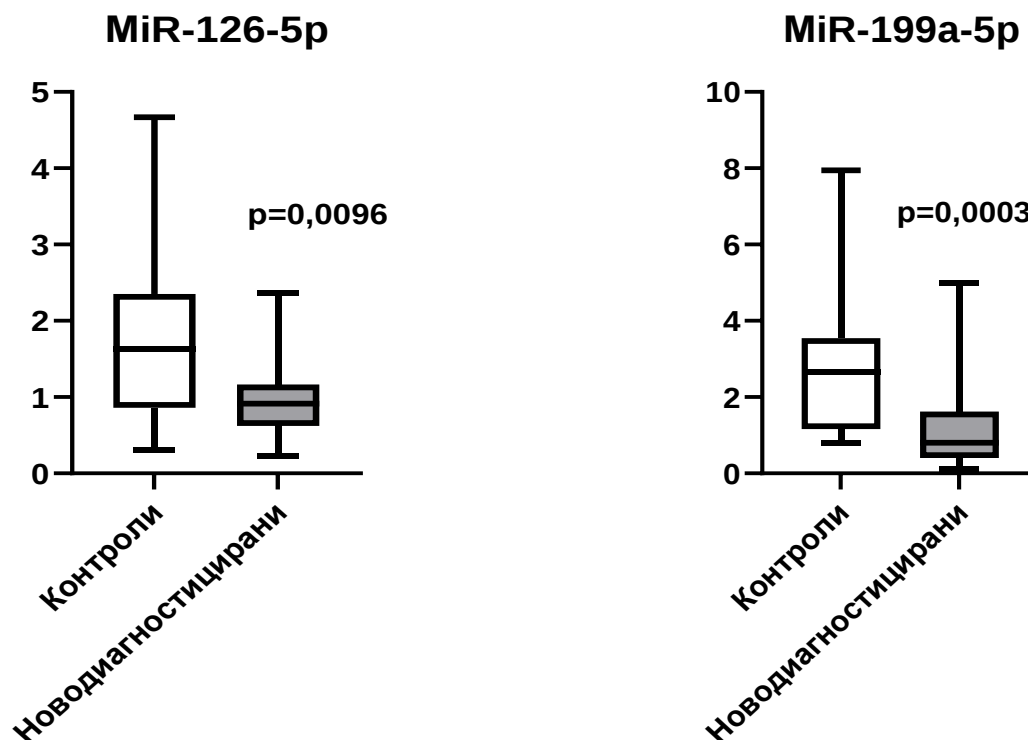
Средните стойности на изследваните miR при пациентите с новодиагностициран ММ преди лечение и здравите контроли са представени в таблица 3.

Таблица 3: Средни стойности на изследваните miR при пациенти преди лечение и здрави контроли и статистическа значимост

	Пациенти преди лечение	Здрави контроли	p
miR-214-3p	2,128 ± 1,078	1,448 ± 0,6709	0,7380
miR-497-5p	1,360 ± 0,303	1,505 ± 0,485	0,1962
miR-126-5p	0,9721 ± 0,1257	1,800 ± 0,78	0,0096
miR-199a-5p	1,168 ± 0,2934	3,018 ± 1,513	0,0003
miR-373-3p	N/A	N/A	N/A

От извършения анализ (фиг. 14) между двете популации при miR-126-5p и miR-199a-5p се установиха сигнификантно по-ниски стойности на изследваните miR в сравнение със здравите контроли (непараметричен Mann-Whitney тест). Резултати, които загатват тяхната роля в патогенезата на MM.





Фигура 15: Серумни нива на miR-214-3p, miR-497-5p, miR-126-5p, miR-199a-5p при здрави контроли и пациенти преди лечение

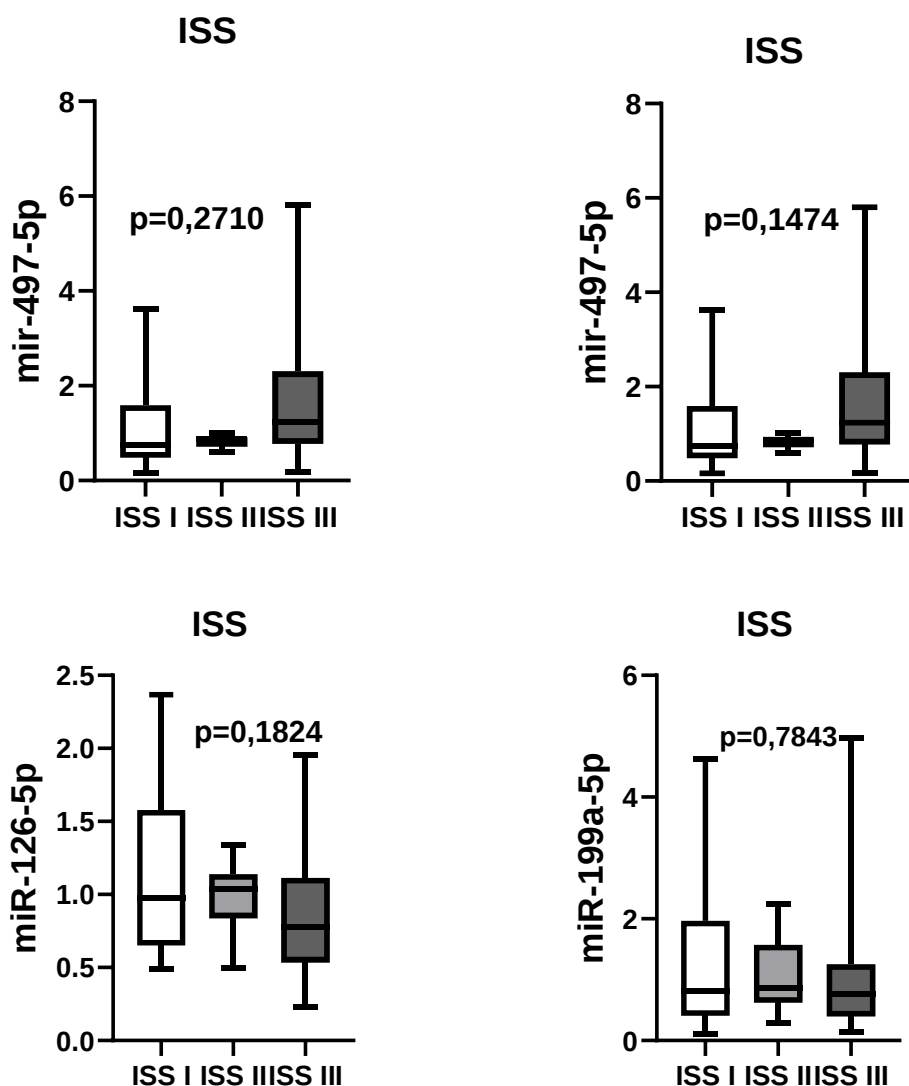
5.2.2. Сравнителен анализ на стойностите на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p при новодиагностицирани пациенти в зависимост от ISS, броя на остеолитични лезии, цитогенетичния профил и наличието на хиперкалциемия

5.2.2.1. Спрямо ISS

На таблица 4 са показани средните стойности на изследваните miR разгледани спрямо стадия на заболяването по ISS. Проведеният тест на Kruskal-Wallis не установява значима връзка спрямо ISS при нито един от подбраните биомаркери (фиг. 15).

Таблица 4: Средни стойности на изследваните miR при пациенти преди лечение, разпределени по групи в зависимост от ISS

	ISS I (n=17)	ISS II (n=9)	ISS III (n=27)	p
miR-214-3p	1,244 ± 0,603	1,014 ± 0,565	3,022 ± 2,048	0,2710
miR-497-5p	1,199 ± 0,491	0,825 ± 0,101	1,631 ± 0,504	0,1474
miR-126-5p	1,151 ± 0,29	0,99 ± 0,186	0,866 ± 0,166	0,1824
miR-199a-5p	1,29 ± 0,58	1,071 ± 0,500	1,165 ± 0,467	0,7843
miR-373-3p	N/A	N/A	N/A	N/A



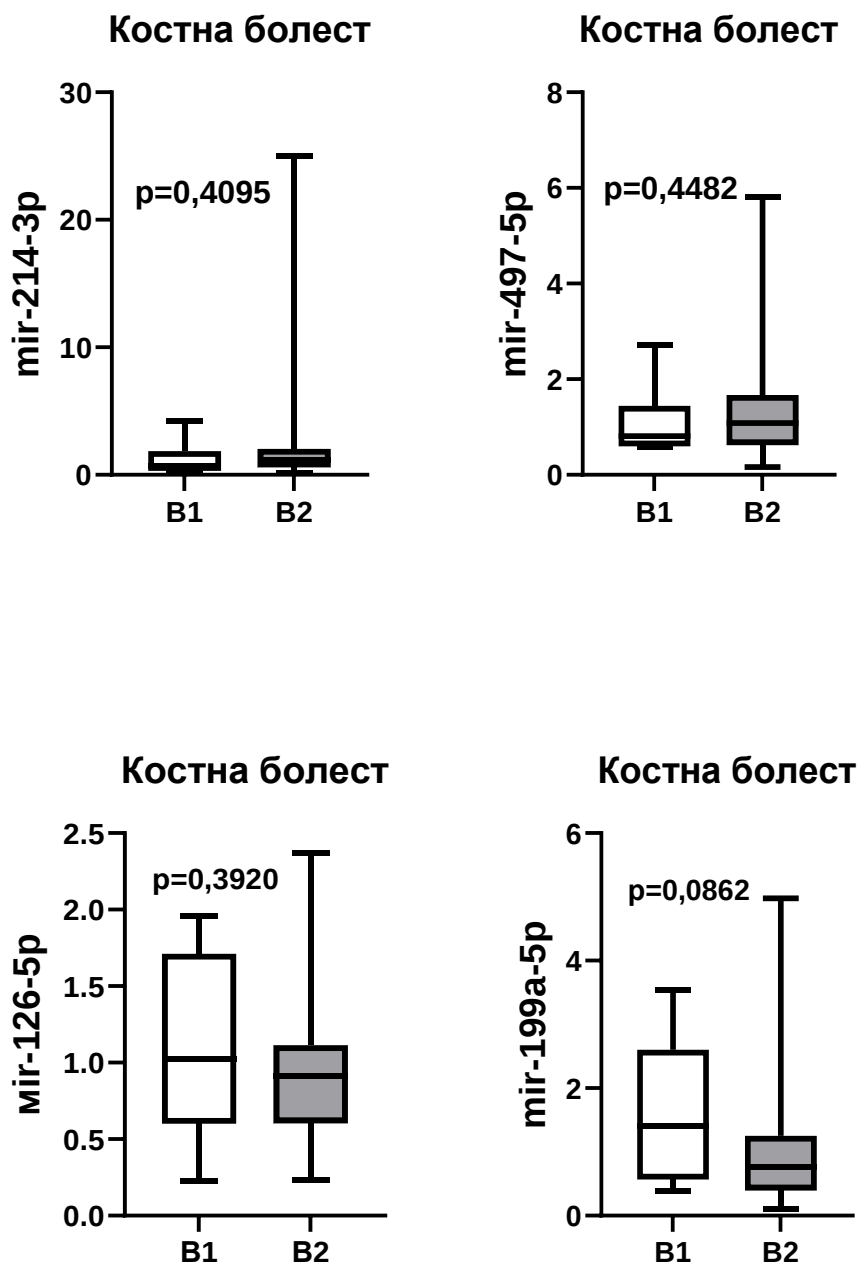
Фигура 16: Сравнителен анализ на стойностите на miR-214-3p, miR-497-5p, miR-126-5p, miR-199a-5p при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом и стратифицирани спрямо ISS

5.2.2.2. Спрямо броя на остеолитични лезии

На базата на броя описани чрез WBLDCT или PET-CT костни лезии пациентската популация се раздели на 2 групи (B1: 0-3 лезии, B2 > 3 лезии). Впоследствие се извърши сравнителен анализ на средните стойности при miR в зависимост от наличието и броя на регистрираните остеолитични лезии (табл. 5). Не се установяват сигнификантно значими отклонения при miR-214-3p, miR-497-5p, miR-126-5p. В стойностите на miR-199a-5p се откроява тенденция за по-ниски нива на последната при пациенти с по-ясно изразена костна болест (фиг. 16).

Таблица 5: Средни стойности на изследваните miR при пациенти преди лечение, разпределени по групи в зависимост от броя остеолитични лезии

	B1 (n=10)	B2 (n=44)	p
miR-214-3p	1,238 ± 0,901	2,330 ± 1,313	0,4095
miR-497-5p	1,070 ± 0,485	1,426 ± 0,359	0,4482
miR-126-5p	1,116 ± 0,436	0,941 ± 0,129	0,3920
miR-199a-5p	1,650 ± 0,822	1,080 ± 0,321	0,0862
miR-373-3p	N/A	N/A	N/A



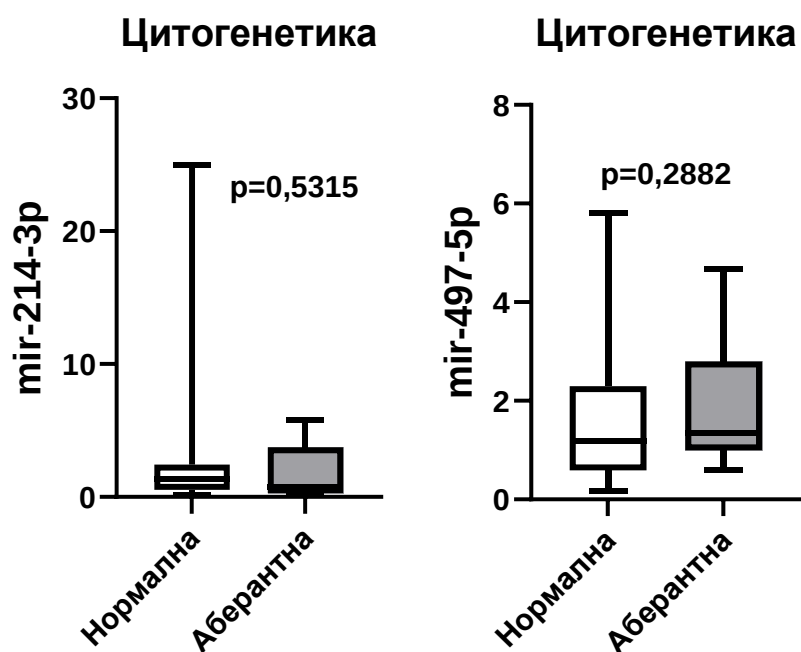
Фигура 17: Сравнителен анализ на стойностите на miR-214-3p, miR-497-5p, miR-126-5p, miR-199a-5p при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом и стратифицирани спрямо броя на остеолитични лезии

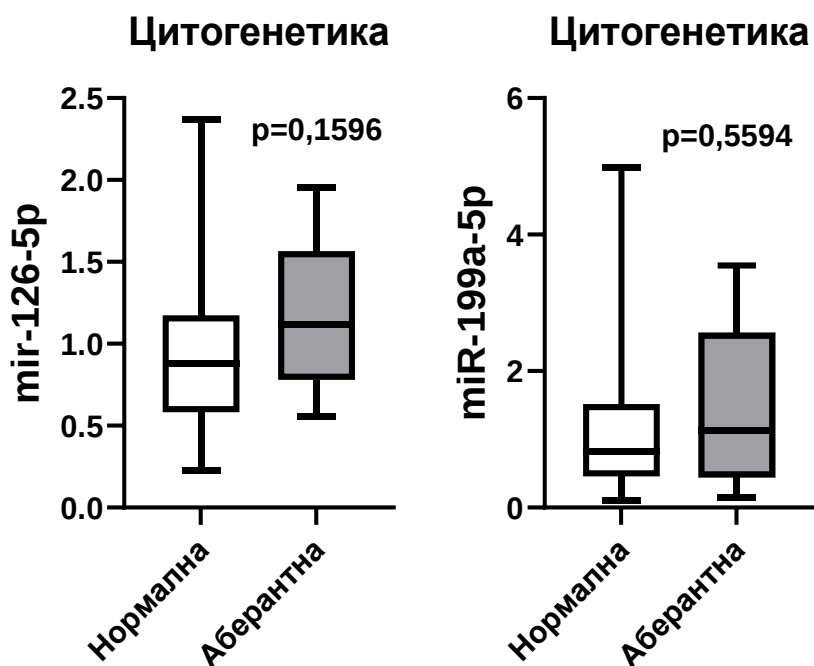
5.2.2.3. Спрямо цитогенетичния профил

В зависимост от цитогенетичния профил (установен от конвенционална метафазна цитогенетика), пациентите бяха разпределени в 2 групи (нормален и патологичен кариотип). Анализирахме средните стойности на изследваните miR в зависимост от кариотипа.

Таблица 6: Средни стойности на изследваните miR при пациенти преди лечение, разпределени по групи в зависимост от цитогенетичния профил

	Normal	Aberrant	p
miR-214-3p	2,490 ± 1,94 (n=26)	1,777 ± 1,989 (n=7)	0,5315
miR-497-5p	1,502 ± 0,498 (n=26)	1,958 ± 1,135 (n=8)	0,2882
miR-126-5p	0,973 ± 0,208 (n=26)	1,177 ± 0,357 (n=9)	0,1596
miR-199a-5p	1,251 ± 0,507 (n=25)	1,474 ± 0,911 (n=9)	0,5594
miR-373-3p	N/A	N/A	N/A





Фигура 18: Сравнителен анализ на стойностите на miR-214-3p, miR-497-5p, miR-126-5p, miR-199a-5p при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом в зависимост от цитогенетичния профил

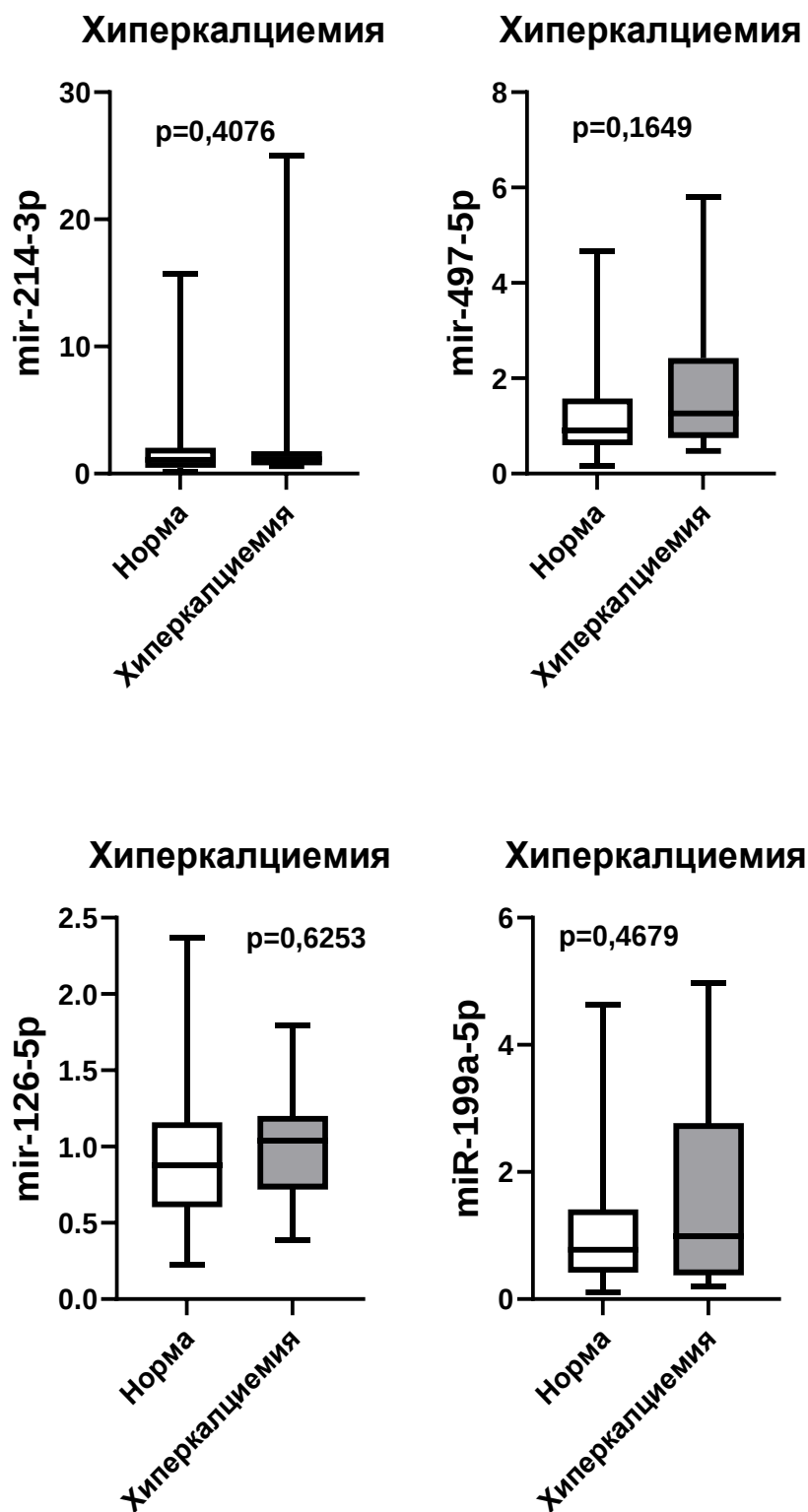
5.2.2.4. Спрямо наличието на хиперкалциемия

Ролята на подобрите miR в патогенезата на хиперкалциемията също беше оценена. Анализирахме средните стойности (табл. 7) на miR при пациентите със завишени нива на калций при диагнозата спрямо тези, при които не е документирано такова усложнение.

Таблица 7: Средни стойности на изследваните miR при пациенти преди лечение разпределени по групи в зависимост от наличието на хиперкалциемия

	Normal (n=42)	Hypercalcemia (n=11)	p
miR-214-3p	1,731 ± 0,781	3,678 ± 4,855	0,4076
miR-497-5p	1,233 ± 0,293	1,86 ± 1,04	0,1649
miR-126-5p	0,964 ± 0,145	1,00 ± 0,285	0,6253
miR-199a-5p	1,085 ± 0,29	1,582 ± 1,013	0,4679
miR-373-3p	N/A	N/A	N/A

Нашите резултати не установяват значими отклонения в проведенния анализ и не могат да отхвърлят нулевата хипотеза.



Фигура 19: Сравнителен анализ на стойностите на miR-214-3p, miR-497-5p, miR-126-5p, miR-199a-5p при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом в зависимост от цитогенетичния профил

5.2.3. Анализирание на корелационната връзка на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p със стойности от клинична лаборатория на пациентите

Проведе се корелационен анализ на Spearman с цел оценка на отношението на потенциалните биомаркери и рутинни лабораторни изследвания от клиничната практика (табл. 8).

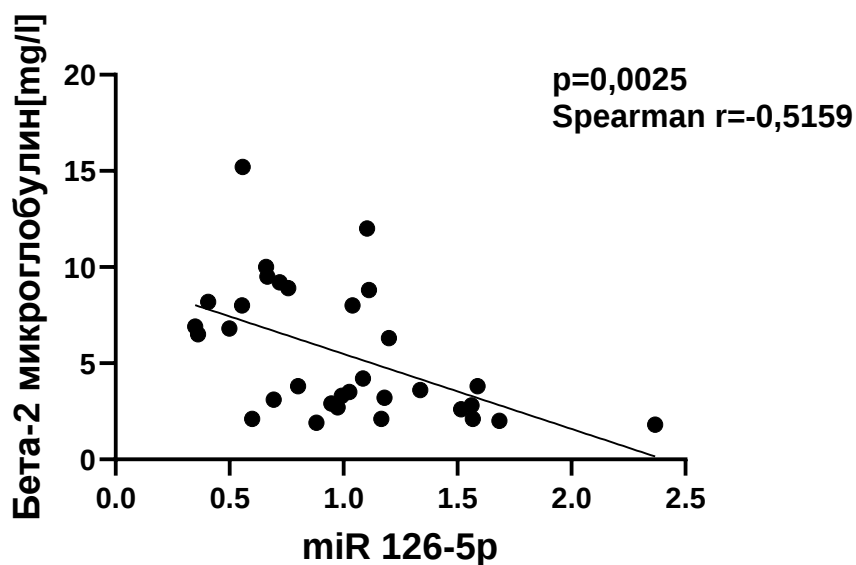
Таблица 8: Стойности на Spearman correlation coefficient и p за изследваните miR и нивата на хемоглобин, серумен креатинин, бета-2 микроглобулин и парапротеин

	Хемоглобин p; r	Креатинин p; r	Бета-2 мкр p; r	Парапротеин p; r
miR-214-3p	0,9708; 0,0069	0,3703;-0,1666	0,7075; 0,0702	0,8228; 0,0462
miR-497-5p	0,4732;-0,1338	0,2829;-0,1991	0,5848;-0,1021	0,6866;-0,0831
miR-126-5p	0,1255; 0,2765	0,1626;-0,2529	0,0025;-0,5159	0,3922;-0,1716
miR-199a-5p	0,0210; 0,4127	0,3020;-0,1915	0,0425;-0,3667	0,7513; 0,0653
miR-373-3p	N/A	N/A	N/A	N/A

Статистически значима умерено силна обратнопропорционална връзка се установи между RQ нивата на miR-126-5p и бета-2 микроглобулин (фиг. 20). При същата се демонстрира и слаба корелация със стойностите на хемоглобин, креатинин и парапротеин (фиг. 21, 22, 23). MiR-199a-5p корелира умерено с хемоглобин (фиг. 24) и бета-2 мкг (фиг. 25) и в ниска степен със серумния креатинин (фиг. 26).

За miR-214-3p и miR-497-5p не се установяват значими пропорционални връзки спрямо изследваните параметри.

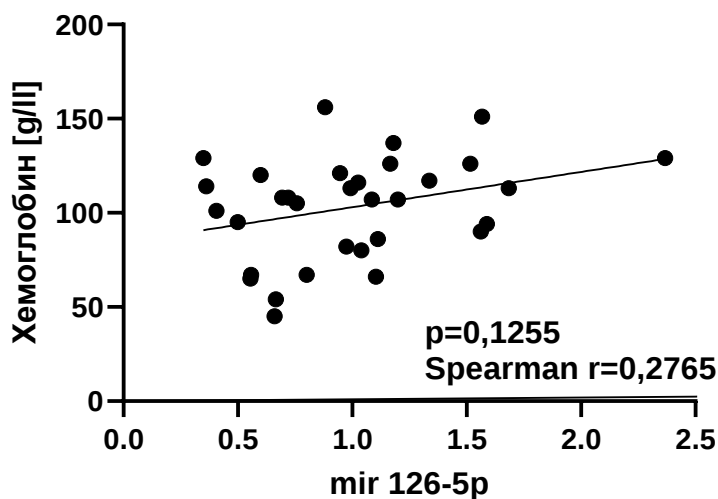
Корелация на miR 126-5p с бета-2 микроглобулин



Фигура 20: Корелационен анализ между miR-126-5p и базовите стойности на бета-2 микроглобулин

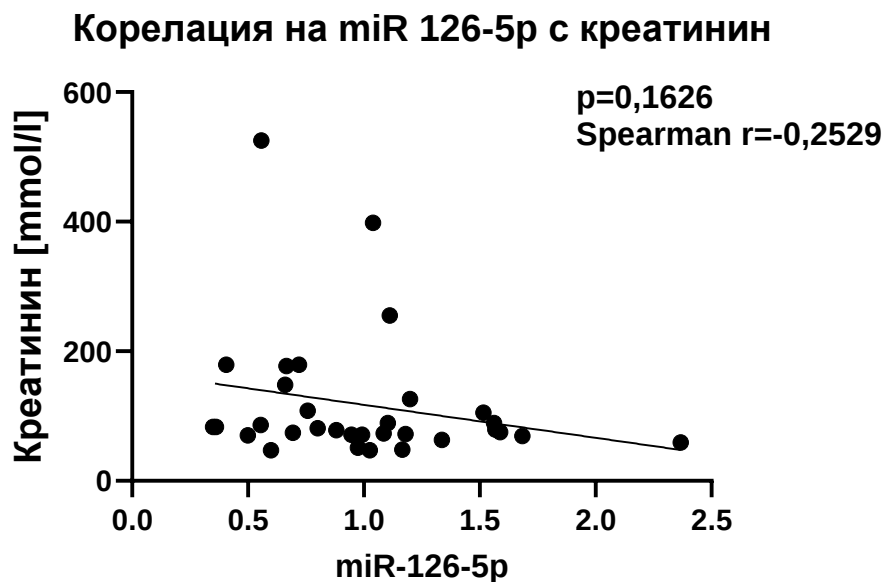
Доказа се сигнификантна обратнопропорционална връзка между нивата на miR-126-5p и бета-2 микроглобулин (Spearman correlation coefficient = -0.5159; $p=0,0025$).

Корелация на miR-126-5p с хемоглобин



Фигура 21: Корелационен анализ между miR-126-5p и базовите стойности на хемоглобин

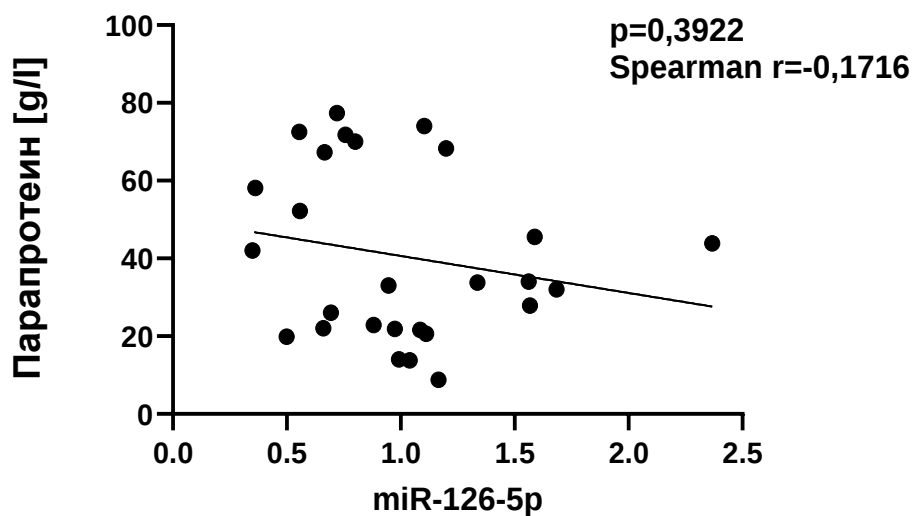
На графиката е изобразена слаба правопрпорционална корелационна връзка между miR-126-5p и базовите стойности на хемоглобин (Spearman correlation coefficient = 0.2765; $p=0,1255$).



Фигура 22: Корелационен анализ между miR-126-5p и базовите стойности на серумен креатинин

Установява се лека отрицателна корелация между miR-126-5p и базовите стойности на серумен креатинин (Spearman correlation coefficient = -0.2529; $p=0,1626$)

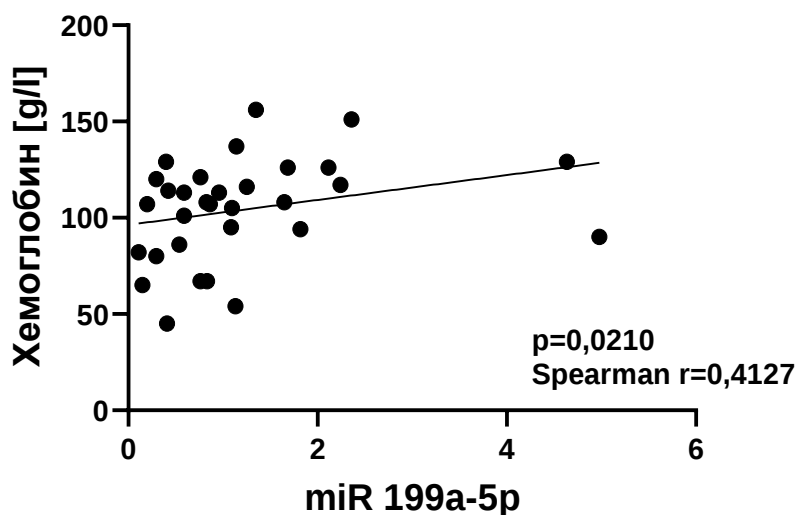
Корелация на miR 126-5p с парапротеин



Фигура 23: Корелационен анализ между miR-126-5p и базовите стойности на парапротеин.

Фигурата демонстрира лека обратна корелация между miR-126-5p и базовите стойности на парапротеин (Spearman correlation coefficient = -0.1716; $p=0,3922$).

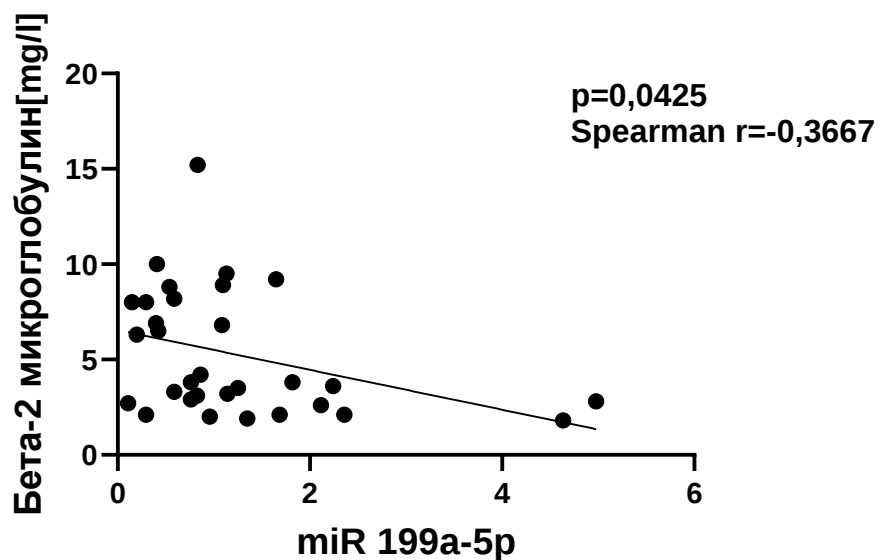
Корелация на miR 199a-5p с хемоглобин



Фигура 24: Корелационен анализ между miR-199a-5p и базовите стойности на хемоглобин

Доказа се корелация с умерна сила и статистическа значимост между нивата на miR-126-5p и хемоглобин (Spearman correlation coefficient = 0,4127; p=0,0210).

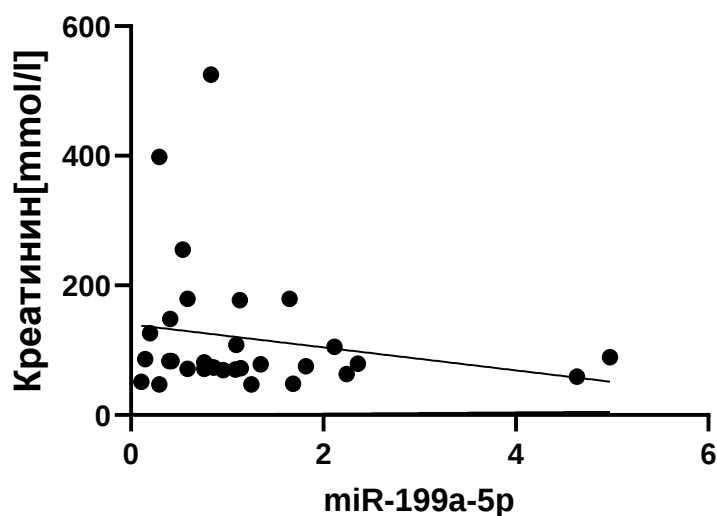
Корелация на miR 199a-5p с бета-2 микроглобулин



Фигура 25: Корелационен анализ между miR-199a-5p и бета-2 микроглобулин

Графиката изобразява умерена отрицателна корелация между експресионните нива на miR-199a-5p и бета-2 микроглобулин (Spearman correlation coefficient = -0,3667; p=0,0425).

Корелация на miR 199a-5p с креатинин



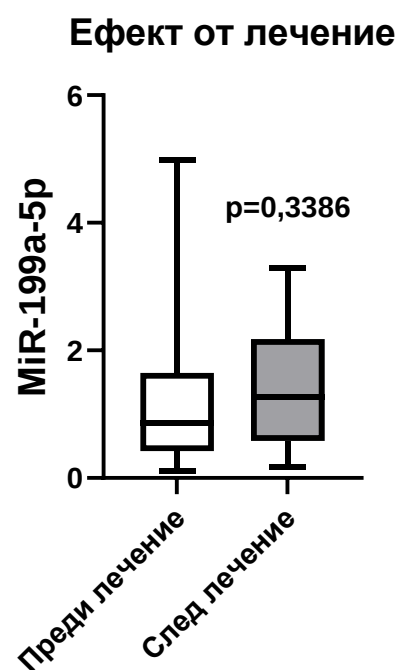
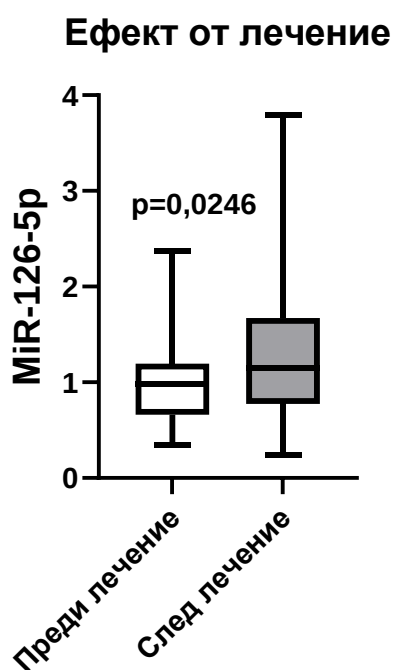
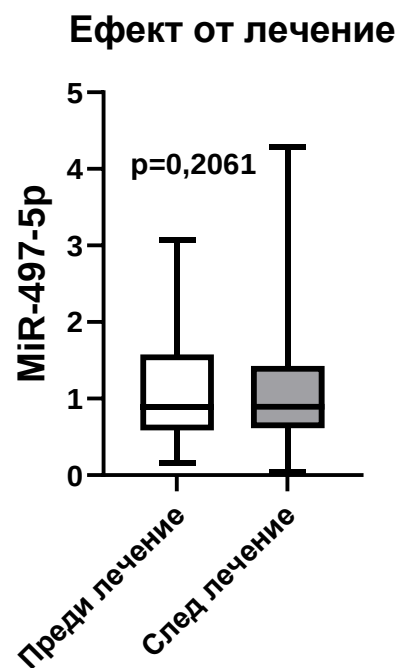
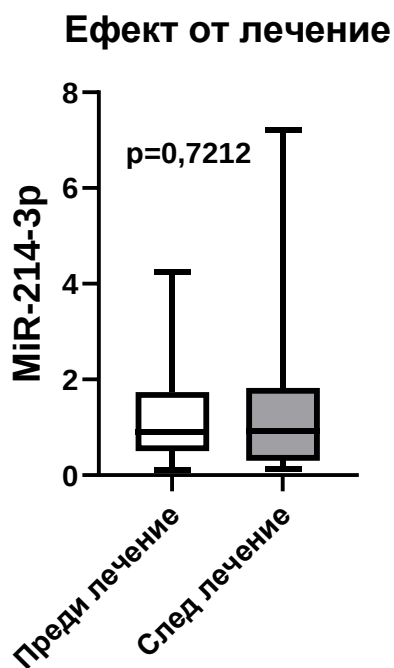
Фигура 26: Корелационен анализ между miR-199a-5p и серумен креатинин

Доказа се лека обратна зависимост между miR-199a-5p и нивата на креатинин (Spearman correlation coefficient = -0,1915; p=0,3020).

5.2.4. Оценка на нивата на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p при пациентите, които са достигнали до второ изследване, и чифтните им проби в хода на лечението и отговора от терапия и сравняване със здрави контроли.

Таблица 9: Стойности на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p при пациентите, които са достигнали до вторична проба преди стартиране на лечение и на чифтните им проби след 6 месеца лечение

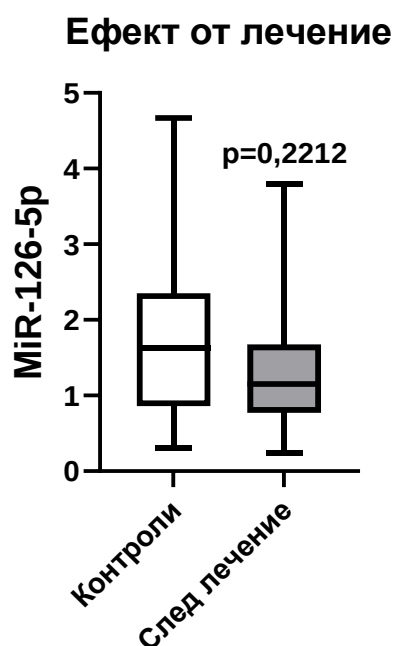
	Нива преди лечение	Нива след лечение	p
miR-214-3p	1,293 ± 0,397 (n=31)	1,276 ± 0,523 (n=30)	0,7212
miR-497-5p	1,112 ± 0,279 (n=31)	1,136 ± 0,365 (n=28)	0,2061
miR-126-5p	0,999 ± 0,163 (n=32)	1,326 ± 0,272 (n=31)	0,0246
miR-199a-5p	1,211 ± 0,419 (n=31)	1,365 ± 0,348 (n=29)	0,3386
miR-373-3p	N/A	N/A	N/A



Фигура 27: Тест на Уилкоксън за свързани двойки със знакови рангове за miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p

Установяват се значимо по-високи стойности на miR-126-5p при пациентите след проведено лечение, резултат, който се доближава до контролните стойности (фиг. 28,

табл. 10). При другите изследвани биомаркери не се демонстрира сигнификантна промяна в хода на терапията.



Фигура 28: Сравнение между нивата на експресия на miR-126-5p при здрави контроли и при пациенти след 6 месеца лечение (непараметричен Man-Whitney тест)

Таблица 10: Средни стойности miR-126-5p при здрави контроли и при пациенти след 6 месеца лечение

	Контроли	Нива след лечение	p
miR-126-5p	1,800 ± 0,78 (n=12)	1,326 ± 0,272 (n=31)	0,2212

5.2.5. Анализ на нивата на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p в хода на лечението спрямо отговора от терапия и сравняване със здрави контроли

От 56-мата пациенти, включени в проучването, 32-ма (57%) достигнаха до 2-ра (проследяваща проба) след 6 курса терапия по протокол VCD. От тях 20/32 (62,5%) попадат в пълен (**Complete Response**) или много добър парциален отговор (**Very Good**

Partial Response). При останалите 12/32 (37,5%) е постигнат частичен отговор (Partial Response) или е отчетена стабилност на заболяването (Stable Disease).

Впоследствие се проведе Kruskal-Wallis, за да се съпоставят резултатите на 4-те независими групи.

На табл. 11 са представени средните стойности на изследваните биомаркери, разпределени по групи спрямо отговора от лечението.

Таблица 11: Средни стойности на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p при здрави контроли, пациенти преди лечение и при пациенти след 6 месеца лечение в зависимост от отговора от терапия

	Здрави контроли	Нива преди лечение	CR+VGPR	PR+SD	P; ϵ^2
miR-214-3p	1,448 $\pm$ 0,671 (n=10)	2,128 $\pm$ 1,078 (n=54)	1,349 $\pm$ 0,828 (n=18)	1,166 $\pm$ 0,589 (n=12)	0,6705
miR-497-5p	1,505 $\pm$ 0,485 (n=11)	1,360 $\pm$ 0,303 (n=54)	1,145 $\pm$ 0,399 (n=18)	1,121 $\pm$ 0,863 (n=10)	0,3407
miR-126-5p	1,8 $\pm$ 0,78 (n=12)	0,9721 $\pm$ 0,126 (n=56)	1,486 $\pm$ 0,379 (n=19)	1,073 $\pm$ 0,387 (n=12)	0,0056; 0.029
miR-199a-5p	3,018 $\pm$ 1,513 (n=11)	1,168 $\pm$ 0,293 (n=54)	1,522 $\pm$ 0,51 (n=18)	1,108 $\pm$ 0,448 (n=11)	0,0038; 0.076
miR-373-3p	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Резултатите от директните сравнения от проведения post hoc анализ на Dunn са представени на табл. 12.

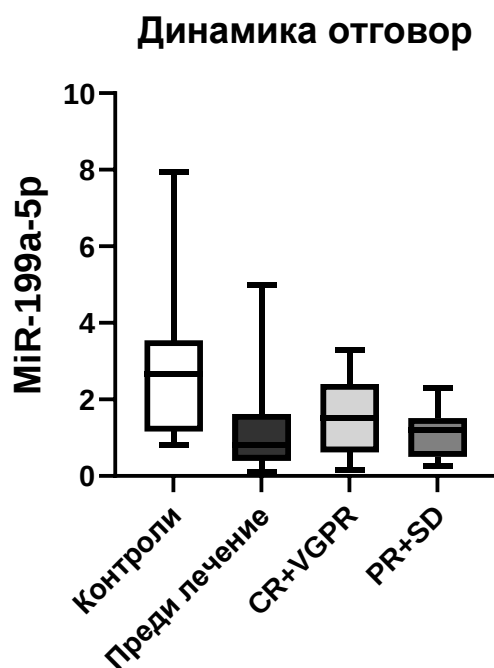
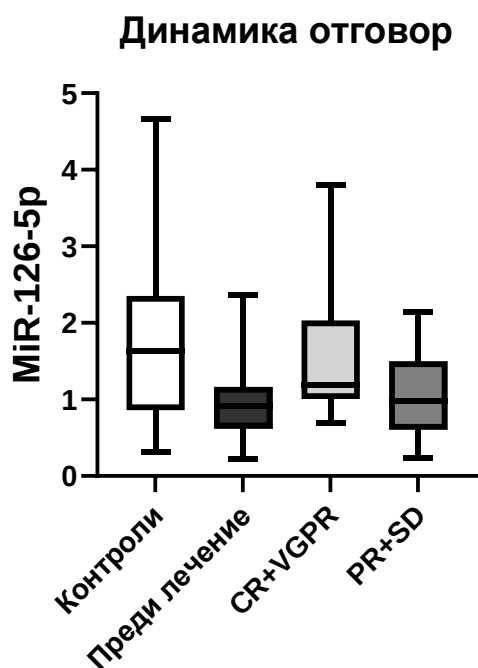
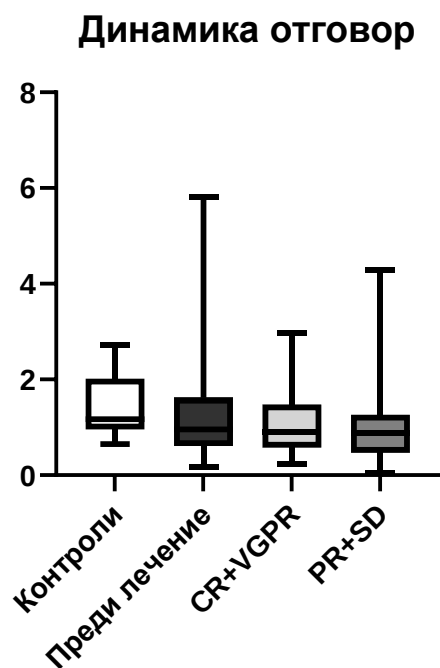
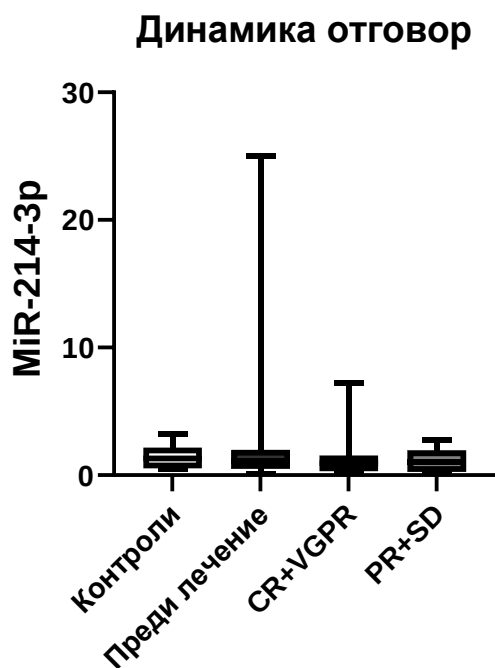
Таблица 12: Post hoc анализ на Dunn за множествени сравнения

	Контроли v.s. преди лечение	Контроли v.s. CR+VGPR	Контрол и v.s. PR+SD	Преди лечение v.s. CR+VGPR	Преди лечение v.s. PR+SD	CR+VGP R v.s. PR+SD
miR-214-3p	p>0,9999	p>0,9999	p>0,9999	p>0,9999	p>0,9999	p>0,9999
miR-497-5p	p>0,9999	p=0,7646	p=0,5717	p>0,9999	p>0,9999	p>0,9999
miR-126-5p	p=0,0418	p >0,9999	p=0,5167	p=0,0320	p>0,9999	p=0,6871
miR-199a-5p	p=0,0022	p=0,2561	p=0,0751	p=0,8366	p >0,9999	p >0,9999
miR-373-3p	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Нивата на miR-199a-5p са сигнификантно по-ниски при NDMM, сравнено със здравите контроли. Резултат, който загатва тяхната роля като потенциален биомаркер за диагностика. От друга страна, експресията на последната не се изменя значимо независимо от отговора (пълнен и много добър или частичен и стабилен). Може да се заключи, че miR-199a-5p е по-информативен за диагностика спрямо за оценка на ефекта от лечение.

Значими отклонения се наблюдават и при miR-126-5p. Нивата на експресия са сигнификантно по-ниски при нелекувани пациенти и могат да се възстановят до контролните при задоволителен ефект от лечението (CR+VGPR). В допълнение при частичен отговор или стабилно заболяване резултатите не се различават статистически от нивата преди лечение.

Резултатите от проведеното изследване показват, че не се регистрира значима разлика в RQ стойностите на miR-497-5p, miR-214-3p в нито една от изследваните субпопулации.



Фигура 29: Анализ на нивата на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p. при здрави контроли, нелекувани пациенти, пациенти в пълен или много добър парциален отговор и пациенти с частичен отговор или стабилна болест

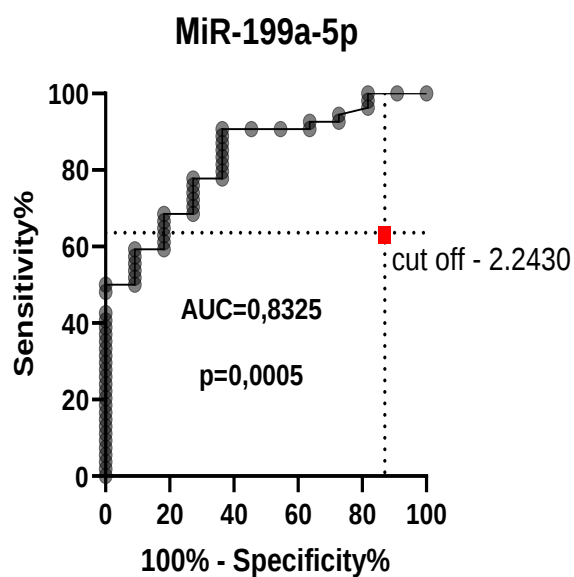
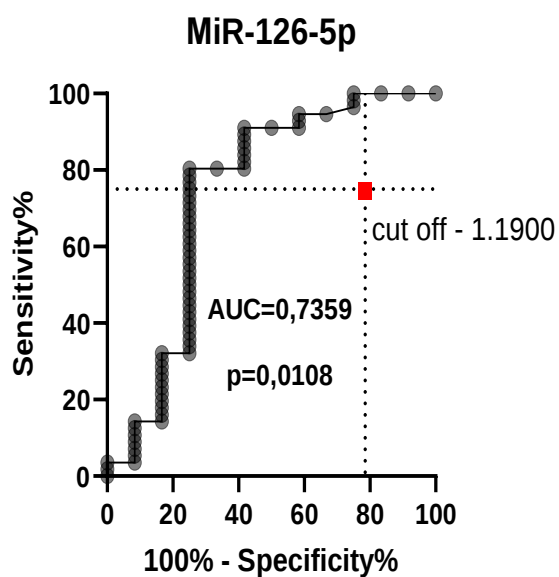
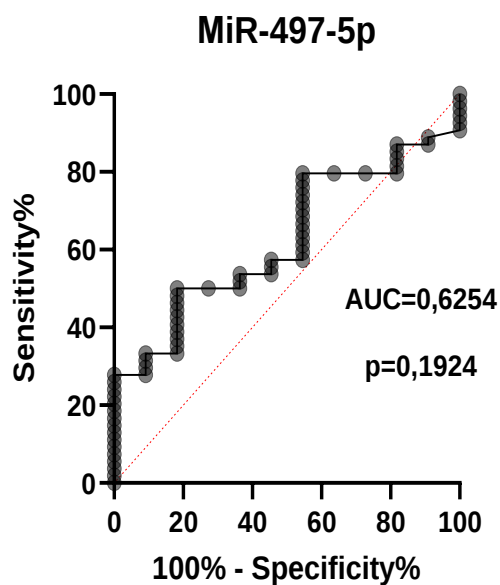
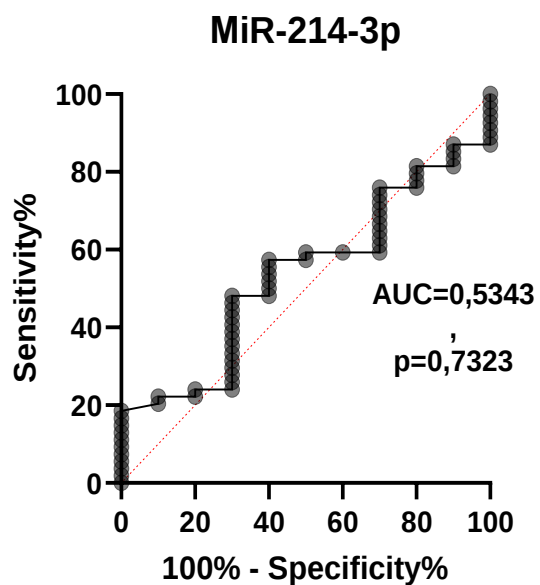
5.2.6. Диагностична стойност на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p като биомаркер

Осъществи се ROC (Receiver Operator Characteristic) с оглед оценка на диагностичния потенциал на изследваните биомаркери (табл. 13).

Таблица 13: Резултати от ROC (Receiver operating characteristic) анализ на изследваните miR като биомаркери за разграничаване на пациенти с множествен миелом и здрави контроли

	AUC, p	Cut-off	Sensitivity % (CI)	Specificity % (CI)
miR-214-3p	0,5343, p=0,7323	0.4435	18.52 (10.38-30.84)	100.00 (72.25-100.00)
miR-497-5p	0,6254, p=0,1924	0.9405	50.00 (37.11-62.89)	81.82 (52.30-96.77)
miR-126-5p	0,7359, p=0,0108	1.1900	78.57 (66.18-87.29)	75.00 (66.18-87.29)
miR-199a-5p	0,8325, p=0,0005	2.2430	87.04 (75.58-93.58)	63.64 (35.38-84.83)
miR-373-3p	N/A	N/A	N/A	N/A

Всред четирите успешно изследвани miR miR-126-5p и miR-199a-5p демонстрират най-обещаващи характеристики като диагностични биомаркери чрез своите високи стойности на AUC и сигнификантно (p). miR-199a-5p е с най-висока чувствителност, докато miR-126-5p е с по-балансиран нива на специфичност и сензитивност. MiR-214-3p и miR-497-5p имат ограничена стойност, нисък AUC и липса на статистическа значимост (фиг. 29).

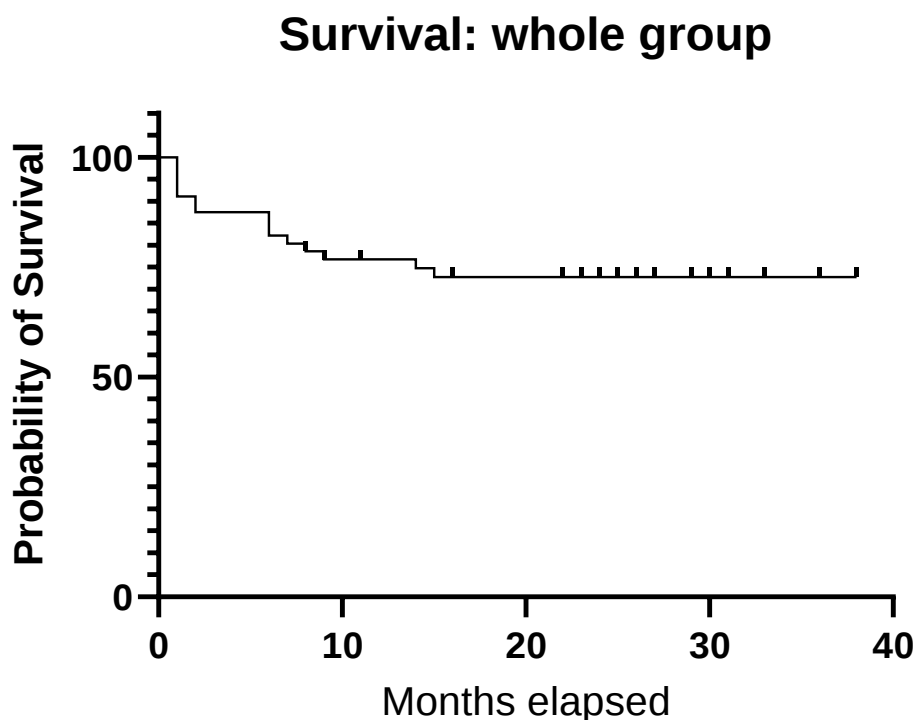


Фигура 30: ROC (Receiver operating characteristic) анализ на изследваните miR като биомаркери за разграничаване на пациенти с множествен миелом и здрави контроли

5.2.7. Обща преживяемост (OS), преживяемост, свободна от прогресия (PFS) и предиктивна роля на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p като биомаркери

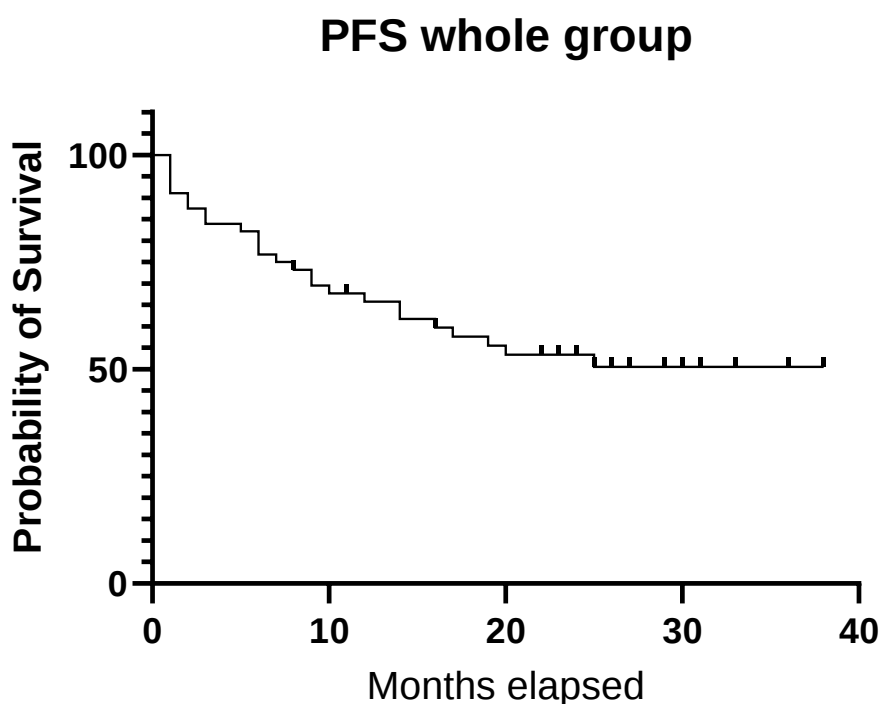
5.2.7.1. Обща преживяемост (OS) и преживяемост, свободна от прогресия (PFS) за цялата популация

Медианата на OS на цялата група не е достигната до 38-ми месец на проследяване. От графиката прави впечатление големият брой пациенти, загинали още през първите 2 месеца от диагнозата. Преживяемостта спада умерено за 9 месеца, след което се достига плато, като след месец 16 не са регистрирани нови смъртни случаи. До края на проследявания период 72,7% от пациентите остават живи (фиг. 30).



Фигура 31: Kaplan-Meier крива на обща преживяемост (OS)

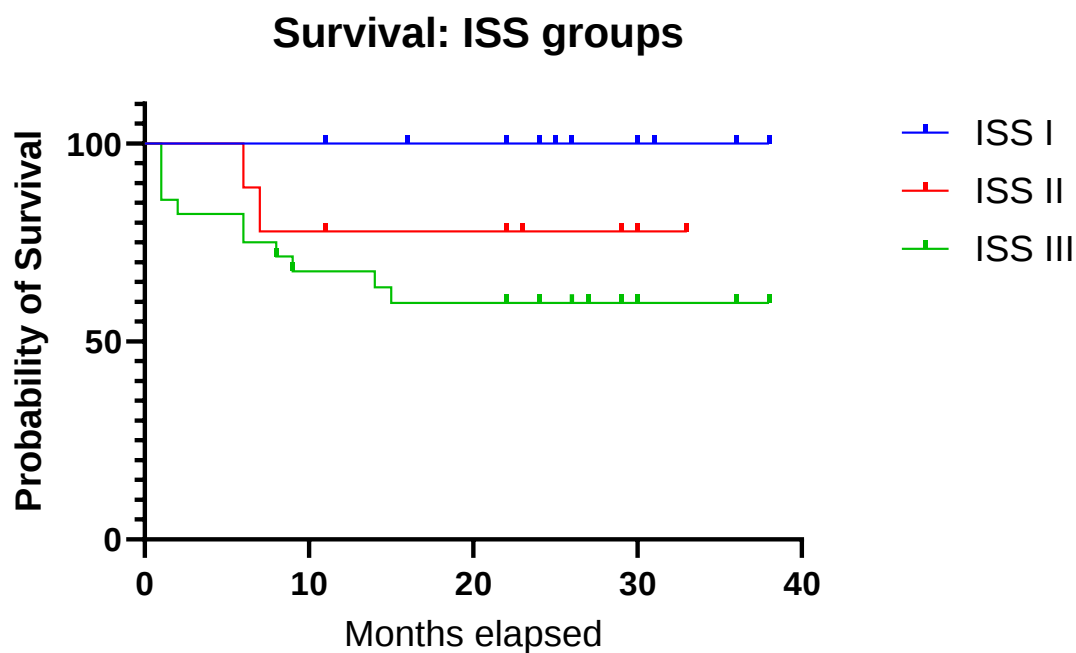
Относно PFS отново медианата не е достигната до края на проследявания период. По-значителният спад на кривата се наблюдава през първите 10 месеца, достигайки 67,7%. След месец 25 PFS се стабилизира с половината от пациентите, оставащи без нежелани събития (фиг. 31).



Фигура 32: Kaplan-Meier крива на обща преживяемост (PFS)

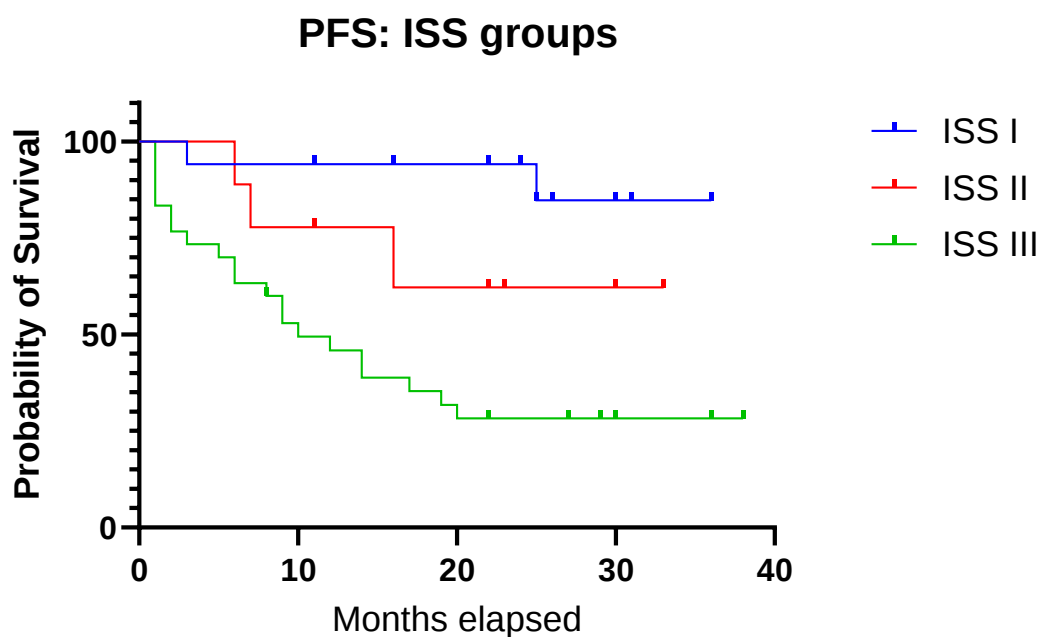
5.2.7.2. Обща преживяемост (OS) и преживяемост, свободна от прогресия (PFS) спрямо ISS

Установява се сигнификантна разлика ($p=0,0134$) при директното сравнение на OS между пациентската популация, стратифицирана по ISS. За периода на проследяване нито 1 пациент в ISS I не е загинал спрямо 2 в ISS II и 11 в ISS 3. Медианата не е установена за нито една от субпопулациите (фиг. 32).



Фигура 33: Анализ на преживяемостта в зависимост от ISS

Статистически подобни резултати се регистрират и при аналогичния анализ PFS кривата ($p=0,0005$). За периода на проследяване нито 1 пациент в ISS I не е загинал спрямо 2 в ISS II и 11 в ISS 3. Единствено във високорисковата група се установява медиана на PFS=11 месеца (фиг. 33).



Фиг.

Фигура 34: Анализ на PFS в зависимост от ISS.

5.2.7.3. Предиктивна роля на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p като биомаркери за обща преживяемост (OS) и преживяемост, свободна от прогресия (PFS)

За да се оцени индивидуалната роля на miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p в контекста на OS и PFS се осъществи регресионен анализ на Кокс (табл. 14, 15).

Таблица 14: Регресионен анализ на Кокс за miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p (OS)

	β коефициент	CI β коеф.	Hazard Ratio	CI HR
miR-214-3p	0.27	0.03 до 0.50	1.31	1.03 до 1.65
miR-497-5p	0.95	0.19 до 1.66	2.57	1.22 до 5.25
miR-126-5p	- 1.16	- 3.33 до 0.76	0.31	0.04 до 2.13
miR-199a-5p	- 0.26	- 1.26 до 0.53	0.77	0.28 до 1.70
miR-373-3p	N/A	N/A	N/A	N/A

Анализът за OS установява статистическа значимост за miR-214-3p и miR-497-5p като потенциални предиктивни маркери за обща преживяемост и риск от ранна смърт. За всяка единица покачване на miR-214-3p се увеличава рискът от смърт с 31%. При miR-497-5p резултатите са още по-красноречиви, като по-високите нива са асоциирани с повече от двукратно увеличение на HR. MiR-126-5p и miR-199a-5p не демонстрираха сигнификантни резултати, въпреки че се загатва протективната роля на miR-126-5p.

Таблица 15: Регресионен анализ на Кокс за miR-199a-5p, miR-126-5p, miR-497-5p, miR-214-3p, miR-373-3p (PFS)

	β коефициент	CI β коеф.	Hazard Ratio	CI HR
miR-214-3p	0.32	0.06 до 0.61	1.38	1.07 до 1.84
miR-497-5p	0.99	0.24 до 1.72	2.7	1.28 до 5.60
miR-126-5p	- 1.21	- 3.33 до 0.64	0.3	0.04 до 1.90
miR-199a-5p	- 0.3	- 1.28 до 0.48	0.74	0.28 до 1.62
miR-373-3p	N/A	N/A	N/A	N/A

Аналогичният анализ за PFS регистрира сходни резултати, откроявайки отново miR-214-3p и miR-497-5p като статистически значими предиктивни биомаркери (табл. 12). Първите по-високи нива на експресия предполагат с до 38,1% по-висок риск от прогресия на заболяването. Повишените стойности на miR-497-5p се свързват отново с над два пъти по-голяма честота на прогресия в изследваната популация. За miR-199a-5p и miR-126-5p не се достига прагът за статистическа значимост, като отново при последната се регистрира потенциална протективна функция.

6. Дискусия

6. 1. Въведение

Множественият миелом (ММ) е хетерогенно злокачествено хематологично заболяване с комплексна генеза, характеризираща се с клонална пролиферация на малигнени плазматични клетки в костния мозък. Въпреки напредъка в терапевтичните стратегии, ММ остава неизлечимо заболяване, а пациентите често изпитват множество рецидиви поради развитие на лекарствена резистентност [Rajkumar SV et al. 2024]. Идентифицирането на надеждни биомаркери за ранна диагностика, прогноза и мониториране на отговора към лечението е от съществено значение за подобряване на изхода за пациентите. В това проучване изследвахме експресионните нива на специфичните циркулиращи miR: miR-126-5p, miR-199a-5p, miR-214-3p, miR-497-5p и miR-373-3p при новодиагностицирани пациенти с ММ както преди лечението, така и след шест месеца терапия, сравнявайки ги със здрави контроли. Нашите изводи предоставят информация за потенциалната роля на тези miR като диагностични и прогностични биомаркери при ММ и тяхната асоциация с клинични параметри и отговор към лечението.

6.2. Понижение на miR-126-5p и miR-199a-5p при пациенти с ММ

Настоящите резултати установиха, че miR-126-5p и miR-199a-5p са значително понижени при пациенти с новодиагностицирана ММ в сравнение със здравите контроли. Това следствие съответства на няколко проучвания, подчертаващи тумор-супресивните роли на тези miR при ММ и други заболявания [Zhao Y et al. 2020, Wei D et al. 2019, Liu X et al. 2018]. Изследванията върху miR-126 показват, че той е ключов регулатор на сигнални пътища, свързани с растежния фактор EGFR (epidermal growth factor receptor), както и с ангиогенезата и адхезията [Zhao Y et al. 2020]. При редица солидни тумори, включително хепатоцелуларен карцином (HCC) [Zailaie SA et al. 2022] и рак на гърдата [Msheik ZS et al. 2022], ниските нива на miR-126 корелират с по-агресивно поведение и

намалена преживяемост на пациентите. Когато експресията му се възстанови (чрез приложение на агонисти), се наблюдава отчетливо потискане на клетъчната пролиферация, ангиогенезата и метастазирането [Du C et al. 2014]. Така miR-126 действа като тумор-супресор, блокирайки проонкогенните сигнали, което подсказва, че терапевтичното му възстановяване може да ограничи напредването на туморния процес, включително и при множествен миелом (ММ) (Zhao Y. и съавт. 2020).

От своя страна, miR-199a също се откроява като силен тумор-супресор при различни злокачествени заболявания, напр. орален плоскоклетъчен карцином (OSCC) и овариален карцином [Wei D et al. 2019]. В тези случаи miR-199a е значително занижен в сравнение с нормалните тъкани; при възстановяване на нивата му туморните клетки губят способност за интензивна пролиферация и инвазия, отчасти поради блокиране на NF-κB–медираните сигнални пътища (например чрез директна регулация на IKKβ или NF-κB1) [Markopoulos GS et al. 2018]. Освен това, miR-199a намалява експресията на матриксни металопротеинази (MMP-2, MMP-9) [Lou Z et al. 2018], които са ключови за метастатичния процес. Тези наблюдения потвърждават, че miR-199a директно потиска критични фактори на туморния растеж и метастазиране, което го превръща в потенциална мишена за молекулярно насочена терапия (Wei D. Et al. 2019), (Liu X. et al. 2018).

6.2.1. MiR-126-5p като тумор супресорен агент

В нашата кохорта пациенти установихме, че концентрацията на miR-126 намалява при случаи в по-напреднал клиничен стадий, по-голямо туморно натоварване и маркери, свързани с по-лоша прогноза и агресивно заболяване. Това е в асоциация с предишни проучвания, подчертаващи прогностичната стойност на miR-126 при различни неоплазии. Например при бъбречния карцином от светлоклетъчен тип (ccRCC) ниската експресия на miR-126 е свързана с по-висока степен на тумора и по-лоша преживяемост [Vergho D et al. 2014, White NM et al. 2011]. Подобни наблюдения в недребноклетъчен белодробен карцином и колоректален карцином (CRC) показват, че намалените нива на miR-126 са в тясна зависимост с прогресията на заболяването, метастазиране и по-ниска обща преживяемост [Jusufović E et al. 2012, Liu Y et al. 2014, Zhang Y et al. 2013].

Функционалната активност на miR-126 е известна с това, че таргетира ключови молекули, участващи в ангиогенезата, пролиферацията и туморната микросреда. В контекста на ММ, където прогресията е тясно обвързана с костномозъчното

микрообкръжение и неоваскуларизацията, доказаните ангиогенни и растежнорегулаторни свойства на miR-126 биха могли да обяснят докладваните резултати. Множество изследвания показват, че miR-126 модулира оста VEGF/VEGFR, PI3K/AKT сигнализацията и други критични пътища [Kong R et al. 2016, Jusufović E et al. 2012]. Нашите данни, показващи по-ниски нива на miR-126 при по-агресивни случаи, са в съответствие с експериментите при бъбречен карцином и меланом, където възстановяването на miR-126 потиска клетъчната пролиферация и миграция [Li N et al. 2013, Felli N et al. 2013]. Макар тези механизми да са по-слабо изследвани при ММ, паралелите предполагат, че miR-126 може да потиска растежните и сигналните пътища и при ММ, с което ограничава агресивността на заболяването.

Освен това, miR-126 влияе върху имунната регулация и стромалните взаимодействия, за които е известно, че са ключови при ММ. Сходни изменения на miR-126 са свързани с имунни дисбаланси в придобита апластична анемия и миелодиспластични синдроми, където нивата на miR-126 отразяват тежестта на заболяването [Giudice V et al. 2011]. Аналогично, при ММ микросредата имунната регулация и съдовият растеж може да бъдат частично формирани от miR-126-зависими промени, включително цитокинова сигнализация, ендотелна цялост и адхезионни молекули.

6.2.2. Протективната роля на miR-199a-5p

В настоящото проучване сред изследваните miR miR-199a-5p се откроява като особено значима. Установихме значително по-ниски нива на miR-199a-5p при пациенти с новодиагностициран ММ (NDMM) в сравнение със здрави контроли. Това съответства на предходни съобщения, свързващи miR-199a-5p с тумор-супресорни функции при различни солидни и хематологични злокачествени заболявания [Byrnes KA et al. 2016, Yu X et al. 2022].

MiR-199a-5p е показала, че влияе на множество неопластично-асоциирани механизми, като директно таргетира гени, участващи в клетъчната пролиферация, преживяемост и ангиогенеза [Wang L et al. 2020, Wang SH et al. 2014]. Един от валидираните ѝ таргети в други туморни модели е митоген-активирана протеин киназа 11 (MAP3K11), позната като MLK3 — ключов елемент на MAP киназната сигнализация [Song G et al. 2010]. В няколко солидни тумора ниските нива на miR-199a-5p корелират с повишена експресия на MAP3K11, с което се стимулират пролиферацията и инвазията

[Hong, S.A et al. 2023]. Въпреки че настоящото проучване не оценява директно MAP3K11 при ММ, екстраполацията от други злокачествени заболявания предполага потенциален механизъм, при който намалението на miR-199a-5p допринася за патогенезата на ММ, позволявайки неконтролирана MAP киназна сигнализация.

Освен това, miR-199a-5p се свързва с модулация на различни онкогенни пътища, включително mTOR и NF-κB, в други неопластични процеси [Callegari E et al. 2018, Wu C et al. 2016]. Нейната понижена експресия при NDMM потенцира, че тя играе фундаментална роля за злокачествената трансформация. Тази аберация може да подготви почвата за прогресия на заболяването много преди появата на клинични симптоми.

6.3. Корелация с клинични параметри

В рамките на настоящото проучване е проведен корелационен анализ между пет подбрани miR и няколко рутинни лабораторни показателя (хемоглобин, креатинин, бета-2 микроглобулин и стойности на парапротеин). Тези клинично значими тестове се използват регулярно при пациенти с множествен миелом (ММ) и отразяват ключови аспекти на хематологичния и функционалния статус – включително костномозъчна инфилтрация, степен на анемия и бъбречно засягане. Основната цел при включването им в анализа е да се идентифицират възможни взаимовръзки между нивата на разглежданите miR и клиничните прояви на миеломната болест.

Анализът установява, че понижените нива на miR-126-5p са тясно свързани с по-високи стойности на бета-2 микроглобулин – маркер, който се използва широко в клиничната практика за оценка на тежестта на заболяването и наличие на бъбречна дисфункция при ММ. Тази констатация подсказва, че дефицитът в експресията на miR-126-5p отразява по-напреднал ход на заболяването и по-голям туморен товар, тъй като по-високите нива на бета-2 микроглобулин обикновено корелират с по-тежка инфилтрация на костния мозък и/или влошена бъбречна функция. В контекста на персонализираната медицина miR-126-5p може да бъде изследван като допълнителен прогностичен показател, който да подпомага по-прецизното стадиране на пациентите, особено в комбинация с други критерии като ISS или R-ISS.

Що се отнася до хемоглобина, корелацията с miR-126-5p ($r=0,2765$; $p=0,1255$), макар и да показва тенденция за положителна връзка, не достига статистическа значимост ($p>0,05$). Проапоптоичната функция на miR-126 е застъпена и при [Fourdinier,

О et al. 2019], където се установява независима положителна връзка между последната и нивата на хемоглобин при пациенти с хронично бъбречно заболяване.

В контекста на хроничните хематологични нарушения при ММ и данните от публикацията на Fourdinier – може да се предположи, че спадът на miR-126-5p играе роля в патогенезата на анемията, но тази изява вероятно се влияе и от други фактори (например еритропоетинава продукция, костномозъчна инфилтрация, инфламаторни процеси).

По отношение на креатинина стойностите ($p=0,1626$; $r=-0,2529$) също не достигат ниво на статистическа значимост, но отразяват отрицателна посока на корелация – сходна тенденция с наблюденията в статията на Fourdinier, където по-ниски нива на miR-126 често се асоциират с влошена бъбречна функция и по-нисък eGFR. Въпреки че при ММ оценката на бъбречната функция е комплексна (протеинурия, бета-2 микроглобулин и др.), подобна тенденция за отрицателна връзка подкрепя хипотезата, че намаленият miR-126-5p отразява или задълбочаващ се бъбречен проблем, или едновременно влошаване на заболяването.

Освен това, по-високите нива на miR-199a-5p демонстрират положителна корелация с по-добри хематологични показатели, в частност с по-високи стойности на хемоглобина, и обратна корелация с бета-2 микроглобулин. Анемията е една от честите клинични прояви при множествен миелом, произтичаща от инфилтрацията на костния мозък от злокачествените плазматични клетки и последващото потискане на нормалната еритропоеза. Следователно положителната връзка между miR-199a-5p и хемоглобина предполага, че по-високата експресия на този miR би могла да е показателна за по-ограничена костномозъчна инфилтрация и по-добре запазена хемопоетична функция. По този начин miR-199a-5p би могъл да се окаже ценен биомаркер, даващ допълнителна информация за състоянието на пациента и евентуалната тежест на заболяването.

В обобщение, данните от това проучване подкрепят потенциала на miR-126-5p и miR-199a-5p като биомаркери за стратифициране на риска и за оценка на терапевтичния отговор при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом. Експресионните им нива могат да осигурят допълнителен слой информация, надграждащ върху рутинно използваните клинични параметри (като серумен калций, LDH, хемоглобин, бета-2 микроглобулин, стадий по ISS), и така да се постигне по-прецизна оценка на статуса на болния. Това е особено важно в контекста на индивидуализирания терапевтичен подход,

където ранната идентификация на пациенти с по-лоша прогноза би могла да доведе до модификации в избора или агресивността на лечението. Наличните в литературата данни за ролята на тези miR са все още ограничени, особено в националните проучвания, което подчертава необходимостта от по-мощни и задълбочени изследвания, насочени към валидирането и внедряването на miR-базираните биомаркери в клиничната практика.

6.4. Промени в нивата на miR след лечение

След шест месеца лечение пациентите, които постигнаха пълен отговор (CR) или много добър частичен отговор (VGPR), показаха значително увеличение на нивата на miR-126-5p, приближавайки се до тези на здравите контроли. Това предполага, че ефективната терапия може да възстанови експресията на miR-126-5p, потенциално нарушавайки проангиогенната среда, и да забави последваща прогресия. В момента стратификацията на риска при ММ се основава основно на цитогенетични промени, серумни маркери и образни изследвания. Включването на miR-126 в прогностичните модели може да осигури ново молекулярно ниво на стратификация. Както при колоректален карцином и светлоклетъчен бубречен карцином [Selven H et al. 2021, Khella HW et al. 2015], където ниските нива на miR-126 се асоциират с намалена преживяемост и се разглеждат като част от интегративни прогностични модели, така и при ММ употребата на miR-126 би могла да изостри точността на риска и да помогне при вземането на клинични решения за по-индивидуализирани терапии.

Пациентите с частичен отговор (PR) или стабилно заболяване (SD) не показаха значителни промени в нивата на miR-126-5p, което показва, че експресията на miR-126-5p корелира с ефективността на лечението. Този резултат предполага, че miR-126-5p може да служи като биомаркер за мониториране на терапевтичния отговор и динамична оценка на туморния товар.

Интересно е, че нивата на miR-199a-5p не се променят съществено в нашата кохорта след лечение, както и не корелират силно с категориите на отговор като CR/VGPR спрямо PR/SD. Това предполага, че макар miR-199a-5p да е сигнификантна за установяването или поддържането на злокачествения фенотип към момента на диагнозата, не се потвърждава свойството ѝ на динамичен маркер за оценка на краткосрочния терапевтичен отговор. Подобна статична роля при диагнозата, вместо флукутиращ биомаркер по време на лечението, не е без прецедент; някои генетични и епигенетични промени отразяват по-скоро базовата биология на заболяването, отколкото промените, индуцирани от терапията.

Въпреки това, в групата, при която се достигнаха CR или VGPR, се показва тенденция към увеличаване на стойностите. На базата на това могат да се направят изводи, че miR-199a-5p също реагира на ефективна терапия, въпреки че до по-малка степен от miR-126-5p. Липсата на статистическа значимост може да се дължи на малкия размер на извадката или необходимостта от по-дълъг период на проследяване за наблюдаване на значителни промени.

6.5. MiR-214-3p и miR-497-5p като прогностични биомаркери

MiR-214-3p и miR-497-5p не показаха значителни разлики между пациентите с ММ и здравите контроли при диагнозата. Въпреки това, по-високите нива на тези miR бяха свързани с по-лоша обща преживяемост (OS) и преживяемост без прогресия (PFS), което подсказва тяхната потенциална роля като прогностични биомаркери.

6.5.1. MiR-214-3p при прогресия на заболяването

MiR-214-3p е замесен в промотирането на прогресията на заболяването чрез таргетиране на PTEN, водещо до активация на пътя PI3K/AKT, който усилва клетъчното оцеляване, пролиферация и резистентност към апоптоза (Liu J et al. 2017). Асоциацията на повишените нива на miR-214-3p с по-лоши изходи при нашето проучване подкрепя потенциалната му роля като прогностичен биомаркер при ММ. Повишените нива на miR-214-3p могат да допринесат за агресивността на заболяването и резистентността към терапията. В своето проучване Misiewicz-Krzeminska I et al, докладват подобни резултати, изследването доказва, че възстановяването на miR-214 в миеломни клетъчни култури води до редукция на пролиферацията и индуцира апоптоза.

6.5.2. MiR-497-5p и комплексната му изява

MiR-497-5p е докладван да действа като тумор-супресор при различни заболявания чрез таргетиране на гени, участващи в регулацията на клетъчния цикъл и апоптозата, като B-cell lymphoma 2 (BCL2) и циклин D2 (CCND2) (Wu R et al. 2016). Въпреки това, нашите резултати предполагат, че по-високите нива на miR-497-5p могат да бъдат свързани с неблагоприятни изходи при ММ. Това несъответствие може да се дължи на сложните регулаторни взаимодействия при ММ, където miR-497-5p може да има контекст-зависими функции, потенциално действайки като онкоген в определени клетъчни условия.

Нови проучвания показват, че miR-497-5p може да участва в регулирането на ангиогенезата и може да има двойствена роля в зависимост от типа на заболяването и микрообкръжението [Luo G. 2021]. При ММ повишените нива на miR-497-5p може да допринасят за патологична ангиогенеза или да нарушават апоптотичните пътища по начин, който насърчава оцеляването на клетките на заболяването.

6.6. Липса на значими резултати с miR-373-3p

MiR-373-3p беше недоловим или присъстващ в много ниски нива при повечето от нашите проби, което ограничава възможността за извличане на значими статистически данни. Въпреки че miR-373-3p е докладван да проявява както супресивни, така и онкогенни свойства при различни заболявания [Wei F et al. 2015, Langroudi L et al. 2015], неговата роля при ММ остава неясна. Ниските нива на детекция в нашето проучване могат да се дължат на технически ограничения, като чувствителността на методите за детекция, или може да отразяват минималното участие на miR-373-3p в патофизиологията на ММ.

По-нататъшни изследвания с по-чувствителни методи за детекция или анализиране на по-големи кохорти могат да помогнат за изясняване на потенциалната роля на miR-373-3p при ММ.

6.7. Диагностичен потенциал на miR-126-5p и miR-199a-5p

Анализът на кривите на операционната характеристика на приемника (ROC) демонстрира, че miR-126-5p и miR-199a-5p имат потенциал като диагностични биомаркери за ММ. miR-199a-5p показва висока чувствителност (87.04%), но умерена специфичност (63.64%), което го прави подходящ за скринингови цели с цел минимизиране на фалшивите отрицателни резултати. При заболяване, при което диагнозата често изисква инвазивни костномозъчни изследвания и сложни образни методи, серумен биомаркер на основата на miR може да опрости ранното откриване и евентуално да идентифицира пациенти с по-висок риск от бърза прогресия. Макар самата miR да не замества установените диагностични алгоритми, нейната интеграция с анализ на серумни леки вериги, β 2-микроглобулин и протеинова електрофореза би могла да повиши диагностичната специфичност и чувствителност.

Подобна роля на miR-199a като диагностичен биомаркер е описана от Zhang W et al. в контекста на пациенти с недребноклетъчен карцином на бял дроб [Zhang W et al. 2022], като към настоящия момент липсват подобни проучвания в сферата на множествения миелом.

MiR-126-5p показва балансирана чувствителност (78.57%) и специфичност (75%), което показва добра диагностична точност. Този баланс предполага, че miR-126-5p може да бъде надежден маркер за разграничаване на пациентите с ММ от здравите индивиди. Включването на измерването на miR-126-5p в диагностичните протоколи може да намали нуждата от инвазивни процедури като биопсия на костен мозък и да улесни ранното откриване.

Тези miRNAs могат да допълнят съществуващите диагностични методи, като серумна протеинова електрофореза, имунофиксация и тестове за свободни светлини, предоставяйки неинвазивен и достъпен начин за откриване на ММ.

6.8. Терапевтичен потенциал на модулирането на експресията на miR

Терапевтичният потенциал на модулирането на експресията на miR при ММ е вълнуваща перспектива. Възстановяването на нивата на тумор-супресивни miR, като miR-126-5p и miR-199a-5p, може да инхибира растежа на заболяването, ангиогенезата и да повиши чувствителността към химиотерапия.

6.8.1. Възстановяване на miR-126-5p

Терапевтичните стратегии за увеличаване на нивата на miR-126-5p могат да потиснат експресията на VEGFA, намалявайки ангиогенезата и васкуларизацията на заболяването. Освен това, възстановяването на нивата на miR-126-5p може да повиши ефективността на съществуващите лечения чрез потенциране на чувствителността на ММ клетките към химиотерапевтичните агенти.

6.8.2. Възстановяване на miR-199a-5p

По подобен начин възстановяването на нивата на miR-199a-5p може да потисне пътеводните фактори HIF-1 α и mTOR, намалявайки клетъчната пролиферация и индуцирайки апоптоза. Това също може да преодолее резистентността към лекарствата, тъй като miR-199a-5p е показано, че засилва чувствителността на ММ клетките към протеазомните инхибитори като бортезомиб [Robak P et al. 2020].

6.8.3. Таргетиране на онкогенни miR

Обратно, инхибирането на онкогенни miR като miR-214-3p може да потисне антиапоптоичните пътища и да преодолее лекарствената резистентност. Антисенс олигонуклеотиди или miR спонджове могат да бъдат използвани за инхибиране на miR-

214-3p, потенциално възстановявайки функцията на PTEN и инхибирайки пътя PI3K/AKT [Wang W et al. 2014].

6.8.4. Предизвикателства и перспективи

Развитието на ефективни системи за доставка на miR миметици или инхибитори остава значително предизвикателство. Механизмът на приложение трябва да защитава miR от деградация, да ги насочват специфично към клетките на ММ и да минимизира предизвикването на имунни реакции. Напредъкът в нанотехнологиите, като липидни наночастици, екзозоми и вирусни вектори, може да улесни клиничното приложение на терапиите, базирани на miR.

Освен това, потенциалните оф-таргет ефекти и токсичността, свързани с модулирането на miR, трябва да бъдат внимателно оценени чрез предклинични и клинични проучвания.

6.9. Ограничения на проучването

Нашето проучване има няколко ограничения:

Размер на извадката и едноцентров дизайн: Относително малкият размер на извадката, особено за пациентите, които достигнаха шестмесечното проследяване, може да ограничи общата приложимост на нашите открития и да намали статистическата достоверност. По-големи кохорти от множество центрове са необходими за валидиране на настоящите резултати и осигуряване на тяхната приложимост към различни популации на пациенти.

Технически предизвикателства: Ниските нива на детекция на miR-373-3p подчертават необходимостта от стандартизирани протоколи и по-чувствителни методи за детекция на miR. Вариации в екстракцията на РНК, обратната транскрипция и техниките за количествено измерване могат да повлияят на измерванията на miR и съпоставимостта между проучванията.

Липса на функционална валидизация: Въпреки че наблюдавахме асоциации между нивата на miR и клинични параметри, не извършихме функционални проучвания за изясняване на механизмите, чрез които тези miR влияят върху патогенезата на ММ. Функционалната валидизация чрез *invitro* и *invivo* модели би укрепила разбирането на техните роли и терапевтичен потенциал.

Хетерогенност на ММ: ММ е силно хетерогенно заболяване с различни генетични и молекулярни подтипове. Нашето проучване не стратифицира пациентите въз основа на специфични цитогенетични аномалии или молекулярни профили, които могат да влияят на експресионните модели на miR. Бъдещите проучвания трябва да разглеждат такива стратификации за изследване на асоциациите на miR в зависимост от подтиповете.

6.10. Бъдещи направления

Бъдещите изследвания трябва да се фокусират върху:

Валидиране на откритията в по-големи кохорти: Мултицентровите проучвания с по-големи популации на пациенти ще повишат статистическата надеждност и общата приложимост на резултатите.

Дългосрочни проучвания: Разширени периоди на проследяване могат да предоставят прозрения за дългосрочната прогностична стойност на тези miR и техния потенциал за предсказване на рецидив или резистентност към терапията.

Функционални проучвания: Изследване на молекулните механизми, чрез които тези miR влияят върху патогенезата на ММ, е от съществено значение. **Invitro** и **in vivo** проучвания могат да изяснят техните таргети, участващи сигнали и взаимодействия с други молекулярни фактори.

Интеграция с други биомаркери: Комбиниране на профилирането на miR с други молекулярни маркери, като генетични мутации, епигенетични промени и протеин биомаркери, може да подобри диагностичните и прогностичните модели, водейки до персонализирани подходи в медицината.

Развитие на терапии, базирани на miR: Предклиничните проучвания, оценяващи ефективността, безопасността и методите за приложение на miR миметици или инхибитори в модели на ММ, са необходими. Клиничните изпитвания по-късно могат да оценят техния терапевтичен потенциал при пациентите.

6.11. Заключение

В заключение нашето проучване допринася за нарастващия брой доказателства, подкрепящи ролята на циркулиращите miR като биомаркери при ММ. Значителното понижение на miR-126-5p и miR-199a-5p при пациентите с ММ, заедно с техния потенциал като диагностични маркери и индикатори за отговор към лечението, подчертава тяхната клинична значимост. Нормализирането на нивата на miR-126-5p след

ефективна терапия затвърждава потенциала му като биомаркер за мониториране на терапевтичната ефективност.

Асоциацията на повишените нива на miR-214-3p и miR-497-5p с по-неблагоприятен изход загатва за тяхната утилизация в прогнозата и рисковата стратификация. Тези miR могат да помогнат в идентифицирането на пациентите с по-висок риск от прогресия на заболяването, които могат да се възползват от по-агресивни или алтернативни терапевтични стратегии.

Нашите резултати засилват вече доказаното в световната литература значение на miR в патогенезата на ММ и техния потенциал като цели за терапевтична интервенция. Необходими са допълнителни изследвания за валидиране на тези открития, изясняване на основните механизми и изследване на разработването на терапии, базирани на miR, за подобряване на управлението на ММ и изхода за пациентите.

6.12. Изводи

1. Установяват се значително по-високи стойности на miR-126, miR-199a при пациенти с множествен миелом в сравнение със здрави контроли.
2. Доказа се сигнификантна обратнопропорционална връзка между нивата на miR-126-5p и miR-199a с бета-2 микроглобулин.
3. Установи се и умерена положителна зависимост между експресионните нива на miR-199a-5p и хемоглобин.
4. Регистрираха се значимо по-високи стойности на miR-126-5p при пациентите в (CR+VGPR) след проведено лечение, сравнено с нелекувани, резултат, който се доближава до стойностите на контролната група.
5. MiR-126-5p и miR-199a-5p демонстрират сигнификантни характеристики като диагностични биомаркери от проведени ROC анализи.
6. Високите нива на miR-214-3p и miR-497-5p са свързани с повишен риск от прогресия на заболяването и ранна смърт.

7. Приноси

7.1. Приноси с оригинален характер

1. За първи път е проведено изследване на плазмените нива на miR-126-5p, miR-199a-55, miR-214-3p, miR-497-5p и miR-373-3p при голяма група пациенти с рядка хематологична неоплазия като ММ.
2. За първи път се изследва връзката на miR-126-5p, miR-199a-55, miR-214-3p, miR-497-5p и miR-373-3p с редица клинично-лабораторни и молекулярно генетични фактори при новодиагностицирани пациенти с множествен миелом.
3. За първи път е изследвана динамиката в серумните нива на miR-126-5p, miR-199a-55, miR-214-3p, miR-497-5p и miR-373-3p в хода на терапевтичния процес и е анализирана зависимостта им от отговора към терапията.
4. За първи път в България е изследвана диагностичната роля на miR-126-5p, miR-199a-55, miR-214-3p, miR-497-5p и miR-373-3p при пациенти с ММ.
5. За първи път в България е оценена предиктивната роля на miR-126-5p, miR-199a-55, miR-214-3p, miR-497-5p и miR-373-3p за прогресия на заболяването и ранна смърт при пациенти с ММ.

7.2. Приноси с приложна научна стойност

1. MiR-126-5p, miR-199a-55, miR-214-3p, miR-497-5p и miR-373-3p биха могли да се внедрят в диагностичния алгоритъм и рисковата стратификация на новодиагностицираните пациенти с ММ.
2. MiR-126-5p, miR-199a-55, miR-214-3p, miR-497-5p и miR-373-3p биха могли да се използват за оценка на стадия и прогресията на ММ.
3. MiR-126-5p, miR-199a-55, miR-214-3p, miR-497-5p и miR-373-3p биха могли да се утилизират като допълнителни параметри за оценка отговора на NDMM пациентите към приложената терапия.
4. Резултатите от настоящия дисертационен труд могат да послужат като отправна точка за разработване на нови таргетни медикаменти.

8. Научни публикации по темата

1. БИОМАРКЕРИ И ПЕРСОНАЛИЗИРАН ПОДХОД ПРИ ДИАГНОСТИКАТА И ЛЕЧЕНИЕТО НА МНОЖЕСТВЕНИЯ МИЕЛОМ Герчева Л. и Луканов Р ISSN 23677864 Hematology (Bulgaria) Volume 56, Issue 1, Pages 18 – 25 2020
2. CONVENTIONAL CYTOGENETIC ANALYSIS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA – SINGLE CENTER STUDY Author(s): Radi Lukanov, Stela Dimitrova, Valentina Miteva, Ilina Micheva EHA Library. Lukanov R. 06/09/21; 324359; PB1686
3. MiR-199 and miR-126 as potential biomarkers for newly diagnosed patients with multiple myeloma: Lukanov Radi, Chervenkov Trifon, Grudeva-Popova Zhanet, Micheva Ilina and Teneva Maria; American Journal of Hematology Volume 99, Issue S2 Supplement: Abstracts from the 2024 Lymphoma Leukemia and Myeloma Congress October 16-19, 2024 <https://doi.org/10.1002/ajh.27491>