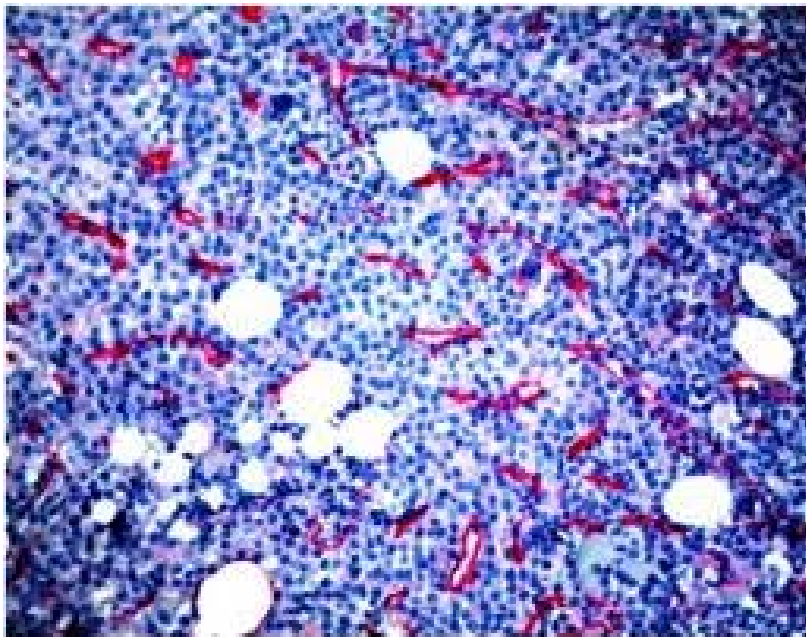


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΣΙΡΑΚΗΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ CD105, CD40-LIGAND
ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ
ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥ ΜΥΕΛΩΜΑΤΟΣ**



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΣΙΡΑΚΗΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ CD105, CD40-LIGAND
ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ
ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥ ΜΥΕΛΩΜΑΤΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΣΙΡΑΚΗΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ CD105, CD40-LIGAND
ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ
ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥ ΜΥΕΛΩΜΑΤΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

Επιβλέπων:

Μ. Αλεξανδράκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Αιματολογίας

Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

Α. Τόσκα, Καθηγήτρια Δερματολογίας

Ε. Σταθόπουλος, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αιματολογίας Μιχαήλ Γ. Αλεξανδράκη, για τη μεγάλη υποστήριξη του τόσο κατά τη διάρκεια της ειδικότητας, όσο και μετά, στην εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής αλλά και στη γενικότερη αντιμετώπιση. Επιπλέον, τον ευχαριστώ γιατί με έκανε να βλέπω τα πράγματα λίγο διαφορετικά. Μαζί ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητές κυρία Τόσκα και κύριο Σταθόπουλο για την επίβλεψη και την ουσιαστική τους υποστήριξη, όπως επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής για το χρόνο που αφιέρωσαν στην αξιολόγηση αυτής της δουλειάς.

Επίσης, ευχαριστώ όλους αυτούς που με την πολύ ουσιαστική βοήθειά τους, συνεισέφεραν στην ολοκλήρωση της παρούσας Διατριβής. Αρχικά, ευχαριστώ τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής Ευστάθιο Σταθόπουλο για τη σημαντικότερη βοήθειά του στην κατανόηση και ακολούθως αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών δεδομένων. Για τον ίδιο λόγο ευχαριστώ τους παθολογοανατόμους Βίκτωρα Χανιώτη και Αθηνά Ξεγάλου και τις τεχνολόγους Μαρία Κλινάκη και Γεωργία Φιλιτάκη. Οφείλω επίσης ευχαριστίες στην Αιματολόγο Αικατερίνη Σφιριδάκη, για τη σημαντική βοήθεια που προσέφερε στη μέτρηση των υπό μελέτη μορίων, καθώς και στον Αθανάσιο Αλεγκάκη για τη συνεισφορά του στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Επιπλέον, ευχαριστώ, μη ειδικά, όλους τους γιατρούς των Αιματολογικών Κλινικών του Πανεπιστημιακού και Βενιζελείου Νοσοκομείου Ηρακλείου και Γενικού Νοσοκομείου Χανίων για τη βοήθεια στη συλλογή υλικών και δεδομένων και για την υποστήριξη τους σε κάθε άλλο στάδιο. Και σε αυτό το πλαίσιο, ευχαριστώ ιδιαίτερα όλους αυτούς που δέχτηκαν να μελετηθούν.

Τέλος, είμαι ευγνώμων σε όλους αυτούς που με υποστηρίζουν συνεχώς.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα: Γεώργιος Τσιράκης

Ημερομηνία γέννησης: 13/10/1972

Τόπος γέννησης: Χανιά

Διεύθυνση κατοικίας: Μ. Ησυχάκη 9, Χανιά

Τηλέφωνο: 2821073271, 6986381568

E-mail: georgetsirakis@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ-ΤΙΤΛΟΙ

12^{ος}/1997: Πτυχίο Ιατρικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, βαθμός «Λίαν Καλώς»

7^{ος}/2007: Λήψη Ιατρικού Τίτλου Ειδικότητας Αιματολογίας

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ

2^{ος}-5^{ος}/1998: Τρίμηνη υποχρεωτική εκπαίδευση προ της υπηρεσίας υπαίθρου, Βενιζέλειο Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτη

5^{ος}/1998-5^{ος}/1999: Υπηρεσία υπαίθρου στη Μονάδα Τεχνητού Νεφρού, Βενιζέλειο Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτη (Διευθυντής: κος Παπαχριστοφόρου)

5^{ος}/1999-11^{ος}/2000: Στρατιωτική θητεία ως οπλίτης ιατρός

2^{ος}/2001-11^{ος}/2002: Ειδικευόμενος Παθολογίας, Α΄ Παθολογική Κλινική, Βενιζέλειο Νοσοκομείο Ηράκλειο, Κρήτη (Διευθυντής: κος Κορτσιδάκης)

11^{ος}/2002-3^{ος}/2003: Υπεράριθμος ιατρός στη Μονάδα Διάγνωσης και Θεραπείας Μεσογειακής Αναιμίας, Βενιζέλειο Νοσοκομείο Ηράκλειο, Κρήτη (Υπεύθυνος: κος Παπαδάκης)

4^{ος}/2003-4^{ος}/2007: Ειδικευόμενος Αιματολογίας, Πανεπιστημιακή Αιματολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτη (Διευθυντής: κος Σαμώνης)

4^{ος}/2007-10^{ος}/2007: Επιστημονικός συνεργάτης, Πανεπιστημιακή Αιματολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτη (Διευθυντής: κος Σαμώνης)

10^{ος}/2007-σήμερα: Επικουρικός Επιμελητής Β΄, Αιματολογική Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο Χανίων, Κρήτη (Διευθύντρια: Κα Μαρκίδου)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

- 1: **Tsirakis G**, Pappa CA, Spanoudakis M, Chochlakis D, Alegakis A, Psarakis FE, Stratinaki M, Stathopoulos EN, Alexandrakis MG. Clinical significance of sCD105 in angiogenesis and disease activity in multiple myeloma. *Eur J Intern Med.* 2012;23:368-73.
- 2: Alexandrakis MG, **Tsirakis G**. Anemia in heart failure patients. *ISRN Hematol.* 2012;2012:246915.
- 3: Fragioudaki M, Boula A, **Tsirakis G**, Psarakis F, Spanoudakis M, Papadakis IS, Pappa CA, Alexandrakis MG. B cell-activating factor: its clinical significance in multiple myeloma patients. *Ann Hematol.* 2012 Apr 21. [Epub ahead of print]
- 4: Fragioudaki M, **Tsirakis G**, Pappa CA, Aristeidou I, Tsioutis C, Alegakis A, Kyriakou DS, Stathopoulos EN, Alexandrakis MG. Serum BAFF levels are related to angiogenesis and prognosis in patients with multiple myeloma. *Leuk Res.* 2012;36:1004-8.
- 5: **Tsirakis G**, Pappa CA, Psarakis FE, Fragioudaki M, Tsioutis C, Stavroulaki E, Boula A, Alexandrakis MG. Serum concentrations and clinical significance of soluble CD40 ligand in patients with multiple myeloma. *Med Oncol.* 2012 Mar 9. [Epub ahead of print].
- 6: **Tsirakis G**, Kanellou P, Kaparou M, Passam A, Zampoulaki A, Stylianou K, Alexandrakis MG. Coexistence of plasma cell dyscrasia with prefibrotic stage of primary myelofibrosis: a case report. *ISRN Hematol.* 2011;2011:404057.
- 7: **Tsirakis G**, Pappa CA, Kaparou M, Katsomitrou V, Hatzivasili A, Alegakis T, Xekalou A, Stathopoulos EN, Alexandrakis MG. Assessment of proliferating cell nuclear antigen and its relationship with proinflammatory cytokines and parameters of disease activity in multiple myeloma patients. *Eur J Histochem.* 2011;55(3):e21.

8: Sfiridaki K, Pappa CA, **Tsirakis G**, Kanellou P, Kaparou M, Stratinaki M, Sakellaris G, Kontakis G, Alexandrakis MG. Angiogenesis-related cytokines, RANKL, and osteoprotegerin in multiple myeloma patients in relation to clinical features and response to treatment. *Mediators Inflamm.* 2011;2011:867576.

9: Pappa CA, **Tsirakis G**, Kanellou P, Kaparou M, Stratinaki M, Xekalou A, Alegakis A, Boula A, Stathopoulos EN, Alexandrakis MG. Monitoring serum levels ELR+ CXC chemokines and the relationship between microvessel density and angiogenic growth factors in multiple myeloma. *Cytokine.* 2011;56:616-620.

10: **Tsirakis G**, Pappa CA, Kanellou P, Stratinaki MA, Xekalou A, Psarakis FE, Sakellaris G, Alegakis A, Stathopoulos EN, Alexandrakis MG. Role of platelet-derived growth factor-AB in tumour growth and angiogenesis in relation with other angiogenic cytokines in multiple myeloma. *Hematol Oncol.* 2011 Sep 14. doi: 10.1002/hon.1014.

11: Sfiridaki A, Miyakis S, Pappa C, **Tsirakis G**, Alegakis A, Kotsis V, Stathopoulos E, Alexandrakis M. Circulating osteopontin: a dual marker of bone destruction and angiogenesis in patients with multiple myeloma. *J Hematol Oncol.* 2011;4:22.

12: Stylianou K, **Tsirakis G**, Mantadakis E, Xylouri I, Foudoulakis A, Vardaki E, Katsipi I, Daphnis E, Samonis G. Refractory thrombotic thrombocytopenic purpura associated with oral contraceptives and factor V Leiden: a case report. *Cases J.* 2009;2:6611.

13: Passam FH, Alexandrakis MG, Kafousi M, Fotinou M, Darivianaki K, **Tsirakis G**, Roussou PA, Stathopoulos EN, Siafakas NM. Histological expression of angiogenic factors: VEGF, PDGFRalpha, and HIF-1alpha in Hodgkin lymphoma. *Pathol Res Pract.* 2009;205:11-20.

14: Neonakis IK, Alexandrakis MG, Gitti Z, **Tsirakis G**, Krambovitis E, Spandidos DA. Miliary tuberculosis with no pulmonary involvement in myelodysplastic syndromes: a curable, yet rarely diagnosed, disease: case report and review of the literature. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2008;7:8.

- 15: Pappa C, Miyakis S, **Tsirakis G**, Sfiridaki A, Alegakis A, Kafousi M, Stathopoulos EN, Alexandrakis MG. Serum levels of interleukin-15 and interleukin-10 and their correlation with proliferating cell nuclear antigen in multiple myeloma. *Cytokine*. 2007;37:171-175.
- 16: Mantadakis E, Boula AM, **Girakis G**, Xilouri IM, Foudoulakis AM, Samonis G. Transient loss of the Y-chromosome in an elderly man with anemia and lead poisoning: chance occurrence or a clonal marker of the underlying hematological abnormality? *Haematologica*. 2006 Aug;91(8 Suppl):ECR37.
- 17: Sfiridaki A, Miyakis S, **Tsirakis G**, Alegakis A, Passam AM, Kandidaki E, Margioris AN, Alexandrakis MG. Systemic levels of interleukin-6 and matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple myeloma may be useful as prognostic indexes of bone disease. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43:934-938.
- 18: Alexandrakis MG, Passam FH, Pappa CA, Damilakis J, **Tsirakis G**, Kandidaki E, Passam AM, Stathopoulos EN, Kyriakou DS. Serum evaluation of angiogenic cytokine basic fibroblast growth factor, hepatocyte growth factor and TNF-alpha in patients with myelodysplastic syndromes: correlation with bone marrow microvascular density. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2005;18:287-295.
- 19: Boula AM, Bizakis JG, **Tsirakis GE**, Chimona TS, Stathopoulos EN, Alexandrakis MG. Kikuchi's disease: a benign cause of fever and cervical lymphadenopathy. *Eur J Intern Med*. 2005;16:356-358.
- 20: Alexandrakis MG, Passam FH, Kyriakou DS, Dambaki C, Katrinakis G, **Tsirakis G**, Konsolas J, Stathopoulos EN. Expression of the proliferation-associated nuclear protein MIB-1 and its relationship with microvascular density in bone marrow biopsies of patients with myelodysplastic syndromes. *J Mol Histol*. 2004;35:857-863.
- 21: Passam FH, **Tsirakis G**, Boula A, Fragou A, Consolas I, Alegakis A, Kyriakou DS, Alexandrakis MG. Levels of soluble forms of ICAM and VCAM in patients with

myelodysplastic syndromes and their prognostic significance. Clin Lab Haematol.2004;26:391-395.

22: Alexandrakis MG, Passam FH, Pappa CA, Sfiridaki K, **Tsirakis G**, Damilakis J, Stathopoulos EN, Kyriakou DS. Relation between bone marrow angiogenesis and serum levels of angiogenin in patients with myelodysplastic syndromes. Leuk Res. 2005;29:41-46.

23: Alexandrakis MG, Passam FH, Sfiridaki A, Pappa CA, Moschandrea JA, Kandidakis E, **Tsirakis G**, Kyriakou DS. Serum levels of leptin in multiple myeloma patients and its relation to angiogenic and inflammatory cytokines. Int J Biol Markers.2004;19:52-57.

ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Μ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗΣ, Φ. ΠΑΣΣΑΜ, Κ. ΝΤΑΜΠΙΑΚΗ, Ε. ΚΑΝΤΙΔΑΚΗ, Γ. ΤΣΙΡΑΚΗΣ, Δ. ΚΥΡΙΑΚΟΥ, Ε.Ν. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ. Έκφραση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) στο μυελό ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα και η σχέση του με την νεοαγγείωση και άλλους δείκτες δραστηριότητας της νόσου. **14ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. 13-16 Νοεμβρίου 2003, Αλεξανδρούπολη.**
2. Φ. ΠΑΣΣΑΜ, Μ. ΚΑΦΟΥΣΗ, Γ. ΤΣΙΡΑΚΗΣ, Π. ΡΟΥΣΟΥ, Μ. ΦΩΤΕΙΝΟΥ, Δ. ΚΥΡΙΑΚΟΥ, Μ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗΣ, Ε. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ. Ιστολογική έκφραση ρυθμιστών της αγγειογένεσης στο Hodgkin λέμφωμα. **18ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. 14-17 Νοεμβρίου 2007, Θεσσαλονίκη.**
3. Γ. ΤΣΙΡΑΚΗΣ, Κ. ΣΦΙΡΙΔΑΚΗ, Κ. ΠΑΠΠΑ, Ρ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ, Ε. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ, Δ. ΚΥΡΙΑΚΟΥ, Μ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗΣ. Τα επίπεδα του υποδοχέα της Ιντερλευκίνης-6 και της Ιντερλευκίνης-1β στον ορό ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα σχετίζονται με το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού PCNA. **18ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. 14-17 Νοεμβρίου 2007, Θεσσαλονίκη.**
4. Μ. ΦΡΑΓΚΙΟΥΔΑΚΗ, Π. ΚΑΝΕΛΛΟΥ, Γ. ΤΣΙΡΑΚΗΣ, Μ. ΚΑΠΑΡΟΥ, Α. ΑΛΕΓΚΑΚΗΣ, Α. ΣΦΥΡΙΔΑΚΗ, Β. ΧΑΝΙΩΤΗΣ, Ε. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ, Μ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗΣ. Κλινική και προγνωστική σημασία των αυξημένων επιπέδων του BAFF/BLyS στον ορό σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα. **20ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 4 - 7 Νοεμβρίου 2009. Χερσόνησος Ηράκλειο Κρήτης.**
5. Γ. ΤΣΙΡΑΚΗΣ, Φ. ΠΑΣΣΑΜ, Μ. ΚΑΠΑΡΟΥ, Π. ΚΑΝΕΛΛΟΥ, Α. ΣΦΥΡΙΔΑΚΗ, Α. ΧΑΤΖΗΒΑΣΙΛΗ, Ε. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ, Μ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗΣ. Μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλυτού υποδοχέα του CD40 (CD40L) για την εκτίμηση της πολλαπλασιαστικής και αγγειογενετικής δραστηριότητας του μυελού σε σειρά ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα. **20ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 4 - 7 Νοεμβρίου 2009. Χερσόνησος Ηράκλειο Κρήτης.**
6. Γ. ΤΣΙΡΑΚΗΣ, Α. ΣΦΥΡΙΔΑΚΗ, Α. ΧΑΤΖΗΒΑΣΙΛΗ, Μ. ΚΑΠΑΡΟΥ, Κ. ΠΑΠΠΑ, Φ. ΠΑΣΣΑΜ, Δ. ΚΥΡΙΑΚΟΥ, Μ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗΣ. Τα επίπεδα ενδογλίνης (CD105) στον ορό ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα είναι δείκτης αγγειογένεσης και δραστηριότητας της νόσου. **20ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 4 - 7 Νοεμβρίου 2009. Χερσόνησος Ηράκλειο Κρήτης.**

7. Μ. ΦΡΑΓΚΙΟΥΔΑΚΗ, Γ. ΤΣΙΡΑΚΗΣ, Μ. ΚΑΠΑΡΟΥ, Π. ΚΑΝΕΛΛΟΥ, Κ. ΠΑΠΠΑ, Α. ΑΛΕΓΚΑΚΗΣ, Φ. ΠΑΣΣΑΜ, Μ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗΣ. Τα αυξημένα επίπεδα του BAFF/BLYS στον ορό ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα σχετίζονται με δείκτες εξέλιξης της νόσου. **20ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 4 - 7 Νοεμβρίου 2009. Χερσόνησος Ηράκλειο Κρήτης.**

8. Γ. ΤΣΙΡΑΚΗΣ, Α. ΣΦΥΡΙΔΑΚΗ, Φ. ΨΑΡΑΚΗΣ, Π. ΚΑΝΕΛΛΟΥ, Κ. ΠΑΠΠΑ, Φ. ΠΑΣΣΑΜ, Δ. ΚΥΡΙΑΚΟΥ, Μ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗΣ. Τα επίπεδα οστεοποντίνης ορού σχετίζονται με την πρόοδο της νόσου στους ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα. **20ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 4 - 7 Νοεμβρίου 2009. Χερσόνησος Ηράκλειο Κρήτης.**

ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. PAPADOGIANNAKIS, G. TSIRAKIS, A. DERMITZAKIS, K. BALALIS, E. BIZAS, K. PAPACHRISTOFOROU. Effect of lisinopril on erythropoietic response in patients undergoing chronic hemodialysis. **XXXVIth EDTA-European Nephrology Association Congress, 1999, Madrid, Spain.**
2. PAPADOGIANNAKIS, G. TSIRAKIS, A. DERMITZAKIS, K. BALALIS, E. KIDONAKIS, K. PAPACHRISTOFOROU. Effect of venlafaxine on arterial blood pressure in patients undergoing hemodialysis. **XXXVIth EDTA-European Nephrology Association Congress, 1999, Madrid, Spain.**
3. FH PASSAM, A. FRAGOU, G. TSIRAKIS, D. DAMBAKI, P. ROUSSOU, CA PAPP, EN STATHOPOULOS, DS KYRIAKOU, MG ALEXANDRAKIS. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in myelodysplastic syndromes and its prognostic significance. **9th Congress of the European Haematology Association. June, 2004, Geneva, Switzerland.**
4. M. ALEXANDRAKIS, A. SFIRIDAKI, G. TSIRAKIS, F. PASSAM, C. PAPP, A. PASSAM M ALEXANDRAKIS. Circulating metalloproteinase-9 in patients with multiple myeloma is a marker of bone disease. **10th Congress of the European Haematology Association. June 2-5, 2005. Stockholm, Sweden.**
5. M.G. ALEXANDRAKIS, G. TSIRAKIS, C. PAPP, A. SFIRIDAKI, R. ALEXANDRAKI, M. KAFOUSI, A. ALEGAKIS, E. STATHOPOULOS. Serum Interleukin-17 and its relationship with angiogenic factors in multiple myeloma. **11th Congress of the European Hematology Association. June 15 - 18, 2006, Amsterdam, Netherlands.**
6. F.H. PASSAM, A. SFIRIDAKI, G. TSIRAKIS, J. MOSCHANDREA, P. ROUSSOU, N. SIAFAKAS, M.G. ALEXANDRAKIS. Angiogenic molecules in Hodgkin's disease: Results from sequential serum analysis. **11th Congress of the European Hematology Association. June 15 - 18, 2006, Amsterdam, Netherlands.**
7. F.H. PASSAM, M. KAFOUSI, M. FOTEINOU, G. TSIRAKIS, P. ROUSSOU, D.S. KYRIAKOU, M.G. ALEXANDRAKIS, E. STATHOPOULOS. Expression of angiogenesis related factors in Hodgkin's Lymphoma. **12th Congress of the European Hematology Association. June 7 - 10, 2007, Vienna, Austria.**
8. F.H PASSAM, A. SFIRIDAKI, G. TSIRAKIS, J. MOSCHANDREA, P. ROUSSOU, NM SIAFKAS, MG ALEXANDRAKIS. Angiogenic molecules in Hodgkin's disease: results from sequential serum analysis. **12th Congress of the European Hematology Association. June 7 - 10, 2007, Vienna, Austria.**
9. G. TSIRAKIS, A. SFIRIDAKI, C. PAPP, R. ALEXANDRAKI, E. STAYFOULAKI, F.H. PASSAM, E. STATHOPOULOS, D.S. KYRIAKOU, MG. ALEXANDRAKIS. Elevated serum concentrations of interleukin-6 receptor and interleukin-1 β correlates with PCNA proliferative index in multiple myeloma. **12th Congress of the European Hematology Association. June 7 - 10, 2007, Vienna, Austria.**
10. G. TSIRAKIS, M. FRAGIOUDAKI, M. KAPAROU, A. HATZIVASSILI, K. SFIRIDAKI, C. PAPP, D. KYRIAKOU, M. ALEXANDRAKIS. Clinical and prognostic significance of elevated serum BAFF levels in multiple myeloma. **15th Congress of the European Hematology Association. June 10 - 13, 2010, Barcelona, Spain.**

11. **G. TSIRAKIS**, M. FRAGIOUDAKI, P. KANELLOU, D. LIAPI, M. STRATINAKI, A. HATZIVASSILI, K. SFIRIDAKI, M. ALEXANDRAKIS. CD40 ligand levels in the serum of patients with multiple myeloma constitute a marker of bone marrow proliferative activity. **15th Congress of the European Hematology Association. June 10 - 13, 2010, Barcelona, Spain.**
12. V. VIOLAKI, **G. TSIRAKIS**, A. KOLOVOU, M. FAMELI, A. PAPANIKOLAOU, L. MARINOS, T. PAPADAKI, F. MARKIDOU. Treatment of splenic marginal zone non Hodgkin lymphoma (SMZL). **15th Congress of the European Hematology Association. June 10 - 13, 2010, Barcelona, Spain.**
13. **G. TSIRAKIS**, K. SFIRIDAKI, C. PAPPA, M. KAPAROU, M. STRATINAKI, A. XEKALOU, F. PSARAKIS, E. STATHOPOULOS, M. ALEXANDRAKIS. Role of the platelet growth factor-AB in tu,or growth and angiogenesis in relation with other angiogenic cytokines in multiple myeloma. **16th Congress of the European Hematology Association. June 9 - 12, 2011, London, UK.**
14. **G. TSIRAKIS**, C. PAPPA, M. KAPAROU, V. KATSOMITROU, A. HATZIVASSILI, A. ALEGAKIS, A. XEKALOU, E. STATHOPOULOS, M. ALEXANDRAKIS. The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and its relationship with proinflammatory cytokines and parameters of disease activity in multiple myeloma patients. **16th Congress of the European Hematology Association. June 9 - 12, 2011, London, UK.**
15. C. PAPPA, **G. TSIRAKIS**, A. BOULA, P. KANELLOU, M. KAPAROU, A. XEKALOU, E. STATHOPOULOS, D. KYRIAKOU, M. ALEXANDRAKIS. Monitoring serum levels ELR⁺ CXC chemokines and relationship between microvessel density and angiogenic growth factors in multiple myeloma. **16th Congress of the European Hematology Association. June 9 - 12, 2011, London, UK.**
16. **G. TSIRAKIS**, M. FRAGIOUDAKI, A. BOULA, M. SPANOUDAKIS, M. KAPAROU, P. KANELLOU, I. PAPADAKIS, A. ALEGAKIS, C. PAPPA, M. ALEXANDRAKIS. Relationship between circulating BAFF levels with proliferation markers in patients with multiple myeloma. **17th Congress of the European Hematology Association. June 14-17, 2012, Amsterdam, Netherlands**
17. **G. TSIRAKIS**, A. BOULA, C. PAPPA, I. PAPADAKIS, P. SAMIOTAKIS, M. TSIGARIDAKI, D. STAFYLAKI, K. SFYRIDAKI, MG ALEXANDRAKIS. Increased serum levels of MIP-1 alpha correlate with bone disease and angiogenic cytokines in multiple myeloma patients. . **17th Congress of the European Hematology Association. June 14-17, 2012, Amsterdam, Netherlands**

Περίληψη

Υπάρχοντα δεδομένα: Το πολλαπλό μυέλωμα είναι ανίατη κακοήθης νόσος των πλασματοκυττάρων, που αναπτύσσεται στο χώρο του μυελού των οστών. Τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα, προκειμένου να εγκατασταθούν και στη συνέχεια να επεκταθούν, αλληλεπιδρούν με τα στοιχεία του μυελικού μικροπεριβάλλοντος, το οποίο και τροποποιούν. Ένα στοιχείο, εξαρτώμενο από αυτές τις αλληλεπιδράσεις, είναι η διαδικασία της αγγειογένεσης, δηλαδή της δημιουργίας νέων αγγείων από τα προϋπάρχοντα, που εμπλέκεται στην ανάπτυξη του όγκου. Υπάρχουν ήδη αρκετές πληροφορίες για τη διαδικασία της αγγειογένεσης, τόσο στο πολλαπλό μυέλωμα όσο και σε άλλες κακοήθειες, που μπορούν να δημιουργήσουν μοντέλα θεραπευτικών παρεμβάσεων. Ήδη χρησιμοποιούνται θεραπευτικά σχήματα με στόχο, μεταξύ των άλλων, και την αγγειογένεση, που ειδικά στο πολλαπλό μυέλωμα έχουν σημαντική αποτελεσματικότητα. Παρολαυτά, η νόσος παραμένει ανίατη και συνεπώς χρειάζεται περισσότερη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στη βιολογία της εξέλιξης του πολλαπλού μυελώματος.

Σκοπός της μελέτης: Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να μελετήσει το ρόλο διαφόρων αγγειογενετικών μορίων στο πολλαπλό μυέλωμα. Μετρήθηκε η περιφερική έκφραση διαφόρων μορίων με δυνητική αγγειογενετική δράση και εξετάστηκε η σχέση αυτής της έκφρασης, τόσο με την αγγειογενετική δραστηριότητα του μυελού, όσο και με την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κακοηθών πλασματοκυττάρων και το φορτίο της νόσου.

Υλικά και μέθοδοι: Μελετήθηκαν 65 ασθενείς κατά τη διάγνωση του μυελώματος, καθώς και 40 από αυτούς, που μπήκαν σε ύφεση μετά από θεραπεία. Επίσης μελετήθηκαν 25 άτομα με MGUS και 30 μάρτυρες. Η μελέτη έγινε σε 4 ανεξάρτητα στάδια Στο πρώτο στάδιο μετρήθηκαν τα επίπεδα στον ορό του αγγειογενετικού δείκτη **CD105**, σε συνδυασμό με του συνδέτη του, TGF-β1, την εκτίμηση της αγγειογενετικής δραστηριότητας του μυελού, με άμεση μέτρηση της μικροαγγειακής πυκνότητας, και την εκτίμηση της δραστηριότητας νόσου, με μέτρηση των επιπέδων IL-6 στον ορό και της μυελικής έκφρασης του Ki-67 PI. Στο δεύτερο στάδιο μετρήθηκε στον ορό ο δείκτης **CD40L**, σε συνδυασμό με τους γνωστούς αγγειογενετικούς παράγοντες, HGF και VEGF, και με εκτίμηση της δραστηριότητας της νόσου, με μέτρηση επιπέδων IL-6 στον ορό, της πλασματοκυτταρικής διήθησης και της έκφρασης του Ki-67 PI στο μυελό. Στο τρίτο στάδιο μετρήθηκαν τα επίπεδα ορού του αγγειογενετικού δείκτη **PDGF-AB**, σε συνδυασμό με την μικροαγγειακή

πυκνότητα του μυελού, και τα επίπεδα ορού ANG, bFGF, IL-6, LDH και B2M. Στο τέταρτο στάδιο εκτιμήθηκαν στον ορό οι δείκτες δραστηριότητας νόσου MIP-1α, IL-1β, LDH και οι έμμεσοι αγγειογενετικοί IL-8 και IL-6, σε συνδυασμό με το μυελικό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού PCNA. Η μέτρηση των κυτταροκινών στον ορό έγινε με ELISA, ενώ η έκφραση των Ki-67, PCNA και η MVD στο μυελό εκτιμήθηκαν ανοσοϊστοχημικά.

Αποτελέσματα: Τα επίπεδα των sCD105, sCD40L, PDGF-AB, IL-6, IL-8, IL1β και MIP-1α, καθώς και η MVD και η έκφραση των Ki-67 PI και PCNA, ήταν αυξημένα στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες, και έβαιναν παράλληλα με την πρόοδο του σταδίου της νόσου. Επίσης τα επίπεδα αυτά έπεφταν σημαντικά μετά από αποτελεσματική θεραπεία. Το sCD105 συσχετίστηκε με την MVD, την IL-6 και την έκφραση του Ki-67PI. Το sCD40L συσχετίστηκε με τους HGF, VEGF, IL-6 και την έκφραση του Ki-67PI. Ο PDGF-AB συσχετίστηκε με τους b-FGF, ANG, IL-6, B2M και MVD. Τέλος, η έκφραση του PCNA συσχετίστηκε με τις μετρούμενες κυτταροκίνες. Επιπλέον η IL-6 συσχετίστηκε με τις IL-8, IL-1β και MIP-1α, οι IL-8 και η MIP-1α με τις B2M και LDH, ενώ οι τιμές των B2M και IL-1β αποτέλεσαν ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες.

Συμπεράσματα: Τα επίπεδα στον ορό των sCD105, sCD40L και PDGF-AB είναι αυξημένα στους ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα και σχετίζονται τόσο με το φορτίο της νόσου (στάδιο, κυτταροκίνες, ανταπόκριση στη θεραπεία) και την πολλαπλασιαστική δυναμική των πλασματοκυττάρων (έκφραση Ki-67 και PCNA) όσο και με την αγγειογενετική διαδικασία (μικροαγγειακή πυκνότητα, αγγειογενετικές κυτταροκίνες). Η συσχέτιση λοιπόν των αγγειογενετικών μηχανισμών με τους δείκτες δραστηριότητας της νόσου συνηγορεί στη σημαντική συμμετοχή της αγγειογένεσης στους σύνθετους μηχανισμούς που προκαλεί η μυελωματική νόσος στο μυελικό μικροπεριβάλλον. Η διαπίστωση αυτή θα μπορούσε να φανεί χρήσιμη, τόσο ως προς τη χρήση αυτών των κυτταροκινών για προγνωστικούς λόγους, όσο και για τη δημιουργία θεραπευτικών μοντέλων.

Abstract

Background: Multiple myeloma is an incurable malignancy of plasma cells, developed at the bone marrow. In order to settle and then expand, myeloma plasma cells interact with the elements of the bone microenvironment, which is being transformed. Angiogenesis, ie the formation of new blood vessels from the pre-existing ones, being involved in tumor development, is dependent on these interactions. There is already enough information on the process of angiogenesis, in multiple myeloma as well as in other malignancies, that has created models of therapeutic interventions. Already used regimens, based on angiogenesis among others, have shown significant efficacy, especially in myeloma tumors. Nevertheless, the disease remains incurable and therefore the comprehension of the involved mechanisms in the biology of myeloma progression is necessary.

Aim: The aim of the current study was to examine the role of various angiogenic molecules in progression of multiple myeloma. In order to achieve this, the peripheral expression of various molecules with potential angiogenic activity was measured. Furthermore, the relationship of this expression, with the angiogenic activity of bone marrow, the proliferative activity of malignant plasma cells and the burden of disease, was also examined.

Material & Methods: We studied 65 myeloma patients in diagnosis, and 40 of them who responded to treatment. We also studied 25 persons with MGUS and 30 controls. The study was performed in 4 independent stages. In the first stage, we measured serum levels of the angiogenic marker sCD105, together with its ligand TGF- β 1 and bone marrow angiogenic activity, estimated by microvascular density (MVD) and disease activity, estimated by serum levels of IL-6 and bone marrow expression of Ki-67 PI. In the second stage we measured serum levels of sCD40L, in combination with known angiogenic factors, HGF and VEGF, and markers of disease activity, (by measuring serum levels of IL-6 and bone marrow plasma cell infiltration and expression of Ki-67 PI). In the third stage, we measured serum levels of the angiogenic marker PDGF-AB, together with bone marrow MVD and serum levels of ANG, bFGF, IL-6, LDH and B2M. In the fourth stage, we assessed serum levels of disease activity indices MIP- α , IL-1 β , LDH and indirect angiogenic molecules IL-8 and IL-6, in combination with bone marrow proliferation marker PCNA. The measurement of cytokines in serum was performed by ELISA method, whereas the

expressions of Ki-67, PCNA and MVD in the bone marrow were evaluated immunohistochemically.

Results: Serum levels of sCD105, sCD40L, PDGF-AB, IL-6, IL-8, IL-1 β and MIP-1 α , as well MVD and bone marrow expression of Ki-67 PI and PCNA, were increased in patients compared to controls, and were in parallel with progress of the disease stage. Furthermore, their values decreased significantly after effective treatment. sCD105 correlated with MVD, IL-6 and the expression of Ki-67PI, sCD40L correlated with HGF, VEGF, IL-6 and expression of Ki-67PI and PDGF-AB correlated with b-FGF, ANG, IL-6, B2M and MVD. Finally, expression of PCNA correlated with the measured cytokines. Moreover, IL-6 correlated with IL-8, IL-1 β and MIP-1 α , IL-8 and MIP-1 α with B2M and LDH, while the values of B2M and IL-1 β were found to independent prognostic indices.

Conclusions: Serum levels of sCD105, sCD40L and PDGF-AB are elevated in patients with multiple myeloma and associated with the burden of disease (stage, cytokines, response to treatment), the proliferative potential of plasma cells (Ki-67 expression and PCNA) and the angiogenic process (microvessel density, angiogenic cytokines). Therefore, the correlation of those angiogenic mediators with indices of disease activity, suggests the significant contribution of angiogenesis in the complex mechanisms induced by myeloma cell disease in the bone microenvironment. This notion could be useful, since the studied cytokines could be useful both for prognostic purposes and for designing models for new therapeutic interventions.

Περιεχόμενα

<i>Ευχαριστίες</i>	7
<i>Βιογραφικό</i>	9
<i>Περίληψη</i>	19
<i>Abstract</i>	21
<i>Περιεχόμενα</i>	23
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	26
1. Εισαγωγή	30
2. Στάδια ΠΜ	32
3. Επιδημιολογία ΠΜ	33
4. Αιτιολογία ΠΜ	34
Περιβαλλοντικοί παράγοντες	34
Κληρονομική μεταβλητότητα	34
5. Παθογένεια ΠΜ	35
Μυελικό μικροπεριβάλλον	35
Γενετική στο ΠΜ	36
Εγκατάσταση μυελωματικών πλασματοκυττάρων στο μυελό	38
Ανάπτυξη και επιβίωση μυελωματικών πλασματοκυττάρων	39
1. <i>Ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT και MAPK</i>	<i>40</i>
• <i>IGF-1</i>	<i>40</i>
• <i>Ινσουλίνη</i>	<i>41</i>
• <i>HGF (EGF, HGF, FGF)</i>	<i>41</i>
2. <i>Ενεργοποίηση του μονοπατιού JAK/STAT και MAPK</i>	<i>41</i>
• <i>IL-6</i>	<i>41</i>
3. <i>Ενεργοποίηση του μονοπατιού NF-κB</i>	<i>42</i>
Μοντέλα για την παθογένεια του ΠΜ	43
1. <i>Μοντέλο του Hallek και συνεργατών</i>	<i>43</i>
2. <i>Μοντέλο του Bergsagel και συνεργατών</i>	<i>44</i>
3. <i>Μοντέλο του Klein και συνεργατών</i>	<i>45</i>
6. Αγγειογένεση στο ΠΜ	47
Αγγειογενετικοί μεσολαβητές	53
1. <i>VEGF</i>	<i>56</i>
2. <i>HGF</i>	<i>58</i>
3. <i>FGF-2</i>	<i>59</i>
4. <i>MMP</i>	<i>59</i>
Ρυθμιστές της αγγειογένεσης	61
1. <i>HIF</i>	<i>61</i>
2. <i>c-Myc</i>	<i>62</i>

3. Μονοπάτι του NF-κB	62
Η αγγειογένεση ως θεραπευτικός στόχος	64
1. Θαλιδομίδη	64
2. Λεναλιδομίδη	64
3. Bortezomib	64
7. Συμπέρασμα	65
Βιβλιογραφικές αναφορές γενικού μέρους	66
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	73
1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	75
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	77
α. Ασθενείς	77
β. Υλικά	79
γ. Μέθοδοι	80
Μέθοδος ELISA	80
Αρχές της μεθόδου	80
Υπολογισμός της συγκέντρωσης του μορίου με βάση καμπύλη αναφοράς	80
Ανοσοϊστοχημική χρώση ιστολογικών τομών	82
Αρχή της μεθόδου	82
Εκτίμηση της πλασματοκυτταρικής διήθησης	84
Μέτρηση των μικροαγγείων	84
Εκτίμηση του Ki-67 PI	86
Εκτίμηση του PCNA	88
δ. Στατιστική ανάλυση	90
ε. Βιβλιογραφικά δεδομένα για τους υπό εξέταση επαγωγικούς παράγοντες	91
1. sCD105	91
2. sCD40L	93
3. PDGF-AB	94
4. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες	95
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	97
1. sCD105	97
2. sCD40L	102
3. PDGF-AB	107
4. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες	111
4. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	115
1. sCD105	115
2. sCD40L	118

3. PDGF-AB	121
4. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες	123
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	125
<i>Βιβλιογραφικές αναφορές ειδικού μέρους</i>	127
<i>Παράρτημα</i>	134
<i>Πίνακας 1: Διάγνωση του ΠΜ</i>	135
<i>Πίνακας 2: Σταδιοποίηση του ΠΜ</i>	136
<i>Πίνακας 3: Κριτήρια ανταπόκρισης στη θεραπεία</i>	137
<i>Ανάτυπα δημοσιευμένων εργασιών</i>	

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

...Og det går så glat. Han får bare en snor i halsbåndet. Så leder jeg ham tre gange rundt huset. Og spiller på mundharpe. Og når de det hører, så må de op af kælderne og ned fra lofterne og ud fra hullerne, – alle de velsignede små skabninger... Vi går ned til båden. Og så følger de efter os. Både de voksne og småpuslingerne deres... Så lægger vi ud fra land. Og jeg vrikker med åren og spiller på mundharpe. Og alle de, som kribled og krabled, de følger og følger os ud på dybets vande. (*Henrik Ibsen: Lille Eyolf, 1894*)

...Και πάει τόσο ωραία. Του δένω ένα λουρί στο κολάρο. Μετά τον οδηγώ τρεις φορές γύρω απ' το σπίτι. Και παίζω το φλάουτο. Και όταν το ακούν, πρέπει να βγουν απ' τα κελάρια, και κάτω απ' τις σκεπές και έξω απ' τις τρύπες, - όλα τα ευλογημένα πλασματάκια... Κατεβαίνουμε προς τη βάρκα. Και μας ακολουθούν. Και τα μεγάλα και τα μικρά ποντικάκια τους... Και τα βγάζουμε από τη στεριά. Και κάνω κουπί και παίζω φλάουτο. Και όλα τους, που έρπουν και σέρνονται, ακολουθούν και μας ακολουθούν στα βαθειά νερά. (*Ερρίκος Ίψεν: Ο μικρός Εγιολφ, 1894*)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το πλασματοκυτταρικό μύελωμα (ΠΜ) είναι ένας κακοήθης όγκος των πλασματοκυττάρων, που κατανέμεται σε πολλαπλές θέσεις του μυελού των οστών. Γι' αυτό παλαιότερα ονομαζόταν πολλαπλό μύελωμα. Αποτελεί το 1% όλων των κακοηθειών και είναι η δεύτερη πιο συχνή αιματολογική κακοήθεια στους ενήλικες, μετά τα μη Hodgkin λεμφώματα. Φαίνεται ότι στις περισσότερες περιπτώσεις αποτελεί την εξέλιξη μιας προνεοπλασματικής κατάστασης, που ονομάζεται μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (monoclonal gammopathy of undetermined significance- MGUS) [1].

Η εξέλιξη από τη σταθερή MGUS στο ενεργό μύελωμα είναι μια σύνθετη διαδικασία, όπου συμμετέχουν πολλές επίκτητες αλλαγές στη συμπεριφορά των πλασματοκυττάρων (αυτοεπάρκεια στα αυξητικά σήματα, ελαττωμένη απόπτωση, απόκτηση επεκτατικών ιδιοτήτων) και αλληλεπιδράσεις τους με το μικροπεριβάλλον του μυελού. Η συμμετοχή του μυελικού μικροπεριβάλλοντος στην ανάπτυξη του όγκου, στην αγγειογένεση, στην οστική νόσο και στην αντοχή στη θεραπεία, έχει ήδη επιβεβαιωθεί και συνίσταται στις αλληλεπιδράσεις του με τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα. Έτσι, τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα ενεργοποιούν τους ανοβλάστες, που με τη σειρά τους παράγουν αυξητικούς παράγοντες, και τα ενδοθηλιακά κύτταρα προκειμένου να αρχίσει η αγγειογενετική απάντηση. Επίσης διεγείρουν ανοσολογικά και φλεγμονώδη κύτταρα και τέλος διαταράσσουν την ισορροπία μεταξύ οστεοβλαστών και οστεοκλαστών, δημιουργώντας τις οστεολύσεις [2]. Μελέτες έκφρασης γονιδίων σε πλασματοκύτταρα έδειξαν ότι ναι μεν υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στα φυσιολογικά και νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα, αλλά όχι ανάμεσα στην MGUS και στο ΠΜ [3]. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι το μυελικό μικροπεριβάλλον είναι αυτό που συμβάλλει περισσότερο στην εξέλιξη της MGUS σε ΠΜ και όχι τόσο οι γενετικές αλλαγές [4].

Αγγειογένεση είναι ο σχηματισμός νέων αγγείων. Στην αγγλική ορολογία διακρίνονται δύο ορισμοί: vasculogenesis είναι η δημιουργία πρωτογενούς αγγειακού πλέγματος από αγγειοβλάστες μεσοδερμικής προέλευσης και παρατηρείται κυρίως στην εμβρυϊκή ζωή [5]. Angiogenesis είναι η δημιουργία νέων αγγείων από προϋπάρχοντα, και παρατηρείται τόσο σε φυσιολογικές (πχ στο σχηματισμό του ωχρού σωματίου) όσο και παθολογικές (πχ σε χρόνιες φλεγμονές, κακοήθειες) συνθήκες [6]. Τα τελευταία χρόνια έχει διαπιστωθεί η συμμετοχή των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων στο σχηματισμό νέων αγγείων στον ενήλικα, καθότι

μπορούν να διαφοροποιηθούν με μηχανισμούς ανάλογους της εμβρυϊκής vasculogenesis. Η ανακάλυψη και η μελέτη τους έχουν οδηγήσει στη διαπίστωση ότι η vasculogenesis και η angiogenesis συμβαίνουν ταυτόχρονα και στην ενήλικη ζωή [7]. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η αγγειογένεση εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ θετικών και αρνητικών αγγειογενετικών μεσολαβητών στο μυελικό μικροπεριβάλλον [8]. Προϋποθέτει τη δραστηριότητα πολλών μορίων (αγγειογενετικοί παράγοντες, πρωτεΐνες εξωκυττάριας ουσίας, υποδοχείς σύνδεσης και πρωτεολυτικά ένζυμα). Η αγγειογένεση στον όγκο σχετίζεται με διαταραχή αυτής της ισορροπίας και εξαρτάται κυρίως από την απελευθέρωση, από τα νεοπλασματικά κύτταρα, ειδικών αυξητικών παραγόντων για τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ικανών να διεγείρουν τα αγγεία του ξενιστή [9]. Κατά την ανάπτυξη του όγκου διακρίνεται η μη-αγγειακή και η αγγειακή φάση. Εφόσον η αγγειακή φάση εξαρτάται από την αγγειογένεση και την απελευθέρωση αγγειογενετικών παραγόντων, τότε η αγγειογενετική ικανότητα του όγκου θα μπορούσε να θεωρηθεί ως έκφραση προόδου της νόσου, της νεοπλασματικής εξαλλαγής και τελικώς της μετάστασης [10].

Ήδη από το 1994 διαπιστώθηκε ότι η αγγειογένεση συμμετέχει στην ανάπτυξη λευχαιμικών και άλλων κακοηθών κυττάρων του αιμοποιητικού ιστού, σε σημείο που να φαίνεται ότι η πρόοδος αρκετών αιματολογικών κακοηθειών σχετίζεται με το βαθμό της αγγειογένεσης. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα (microvascular density- MVD) στο μυελό αυξάνεται με την πρόοδο από MGUS σε μη ενεργό και ακολούθως σε ενεργό ΠΜ και σχετίζεται με το ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων (όπως καθορίζεται από το δείκτη plasma cell labeling index) [11]. Θεωρώντας λοιπόν ότι η MVD εξαρτάται από την αγγειογένεση, αυτά τα δεδομένα συνηγορούν στο ότι η αγγειογένεση προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ευνοώντας έτσι την αύξηση της μυελωματικής μάζας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη παραγόντων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση στο ΠΜ, κυρίως του CD105 και του CD40-ligand (CD40L). Αρχικά περιγράφεται η παθοφυσιολογία του ΠΜ, ακολούθως η μέχρι τώρα γνώση για τους αγγειογενετικούς μηχανισμούς στη δημιουργία και κυρίως στην εξέλιξη της νόσου και τέλος περιγράφονται τα δεδομένα της μελέτης.

2. ΣΤΑΔΙΑ ΠΜ

Τα πλασματοκυτταρικά νεοπλάσματα χαρακτηρίζονται από μία ιδιοτυπική αναδιάταξη του γονιδίου των ανοσοσφαιρινών, που διαπιστώνεται πριν την κακοήθη μετατροπή του προγονικό πλασματοκυττάρου. Ο κλώνος που θα προκύψει θα πρέπει να αυξηθεί σε περίπου 5×10^9 κύτταρα για να μπορέσει να παραγάγει την ιδιοτυπική ανοσοσφαιρίνη που φαίνεται ως μονοκλωνική αιχμή (M) στην ηλεκτροφόρηση λευκωμάτων [12]. Αν αποκλειστούν άλλα αίτια παραγωγής μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης, τότε αυτή η κατάσταση ονομάζεται **MGUS**. Εξορισμού, ο κλώνος και τα επίπεδα της M-πρωτεΐνης είναι σταθερά για πολλά χρόνια και ο ασθενής παραμένει ασυμπτωματικός. Παρολαυτά, η μακροχρόνια παρακολούθηση ατόμων με MGUS έδειξε ότι κάθε χρόνο υπάρχει κίνδυνος, στο 1% αυτών, να εξελιχθούν σε συμπτωματικό ΠΜ, Β-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, μακροσφαιριναιμία ή αμυλοείδωση [13]. Σχεδόν όλες οι καρυοτυπικές ανωμαλίες που χαρακτηρίζουν το ΠΜ ανευρίσκονται και στην MGUS [14]. Όμως προκειμένου ο σταθερός κλώνος της MGUS να μετατραπεί σε ΠΜ χρειάζονται επιπλέον αλλαγές. Το ΠΜ ξεχωρίζει από την MGUS γιατί έχει μεγαλύτερη ενδομυελική πλασματοκυτταρική παρουσία (>10%), οστεολύσεις ή/και αυξανόμενη μάζα όγκου [15].

Το **έρπον μυέλωμα** έχει σταθερή ενδομυελική πλασματοκυτταρική παρουσία >10%, αλλά χωρίς τις επιπλοκές του ΠΜ (αναίμια, οστική νόσος, υπερασβεστιαϊμία ή νεφρική προσβολή). Ο κίνδυνος εξέλιξης σε **συμπτωματικό μυέλωμα** εξαρτάται από τον τύπο και το επίπεδο της M-πρωτεΐνης, την παρουσία ελαφρών αλύσων στα ούρα, την αναλογία ελεύθερων ελαφρών αλύσων στον ορό, το βαθμό πλασματοκυτταρικής διήθησης στο μυελό και το βαθμό ελάττωσης των φυσιολογικών, μη εμπλεκόμενων, ανοσοσφαιρινών.

Το τελικό στάδιο της είναι η **πλασματοκυτταρική λευχαιμία** ή **εξωμυελικό μυέλωμα**, όπου πλέον το πλασματοκύτταρο χάνει την εξάρτησή του από το μυελικό περιβάλλον και εισέρχεται στην κυκλοφορία. Διακρίνεται σε de novo και σε εξέλιξη προϋπάρχοντος ΠΜ.

Τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα έχουν χαμηλό βαθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ο plasma cell labeling index ανιχνεύει τα κύτταρα που συνθέτουν ενεργά DNA και είναι <1% μέχρι τα τελικά στάδια [16]. Παρόμοια ένδειξη μπορεί να δώσει και η ανοσοϊστοχημική έκφραση του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67 [17].

3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΠΜ

Η επίπτωση της MGUS είναι 5,3% και 7,5% στα άτομα >50 και >85 ετών, αντίστοιχα [18]. Η αθροιστική πιθανότητα εξέλιξης από MGUS σε ΠΜ ή σε σχετιζόμενη διαταραχή είναι σχεδόν 1% ανά έτος, με κίνδυνο 10% και 26%, στα 10 και 25 χρόνια αντίστοιχα [19]. Στις ΗΠΑ, η συχνότητα του ΠΜ φαίνεται να είναι περίπου 5,5 ανά 100.000 άτομα/έτος. Σύμφωνα με εκτιμήσεις της Αμερικάνικης Εταιρείας του Καρκίνου, στις ΗΠΑ, το 2007 διαγνώσθηκαν 19.900 καινούρια περιστατικά ΠΜ και 10.790 θάνατοι από τη νόσο. Η διάμεση ηλικία διάγνωσης είναι τα 72 έτη. Η συχνότητα αυξάνει με την ηλικία, με <2% και περίπου 40% να αφορούν τους <40 και τους <60 ετών αντίστοιχα. Υπάρχει αντρική επικράτηση σχεδόν 1,5 [20]. Επίσης, διαπιστώνεται διπλάσια συχνότητα, προσαρμοσμένη στην ηλικία, για το ΠΜ και τριπλάσια για την MGUS, στους αφροαμερικάνους σε σχέση με τους λευκούς και ακόμη μικρότερη στους ασιάτες, ενώ ο κίνδυνος εξέλιξης της MGUS είναι σταθερός στις φυλές. Η αυξημένη συχνότητα στους μαύρους, καθότι αποτελεί γι' αυτούς την πιο συχνή λεμφική κακοήθεια, αντικατοπτρίζει τις υψηλότερες φυσιολογικές τιμές των ανοσοσφαιρινών σε σχέση με τους λευκούς, θέτοντας έτσι αυξημένο Β πληθυσμό σε κίνδυνο κακοήθους εξαλλαγής [1].

4. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΠΜ

Η εξέλιξη του ΠΜ γίνεται σε πολλά στάδια, όπου συμμετέχουν τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες, προκειμένου το προδρομικό κύτταρο του ΠΜ να γίνει αθάνατο, να πολλαπλασιασθεί και να αρχίσει η σταθερή φάση της MGUS. Στη συνέχεια απαιτούνται επιπρόσθετα γενετικά συμβάντα προκειμένου αυτή η σταθερή, ασυμπτωματική φάση να μετατραπεί στην προοδευτική και ανεξέλεγκτη φάση του ΠΜ.

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Υπάρχουν ενδείξεις για αυξημένη και δοσοεξαρτώμενη επίπτωση ΠΜ στους επιζήσαντες ατομικής βόμβας και εργαζόμενους σε εργοστάσια πυρηνικής ενέργειας [21], ενώ δεν έχει βρεθεί συσχέτιση σε εργαζόμενους σε ακτίνες X [22]. Αυξημένος κίνδυνος έχει αναφερθεί επίσης σε εργαζόμενους στη γεωργία και στην αλιεία [22] καθώς και σε έκθεση σε οργανικούς διαλύτες, πετρέλαιο και μέταλλα [24]. Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν την ανάπτυξη του ΠΜ με τη χρόνια αυτοανοσία και την ανοσολογική διέγερση. Έτσι, έχει διαπιστωθεί αυξημένη επίπτωση ΠΜ σε πάσχοντες από αλλεργία, σε κακοήγη αναιμία και ΣΕΛ [25], καθώς και σε ασθενείς με AIDS. Επίσης, αυξημένος κίνδυνος έχει περιγραφεί σε άτομα με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος και με χαμηλή κοινωνικοοικονομική κατάσταση, ενώ αντίθετα, ελαττωμένος κίνδυνος έχει περιγραφεί σε άτομα με αυξημένη πρόσληψη λαχανικών και ψαριών [26].

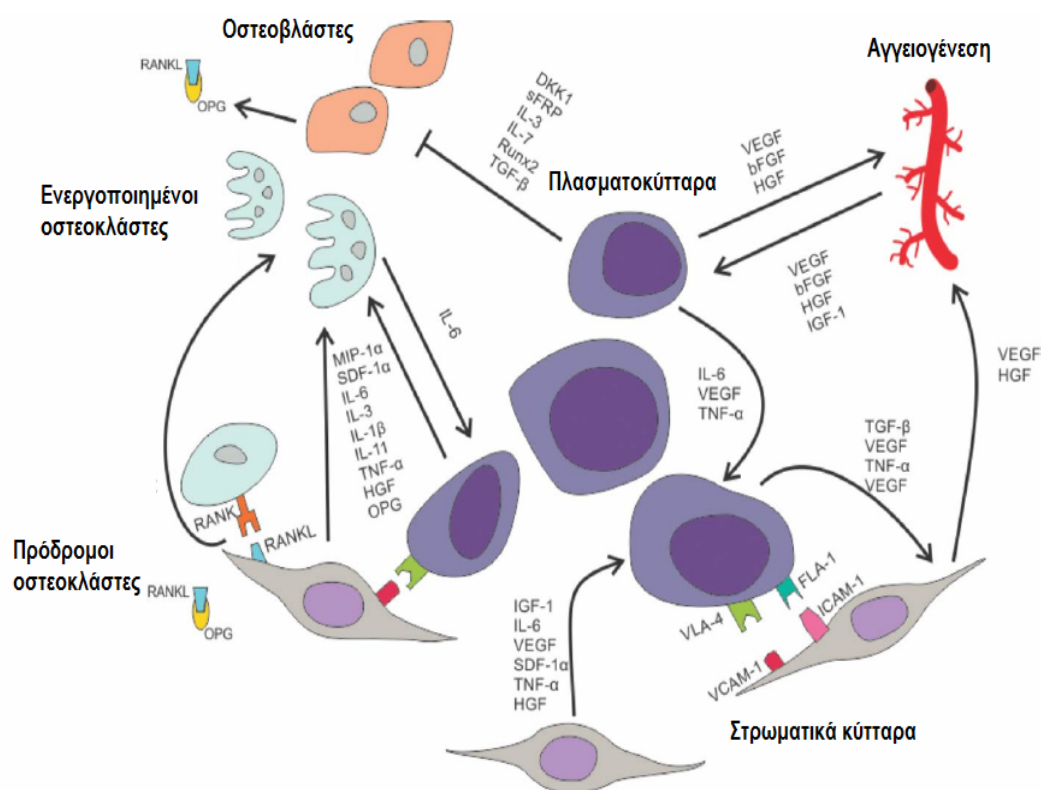
Κληρονομική μεταβλητότητα

Περιορισμένα δεδομένα από μελέτη πολυμορφισμού μονών γονιδίων (single nucleotide polymorphisms-SNP's) έχουν συσχετίσει αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΠΜ σε γονίδια που κωδικοποιούν τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης (IL)-4 (IL-4R) και τον υποδοχέα χαμηλής συγγένειας IIa του Fc τμήματος της IgG (CD32 ή FCGR2A) καθώς και τον τόπο του απλότυπου block που καλύπτει τη λεμφοτοξίνη α^* του tumor necrosis factor (LTA*TNF) [27]. Λιγότερο σαφής είναι η συσχέτιση με την IL-6 [28].

5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΠΜ

Μυελικό μικροπεριβάλλον

Το μυελικό μικροπεριβάλλον αποτελείται από το κυτταρικό, το εξωκυττάριο και το υγρό διαμέρισμα. Το κυτταρικό αποτελείται από αιμοποιητικά και μη (οστεοβλάστες, οστεοκλάστες, λιποκύτταρα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά και ανοσολογικά) κύτταρα. Το εξωκυττάριο είναι ένα σύνθετο δίκτυο πρωτεϊνών (φιμπρονεκτίνη, λαμινίνη, κολλαγόνο). Τέλος, το υγρό διαμέρισμα αποτελείται από ένα μίγμα αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών και χημοκινών. Η παρουσία κακοηθών κυττάρων στο μυελικό μικροπεριβάλλον διαταράσσει τις ομοιοστατικές αλληλεπιδράσεις αυτών των διαμερισμάτων, ευνοώντας τη μετανάστευση, διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό και επιβίωση αυτών των κυττάρων. Παράλληλα επάγει την αγγειογένεση, την οστική νόσο και την αντοχή στη θεραπεία [29].



Αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μυελωματικά πλασματοκύτταρα και το μυελικό μικροπεριβάλλον (Γροποποιημένο από το [29]).

Γενετική στο ΠΜ

Στο μυελό των οστών, ένα άωρο B λεμφοκύτταρο διαφοροποιείται σε προ-B λεμφοκύτταρο. Μετά τις αναδιατάξεις των βαρέων και των ελαφρών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών και την περαιτέρω ωρίμανση, εξέρχεται από το μυελό και μεταναστεύει ως ώριμο B λεμφοκύτταρο, στους δευτερογενείς λεμφικούς ιστούς. Εκεί, αφού δεχθεί τον αντιγονικό ερεθισμό, στο βλαστικό κέντρο του λεμφοζιδίου, διαφοροποιείται σε βραχύβιο πλασματοκύτταρο ή σε κεντροβλάστη. Η κεντροβλάστη μετατρέπεται σε κεντροκύτταρο, υφίσταται τις σωματικές υπερμεταλλάξεις και ισοτυπική αλλαγή των ανοσοσφαιρινών, και προκύπτει το μνημονικό B λεμφοκύτταρο ή πλασμαβλάστη, που παράγει αντίσωμα υψηλής συγγένειας. Οι πλασμαβλάστες μεταναστεύουν στο μυελό των οστών, μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες αποτελούν το 0.25% των μονοπύρηνων κυττάρων [30].

Ο έλεγχος της αλληλουχίας των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών έδειξε ότι στα μυελωματικά πλασματοκύτταρα δεν υπάρχουν ενδοκλωνικές διαφοροποιήσεις στις σωματικές υπερμεταλλάξεις. Αυτό υποδηλώνει ότι το πρωταρχικό μυελωματικό πλασματοκύτταρο προέρχεται από B-λεμφοκύτταρο που έχει ήδη δεχθεί αντιγονικό ερεθισμό, μετά την επαφή του με το αντιγόνο, στο βλαστικό κέντρο [30].

Η μετατροπή του φυσιολογικού πλασματοκυττάρου σε κακόηθες είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται σε πολλά στάδια ογκογενετικών γεγονότων. Παρολαυτά, ακόμα παραμένουν αβέβαιοι ποιοι παράγοντες ξεκινούν αυτή την ογκογενετική διαδικασία. Κυτταρογενετικός και έλεγχος με FISH έδειξαν ότι οι μυελωματικοί όγκοι περιλαμβάνουν τόσο πρωτοπαθείς όσο και δευτεροπαθείς αντιμεταθέσεις και αριθμητικές διαταραχές (ανευπλοειδία, υπερπλοειδία).

Οι ανευπλοειδικές διαταραχές σχετίζονται με ελαττωμένη επιβίωση των πλασματοκυττάρων και με αυξημένη συχνότητα συνύπαρξης αντιμεταθέσεων με το 13/13q14 και με το γονίδιο των βαρέων αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών που εδράζει στο 14q32. Έτσι είναι συχνές οι παρακάτω αντιμεταθέσεις:

- t(4;14)(p16;q32), με το γονίδιο MMSET, οπότε προκύπτει το χιμαιρικό γονίδιο IGH-MMSET.
- t(4;14)(p16;q32), με το γονίδιο FGFR3 (ειδική αντιμετάθεση για το ΠΜ), που οδηγεί σε ενεργοποίηση της μεταγραφής του υποδοχέα FGFR3.

Παρολαυτά διαπιστώνεται αυξημένη έκφρασή του μόνο στα 2/3 των περιπτώσεων.

- t(6;14)(p21;q32), με το γονίδιο της κυκλίνης D3.
- t(11;14)(q13;q32), με το γονίδιο της κυκλίνης D1. Αυτή η αντιμετάθεση είναι παρούσα και στο λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα, προκαλεί αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D1, που θα ενεργοποιούσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παρολαυτά ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι χαμηλός. Παλαιότερα είχε συσχετισθεί με καλύτερη πρόγνωση, πλέον όμως αυτή αμφισβητείται.
- t(14;16)(q32;q23), με το γονίδιο cMAF (ειδική για το ΠΜ), που προκαλεί υπερέκφραση του MAF (μεταγραφικός παράγοντας για το CCND2 και την ιντεγκρίνη β7).
- t(14;20)(q32;q11), με το γονίδιο MAFBt, που οδηγεί σε απορρύθμιση του MAFB [31, 32].

Αντίθετα στην υπερπλοειδία οι αντιμεταθέσεις με το 13/13q14 και με το γονίδιο των βαρέων αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών είναι σπάνιες.

Όψιμα δευτεροπαθή γεγονότα που εμπλέκονται στην εξέλιξη του ΠΜ περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση των NRAS, KRAS και FGFR3, την απενεργοποίηση ή απώλεια του p53 και την αντιμετάθεση στο c-myc [31]. Επιπλέον, κάποιες απενεργοποιητικές μεταλλάξεις και αντιμεταθέσεις σχετίζονται με σταθερή ενεργοποίηση του μονοπατιού του NFκB [33].

Εγκατάσταση μυελωματικού πλασματοκυττάρου στο μυελό

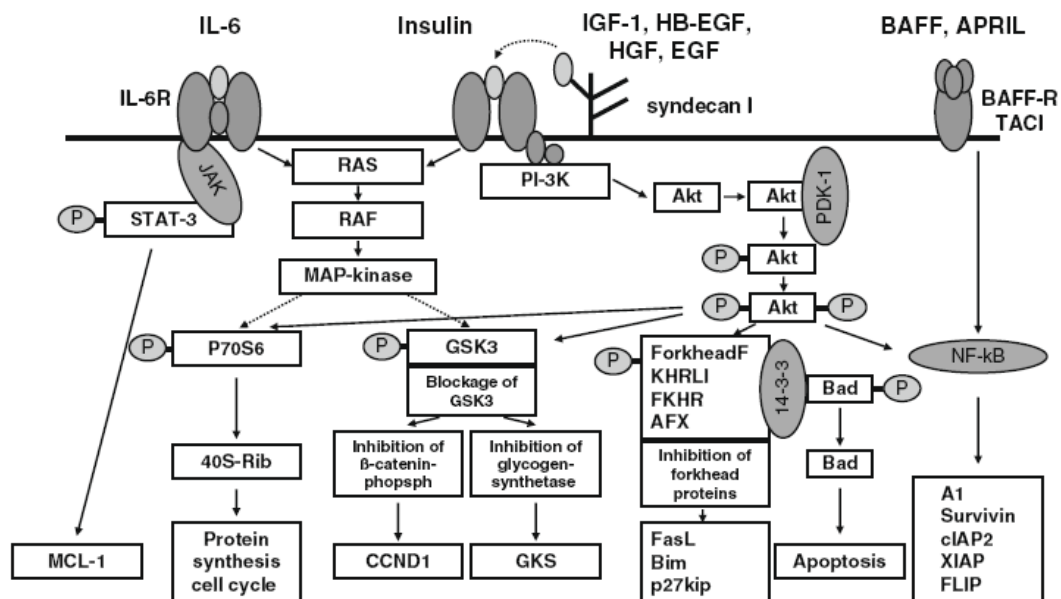
Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των μυελωματικών πλασματοκυττάρων είναι η κατεξοχήν εντόπισή τους στο μυελό. Η διαδικασία εγκατάστασής τους στο μυελό είναι ανάλογη της μετανάστευσης των φυσιολογικών λευκών από την αγγειακή κυκλοφορία στον εξωαγγειακό χώρο [34]. Αρχικά, υπάρχει μια παροδική σύνδεση με το ενδοθηλιακό κύτταρο, μέσω σελλεκτίνης. Στη συνέχεια, τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα, εκφράζοντας ιντεγκρίνες (LFA-1 και VLA-4), συνδέονται με υποδοχείς και συνδέτες των ενδοθηλιακών κυττάρων [36]. Έτσι, προκαλείται αναστολή στην κινητικότητα των πλασματοκυττάρων, γίνονται ευάλωτα στη δράση χυμοκινών που τα προσελκύουν στο μυελό, συμβάλλοντας έτσι στη μετανάστευση αλλά και στην επιβίωση και ανάπτυξή τους. Τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα εκφράζουν υποδοχείς χυμοκινών, όπως το CXCR4 (για το SDF-1), τα CCR1 και CCR5 (για την MIP-1α), το CCR2 (για τους MCP-1, MCP-2 και MCP-3) και το CXCR3 (για την IP-10). Άλλοι παράγοντες που παράγονται από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού και προάγουν, μαζί με την αγγειογένεση και τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση των μυελωματικών πλασματοκυττάρων είναι ο VEGF, η OPN και ο IGF-1 [29].

Το τελικό στάδιο στη διαδικασία εγκατάστασης είναι η μετακίνηση μέσω του ενδοθηλίου του μυελού και της υπενδοθηλιακής βασικής μεμβράνης. Προκειμένου να γίνει, απαιτείται διάσπασή της, μέσω πρωτεολυτικών ενζύμων που παράγονται από τα νεοπλασματικά κύτταρα. Οι πιο γνωστές πρωτεάσες στο ΠΜ είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (matrix metalloproteinase's-MM) και ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (urokinase type plasminogen activator- uPA). Οι MMP εκκρίνονται ως ανενεργά προένζυμα και ενεργοποιούνται με εξωκυττάρια πρωτεολυτική διάσπαση. Ο uPA μετατρέπει το πλασμινογόνο σε πλασμίνη, που ακολούθως ενεργοποιεί τις MMP. Άπαξ και η βασική μεμβράνη διασπασθεί, οι MMP διευκολύνουν περαιτέρω τη μετανάστευση των πλασματοκυττάρων στο γύρω μυελικό μικροπεριβάλλον [36]. Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα του μυελού παράγουν τον HGF, που διεγείρει την παραγωγή της MMP-9 από τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα, υποδεικνύοντας έτσι ότι τα μυελικά ενδοθηλιακά κύτταρα ευοδώνουν την πλασματοκυτταρική εισβολή [37].

Ανάπτυξη και επιβίωση των μυελωματικών πλασματοκυττάρων

Μετά την εγκατάστασή τους στο μυελό, τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα δημιουργούν αμφίδρομες αλληλεπιδράσεις με τα υπόλοιπα κύτταρα. Κυρίως τα στρωματικά κύτταρα, μαζί με τα πλασματοκύτταρα, παράγουν πληθώρα κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και μόρια προσκόλλησης, οδηγώντας τελικά άμεσα και έμμεσα στην επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων.

Με βάση το μονοπάτι σηματοδότησης που ενεργοποιούν, διακρίνονται 3 κατηγορίες παραγόντων που επάγουν την επιβίωση και πολλαπλασιασμό των μυελωματικών πλασματοκυττάρων. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες είναι ο IGF-1 και η IL-6 [38].



Μονοπάτια μετάδοσης του σήματος σε φυσιολογικά και κακοήγη πλασματοκύτταρα. Τα κύρια μονοπάτια είναι : JAK/STAT, MAPK, PI3K/AKT και μέσω του NF-κB. Η συνδεκίνη-1 είναι ένα σημαντικό μόριο για τα φυσιολογικά και μυελωματικά πλασματοκύτταρα. Δρα δεσμεύοντας αυξητικούς παράγοντες (συμπεριλαμβανομένων των IGF-1, HGF, BAFF, APRIL) στην επιφάνεια των κυττάρων διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση με τους αντίστοιχους υποδοχείς [38].

1. Ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT και MAPK (IGF-1, ινσουλίνη, EGF, HGF)

- **Insulin-like growth factor-1 (IGF-1):** Είναι ένα πολύ σημαντικό μόριο. Παράγεται από τα στρωματικά κύτταρα και τους οστεοβλάστες. Φυσιολογικά συμμετέχει στη διαδικασία διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα. Στο ΠΜ συμβάλλει στην ανάπτυξη του όγκου, ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό και επιβίωση των πλασματοκυττάρων, εξαρτώμενα αλλά και ανεξάρτητα από την ιντερλευκίνη-6 [39]. Έτσι, τα επίπεδά του στο μυελό ασθενών με ΠΜ είναι αυξημένα, ενώ αντίθετα στον ορό δε διαφέρουν σε γενικές γραμμές από τα φυσιολογικά. Παρολαυτά, όταν ανιχνευθούν αυξημένα επίπεδα ορού, συνοδεύεται από κακή πρόγνωση [40]. Συνδέεται με τον πλασματοκυτταρικό υποδοχέα IGF-1R, που δεν εκφράζεται στα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα. Ο υποδοχέας είναι ένα ετεροδιμερές μόριο, με 2 εξωκυττάρια α και 2 διαμεμβρανικές β περιοχές. Οι τελευταίες, με δράση τυροσινικής κινάσης, αυτοφωσφοριλιώνουν τον υποδοχέα όταν συνδεθεί με τον IGF-1, προκαλώντας ενεργοποίηση διαφόρων μονοπατιών, κυρίως του PI3K/AKT και λιγότερο των JAK/STAT, του NF- κ B και του MEK/ERK [29, 38].
- **Ινσουλίνη:** Είναι συναφές μόριο με τον IGF. Δεν είναι καλά μελετημένος ο ρόλος της στη μυελωματική νόσο. Φαίνεται όμως ότι δρα ως αυξητικός παράγοντας, τόσο για τα φυσιολογικά, όσο και για τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα, αφού συνδεθεί με τον υποδοχέα της [38].
- **Παράγοντες συνδεδόμενοι με την ηπαρίνη (Heparin binding factors-HBF):** Τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους την πρωτεογλυκάνη συνδεκάνη-1 (CD138). Είναι πρωτεΐνη θεϊκής ηπαράνης, με πολλές λειτουργίες, μία εκ των οποίων είναι και η σύνδεση με τους αυξητικούς παράγοντες HBF και η παρουσίασή τους στους ειδικούς υποδοχείς τους [38].
 - **Epidermal growth factor (EGF):** Τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα υπερεκφράζουν τον EGF και η αναστολή του προκαλεί αναστολή επιβίωσης, μέσω ιντερλευκίνης-6. Επίσης τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα εκφράζουν και τους 4 υποδοχείς για τον EGF: Erb1, Erb2, Erb3 και Erb4, ενώ τα φυσιολογικά μόνο τους 1 και 2. Η σύνδεση

των υποδοχέων με το συνδέτη προκαλεί ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT και MAPK, αλλά όχι του STAT [38].

- **Hepatocyte growth factor (HGF):** Συνδέεται με τον υποδοχέα του cMET, διεγείροντας το μονοπάτι PI3K/AKT και MAPK. Ίσως δρα συνεργικά με την ιντερλευκίνη-6. Εκφράζεται στην πλειοψηφία των μυελωματικών πλασματοκυττάρων, τα επίπεδά του είναι αυξημένα στον ορό ασθενών με ΠΜ και αποτελούν προγνωστικό δείκτη. Αυξάνει την οστική απορρόφηση και ίσως εμπλέκεται στην ανώμαλη οστεοκλαστική απορρόφηση. Επιπλέον, συσχετίζεται σαφέστατα με την αγγειογενετική δραστηριότητα του μυελού [41, 42].
- **Fibroblast growth factor (FGF):** Στο 15% των ασθενών με ΠΜ ανιχνεύεται η αντιμετάθεση t(4;14) και αφορά τον υποδοχέα FGFR3 του FGF. Η σύνδεσή τους οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT και MAPK, προκαλώντας επιβίωση και πολλαπλασιασμό του νεοπλασματικού πλασματοκυττάρου [38].

2. Ενεργοποίηση του μονοπατιού JAK/STAT και MAPK (IL-6, IL-10, IL-21, TNF-α)

- **Ιντερλευκίνη-6 (IL-6):** Είναι μια κυτταροκίνη με πλειότροπες δράσεις, τόσο στα αιμοποιητικά όσο και στα μη αιμοποιητικά κύτταρα. Στο μυελικό μικροπεριβάλλον παράγεται κυρίως από τα στρωματικά κύτταρα. Επίσης, όταν αυτά συνδεθούν με τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα, επάγεται μέσω του NF-κB, και η παραγωγή της, σε μικρότερο βαθμό και από τα νεοπλασματικά κύτταρα. Τέλος, η ενεργοποίηση του CD40 προκαλεί παραγωγή της τόσο από τα στρωματικά κύτταρα όσο και από τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα.

Η IL-6 δρα στο πλασματοκύτταρο αφού συνδεθεί με το μεμβρανικό υποδοχέα της IL-6R. Ο υποδοχέας αποτελείται από την αλυσίδα IL-6Ra αλυσίδα (CD126), με την οποία συνδέεται η IL-6, και την gp130 ή IL-6 signal transducer (IL6ST) (CD130), που μεταφέρει το σήμα. Η IL6ST δεν είναι ειδική για την IL-6, καθότι υπάρχει και σε υποδοχείς άλλων συναφών κυτταροκινών. Ο IL-6R επίσης κυκλοφορεί στον ορό, ως διαλυτό μόριο, δρώντας αγωνιστικά, δηλαδή όπως και στην περίπτωση του μεμβρανικού

υποδοχέα, η σύνδεση της IL-6/sIL-6R προκαλεί ομοδιμερισμό της gp130 και ενεργοποίηση του JAK/STAT μονοπατιού. Τα επίπεδα ορού της IL-6 και sIL-6R είναι αυξημένα στους ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα, προσδίνοντάς τους κακή πρόγνωση. Η έκκριση της IL-6 επάγεται από την IL-1 (παραγώμενη από τα μονοκύτταρα και τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα), το b-FGF και τον TGFβ [29].

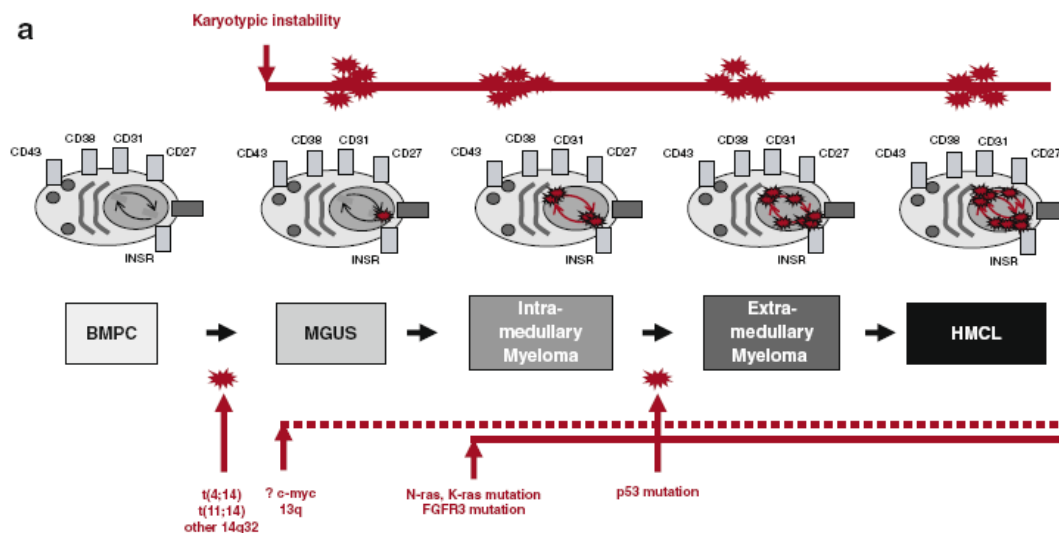
3. Ενεργοποίηση του μονοπατιού NF-κB (Οικογένεια BAFF)

Οι **BAFF** και **APRIL** ανήκουν στην οικογένεια του TNF και είναι απαραίτητες για την επιβίωση των B λεμφοκυττάρων. Εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό στην παθοφυσιολογία του συστηματικού ερυθματώδους λύκου. Μπορούν να ενεργοποιήσουν 3 υποδοχείς: BAFF-R, BCMA και TACI. Τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα εκφράζουν κυρίως τους BCMA και TACI υποδοχείς και η σύνδεση με τις BAFF πρωτεΐνες προκαλεί ενεργοποίηση κυρίως του NF-κB αλλά και σε μικρότερο βαθμό και άλλων μονοπατιών. Φαίνεται ότι ο ρόλος των BAFF πρωτεϊνών είναι αυξητικός και επίσης προστατεύει τα νεοπλασματικά κύτταρα από την απόπτωση που προκαλεί η δεξαμεθαζόνη. Έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα BAFF στον ορό ασθενών με ΠΜ, που βαίνουν παράλληλα με την κατάσταση και το στάδιο της νόσου. Επίσης συσχετίζονται τόσο με δείκτες δραστηριότητας της νόσου (TNF-α, LDH, PCNA, IL-6, CRP, B2M), όσο και με την αγγειογένεση του μυελού (MVD). Τα επίπεδα BAFF στον ορό φαίνεται επίσης να έχουν προγνωστική αξία [43, 44]. Ήδη κυκλοφορούν αντι-BAFF θεραπείες για το συστηματικό ερυθματώδη λύκο, ενώ υπάρχουν και θεραπευτικά μοντέλα για τη χρήση τους στο ΠΜ [38].

Μοντέλα για την παθογένεια του ΠΜ

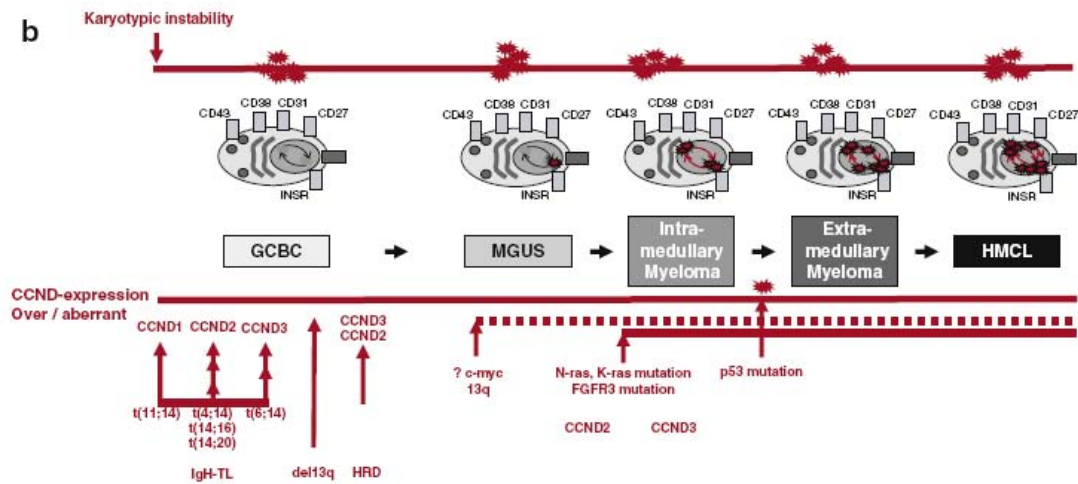
Έχουν ήδη προταθεί 3 μοντέλα για την παθογένεια του ΠΜ. Τα 2 πρώτα (1998 και 2005) εστιάζουν στη γενετική αστάθεια του νεοπλασματικού πλασματοκυττάρου και προτείνουν ότι η νόσος εξελίσσεται με την προσθήκη καινούριων γενετικών αλλαγών, ενώ το πιο πρόσφατο (2011) αμφισβητεί τη γενετική αστάθεια του νεοπλασματικού κυττάρου και προτείνει το σημαντικό ρόλο του μυελικού μικροπεριβάλλοντος ως υπεύθυνου για την εξέλιξη της νόσου.

1. Μοντέλο του Hallek και συνεργατών, 1998 [45].



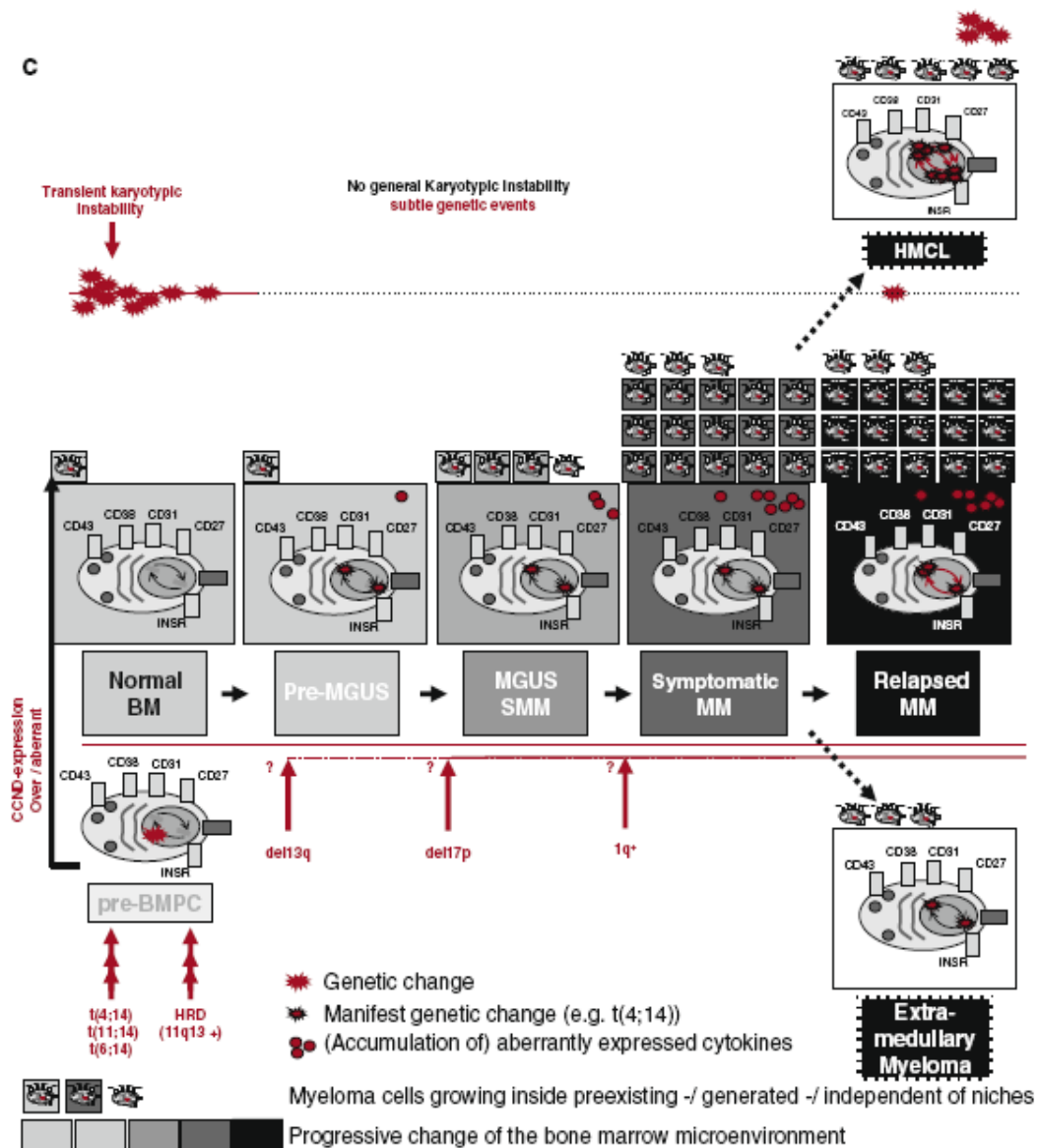
Το μοντέλο προτείνει μια συνεχιζόμενη γενετική αστάθεια (περιγράφεται με κόκκινο αστέρι), που ξεκινά στο αρχικό στάδιο της MGUS και οδηγεί σε πολλαπλές συσσωρευμένες γενετικές βλάβες (κόκκινο αστέρι με μαύρο περίγραμμα). Στο μυελό, τα πλασματοκύτταρα ή τα προγονικά τους κύτταρα υφίστανται IgH-αντιμεταθέσεις και έτσι τα πλασματοκύτταρα εξελίσσονται από προ-κακοήθη (στάδιο MGUS) σε κακοήθη (επί ενδομυελικού ή εξωμυελικού μυελώματος). Κάθε στάδιο προκαλείται από προσθήκη επιπρόσθετων γενετικών συμβαμάτων. Σε αρχικό στάδιο φαίνεται να υπάρχει απορρύθμιση του c-myc, οι μεταλλάξεις του ras και του FGFR3 εμφανίζονται αργότερα ενώ ένα όψιμο γεγονός είναι οι μεταλλάξεις του p53.

2. Μοντέλο του Bergsagel και συνεργατών, 2005 [46].



Το μοντέλο εστιάζει στα αρχικά ογκογενετικά γεγονότα που περιλαμβάνουν 3 αλληλοεπικαλυπτόμενα μονοπάτια. Αυτά συμβαίνουν στα Β λεμφοκύτταρα του βλαστικού κέντρου και υπάρχουν ήδη στην MGUS. Τα 2, μερικώς αλληλοεπικαλυπτόμενα, περιλαμβάνουν τις IgH-αντιμεταθέσεις και τις τρισωμίες, δημιουργώντας έτσι ανευπλοειδικούς και υπερδιπλοειδικούς όγκους, αντίστοιχα. Το τρίτο μονοπάτι, με την έλλειψη του 13q χρωμοσώματος (είτε σε μονοσωμία 13, είτε σε έλλειψη του 13q14), μπορεί να συνυπάρχει και στα δύο είδη όγκων, συνηθέστερα όμως στους ανευπλοειδικούς, οπότε σχεδόν πάντα συνυπάρχει με τις αντιμεταθέσεις t(4;14) και t(14;16), αλλά σπανιότατα με την t(11;14). Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις το τελικό αποτέλεσμα είναι η απορρύθμιση της κινάσης των κυκλινών (CCND), είτε λόγω παρεκκλίνουσας (aberrant) είτε λόγω αυξημένης έκφρασης.

3. Μοντέλο του Klein και συνεργατών, 2011 [38].



Υπάρχουν 2 κύριοι τρόποι τροποποίησης των προγονικών πλασματοκυττάρων (επίπεδο του B λεμφοκυττάρου μετά το βλαστικό κέντρο): με αντιμεταθέσεις, κυρίως στον τόπο της IgH και με υπερδιπλοειδία. Και οι δύο τρόποι οδηγούν σε αυξημένη έκφραση της CCND (υπερέκφραση της CCND2 και παρεκκλίνουσα έκφραση των CCND1 και CCND3). Η καρυοτυπική αστάθεια (κόκκινο αστέρι) υπάρχει μόνο σε αυτό το στάδιο. Έτσι, τα τροποποιημένα προγονικά πλασματοκύτταρα εισέρχονται στο περιβάλλον (γκρίζο κουτί) των φυσιολογικών πλασματοκυττάρων. Το μυελικό μικροπεριβάλλον σε αυτή τη φάση είναι επίσης φυσιολογικό (ανοιχτό γκρίζο κουτί). Αυτά τα κύτταρα έχουν ελάχιστα απορυθμισμένο κυτταρικό κύκλο (πειραγμένα

«φυσιολογικά» πλασματοκύτταρα) με τάση να συσσωρεύονται. Στο προ-MGUS στάδιο αρχίζει μια αργή και σταδιακή μετατροπή του μυελικού μικροπεριβάλλοντος. Έτσι, τα προ-MGUS κύτταρα μοιράζονται τον ίδιο χώρο με τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα. Η περεταίρω συσσώρευσή τους οδηγεί στην MGUS/έρπον μύελωμα, χωρίς να είναι απαραίτητη η προσθήκη καινούριων γενετικών αλλαγών. Με αυτό τον τρόπο, το μυελικό μικροπεριβάλλον μεταμορφώνεται σταδιακά, λόγω της αυξημένης φυσιολογικής (*αυξανόμενο γκρίζο*) και παρεκκλίνουσας έκφρασης παραγόντων (*κόκκινες κουκίδες*) από τα πλασματοκύτταρα. Η παρεκκλίνουσα έκφραση οφείλεται κυρίως στις αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος και όχι στη συσσώρευση νέων γενετικών αλλαγών. Τα κακοήθη πλασματοκύτταρα επικρατούν πλέον στο πλασματοκυτταρικό περιβάλλον (*ανοιχτό γκρίζο κουτί*), επεκτείνονται σε νέες θέσεις (*σκούρο γκρίζο κουτιά*) και εν μέρει αποκτούν ανεξαρτησία από το μυελικό περιβάλλον (*πλασματοκύτταρα χωρίς κουτί*). Περεταίρω συσσώρευση κακοηθών πλασματοκυττάρων οδηγεί σε μύελωμα που απαιτεί θεραπεία. Το μυελικό μικροπεριβάλλον συνεχίζει να μεταμορφώνεται (*αυξανόμενο γκρίζο*, αυξημένος αριθμός παρεκκλινόντως εκφραζόμενων παραγόντων), με θετική ανατροφοδότηση. Η περεταίρω επιλογή πιέζει στην επέκταση νέων θέσεων και τελικά αναπτύσσονται εκτός θέσεων. Οι ανθρώπινες μυελωματικές κυτταρικές σειρές (HMCL) προκύπτουν όταν το μύελωμα απαιτήσει θεραπεία ή όταν υποτροπιάσει, δηλαδή από πλασματοκύτταρα που απέκτησαν την ανεξαρτησία τους από το μυελικό μικροπεριβάλλον. Το ίδιο ισχύει και για το εξωμυελικό μύελωμα, που όμως στην πράξη δεν παρατηρείται συχνά, ακόμα και στα τελικά στάδια της νόσου. Με τη συνεχή συσσώρευση κακοηθών πλασματοκυττάρων εμφανίζονται και οι τελευταίες γενετικές ανωμαλίες (17p-, 1q21+), που σχεδόν πάντα εμφανίζονται στα τελικά στάδια της νόσου.

6. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟ ΠΜ

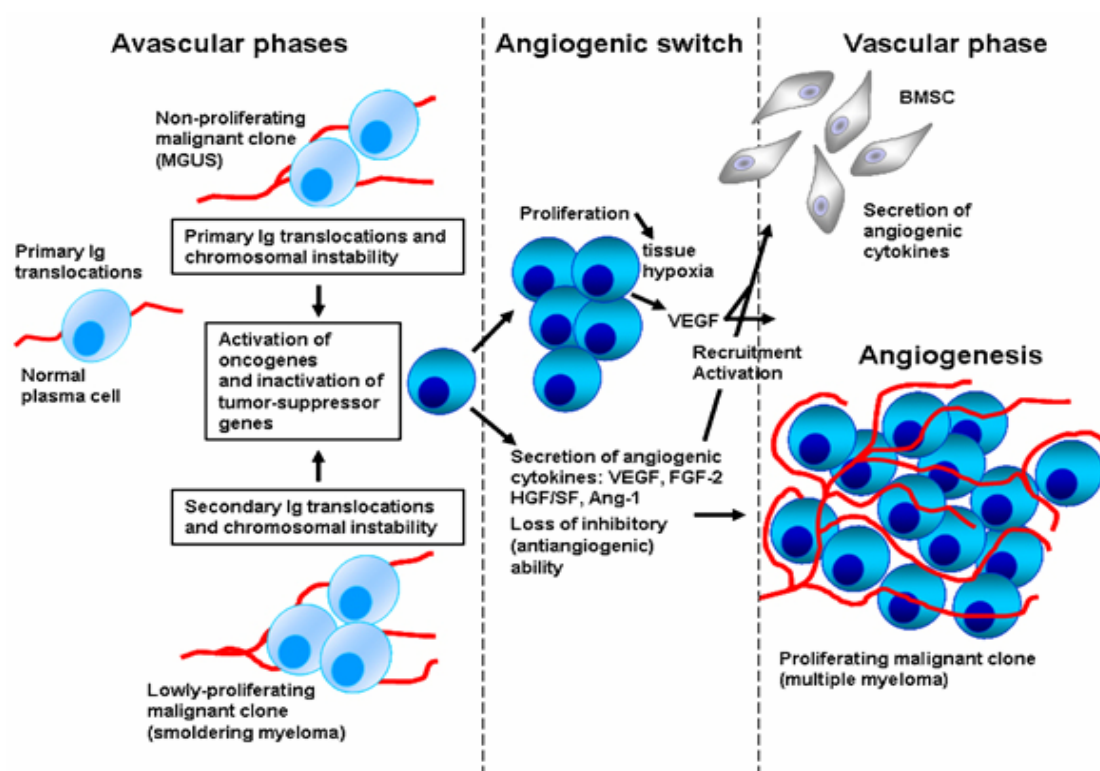
Η αγγειογένεση είναι μια σύνθετη διαδικασία, κατά την οποία τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται, διασπών την εξωκυττάρια ουσία, μεταναστεύουν και τελικά διαφοροποιούνται σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα, προκειμένου να δημιουργήσουν ένα αγγειακό πλέγμα, που υποστηρίζεται από τα περικύτταρα [47]. Η αγγειογενετική ομοιόσταση ρυθμίζεται από σύνθετες αλληλοεπιδράσεις ανάμεσα στα διάφορα διαμερίσματα του μυελού, που καθορίζουν την ισορροπία ανάμεσα στους προ-αγγειογενετικούς (VEGF, bFGF, Ang-1, Ang-2, HGF, PDGF) και αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες (TIMP-1, TIMP-2, αγγειοστατίνη, ενδοστατίνη) που εκφράζονται από τα στρωματικά, ενδοθηλιακά και νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα του μυελού [47, 48].

Ήδη έχει διαπιστωθεί και επιβεβαιωθεί αυξημένη αγγειογένεση-MVD στους ασθενείς με ΠΜ, που οφείλεται σε αυξημένη παραγωγή προ-αγγειογενετικών παραγόντων από τα αυξημένα σε αριθμό μυελωματικά πλασματοκύτταρα και όχι λόγω υπερέκφρασής τους. Συνεπώς, η αγγειογενετική δραστηριότητα έμμεσα θα μπορούσε να αποτελέσει δείκτη φορτίου της νόσου. Το μοντέλο για την αγγειογένεση στο ΠΜ αποτελείται από 3 στάδια [49]:

- Τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα στο μυελό επάγουν την αγγειογένεση ρυθμίζοντας την ισορροπία των προ και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων στο μυελικό μικροπεριβάλλον. Προκειμένου να δημιουργηθεί νέα αγγείωση, η ισορροπία στρέφεται προς τους προ-αγγειογενετικούς παράγοντες.
- Καθώς αυξάνεται το φορτίο των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων, στα αρχικά στάδια της νόσου, αυξάνεται, ως αναμενόμενο, η παραγωγή των προ-αγγειογενετικών παραγόντων.
- Όταν το μύελωμα γίνει πλέον ενεργό, διαπιστώνεται παρεκκλίνουσα έκφραση προ-αγγειογενετικών παραγόντων με αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση της αγγειογένεσης.

Αγγειογενετική μετατροπή (angiogenic switch) είναι η μετάβαση από την προαγγειακή υπερπλασία σε όγκο με αυξημένη αγγείωση. Αυτή η μετατροπή ρυθμίζεται από αλλαγές στην ισορροπία μεταξύ προ και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων που εκφράζονται από τα νεοπλασματικά και τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος. Έτσι, το περιβαλλοντικό στρες (υποξία, ελαττωμένα επίπεδα γλυκόζης, οξέωση, σιδηροπενία), η ενεργοποίηση ογκογονιδίων και η απώλεια

ογκοκατασταλτικών γονιδίων επάγουν την έκφραση προαγγειακών παραγόντων. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς είναι ο VEGF και ο FGF-2. Αντι-αγγειογενετικά μόρια είναι πρωτεϊνικές δομές (είτε ολόκληρα μόρια, είτε προϊόντα διάσπασης ανενεργών πρωτεϊνών) με ανασταλτική δράση στην αγγειογένεση. Τέτοια είναι η θρομβοσπονδίνη-1, η αγγειοστατίνη (τμήμα της πλασμίνης) και το τμήμα 18 του κολλαγόνου (ενδοστατίνη), των οποίων η έκφραση ή/και η δραστηριότητα είναι ελαττωμένη στο μυελωματικό περιβάλλον [50, 51].



Μια υπόθεση σχετικά με την αγγειογενετική μετατροπή στο ΠΜ. Οι πρωτογενείς και δευτερογενείς αντιμεταθέσεις στην MGUS και στο έρπον μνέλωμα, μαζί με τη χρωμοσωμική αστάθεια, οδηγούν σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων και την αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, και τελικά επάγουν γονίδια για αγγειογενετικές κυτταροκίνες. Η ιστική υποξία που προκαλεί έκκριση του VEGF, καθώς και η ενεργοποίηση των στρωματικών κυττάρων του μυελού (BMSC) είναι συμπληρωματικές εκδηλώσεις: η αγγειογενετική μετατροπή εμφανίζεται και βαίνει παράλληλα με το ΠΜ [51].

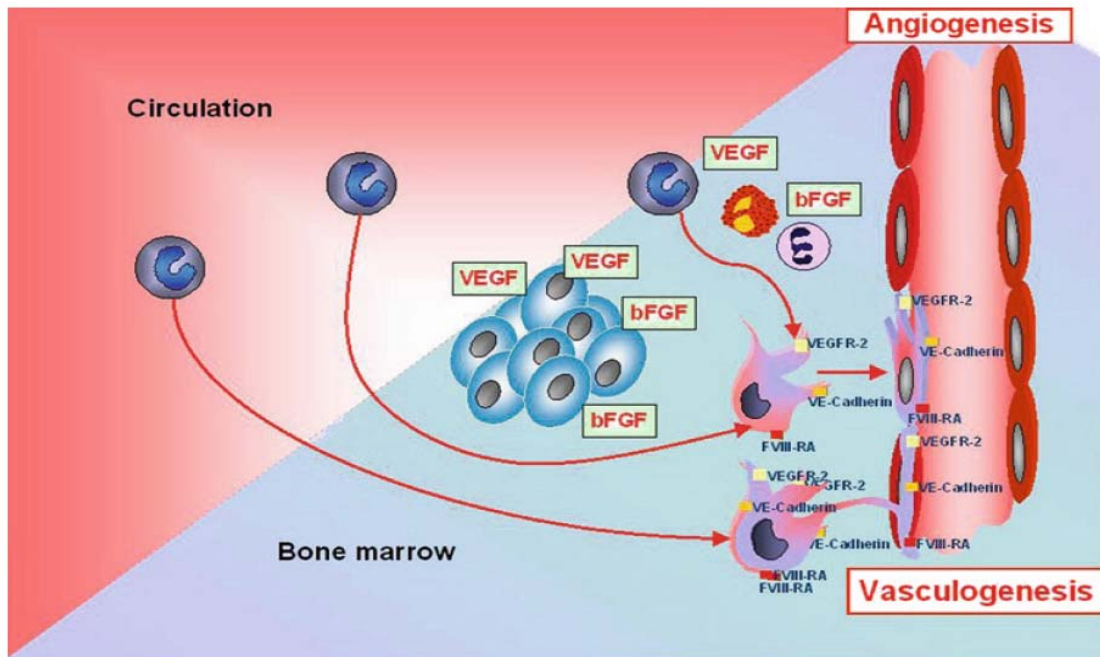
Το αγγειακό δίκτυο είναι ένα ενεργό συστατικό του μυελικού στρώματος. Στο ΠΜ είναι υπεύθυνο για την παροχή οξυγόνου και τροφής, αλλά και για την εγκατάσταση και επέκταση των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων. Επιπλέον

εμπλέκεται σε αυτοκρινείς και παρακρινείς αλληλεπιδράσεις με τα πλασματοκύτταρα [52]. Τα αγγεία του όγκου αποτελούνται από μια στιβάδα χαλαρά συνδεδεμένων ενδοθηλιακών κυττάρων, σε επαφή με τη βασική μεμβράνη και περιβάλλονται από σπάνια περικύτταρα. Αυτά τα ενδοθηλιακά κύτταρα προέρχονται είτε από ενδοθηλιακά κύτταρα προϋπαρχόντων αγγείων, είτε από κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα, ώριμα ή προγονικά [53]. Έχουν δε ειδικό φαινότυπο, καθότι είναι πιο ενεργά, με αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού, αυξημένη επιβίωση και αυξημένη έκφραση αγγειογενετικών δεικτών (Tie2, VEGFR-2, FGFR-2, CD105, vascular endothelial cadherin) σε σχέση με τα φυσιολογικά [54]. Τα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν ιδιότητες αρχέγονου κυττάρου (πολλαπλασιασμός, μετανάστευση, διαφοροποίηση) και συνεπώς μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμα ενδοθήλια [55]. Στους ασθενείς με ΠΜ εκφράζουν τους δείκτες VEGFR-2 και CD133 [56]. Τα ώριμα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα ανευρίσκονται αυξημένα στους ασθενείς με ΠΜ και τα επίπεδά τους σχετίζονται με δείκτες δραστηριότητας της νόσου (B2M, επίπεδα M-πρωτεΐνης). Και οι δύο κατηγορίες κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών κυττάρων, έχει αναφερθεί ότι μπορούν να ελαττωθούν μετά από χορήγηση θαλιδομίδης [56]. Κατά τη μετάβαση από τη MGUS στο ΠΜ διαπιστώνεται αυξημένη κυκλοφορία στο μυελό αρχέγονων ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία μάλιστα εμφανίζουν παρόμοιες γενετικές βλάβες με τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα, υποδεικνύοντας ότι είτε προέρχονται από κοινό προγονικό κύτταρο, είτε τα ενδοθηλιακά είναι υβρίδια πλασματοκυττάρων με ενδοθηλιακά κύτταρα [57].

Εκτός από τα ενδοθηλιακά και τα στρωματικά κύτταρα, στην αγγειογενετική διαδικασία συμμετέχουν και άλλα κύτταρα.

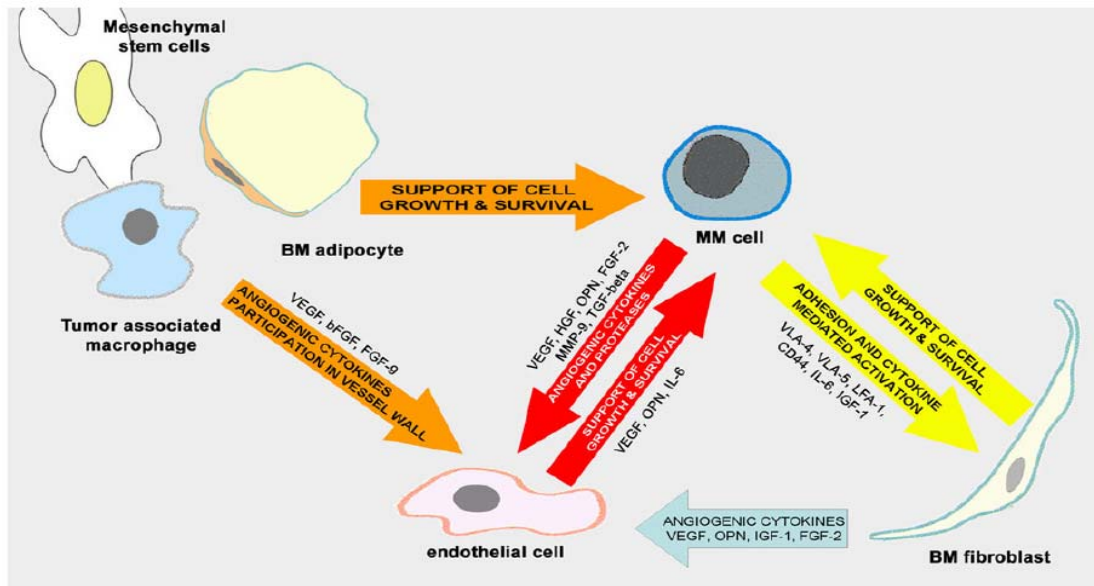
- Τα **μεσεγχυματικά κύτταρα** εκφράζουν περισσότερους αγγειογενετικούς παράγοντες (bFGF, HGF, VEGF) στους ασθενείς με ΠΜ σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα [58].
- Τα **λιποκύτταρα** επίσης αποτελούν πηγή αγγειογενετικών κυτταροκινών (VEGF, FGF-9). Ο ρόλος τους στην αγγειογενετική διαδικασία δεν είναι καλά μελετημένος. Είναι ενδιαφέρον ότι τα λιποκύτταρα αυξάνονται στο μυελό στις ηλικίες που συναντιέται το ΠΜ. Μεμονωμένα δεδομένα υποστηρίζουν ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη του ΠΜ, επιδρώντας στον πολλαπλασιασμό, απόπτωση, μετανάστευση και σύνδεση των πλασματοκυττάρων [59].

- Τα **φλεγμονώδη κύτταρα** ρυθμίζουν τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων τόσο στη φυσιολογική όσο και στην αγγειογένεση του όγκου. Έτσι, μια πληθώρα φλεγμονωδών κυττάρων (ουδετερόφιλα, μακροφάγα, ηωσινόφιλα, μαστοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα) συμμετέχει στην αγγειογενετική διαδικασία, μεταξύ των άλλων παράγοντας κυτταροκίνες και χυμοκίνες.
 - ο Τα **μακροφάγα του όγκου** αποτελούν σημαντικό συστατικό της φλεγμονώδους διήθησης και έχουν διπλό ρόλο. Από τη μια μπορούν να σκοτώνουν τα νεοπλασματικά κύτταρα, από την άλλη όμως παράγουν αγγειογενετικούς αυξητικούς παράγοντες (VEGF, FGF-2, TNF-α, IL-8), μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12) καθώς και COX2, βοηθώντας έτσι στην επέκταση του όγκου. Επιπλέον τα μακροφάγα του όγκου συμβάλλουν στη νεοαγγείωση «σκάβοντας» σήραγγες για τα νέα αγγεία, αφού διασπάσουν, μέσω των MMP, την εξωκυττάρια ουσία. Επιπλέον, συμμετέχουν και άμεσα στην αγγειογενετική διαδικασία, δημιουργώντας αρχικά ένα υποτυπώδες αγγειακό δίκτυο, πάνω στο οποίο θα δημιουργηθεί το ώριμο δίκτυο του όγκου από ενδοθηλιακά κύτταρα και επιπλέον, συνδεδεμένα με το κατεστραμμένο αρχικό αγγειακό δίκτυο, συμβάλλοντας στην επανενδοθηλιοποίηση του αγγειακού φραγμού [10, 60].



Πιθανή «στρατολόγηση» των μακροφάγων για τη νεοαγγείωση στο ΠΜ. Τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα και μακροφάγα κινητοποιούνται από το μυελό, μέσω των VEGF και FGF-2 (ή bFGF) που εκκρίνονται από τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα και επάγονται να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα τύπου ενδοθηλιακών [10].

- ο Τα **μαστοκύτταρα** συμμετέχουν άμεσα στην αγγειογενετική διαδικασία, όπως και τα μακροφάγα, δημιουργώντας ένα υποτυπώδες αγγειακό δίκτυο, πάνω στο οποίο θα δημιουργηθεί το ώριμο δίκτυο του όγκου από ενδοθηλιακά κύτταρα. Επίσης παράγουν αγγειογενετικές κυτταροκίνες (VEGF, FGF-2, TNF- α , IL-8) και πρωτεάσες (θρυπάση, χυμάση, MMP), που εκτός από την άμεση ενεργοποίηση της αγγειογένεσης, προκαλούν και προσέλκυση άλλων φλεγμονωδών κυττάρων [10].



Παρακρινείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ μυελωματικών πλασματοκυττάρων (MM cells), ινοβλαστών (fibroblast) και ενδοθηλιακών κυττάρων (endothelial cell) στο μυελό. Τα μυελωματικά κύτταρα παράγουν αγγειογενετικές κυτταροκίνες που επηρεάζουν άμεσα τον πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, και πρωτεάσες που συμβάλλουν στη διάσπαση της βασικής μεμβράνης και εξωκυττάριας ουσίας. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα υποστηρίζουν την εγκατάσταση και ανάπτυξη των πλασματοκυττάρων, εκκρίνοντας χημοκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Με άμεση σύνδεση με τους ινοβλάστες και με παρακρινή έκκριση αυξητικών παραγόντων, τα πλασματοκύτταρα αυξάνουν την παραγωγή αγγειογενετικών παραγόντων από τους ινοβλάστες. Τα λιποκύτταρα (adipocyte), τα φλεγμονώδη και τα μεσεγγυματικά κύτταρα εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες, ενώ τα μακροφάγα του όγκου (Tumor associated macrophage) μπορούν να μετατραπούν σε κύτταρα τύπου ενδοθηλιακών [4].

Αγγειογενετικοί μεσολαβητές

Τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα παράγουν αγγειογενετικές κυταροκίνες που επηρεάζουν άμεσα τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (VEGF-A, HGF, IGF-1, ANG-1 και OPN) καθώς και πρωτεάσες (MMP-2, MMP-9, ADAM23, ADAMTS9) που διασπούν την εξωκυττάρια ουσία και τη βασική μεμβράνη [51]. Στους πίνακες που ακολουθούν φαίνονται τα γονίδια των προ και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων που εκφράζονται στο ΠΜ. Από την άλλη τα ενδοθηλιακά κύτταρα υποστηρίζουν την ανάπτυξη και εγκατάσταση των μυελωματικών πλασματοκυττάρων εκκρίνοντας χυμοκίνες (IL-8, SDF-1, MCP-1, I-TAC) και αυξητικούς παράγοντες (VEGF, IGF-1, IL-6, bFGF, OPN) [53].

Αντι-αγγειογενετικά γονίδια που εμπλέκονται στο ΠΜ		
Γονίδιο	Πρωτεΐνη	Λειτουργία πρωτεΐνης
TSP-1	Θρομβοσπονδίνη-1	Άμεσα, με αλληλεπίδραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, επηρεάζοντας την επιβίωση και την κινητικότητα. Έμμεσα, ρυθμίζοντας τη βιοδιαθεσιμότητα άλλων αγγειογενετικών κυτταροκινών
ADAMTS9	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 9	Αναστολή προσκόλλησης και μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων.
PF4	Αιμοπεταλιακός παράγοντας 4	Χημειοτακτικός για ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα. Αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων.
TIMP2	Αναστολέας 2 της TIMP μεταλλοπεπτιδάσης	Άμεση καταστολή πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αδρανοποίηση MMP.
LAMA5	Λαμινίνη α5	Αναστολή νεοπλασματικής μετανάστευσης και διήθησης. Καταστολή αγγειογένεσης
SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F, member 1	Ισχυρός αγγειογενετικός αναστολέας, καταστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και επάγοντας την απόπτωσή τους.
BMP6	Bone morphogenic protein 5	Αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των μυελωματικών πλασματοκυττάρων, επάγει την απόπτωσή τους και αναστέλλει άμεσα το σχηματισμό αγγειακού σωλήνα.

Αγγειογενετικά γονίδια που εμπλέκονται στο ΠΜ

Γονίδιο	Πρωτεΐνη	Λειτουργία πρωτεΐνης
HGF	Hepatocyte growth factor	Ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, κινητικότητα και μορφογένεση. Διεγείρει τη μιτογένεση, την κυτταρική κινητικότητα και τη διήθηση στην εξωκυττάρια ουσία, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση, ογκογένεση και ιστική αναδιαμόρφωση.
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, προάγει την κυτταρική μετανάστευση και επάγει τη διαπερατότητα των αγγείων.
IL15	Ιντερλευκίνη-15	Επάγει την παραγωγή προ-αγγειογενετικών κυτταροκινών.
ANG CTGF	Αγγειογενίνη Connective tissue growth factor	Επάγει την αγγειοποίηση. Επάγει την προσκόλληση πολλών ειδών κυττάρων, όπως ινοβλαστών, ενδοθηλιακών και επιθηλιακών.
HDGF	Hepatoma-derived growth factor	Παίζει ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Δυνητικό μιτογόνο των ενδοθηλιακών κυττάρων και ρυθμιστής της μετανάστευσής τους, με διαφορετικό μηχανισμό από το VEGF.
IL6ST	Μετατροπέας σήματος IL-6	Μετατροπέας του σήματος της ιντερλευκίνης-6, αλλά και άλλων κυτταροκινών με αγγειογενετικές ιδιότητες (LIF, ογκοστατίνη M)
ADM	Αδρενομεδουλίνη	Αντι-αποπτωτικός παράγοντας για τα ενδοθηλιακά κύτταρα, επάγει την αγγειογένεση και επηρεάζει τον αγγειακό τόνο και διαπερατότητα.
IGF-1	Insulin-like growth factor-1	Διεγείρει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και το σχηματισμό του αγγειακού σωλήνα. Έμμεσα δρα αυξάνοντας την έκφραση του VEGF.
GPI	Ισομεράση της 6 φωσφορικής γλυκόζης	Διεγείρει την κινητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Αγγειογενετικά γονίδια που εμπλέκονται στο ΠΜ (συνέχεια)

Γονίδιο	Πρωτεΐνη	Λειτουργία πρωτεΐνης
IL-8	Ιντερλευκίνη-8	Χημειοτακτικός παράγοντας που ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα στο αγγειακό σύστημα του όγκου, προκειμένου να αρχίσει η αγγειογένεση.
ANGPT1	Αγγειοποιητίνη-1	Μεσολαβεί στις αλληλοεπιδράσεις ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στην περιβάλλουσα εξωκυττάρια ουσία και στο μεσέγγυμα. Μεσολαβεί στην ωρίμανση και σταθεροποίηση των αγγείων.
FGF-2	Fibroblast growth factor-2	Επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας.
MMP-9	Μεταλλοπρωτεΐνάση 9 της εξωκυττάριας ουσίας (μήτρας)	Συμβάλλει στην αγγειογενετική μετατροπή, μέσω διάσπασης της εξωκυττάριας ουσίας, επιτρέποντας έτσι τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την απελευθέρωση αγγειογενετικών κυτταροκινών.
TGFB	Transforming growth factor-β	Ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και άλλες λειτουργίες σε αρκετά είδη κυττάρων. Διεγείρει την παραγωγή του VEGF, καθώς και του αναστολέα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου (PAI-I), που εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση του αγγείου.
ANXA2	Ανεξίνη II	Ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και συμμετέχει σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Ρυθμίζει την ενεργότητα του tPA και συνεπώς την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου και άλλες αγγειογενετικές διαδικασίες.

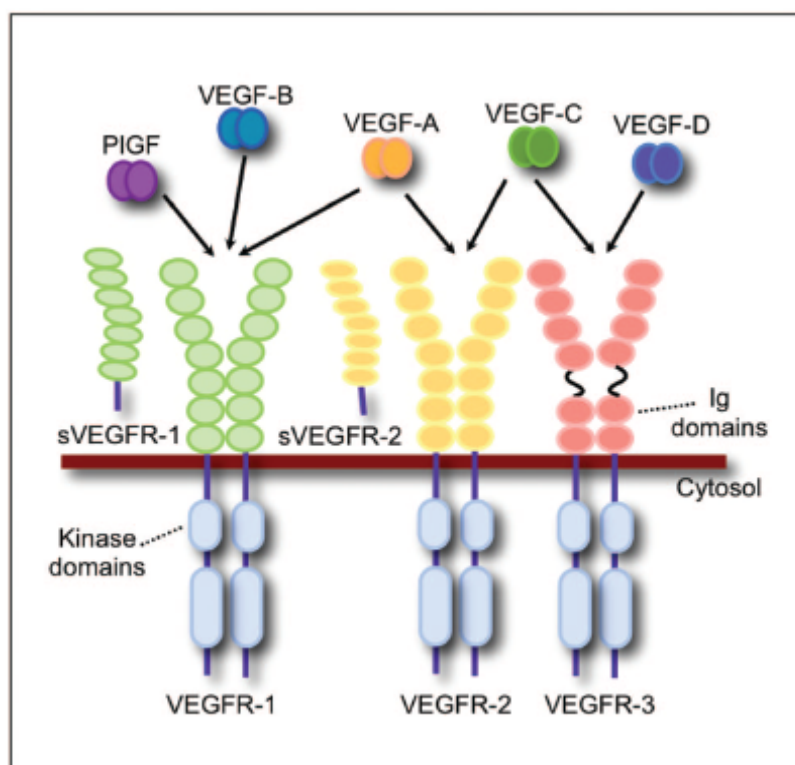
Τροποποιημένοι πίνακες από [4]

Τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα του μυελού εκφράζουν περισσότερα προ-αγγειογενετικά απ' ό,τι αντι-αγγειογενετικά γονίδια [49]. Συνεπώς, η αύξηση του αριθμού των πλασματοκυττάρων στο μυελό μπορεί να αυξήσει την αγγειογένεση. Παρολαυτά, στο ΠΜ φαίνεται να υπάρχει και παρεκκλίνουσα έκφραση των προαγγειακών, καθώς και ελάττωση της έκφρασης των αντι-αγγειογενετικών γονιδίων, συμβάλλοντας έτσι στην αυξημένη αγγειογένεση που διαπιστώνεται σε όλα τα στάδια της νόσου [4].

Οι εκκρινόμενες από τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα αγγειογενετικές κυτταροκίνες φαίνεται να έχουν πλειότροπες δράσεις (κυτταρική ανάπτυξη, μετανάστευση, διήθηση). Οι πιο σημαντικές από αυτές είναι ο VEGF-A και ο HGF [49].

1. VEGF (Vascular endothelial growth factor)

Η οικογένεια του VEGF συμμετέχει στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση αγγειακών και λεμφαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Σε αυτή την οικογένεια συμπεριλαμβάνονται ο VEGF-A, ο VEGF-B, ο VEGF-C, ο VEGF-D, ο placenta growth factor και 2 VEDF-like πρωτεΐνες.



Τα μέλη της οικογένειας VEGF και οι αντίστοιχοι υποδοχείς τους. (Από: Ruiz de Almodovar C, et al. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev.* 2009;89:607-648.)

Ο VEGF-A είναι κρίσιμος ρυθμιστής τόσο της φυσιολογικής, όσο και της νεοπλασματικής αγγειογένεσης. Ο hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) συνδέεται με τα hypoxic response elements (HRE) στην περιοχή του προαγωγού του γονιδίου του VEGF-A και έτσι ρυθμίζει την έκφρασή του. Η ρύθμιση της μεταγραφής του VEGF ρυθμίζεται και από άλλους παράγοντες, ανεξάρτητους του HIF-1α (Ras, β-κατενίνη). Η επαγωγή της έκφρασης του VEGF γίνεται από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α) και αυξητικούς παράγοντες (TGF-α, TGF-β, PDGF-BB, EGF, IGF-1). Άπαξ και εκφραστεί, μέρος της ποσότητας της πρωτεΐνης που παράγεται εκκρίνεται στην εξωκυττάρια ουσία, όπου και παραμένει και διατίθεται όταν απαιτηθεί.

Στη νεοπλασματική αγγειογένεση ο VEGF απελευθερώνεται κυρίως από τα νεοπλασματικά κύτταρα. Επίσης, απελευθερώνεται και από κύτταρα με τα οποία αυτά αλληλεπιδρούν, όπως ινοβλάστες και μακροφάγα. Η δράση του κατευθύνεται άμεσα στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι προ-αγγειογενετικές δράσεις του VEGF παρατηρούνται μετά τη σύνδεσή του με τον υποδοχέα VEGFR-2, ο οποίος είναι και υπεύθυνος για την αγγειογενετική δραστηριότητα. Η σύνδεση του συνδέτη με τον υποδοχέα, ο τελευταίος διμερίζεται και η τυροσινική κινάση του αυτοφωσφοριλιώνει τον υποδοχέα, ενεργοποιώντας τον. Ακολούθως ενεργοποιούνται πολλοί καταρράκτες σηματοδότησης. Έτσι, ο διπλασιασμός του DNA και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης των Ras-Raf-MEK-ERK και MAPK μονοπατιών, η επιβίωση μέσω της PI3 κινάσης και του AKT/PKB μονοπατιού και η μετανάστευση μέσω είτε του FAK και της παξιλίνης, είτε της PI3 κινάσης/AKT είτε του MAPK μονοπατιού. Το τελικό αποτέλεσμα της δράσης του VEGF είναι ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και η ρύθμιση της αγγειακής διαπερατότητας [61].

Στο ΠΜ, τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα εκκρίνουν κυρίως τον VEGF-A, ενώ ο VEGFR-2 υπερεκφράζεται στα μικροαγγεία του μυελού και σε μεμονωμένα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο VEGFR-1 υπερεκφράζεται στα στρωματικά κύτταρα του μυελού. Με αυτό τον τρόπο, ο VEGF-A διεγείρει τόσο τον πολλαπλασιασμό και την χημειοταξία των ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω του VEGFR-2, όσο και τον πολλαπλασιασμό των στρωματικών κυττάρων, μέσω του VEGFR-1. Από την άλλη, τα στρωματικά κύτταρα εκκρίνουν VEGF-C και VEGF-D και συνδέονται με τον υποδοχέα VEGFR-3 που εκφράζουν τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα,

δημιουργώντας έτσι την παρακρινή αγκύλη του VEGF στο ΠΙΜ [62]. Ανάμεσα στα μυελωματικά πλασματοκύτταρα και τα στρωματικά κύτταρα του μυελού υπάρχει αμοιβαία διέγερση, μέσω του VEGF και της IL-6: ο VEGF αυξάνει την παραγωγή της IL-6 από τα στρωματικά κύτταρα, αυξάνοντας έτσι έμμεσα την ανάπτυξη του μυελώματος, την αγγειογένεση και την επιβίωσή τους. Από την άλλη, η σύνδεση των μυελωματικών πλασματοκυττάρων με τα στρωματικά κύτταρα αυξάνει την παραγωγή VEGF από τα τελευταία και άμεσα την παραγωγή IL-6 [63].

2. HGF (Hepatocyte growth factor)

Είναι μια κυτταροκίνη με πλειότροπες δράσεις, που επάγει σύνθετες βιολογικές απαντήσεις στα κύτταρα-στόχους, σχετιζόμενες με την κινητικότητα, ανάπτυξη και μορφογένεση. Η έκφραση του HGF ρυθμίζεται από διάφορους πυρηνικούς υποδοχείς, όπως τον υποδοχέα οιστρογόνων και τους υποδοχείς PRAR-γ (peroxisome proliferators-activated receptors-γ), καθώς και από μεταγραφικούς ρυθμιστές, όπως η AP2 (activating protein 2), ο NF1 (nuclear factor 1), η SP1 (specificity protein 1), η SP3 και η C/EBP-β (CCAAT/enhancer binding protein-β). Ο HGF συνδέεται με το εξοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα του c-Met και ακολούθως ενεργοποιεί πολλά μονοπάτια:

- το Src/focal adhesion kinase (FAK), ρυθμίζοντας την κυτταρική σύνδεση και μετανάστευση,
- το p120/STAT3, ρυθμίζοντας την κλαδική μορφογένεση των κυττάρων,
- το PI3K/AKT, εμπλεκόμενο στην κυτταρική κινητικότητα και επιβίωση και
- το RAS/MEK, ρυθμίζοντας τη διασπορά και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Με αυτές τις δράσεις του τα ενδοθηλιακά κύτταρα διεγείρονται άμεσα (με κινητικές και μορφογενετικές διαδικασίες) και έμμεσα (μέσω ρύθμισης άλλων αγγειογενετικών παραγόντων) [4].

Επιπλέον, τόσο ο HGF όσο και ο υποδοχέας του c-Met εκφράζονται στα μυελωματικά πλασματοκύτταρα. Ο HGF φαίνεται να δρα στα μυελωματικά πλασματοκύτταρα ως παράγοντας πολλαπλασιασμού αλλά και προστασίας από την απόπτωση. Η συνδεκάνη-1, με την οποία συνδέεται αρχικά ο HGF, λειτουργεί ως συν-υποδοχέας και μεταφέρει το μήνυμα στον υποδοχέα c-Met. Αυξημένα επίπεδα

HGF στον ορό, κατά τη διάγνωση του ΠΜ, σχετίζονται με κακή πρόγνωση [41, 42]. Επιπλέον, ο συνδυασμός αυξημένων επιπέδων ορού του HGF και της συνδεκάνης-1 με αυξημένη MVD στο μυελό δίνει επίσης κακή πρόγνωση [64]. Τέλος τα επίπεδα, του HGF είναι αυξημένα στα προχωρημένα στάδια και σχετίζονται και με το στάδιο, αλλά και με κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην εξέλιξη της νόσου, IL-6 και TNF-α [41, 42].

3. FGF-2 (Fibroblast growth factor-2)

Ο FGF-2 επίσης έχει ένα σύνθετο ρόλο στην ανάπτυξη του όγκου, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση [65]. Έτσι, μπορεί να τροποποιήσει την έκφραση σημαντικών μορίων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, όπως της διάμεσης κολλαγενάσης, του uPA, του PAI-1, του uPAR και των β₁-ιντεγκρινών [66, 67]. Στο μυελωματικό μυελό ο FGF-2 παράγεται από τα πλασματοκύτταρα. Η δε έκφραση του φαίνεται να είναι ανάλογη του σταδίου της νόσου, δηλαδή εν τέλει του μυελωματικού φορτίου. Σε πειραματικό μοντέλο η αναστολή του προκαλεί επίσης αναστολή της αγγειογένεσης [68]. Φαίνεται, τέλος, ότι υπάρχει παρακρινής αλληλεπίδραση των μυελωματικών πλασματοκυττάρων και των στρωματικών κυττάρων του μυελού, μέσω αμοιβαίας διέγερσης του FGF-2 και της IL-6 [69].

4. MMP (Matrix metalloproteinases)

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (MMP) αποτελούν μια οικογένεια 25 ενζύμων, με κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Παράγονται από πολλούς τύπους κυττάρων [70]. Παίζουν ρόλο στην πρόοδο της μυελωματικής νόσου, στη διήθηση, στη μετάσταση και στην αγγειογένεση, κυρίως λόγω πρωτεολυτικής διάσπασης της εξωκυττάριας ουσίας και της βασικής μεμβράνης. Η διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας προκαλεί την απελευθέρωση συσσωρευμένων αυξητικών και αγγειογενετικών παραγόντων (VEGF, PDGF, bFGF), επάγοντας δομικές αλλαγές στη βασική μεμβράνη. Έτσι, επάγεται τελικά ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων [71]. Ταυτόχρονα, όμως, απελευθερώνονται και τμήματα του κολλαγόνου, που δρουν ανασταλτικά στην αγγειογενετική διαδικασία (ενδοστατίνη, αρρεστίνη, κανστατίνη, τουμστατίνη), που όταν συνδεθούν με τις ιντεγκρίνες στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων

ελαττώνουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευσή τους [72]. Φαίνεται λοιπόν ότι οι MMP, επάγοντας τη διάσπαση της βασικής μεμβράνης, προκαλούν τόσο προ-αγγειογενετικές όσο και αντι-αγγειογενετικές δράσεις [71].

Η MMP-2 είναι σημαντική για την αγγειογένεση και εκφράζεται περισσότερο στα μυελωματικά πλασματοκύτταρα σε σχέση με της MGUS και τα φυσιολογικά. Από την άλλη, η έκφρασή της είναι σταθερή στα διάφορα στάδια της μυελωματικής νόσου [73]. Επιπλέον, τα επίπεδα ορού της MMP-9 σχετίζονται με άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες (VEGF και HGF) και είναι προγνωστικοί και για το βαθμό οστικής συμμετοχής της νόσου [67].

Άλλες πρωτεΐνάσες, όπως οι ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) και οι ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin motif), επίσης εμπλέκονται στην αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας και στην πρωτεολυτική ενεργοποίηση των μεσολαβητών. Παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση αυξητικών παραγόντων και άλλων προφλεγμονωδών κυτταρικών και έτσι συμμετέχουν στη σειρά γεγονότων που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση και εν τέλει όλη τη σύνθετη διαδικασία της αγγειογένεσης [75]. Οι ADAM28 και ADAMTS6 υπερεκφράζονται στα φυσιολογικά μνημονικά B λεμφοκύτταρα και οι ADAM10 και ADAM19 στους φυσιολογικούς πλασμοβλάστες. Στο ΠΜ διαπιστώνεται παρεκκλίνουσα έκφραση των ADAMTS9 και ADAM23, η έκφραση της τελευταίας σχετιζόμενη με κακή πρόγνωση. Οι ADAMTS εκφράζονται επίσης σε χαμηλό βαθμό στα κύτταρα του μυελικού περιβάλλοντος [76]. Τέλος, η παραγόμενη από τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα ADAM9 συνδέεται, μέσω ιντεγκρίνης στους οστεοβλάστες και τους διεγείρει προς παραγωγή IL-6 [77].

5. Άλλες κυτταροκίνες

Πολλές άλλες κυτταροκίνες έχουν εμπλακεί στην αγγειογενετική διαδικασία στο μυελωματικό μυελό, όπως ο TNF-α [78], η Αγγειοποιητίνη-1 [79], ο SDF-1α [80], η MIP-1α [81] και η οστεοποντίνη, που επιπλέον εμπλέκεται στην επιβίωση των πλασματοκυττάρων [82, 83].

Ρυθμιστές της αγγειογένεσης

1. HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1)

Η υποξία αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για την αγγειογένεση και την πρόοδο της νόσου. Η κυτταρική απάντηση στην υποξία μεσολαβείται μέσω των HIF. Οι HIF αποτελούν ρόλους κλειδιά για το μεταβολισμό, πολλαπλασιασμό, μετανάστευση και διαφοροποίηση των νεοπλασματικών κυττάρων [84]. Στην οικογένεια των HIF υπάρχουν 3 μέλη. Ο HIF αποτελείται από μία α υπομονάδα (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF3 α) και μια β υπομονάδα (arylhydrocarbon receptor nuclear translocator- ARNT) [85]. Ο HIF-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που αποτελείται από μία HIF-1 α και μία HIF-1 β υπομονάδα. Κάτω από συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης εκφράζεται μόνο ο HIF-1 β , ενώ ο HIF-1 α διασπάται από το πρωτεάσωμα και συνεπώς είναι ανενεργός [86], ενώ στην υποξία ο HIF-1 α παραμένει σταθερός, συνδέεται με τον HIF-1 β , δημιουργώντας έτσι το λειτουργικό σύμπλεγμα του HIF-1, ικανό να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας. Αυτή η ρύθμιση της σταθερότητας του HIF-1 α από την κατάσταση οξυγόνωσης πραγματοποιείται λόγω εγκατάστασής του σε περιοχή με διαβάθμιση εξαρτώμενη από το οξυγόνο. Αυτή η περιοχή μεσολαβεί και στην οξυγονοεξαρτώμενη διάσπασή του. Σε νεοπλασματικά κύτταρα συχνά ο HIF-1 α είναι ενεργοποιημένος ακόμα και σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης, λόγω ενεργοποίησης ογκογονιδίων ή απώλειας ογκοκατασταλτικών γονιδίων [87].

Σε γενικές γραμμές ο φυσιολογικός ανθρώπινος μυελός είναι υποξικός (στα μυελικά αναρροφήματα η $pO_2=54.9\text{mmHg}$, που αντιστοιχεί στο 7.2% της ατμοσφαιρικής πίεσης, με μέσο κορεσμό $O_2=87.5\%$). Ομοίως και ο μυελωματικός μυελός είναι υποξικός και συνεπώς ο HIF-1 α εκφράζεται έντονα στα πλασματοκύτταρα [88].

Η υποξία επίσης μπορεί να αλλάξει την έκφραση και άλλων πρωτεϊνών, όπως του SDF-1 α (Stromal-cell derived factor-1 α), μιας χυμοκίνης που συνδέεται κυρίως με τον CXCR4. Η έκφραση του SDF-1 α στα μυελωματικά πλασματοκύτταρα ρυθμίζεται κυρίως από τον HIF-2 [89]. Επίσης, στα κύτταρα με έλλειψη του παράγοντα von Hippel-Lindau, οι HIF-1 α υπομονάδες είναι συνεχώς σταθερές και συνεπώς ο HIF-1 σταθερά ενεργοποιημένος. Όταν ο von Hippel-Lindau επανεκφραστεί, αποκαθίσταται η αστάθεια. Στο ΠΜ το γονίδιο του vHL είναι συχνά μεθυλιωμένο και συνεπώς σιωπηλό, οπότε και η διάσπαση του HIF-1 α ελαττωμένη,

οδηγώντας έτσι στην αυξημένη αγγειογένεση του μυελού [89]. Ο HIF-1 δρα μέσω του c-Myc μονοπατιού [86].

2. c-Myc

Το c-Myc είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο, έχει δράση μεταγραφικού παράγοντα, και σχετίζεται με την απόπτωση και την απώλεια διαφοροποίησης [90]. Ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διπλασιασμό, ανάπτυξη, διαφοροποίηση και απόπτωση. Η έκφραση του c-Myc επάγεται άμεσα από πολλά μιτογόνα και καταστέλλεται κατά την κυτταρική διαφοροποίηση. Φυσιολογικά το c-Myc ρυθμίζει το επιδιορθωτικό σύστημα του DNA [91]. Το απορυθμισμένο c-Myc (ογκογενετικό c-Myc) ανεξαρτητοποιείται από εξωτερικά σήματα και έχει εμπλακεί σε πολλές ανθρώπινες κακοήθειες, όπως το λέμφωμα Burkitt [92]. Στο ΠΜ η ανίχνευσή του σχετίζεται με κακή πρόγνωση, ενώ υπάρχει σχέση ανάμεσα στο ογκογενετικό c-Myc και την έκφραση HIF-1 και παραγωγή VEGF. Έτσι, τόσο το c-Myc όσο και ο HIF-1α είναι αυξημένα σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης, επηρεάζοντας έτσι και την έκφραση του VEGF και προάγοντας έτσι την αγγειογενετική δραστηριότητα [93]. Επιπλέον, διάφορα αντινεοπλασματικά φάρμακα (αδαφωστίνη, bortezomib, λεναλιδομίδη, enzastaurin) μπορούν να ελαττώσουν, μέσω του c-Myc, τα επίπεδα του HIF-1 στα μυελωματικά πλασματοκύτταρα, ελαττώνοντας την παραγωγή και έκκριση VEGF.

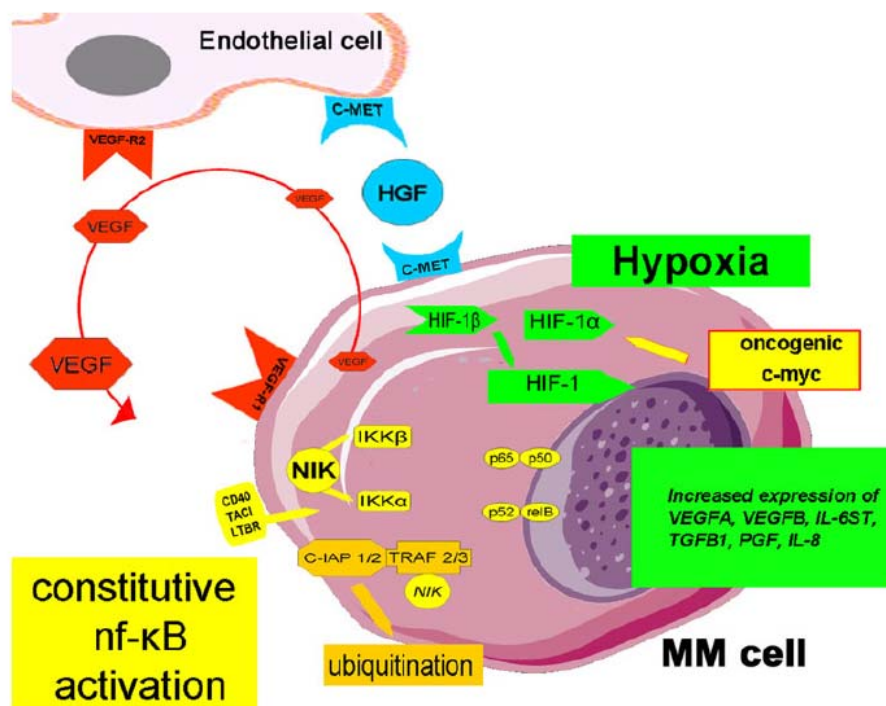
3. Μονοπάτι του NF-κB (Nuclear factor-κ B)

Ο NF-κB είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική απάντηση της υποξίας και σε διαδικασίες που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αγγειογένεση και μετάσταση [94]. Το μονοπάτι του NF-κB είναι σημαντικό στη βιολογία του ΠΜ και παραμένει συνεχώς ενεργοποιημένο, λόγω γενετικών αλλαγών και ενεργοποιητικών σημάτων από το μικροπεριβάλλον [95]. Στα μυελωματικά πλασματοκύτταρα διαπιστώνεται, σε διάφορες συχνότητες, αυξημένη δραστηριότητα της επαγόμενης από τον NF-κB κινάσης (NIK), του CD40, του υποδοχέα της λεμφοτοξίνης-B και του TAC1 και ελαττωμένη δραστηριότητα του παράγοντα 3 σχετιζόμενου με τον TNF (TRAF3), του TRAF2 και του CYLD. Αντίθετα, σπάνια διαπιστώνονται ανωμαλίες που τροποποιούν άμεσα τους μεταγραφικούς παράγοντες του NF-κB, προκύπτοντας υπερέκφραση του NF-κB p50 ή παραγωγή της ισομορφής NF-κB p100, που εισέρχεται εύκολα στον πυρήνα.

Φυσιολογικά, η κινάση NIK ενεργοποιεί τόσο το κλασικό όσο και το εναλλακτικό μονοπάτι του NF-κB και διασπάται από τις λιγκάσες c-IAP1 και c-IAP2, αφού συνδεθεί μαζί τους μέσω των TRAF2 και TRAF3. Η NIK μπορεί να υπερεκφράζεται είτε λόγω ενίσχυσης ή αντιμεταθέσεων, είτε λόγω ελαττωμένης διάσπασης οφειλόμενης σε αδρανοποιητικές μεταλλάξεις στα γονίδια των TRAF3, c-IAP1 και c-IAP2 [95].

Η σύνδεση του HIF-1α με τον NF-κB έχει περιγραφεί και σε άλλες κακοήθειες [96], όπως το λέμφωμα, το μελάνωμα και ο καρκίνος του πνεύμονα. Τα λεμφωματικά κύτταρα, αντίθετα με τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα, εκφράζουν τον HIF-1α. Η αναστολή του NF-κB καταστέλλει άμεσα την έκφραση του HIF-1α, δείχνοντας έτσι ότι ο NF-κB ρυθμίζει εν μέρει τον HIF-1α [97].

Στο παρακάτω σχήμα [4], φαίνονται οι ενδοκυττάρειες διαδικασίες που οδηγούν στην αγγειογένεση και στην ανάπτυξη του όγκου, με έμφαση στην ενεργοποίηση του NF-κB και στην υποξία. Η υποξία καταργεί την εξαρτώμενη από το οξυγόνο διάσπαση του HIF-1α, σχηματίζοντας έτσι, μαζί με τον HIF-1β, το σύμπλεγμα HIF-1. Αυτός δρα ως μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιεί γονίδια που εμπλέκονται στην αγγειογένεση και στην επιβίωση των κυττάρων του όγκου. Στο ΠΜ το μονοπάτι του NF-κB είναι συνεχώς ενεργοποιημένο λόγω γενετικών αλλαγών και ενεργοποίησης από το μυελικό μικροπεριβάλλον.



Η αγγειογένεση ως θεραπευτικός στόχος

Οι καινούριοι αντιμυελωματικοί παράγοντες (η θαλιδομίδη και τα παράγωγά της: λεναλιδομίδη και πομαλιδομίδη και ο αναστολέας του πρωτεασώματος bortezomib) έχουν αποδεδειγμένα αντιαγγειογενετική δράση.

1. Θαλιδομίδη

Αναστέλλει την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω VEGF, bFGF και άλλων προαγγειακών παραγόντων [98]. Επίσης αναστέλλει την έκφραση των VEGF, HGF, bFGF, IGF-1 και Ang-2 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [99].

2. Λεναλιδομίδη

Είναι δυνητικό ανάλογο της θαλιδομίδης, με παρόμοια χημική δομή, αλλά με διαφορετική τοξικότητα. Έτσι ελαττώνει σημαντικά την MVD [100], αναστέλλει ισχυρά την έκφραση του HIF-1α [101], ελαττώνει τη μετάδοση του σήματος VEGF/VEGFR2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, περιορίζοντας έτσι τη μετανάστευσή τους και την αγγειογένεση [102]. Τέλος, αναστέλλει τη δραστηριότητα της p65 υπομονάδας του NF-κB στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα του μυελού.

3. Bortezomib

Είναι αναστολέας του πρωτεασώματος και παρεμβαίνει ειδικά στο 26S πρωτεάσωμα, που είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τη μεταγραφή, τον κυτταρικό κύκλο και μεταβολισμό. Επιδρά άμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα στο μυελωματικό μυελό (αναστολή πολλαπλασιασμού, χημειοταξίας, προσκόλλησης στη φιβρονεκτίνη) και καταστέλλει άμεσα γονίδια προ-αγγειογενετικών παραγόντων (VEGF, IL-6, IGF-1 και Ang) [103].

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Το μυελικό μικροπεριβάλλον είναι ένας σύνθετος χώρος, ευνοϊκός για την ανάπτυξη της μυελωματικής νόσου. Όταν τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα εγκατασταθούν σε αυτόν, αλληλεπιδρούν μαζί του, χρησιμοποιώντας τα στοιχεία του, προκειμένου ο νεοπλασματικός κλώνος να αναπτυχθεί και στη συνέχεια να επεκταθεί. Είναι δε τόσο σημαντικός ο ρόλος του, ώστε προτείνεται ότι αυτό είναι εν τέλει ο κύριος υπεύθυνος για την εξέλιξη της μυελωματικής νόσου. Ένα σημαντικό στοιχείο της συνεισφοράς του μικροπεριβάλλοντος στην εξέλιξη της μυελωματικής νόσου είναι η συμμετοχή του προϋπάρχοντος αγγειακού δικτύου για την επέκτασή του, προκειμένου να διευκολυνθεί η οξυγόνωση και η παροχή τροφής στον αναπτυσσόμενο όγκο. Όμως, ο ρόλος της αγγειογένεσης είναι πιο σύνθετος. Προκειμένου να αναπτυχθούν τα καινούρια αγγεία, παράγονται πολλοί παράγοντες, τόσο από τα νεοπλασματικά, όσο και από τα φυσιολογικά κύτταρα του περιβάλλοντος. Κι έτσι, αυτοί οι παράγοντες δρουν ευοδωτικά, τόσο για την επέκταση του αγγειακού δικτύου, που πλέον προσφέρει τροφή και οξυγόνο στον αναπτυσσόμενο όγκο και που τελικά αναπτύσσεται και επεκτείνεται, όσο και για την άμεση ανάπτυξη του όγκου. Η δράση των αγγειογενετικών παραγόντων στα μυελωματικά πλασματοκύτταρα είναι πλειότροπη: συμπεριφέρονται ως αυξητικοί και αντιαποπτωτικοί παράγοντες, συμβάλλουν στην ανάπτυξη της οστικής νόσου και έμμεσα τροποποιούν περισσότερο το μικροπεριβάλλον, ώστε τελικά δημιουργείται ένας αυτοενισχυόμενος κύκλος.

Τα τελευταία χρόνια, η ευρεία χορήγηση των καινούριων θεραπειών, με ειδική δράση στο μυελικό μικροπεριβάλλον, γνωστών και ως ανοσορυθμιστικών παραγόντων, έχει αλλάξει λίγο την πορεία της μυελωματικής νόσου. Παρολαυτά, η μυελωματική νόσος παραμένει ανίατη και αυτό θα σήμαινε ότι χρειάζονται επιπλέον πληροφορίες για τη βιολογία του μυελώματος ώστε να δημιουργηθούν καινούριοι τρόποι παρέμβασης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

1. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 2009;113:5412-5417.
2. Caers J, Van Valckenborgh E, Menu E, et al. Unravelling the biology of multiple myeloma disease: cancer stem cells, acquired intracellular changes and interactions with the surrounding micro-environment. *Bull Cancer*. 2008 ;95:301-313.
3. Mattioli M, Agnelli L, Fabris S, et al. Gene expression profiling of plasma cell dyscrasias reveals molecular patterns associated with distinct IGH translocations in multiple myeloma. *Oncogene*. 2005;24:2461-2473.
4. Otjacques E, Binsfeld M, Noel A, et al. Biological aspects of angiogenesis in multiple myeloma. *Int J Hematol*. 2011;94:505-518.
5. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:73-91.
6. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386:671-674.
7. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Vacca A. Endothelial progenitor cells in health and disease. *Histol Histopathol*. 2005;20:1351-1358.
8. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86:353-364.
9. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, et al. The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia*. 2007;21:44-52.
10. Vacca A, Ribatti D. Angiogenesis and vasculogenesis in multiple myeloma: role of inflammatory cells. *Recent Results Cancer Res*. 2011;183:87-95.
11. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1994;87:503-508.
12. Bergsagel D. The incidence and epidemiology of plasma cell neoplasms. *Stem Cells*. 1995;13 Suppl 2:1-9.
13. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: emphasis on risk factors for progression. *Br J Haematol*. 2007;139:730-743.
14. Decaux O, Lodé L, Minvielle S, Avet-Loiseau H. Genetic abnormalities in multiple myeloma: role in oncogenesis and impact on survival. *Rev Med Interne*. 2007;28:677-681.
15. Bergsagel PL, Kuehl WM. Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunol Rev*. 2003;194:96-104.
16. Kumar S, Rajkumar SV, Greipp PR, Witzig TE. Cell proliferation of myeloma plasma cells: comparison of the blood and marrow compartments. *Am J Hematol*. 2004;77:7-11.
17. Alexandrakis MG, Passam FH, Dambaki C, et al. The relation between bone marrow angiogenesis and the proliferation index Ki-67 in multiple myeloma. *J Clin Pathol*. 2004;57:856-860.
18. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2006;354:1362-1369.

19. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med.* 2002;346:564-569.
20. Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, et al., editors. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2007.
21. Cardis E, Vrijheid M, Blettner M et al. The 15-Country Collaborative Study of Cancer Risk among Radiation Workers in the Nuclear Industry: estimates of radiation-related cancer risks. *Radiat Res.* 2007 Apr;167(4):396-416.
22. Hatcher JL, Baris D, Olshan AF et al. Diagnostic radiation and the risk of multiple myeloma (United States). *Cancer Causes Control.* 2001 Oct;12(8):755-61.
23. Baris D, Silverman DT, Brown LM, et al. Occupation, pesticide exposure and risk of multiple myeloma. *Scand J Work Environ Health.* 2004;30:215-222.
24. Lee WJ, Baris D, Järholm B, et al. Multiple myeloma and diesel and other occupational exposures in Swedish construction workers. *Int J Cancer.* 2003;107:134-138.
25. Landgren O, Linet MS, McMaster ML, et al. Familial characteristics of autoimmune and hematologic disorders in 8,406 multiple myeloma patients: a population-based case-control study. *Int J Cancer.* 2006;118:3095-3098.
26. Hosgood HD 3rd, Baris D, Zahm SH, et al. Diet and risk of multiple myeloma in Connecticut women. *Cancer Causes Control.* 2007;18:1065-1076.
27. Brown EE, Lan Q, Zheng T, et al. Common variants in genes that mediate immunity and risk of multiple myeloma. *Int J Cancer.* 2007;120:2715-2722.
28. Dring AM, Davies FE, Rollinson SJ et al. Interleukin 6, tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha polymorphisms in monoclonal gammopathy of uncertain significance and multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2001;112:249-251.
29. Lemaire M, Deleu S, De Bruyne E, et al. The microenvironment and molecular biology of the multiple myeloma tumor. *Adv Cancer Res.* 2011;110:19-42.
30. Bakkus MH, Heirman C, Van Riet I, et al. Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intracлонаl variation. *Blood.* 1992;80:2326-2335.
31. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood.* 2007;109:3489-3495.
32. Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene.* 2001;20:5611-5622.
33. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell.* 2007;12:131-44.
34. Vande Broek I, Vanderkerken K, Van Camp B, Van Riet I. Extravasation and homing mechanisms in multiple myeloma. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25:325-334.
35. Sanz-Rodríguez F, Hidalgo A, Teixidó J. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood.* 2001;97:346-351.
36. Van Valckenborgh E, Croucher PI, De Raeve H, et al. Multifunctional role of matrix metalloproteinases in multiple myeloma: a study in the 5T2MM mouse model. *Am J Pathol.* 2004;165:869-878.

37. Vande Broek I, Asosingh K, Allegaert V, et al. Bone marrow endothelial cells increase the invasiveness of human multiple myeloma cells through upregulation of MMP-9: evidence for a role of hepatocyte growth factor. *Leukemia*. 2004;18:976-982.
38. Klein B, Seckinger A, Moehler T, Hose D. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: chromosomal aberrations, changes in gene expression, cytokine networks, and the bone marrow microenvironment. *Recent Results Cancer Res*. 2011;183:39-86.
39. Jelinek DF, Witzig TE, Arendt BK. A role for insulin-like growth factor in the regulation of IL-6-responsive human myeloma cell line growth. *J Immunol*. 1997;159:487-496.
40. Standal T, Borset M, Lenhoff S, et al. Serum insulinlike growth factor is not elevated in patients with multiple myeloma but is still a prognostic factor. *Blood*. 2002;100:3925-3929.
41. Alexandrakis MG, Passam FH, Sfiridaki A, et al. Elevated serum concentration of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma: correlation with markers of disease activity. *Am J Hematol*. 2003;72:229-233.
42. Alexandrakis MG, Sfiridaki A, Miyakis S, et al. Relationship between serum levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor and matrix metalloproteinase-9 with biochemical markers of bone disease in multiple myeloma. *Clin Chim Acta*. 2007;379:31-35.
43. Fragioudaki M, Boula A, Tsirakis G et al. B cell-activating factor: its clinical significance in multiple myeloma patients. *Ann Hematol*. 2012 Apr 21. [Epub ahead of print]
44. Fragioudaki M, Tsirakis G, Pappa CA, et al. Serum BAFF levels are related to angiogenesis and prognosis in patients with multiple myeloma. *Leuk Res*. 2012;36:1004-1008.
45. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*. 1998;91:3-21.
46. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23:6333-6338.
47. Li WW, Hutnik M, Gehr G. Antiangiogenesis in haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2008;143:622-631.
48. Ribatti D, Scavelli C, Roccaro AM, et al Hematopoietic cancer and angiogenesis. *Stem Cells Dev*. 2004;13:484-495.
49. Hose D, Moreaux J, Meissner T, Seckinger A, et al. Induction of angiogenesis by normal and malignant plasma cells. *Blood*. 2009;114:128-143.
50. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009;19:329-337.
51. Vacca A, Ribatti D. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia*. 2006;20:193-199
52. De Raeve H, Van Marck E, Van Camp B, Vanderkerken K. Angiogenesis and the role of bone marrow endothelial cells in haematological malignancies. *Histol Histopathol*. 2004;19:935-950
53. Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. *Leuk Res*. 2007;31:439-444.
54. Vacca A, Ria R, Semeraro F et al. Endothelial cells in the bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood*. 2003;102:3340-3348.
55. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967.

56. Zhang H, Vakil V, Braunstein M, et al. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood*. 2005;105:3286-3294.
57. Dominici M, Campioni D, Lanza F, et al. Angiogenesis in multiple myeloma: correlation between in vitro endothelial colonies growth (CFU-En) and clinical-biological features. *Leukemia*. 2001;15:171-176.
58. Wang X, Zhang Z, Yao C. Angiogenic activity of mesenchymal stem cells in multiple myeloma. *Cancer Invest*. 2011;29:37-41.
59. Caers J, Deleu S, Belaid Z, et al. Neighboring adipocytes participate in the bone marrow microenvironment of multiple myeloma cells. *Leukemia*. 2007;21:1580-1584.
60. Scavelli C, Nico B, Cirulli T, et al. Vasculogenic mimicry by bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *Oncogene*. 2008;27:663-674.
61. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005;9:777-794.
62. Vacca A, Ria R, Ribatti D, et al. A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. *Haematologica*. 2003;88:176-185.
63. Dankbar B, Padró T, Leo R, et al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood*. 2000;95:2630-2636.
64. Andersen NF, Standal T, Nielsen JL, et al. Syndecan-1 and angiogenic cytokines in multiple myeloma: correlation with bone marrow angiogenesis and survival. *Br J Haematol*. 2005;128:210-217.
65. Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res*. 1992;59:115-165
66. Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev*. 1993;73:161-195.
67. Ribatti D, Leali D, Vacca A, et al. In vivo angiogenic activity of urokinase: role of endogenous fibroblast growth factor-2. *J Cell Sci*. 1999;112 :4213-4221.
68. Vacca A, Ribatti D, Presta M, et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood*. 1999;93:3064-3073.
69. Bisping G, Leo R, Wenning D, et al. Paracrine interactions of basic fibroblast growth factor and interleukin-6 in multiple myeloma. *Blood*. 2003;101:2775-2783.
70. Noël A, Jost M, Maquoi E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19:52-60.
71. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):422-433.
72. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res*. 2005;65:3967-3979.
73. Vacca A, et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood*. 1999; 93:3064-3073.
74. Alexandrakis MG, et al. Relationship between serum levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor and matrix metalloproteinase-9 with biochemical markers of bone disease in multiple myeloma. *Clin Chim Acta*. 2007;379: 31-35.

75. Rocks N, et al. Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. *Biochimie*. 2008;90:369–379.
76. Bret C, et al. Gene expression profile of ADAMs and ADAMTSs metalloproteinases in normal and malignant plasma cells and in the bone marrow environment. *Exp Hematol*. 2011;39:546–557.
77. Karadag A, Zhou M, Croucher PI. ADAM-9 (MDC-9/meltringamma), a member of the a disintegrin and metalloproteinase family, regulates myeloma-cell-induced interleukin-6 production in osteoblasts by direct interaction with the alpha(v)beta5 integrin. *Blood*. 2006;107:3271–3278.
78. Hideshima T, et al. Novel therapies targeting the myeloma cell and its bone marrow microenvironment. *Semin Oncol*. 2001;28:607–612.
79. Giuliani N, et al. Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease. *Blood*. 2002;100:4615–4621.
80. Martin SK, et al. Tumor angiogenesis is associated with plasma levels of stromal-derived factor-1alpha in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2006;12:6973–6977.
81. Terpos E, et al. Significance of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha) in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2005;46:1699–707.
82. Caers J, et al. The involvement of osteopontin and its receptors in multiple myeloma cell survival, migration and invasion in the murine 5T33MM model. *Br J Haematol*. 2006;132:469–477.
83. Colla S, et al. Human myeloma cells express the bone regulating gene Runx2/Cbfa1 and produce osteopontin that is involved in angiogenesis in multiple myeloma patients. *Leukemia*. 2005; 19:2166–2176.
84. Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ*. 2008;15:678–685.
85. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂regulated gene expression. *FASEB J*. 2002;16:1151–1162.
86. Yoo YG, et al. An essential role of the HIF-1alpha-c-Myc axis in malignant progression. *Ann NY Acad Sci*. 2009;1177:198–204.
87. Hu Y, et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor-1 function enhances the sensitivity of multiple myeloma cells to melphalan. *Mol Cancer Ther*. 2009;8:2329–2338.
88. Martin SK, et al. Hypoxia-inducible factor-2 is a novel regulator of aberrant CXCL12 expression in multiple myeloma plasma cells. *Haematologica*. 2010;95:776–784.
89. Hatzimichael E, et al. Von Hippel–Lindau methylation status in patients with multiple myeloma: a potential predictive factor for the development of bone disease. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009;9:239–242.
90. Eischen CM, et al. Disruption of the ARF-Mdm2–p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev*. 1999;13:2658–2669.
91. Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:101–133.
92. Menssen A, Hermeking H. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:6274–6279.
93. Zhang J, et al. Targeting angiogenesis via a c-Myc/hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent pathway in multiple myeloma. *Cancer Res*. 2009;69:5082–5090.

94. Karashima T, et al. Nuclear factor-kappaB mediates angiogenesis and metastasis of human bladder cancer through the regulation of interleukin-8. *Clin Cancer Res.* 2003;9:2786–2797.
95. Annunziata CM, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell.* 2007;12:115–130.
96. van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha by NF-kappaB. *Biochem J.* 2008;412:477–484.
97. Qiao Q, et al. NF-kappaB mediates aberrant activation of HIF-1 in malignant lymphoma. *Exp Hematol.* 2010;38:1199–1208.
98. D'Amato RJ, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:4082–4085.
99. Vacca A, et al. Thalidomide downregulates angiogenic genes in bone marrow endothelial cells of patients with active multiple myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2005;23:5334–5346.
100. Lentzsch S, et al. Immunomodulatory analogs of thalidomide inhibit growth of Hs Sultan cells and angiogenesis in vivo. *Leukemia.* 2003;17:41–44.
101. Lu L, et al. The anti-cancer drug lenalidomide inhibits angiogenesis and metastasis via multiple inhibitory effects on endothelial cell function in normoxic and hypoxic conditions. *Microvasc Res.* 2009;77:78–86.
102. De Luisi A, et al. Lenalidomide restrains motility and overangiogenic potential of bone marrow endothelial cells in patients with active multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2011;17:1935–1946.
103. Roccaro AM, et al. Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res.* 2006;66:184–191.

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η διερεύνηση του ρόλου των διαλυτών CD105, CD40L αλλά και άλλων αγγειογενετικών παραγόντων στην παθοφυσιολογία της μυελωματικής νόσου. Γι' αυτό το λόγο μετρήθηκαν στον ορό διάφοροι αγγειογενετικοί παράγοντες, καθώς και παράγοντες που σχετίζονται με τη δραστηριότητα της νόσου. Οι μετρήσεις αυτών των παραγόντων έγινε κατά τη διάγνωση του ΠΜ, δηλαδή πριν από την έναρξη οποιασδήποτε θεραπευτικής παρέμβασης, καθώς και μετά την ολοκλήρωση των θεραπειών, όταν οι ασθενείς είχαν σταθεροποιήσει τη νόσο και είχαν μπει στην φάση του πλατώ. Σε αυτές τις φάσεις επίσης έγιναν και οστεομυελικές βιοψίες, προκειμένου να εκτιμηθεί το φορτίο της νόσου, μετρώντας το ποσοστό της πλασματοκυτταρικής διήθησης, ο ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με εκτίμηση της έκφρασης του Ki-67 και του PCNA και τέλος η καθαυτή αγγειογενετική δραστηριότητα, εκτιμώντας τη μικροαγγειακή πυκνότητα. Τα επίπεδα των μετρούμενων παραγόντων συσχετίστηκαν μεταξύ τους, με το κλινικό στάδιο της νόσου και σε ορισμένες περιπτώσεις και με την επιβίωση των ασθενών.

Τα ερωτήματα που επιχείρησε να απαντήσει η διατριβή είναι:

1. Υπάρχει διαφορά στη συγκέντρωση των κυκλοφορούντων αγγειογενετικών μορίων σε πάσχοντες από ΠΜ σε σχέση με υγιείς;
2. Μεταβάλλεται η συγκέντρωση αυτών των αγγειογενετικών παραγόντων μετά από επιτυχή θεραπεία του ΠΜ;
3. Υπάρχει συσχέτιση αυτών των αγγειογενετικών παραγόντων με την αγγειογενετική δραστηριότητα στο μυελό;
4. Υπάρχει συσχέτιση αυτών των παραγόντων με τη δραστηριότητα και το φορτίο της νόσου;
5. Υπάρχει προγνωστική αξία στη μέτρηση κάποιων παραγόντων που εμπλέκονται, άμεσα ή έμμεσα, στην αγγειογένεση της μυελωματικής νόσου;

Η μελέτη σχεδιάστηκε προκειμένου να εκτιμηθούν ανεξάρτητα διαφορετικοί αγγειογενετικοί παράγοντες, σε τέσσερα στάδια:

1. Μέτρηση των επιπέδων στον ορό του αγγειογενετικού δείκτη **CD105**, σε συνδυασμό με τη μέτρηση των επιπέδων του συνδέτη του, **TGF-β1**, την άμεση εκτίμηση της **αγγειογενετικής δραστηριότητας στο μυελό**, με εκτίμηση της μικροαγγειακής πυκνότητάς του, και την εκτίμηση της **δραστηριότητας της νόσου**, μέσω μέτρησης των επιπέδων IL-6 στον ορό και της έκφρασης στο μυελό του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 PI.
2. Μέτρηση των επιπέδων στον ορό του δείκτη **CD40L**, σε συνδυασμό με την εκτίμηση της **αγγειογενετικής δραστηριότητας στο μυελό**, με μέτρηση των επιπέδων ορού των γνωστών αγγειογενετικών παραγόντων HGF και VEGF και την εκτίμηση της **δραστηριότητας της νόσου**, μέσω μέτρησης των επιπέδων IL-6 στον ορό, της πλασματοκυτταρικής διήθησης και της έκφρασης στο μυελό του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 PI.
3. Μέτρηση των επιπέδων στον ορό του αγγειογενετικού δείκτη **PDGF-AB**, σε συνδυασμό με την εκτίμηση της **αγγειογενετικής δραστηριότητας στο μυελό**, τόσο με την άμεση εκτίμηση της μικροαγγειακής πυκνότητας του μυελού, όσο και με τη μέτρηση των επιπέδων ορού των γνωστών αγγειογενετικών παραγόντων ANG και bFGF και την εκτίμηση της **δραστηριότητας της νόσου**, μέσω μέτρησης των επιπέδων ορού της IL-6, της LDH και της β2-μυοσφαιρίνης
4. Μέτρηση των επιπέδων στον ορό των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, με δυνητική έμμεση αγγειογενετική δράση, **IL-1β, IL-8, IL-6, MIP-1α** σε συνδυασμό με την εκτίμηση **δραστηριότητας της νόσου**, μέσω μέτρησης της LDH ορού και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού PCNA στο μυελό των οστών.

Η συλλογή και η μέτρηση των ορών πραγματοποιήθηκε μεταξύ του 2005 και 2009. Η λήψη των οστεομυελικών βιοψιών και η εκτίμηση του βαθμού διήθησης, της μικροαγγειακής πυκνότητας και της έκφρασης των PCNA και Ki-67 PI, έγιναν μεταξύ του 2005 και 2010.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

α. Ασθενείς

Συνολικά μελετήθηκαν 65 ασθενείς με ΠΜ (διάμεση ηλικία 64.7 έτη, εύρος 34-84) πριν από την έναρξη οποιασδήποτε θεραπείας καθώς και 25 άτομα με MGUS (11 άνδρες, 14 γυναίκες, 14 IgG, 8 IgA, 3 ελαφρών αλυσίδων, με διάμεση ηλικία 54.8 έτη, εύρος 44-72).

Η διάγνωση του ΠΜ έγινε με βάση τα κριτήρια της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (Πίνακας 1 Παραρτήματος) και η σταδιοποίηση έγινε με βάση τα κριτήρια των Durie-Salmon και με βάση το Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης (ISS) (Πίνακας 2 Παραρτήματος).

Οι ασθενείς επίσης επανασταδιοποιήθηκαν και μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας. Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας έγινε τόσο με βάση τα κριτήρια ανταπόκρισης στη θεραπεία (Πίνακας 3 Παραρτήματος) που προτείνει η διεθνής ομάδα μελέτη του μυελώματος (IMWG), όσο και με την εκτίμηση της φάσης του πλατώ, δηλαδή στην περίπτωση που διαπιστώθηκε ελάττωση της M-πρωτεΐνης >50% στον ορό ή στα ούρα 24ώρου, με ταυτόχρονη αποκατάσταση της αιμοποίησης, και διατήρησή τους για περισσότερο από 6 μήνες. Τα κριτήρια της IMWG εκτιμούν κυρίως το φορτίο της νόσου, προτείνοντας ακόμα και την πλήρη ύφεση της νόσου, κάτι που έγινε πλέον εφικτό μετά την εφαρμογή των καινούριων θεραπειών. Η φάση του πλατώ, από την άλλη, εκτιμά κυρίως και μη ειδικά τη δραστηριότητα της νόσου. Οι ασθενείς που μελετήθηκαν στη φάση του πλατώ ήταν σε CR, VGPR ή PR.

Κριτήρια αποκλεισμού ήταν η συνύπαρξη άλλης φλεγμονώδους νόσου ή κακοήθειας, η ανάπτυξη ΠΜ επί εδάφους γνωστής ανοσοκαταστολής (αυτοάνοση νόσος, λήψη ανοσοκατασταλτικών, HIV λοίμωξη), η νεφρική και η ηπατική ανεπάρκεια.

Τέλος, μελετήθηκαν και 30 εθελοντές μάρτυρες, αιματολογικά υγιείς (18 άνδρες και 12 γυναίκες, διάμεσης ηλικίας 62.3 έτη, εύρος 32- 85). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων στην κατανομή ηλικίας και φύλου, όπως αποδείχθηκε με την εφαρμογή του στατιστικού κριτηρίου χ^2 . Από τους μάρτυρες και όλους τους ασθενείς που εντάχθηκαν στη μελέτη, ελήφθη συγκατάθεση σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Helsinki.

Τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΠΜ, που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ	%
Φύλο		
Άνδρες	34	52.3
Γυναίκες	31	47.7
Στάδιο νόσου		
<i>Κατά Durie-Salmon</i>		
I	16	24.6
II	28	43
III	21	32.3
<i>Κατά ISS</i>		
I	16	24.6
II	30	46.1
III	19	29.2
Μ-πρωτεΐνη		
IgG	34	52.3
IgA	22	33.8
Ελαφρών αλύσων	9	13.8
Ανταπόκριση		
CR	8	20
VGPR	14	35
PR	18	45

β. Υλικά

Στους ασθενείς, ύστερα από συγκατάθεση και πριν από την έναρξη οποιασδήποτε αντιμυελωματικής θεραπείας (χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, διφωσφονικά, κορτικοειδή), και στους μάρτυρες, έγινε συλλογή δείγματος περιφερικού αίματος, όγκου 20-30 ml. Σε όλες τις περιπτώσεις είχε αποκλεισθεί η παρουσία φλεγμονής ή κάποιου τραυματισμού. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Ακολούθως, έγινε διαχωρισμός του ορού, ο οποίος και μοιράστηκε σε επιμέρους σωληνάκια και φυλάχθηκε στους -70°C , μέχρι τη μέτρηση. Η ίδια διαδικασία έγινε και σε κάποιους από τους ασθενείς που μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας μπήκαν στην φάση του πλατώ, ή σε CR, VGPR, και PR. Σημειώνεται ότι όλες οι μετρήσεις έγιναν στο τέλος της μελέτης προκειμένου να αποφευχθεί μεταβλητότητα ανάμεσα στις μετρήσεις.

Επιπλέον, οι ασθενείς, κατά τη διάγνωση αλλά και μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, και οι μάρτυρες υπεβλήθησαν σε οστεομυελική βιοψία, από την οπίσθια άνω λαγόνια άκανθα, με τη συνήθη διαδικασία (βελόνα 10 G 11 cm; Allegiance Healthcare Corporation, McGaw Park, Illinois, USA).

γ. Μέθοδοι

Μέθοδος ELISA

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική που εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό όλων των μορίων στον ορό ήταν η ανοσοπροσοφορική ανάλυση στερεάς φάσης με σύνδεση ενζύμου μη συναγωνιστικού τύπου (sandwich ELISA). Η τεχνική βασίζεται στα παρακάτω βήματα:

- Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του υπό εξέταση μορίου προσροφάται στη βάση πηγαδιών δοκιμαστικού σωληναρίου.
- Σε αυτά τα πηγάδια προστίθενται τα δείγματα (που έχουν άγνωστη συγκέντρωση του υπό εξέταση μορίου), καθώς και δείγματα αναφοράς (με γνωστή συγκέντρωση του υπό εξέταση μορίου).
- Γίνεται επώαση για επαρκή χρόνο, ώστε να πραγματοποιηθεί η σύνδεση του προσροφηθέντος αντισώματος με το υπό εξέταση μόριο.
- Ακολουθεί πλύση του πλακιδίου για απομάκρυνση του ασύνδετου μορίου
- Στη συνέχεια προστίθεται δεύτερο πολυκλωνικό (ή μονοκλωνικό) αντίσωμα, που είναι συνδεδεμένο με την υπεροξειδάση χρένου (horseradish peroxidase), έναντι του υπό εξέταση μορίου, και ακολουθεί νέα επώαση.
- Ακολουθεί πλύση για απομάκρυνση του ασύνδετου αντισώματος.
- Γίνεται προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος (tetramethylbenzidine) και υπεροξειδίου του υδρογόνου, που με την υπεροξειδάση μετατρέπουν το άχρωμο χρωμογόνο σε χρωστική.
- Γίνεται τερματισμός της αντίδρασης με προσθήκη θειικού οξέος.
- Τέλος, γίνεται φωτομετρική μέτρηση της έντασης του χρώματος στα 450nm.

Η ένταση του χρώματος που τελικά μετράται είναι ανάλογη της ποσότητας του, συνδεδεμένου με την υπεροξειδάση, υπό εξέταση μορίου.

Υπολογισμός της συγκέντρωσης του μορίου με βάση καμπύλη αναφοράς

Στη συσκευασία της κατασκευάστριας εταιρείας υπάρχει πρότυπο διάλυμα με γνωστή συγκέντρωση του υπό εξέταση μορίου, στο οποίο εκτελούνται διαδοχικές αραιώσεις και συνεπώς πολλαπλές γνωστές συγκεντρώσεις. Όταν γίνει η μέτρηση της χρωματικής έντασης σε αυτές τις γνωστές συγκεντρώσεις, προκύπτει μια καμπύλη αναφοράς, όπου στον ένα άξονα απεικονίζονται οι διαδοχικές γνωστές συγκεντρώσεις του πρότυπου διαλύματος, ενώ στον άλλο οι αντίστοιχες τιμές

οπτικής απορρόφησης. Έτσι, με αυτή την καμπύλη μπορούν να υπολογισθούν οι τιμές στα υπό εξέταση δείγματα.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα όρια ευαισθησίας και της απόδοσης του συστήματος για τα 13 μόρια που μελετήθηκαν συνολικά:

Τεχνικές λεπτομέρειες των αντιδραστηρίων ELISA που χρησιμοποιήθηκαν στις μετρήσεις (Κατασκευάστρια εταιρεία: Quantikine, R&D, Minneapolis, MN, USA)

Μόριο	Αριθμός καταλόγου	Μέγιστη συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος	Ελάχιστη συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος	Ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση στον ορό	Αναφερόμενες, από την εταιρεία, μέση τιμή (όρια)
sCD105	DNDG00	10 ng/ml	0.156 ng/ml	0.007 ng/ml	3.96 ng/ml (2.54-7.06)
TGF-β1	DB100B	2000 pg/ml	31.2 pg/ml	4.61 pg/ml	39.592 pg/ml (18.289-63.416)
sCD40L	DCDL40	4000 pg/ml	62.5 pg/ml	4.2 pg/ml	5461 pg/ml (0-11451)
PDGF-AB	DHD00B	2000 pg/ml	31.2 pg/ml	1.7 pg/ml	20.126 pg/ml (10.499-29.463)
IL-6	D6050	100 pg/ml	3.12 pg/ml	<0.7 pg/ml	33 δείγματα<3.12 7 δείγματα: 3.12-12.5 pg/ml
IL-8	D8000C	1000 pg/ml	31.2 pg/ml	3.5 pg/ml	<31.2 pg/ml
IL-1β	SLB50	250 pg/ml	3.9 pg/ml	<1 pg/ml	<3.9 pg/ml
HGF	DHG00	4000 pg/ml	125 pg/ml	<40 pg/ml	1257 pg/ml (671-1992)
VEGF	DVE00	1000 pg/ml	31.2 pg/ml	<9 pg/ml	220 pg/ml (62-707)
b-FGF	DFB0	320 pg/ml	320 pg/ml	10 pg/ml	Μη ανιχνεύσιμο
ANG	DAN00	2500 pg/ml	78.1 pg/ml	<6 pg/ml	360000 pg/ml (196000-437000)
MIP-1α	DMA00	1000 pg/ml	31.2 pg/ml	<10 pg/ml	<46.9 pg/ml

Ανοσοϊστοχημική χρώση ιστολογικών τομών

Αρχή της μεθόδου

Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος χρησιμοποιείται προκειμένου να εντοπισθούν συγκεκριμένα αντιγόνα σε ιστολογικές τομές με τη χρήση σεσημασμένων αντισωμάτων. Όταν το αντίσωμα έναντι του αντιγόνου φέρει το σήμα, τότε γίνεται άμεσος προσδιορισμός του αντιγόνου (πχ άμεσος ανοσοφθορισμός), ενώ όταν το αντίσωμα έναντι του αντιγόνου δε φέρει το σήμα, αλλά απαιτείται χρήση δευτέρου αντισώματος με σήμα έναντι του πρώτου, τότε γίνεται έμμεσος προσδιορισμός. Το σήμα στο αντίσωμα μπορεί να είναι ένζυμο, ραδιοϊσότοπο, χρωστική ή κολλοειδές χρυσού και είναι αυτό που καθιστά ορατή τη σύνδεση του αντισώματος με το αντιγόνο. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο έμμεσος προσδιορισμός με σήμα το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση.

Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

- Ο οστικός κύλινδρος σταθεροποιείται σε διάλυμα 10% φορμαλίνης, ακολούθως απασβεστώνεται σε 10% EDTA (Titriplex III, αριθμός καταλόγου 64271, Merck, Darmstadt, Germany) για 48 ώρες, και τελικώς ενσωματώνεται σε μπλοκ παραφίνης, με Paramat extra (BDH, Poole, Dorset, UK).
- Στο μπλοκ παραφίνης γίνονται ιστολογικές τομές, πάχους 3μm, με αυτόματο μικροτόμο, που τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες SuperFrost Plus.
- Στη συνέχεια οι ιστολογικές τομές υποβάλλονται σε αποπαραφινποίηση σε διάλυμα ξυλόλης και ενυδάτωση με διαδοχικά διαλύματα αλκοόλης (100%, 95%, 75%, 50%, νερό, διάλυμα TBS).
- Ακολούθως, η ιστολογική τομή θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων, με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος, με pH=6.0, προκειμένου να αποκαλυφθούν οι αντιγονικοί επίτοποι που είχαν καλυφθεί στα προηγούμενα στάδια.
- Κατόπιν προστίθεται ορός (blocking serum), που αποσκοπεί στη μείωση της μη-ειδικής σύνδεσης του χρησιμοποιούμενου αντισώματος.
- Ακολουθεί η τιτλοποίηση του αντισώματος, δηλαδή ο καθορισμός της ιδανικής συγκέντρωσης του πρωτογενούς αντισώματος, με διαδοχικές αραιώσεις, με βάση τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας, και εφαρμογή τους σε δοκιμαστικό δείγμα.

- Στη συνέχεια, εφαρμόζεται η κατάλληλη αραίωση του πρωτογενούς αντισώματος έναντι του υπό εξέταση αντιγόνου σε ολόκληρο το πλακίδιο, γίνεται επώαση σε υγρό θάλαμο και ακολούθως πλύσεις με διάλυμα TBS.
- Ακολουθεί προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος κονίκλου, έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού, που δρα ως γέφυρα, ενώνοντας το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του αντιγόνου, με το τριτογενές αντίσωμα (αντίσωμα ποντικού έναντι ανοσοσφαιρινών κονίκλου) που φέρει το σύμπλεγμα αλκαλικής φωσφατάσης με δεξτράνη. Η αλκαλική φωσφατάση υδρολύει το υπόστρωμα naphthol AS-BI phosphate σε aryl naphtholamide που, όταν συνδεθεί με το άλας Fast Red, δημιουργεί αδιάλυτο χρώμα, ορατό στο οπτικό μικροσκόπιο (Ultarvision LP Detection System, AP Polymer with Fast Red Chromogen, TL-015-AF, Lab Vision, Fremont, CA, USA). Η ενδογενής δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εξουδετερώθηκε με προσθήκη levamisol στο διάλυμα του υποστρώματος.
- Τελικά εφαρμόζεται αντίχρωση με αιματοξυλλίνη για 30 δευτερόλεπτα και οι τομές καλύπτονται με σταθεροποιητικό υλικό Glycergel (C-05630, DAKO, Carpinteria, CA 93013, USA).

Για κάθε μόριο που εξετάστηκε χρησιμοποιήθηκε θετικός και αρνητικός μάρτυρας. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ιστός που προηγουμένως είχε αποδειχθεί ότι εξέφραζε ανοσοϊστοχημικά το αντιγόνο, ενώ ως αρνητικός χρησιμοποιήθηκε δείγμα όπου έγιναν όλα τα βήματα, χωρίς όμως να χρησιμοποιηθεί το πρωτογενές αντίσωμα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων επιβεβαιώθηκαν από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές, που δε γνώριζαν τα δεδομένα του δείγματος. Η διαφοροποίηση ανάμεσα στους παρατηρητές κυμάνθηκε σε <10%.

Τα μόρια που μετρήθηκαν στους οστικούς κυλίνδρους ήταν το CD38, για την τυποποίηση των πλασματοκυττάρων, το CD31, για την τυποποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, το PCNA και το Ki-67, σε διπλή χρώση με το CD38, για ανίχνευση των πλασματοκυτταρικών πυρήνων που βρίσκονταν στην S φάση.

Εκτίμηση της πλασματοκυτταρικής διήθησης

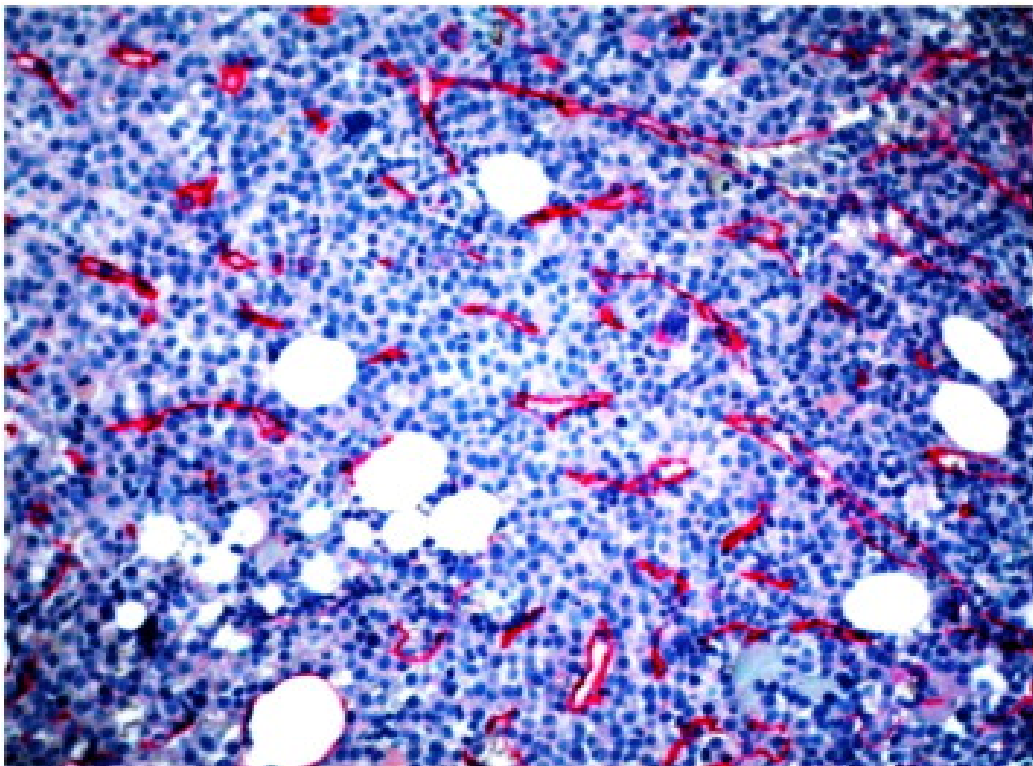
Το είδος και το ποσοστό πλασματοκυτταρικής διήθησης του μυελού των ασθενών με ΠΜ αναδείχθηκε με ανοσοχρώση των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων, χρησιμοποιώντας το αντι-CD38 μονοκλωνικό αντίσωμα (Code M7077; Dako, Glostrup, Denmark), τη μέθοδο αλκαλικής-αντιαλκαλικής φωσφατάσης (APAAP). Η μονοκλωνικότητα και τα ποσοστά των κ/λ νεοπλασματικών κυττάρων στο μυελό εκτιμήθηκαν με *in situ* υβριδισμό (SS ISH ανιχνευτικό σύστημα, αριθμός καταλόγου DA030-SS; Biogenex, San Ramon, California, USA; κ/λ mRNA peptide nucleic acid probes/fluorescein isothiocyanate; αριθμός καταλόγου Y5202; Dako).

Μέτρηση μικροαγγείων

Τα αγγεία στο μυελό αναδείχθηκαν με ανοσοχρώση των ενδοθηλιακών κυττάρων, χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού, έναντι του CD31 (Code MS 353; Neomarkers, Lab Vision Corp, Fremont, CA, USA), σε αραιώση 1:400. Η MVD εκτιμήθηκε, χρησιμοποιώντας ένα σταθερό 16 Zeiss μικροσκόπιο, εξοπλισμένο με κατάλληλα προσοφθάλμια. Η αναγνώριση και τυποποίηση των στοιχείων των μικροαγγείων έγινε με σταθερά κριτήρια. Επειδή διαπιστώθηκε ετερογένεια στην MVD των δειγμάτων, σε κάθε δείγμα εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές περιοχές νεοπλασματικής διήθησης με το μέγιστο αριθμό μικροαγγείων (τριχοειδών και φλεβιδίων), αντιπροσωπεύοντας με αυτόν τον τρόπο τις περιοχές που είχαν την πιο έντονη αγγείωση (hot spots). Αρχικά, έγινε έλεγχος των τομών σε μικρή μεγέθυνση ($\times 100$) πριν τη μέτρηση των αγγείων, με σκοπό να εντοπισθούν τα hot spots. Τα μικροαγγεία που βρίσκονταν κοντά σε δοκίδες ή σε σκληρυντικές περιοχές δε συμπεριλήφθηκαν στη μέτρηση. Ακολούθως, και αφού αναγνωρίστηκαν τα hot spots, μετρήθηκαν τα μεμονωμένα μικροαγγεία σε μεγέθυνση $\times 400$. Για τη συστηματική εξέταση των δειγμάτων, τοποθετήθηκε στον ένα προσοφθάλμιο φακό ένα αριθμημένο και τετραγωνισμένο προσοφθάλμιο τετραγωνίδιο (με 100 τετράγωνους, ίσων διαστάσεων, δείκτες, όπου $1 \mu\text{m}=1$ τετραγωνίδιο), διαστάσεων 1×1 cm (NE35 mm; Graticules Ltd, Kent, UK). Οι μετρήσεις έγιναν στην περιοχή του πεδίου που κάλυπτε επιφάνεια 0.0625 mm^2 . Κατά τη μέτρηση των μικροαγγείων, η κίνηση του μικροσκοπίου γινόταν με τρόπο ώστε να μετρηθεί ολόκληρη η επιφάνεια των hot spots. Έγινε προσπάθεια να

επιβεβαιωθεί ότι κάθε μετρούμενο τετράγωνο ήταν καλυμμένο με ιστό. Κάθε βαμμένο ερυθρό, μορφολογικά συμβατό με ενδοθηλιακό κύτταρο ή/και σύμπλεγμα ενδοθηλιακών κυττάρων, με ή χωρίς (υποτυπώδη ή καλοσχηματισμένο) αυλό, θεωρήθηκε ότι είναι μικροαγγείο και προσμετρήθηκε. Με αυτόν το τρόπο υπολογίσθηκε η μέση μέτρηση των μικροαγγείων από τα τρία hot spots και εκφράσθηκε ως αγγεία/0.0625 mm².

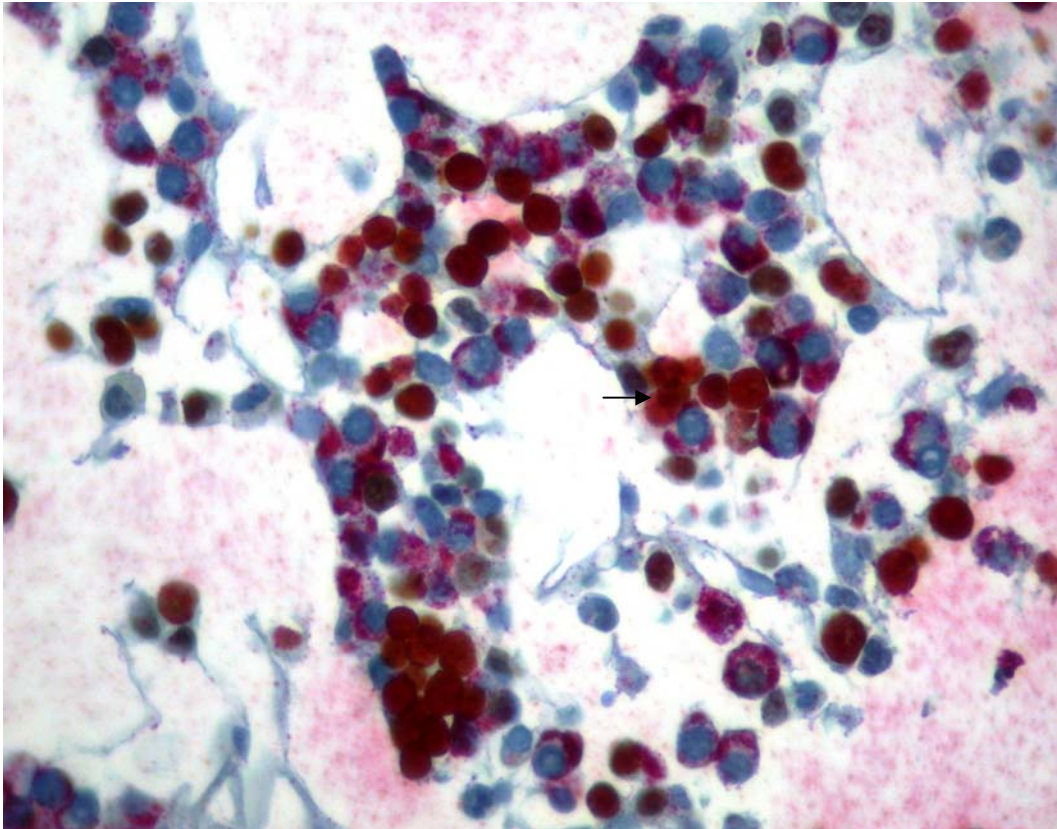
Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα που διαπιστώνεται σε δείγμα οστικού κυλίνδρου με εκτεταμένη πλασματοκυτταρική διήθηση, όπου χρησιμοποιώντας το αντι-CD31 μονοκλωνικό αντίσωμα και τη μέθοδο APAP, τα αγγεία φαίνονται ερυθρά και συχνά με παρουσία αυλού (μεγέθυνση X200).



Εκτίμηση του Ki-67 PI

Η έκφραση του Ki-67 PI εκτιμήθηκε με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντικό (DAKO M-7240 Clone MIB-1, DAKO-DK2600, Glostrup Denmark), χρησιμοποιώντας ανοσολογική τεχνική αλκαλικής φωσφατάσης. Το αντίσωμα για το Ki-67 εφαρμόστηκε σε αραιώση 1:50, ενώ το σύμπλεγμα APAAP (DAKO, D-0651, DAKO-DK 2600) σε αραιώση 1:25. Μετά από επώαση με το Dako EnVision παράγοντα/πολυμερές συζευγμένο με πολυμεράση χρένου (Kit 5007; Dako), τα δείγματα εκτέθηκαν σε διάλυμα diaminobenzidine tetrahydrochloride. Μετά από πλύση με το διάλυμα TBS, ακολούθησε έκθεση στο δεύτερο αντίσωμα, έναντι του CD38 (M-7077; Dako), σε αραιώση 1:50, επώαση με το Dako EnVision παράγοντα/πολυμερές συνεζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση (Kit 1396; Dako) και ακολούθως με το Fast Red χρωμογόνο με levamisole. Οι τομές βάφτηκαν με χρώση αιματοξυλλίνης Papanicolaou και Harris (KGaA 64271; Merck), και τελικά επικαλύφθηκαν με σταθεροποιητικό υλικό Glycergel (C-05630, Dako, Carpinteria, CA 93013, USA). Ακολούθησε εκτίμηση των πλασματοκυττάρων (ερυθρή χρώση του κυτταροπλάσματος με το αντι-CD38 αντίσωμα) και επί του συνόλου τους, εκτίμηση των καφέ βαμμένων πυρήνων (χρώση με το αντι-Ki-67), σε μεγέθυνση X400. Σε κάθε περιοχή αξιολογήθηκαν τουλάχιστον 500 κύτταρα και το ποσοστό του συνολικού πλασματοκυτταρικού πληθυσμού που εξέφραζε το αντιγόνο Ki-67 ορίστηκε ως Ki-67 proliferation index (Ki-67 PI).

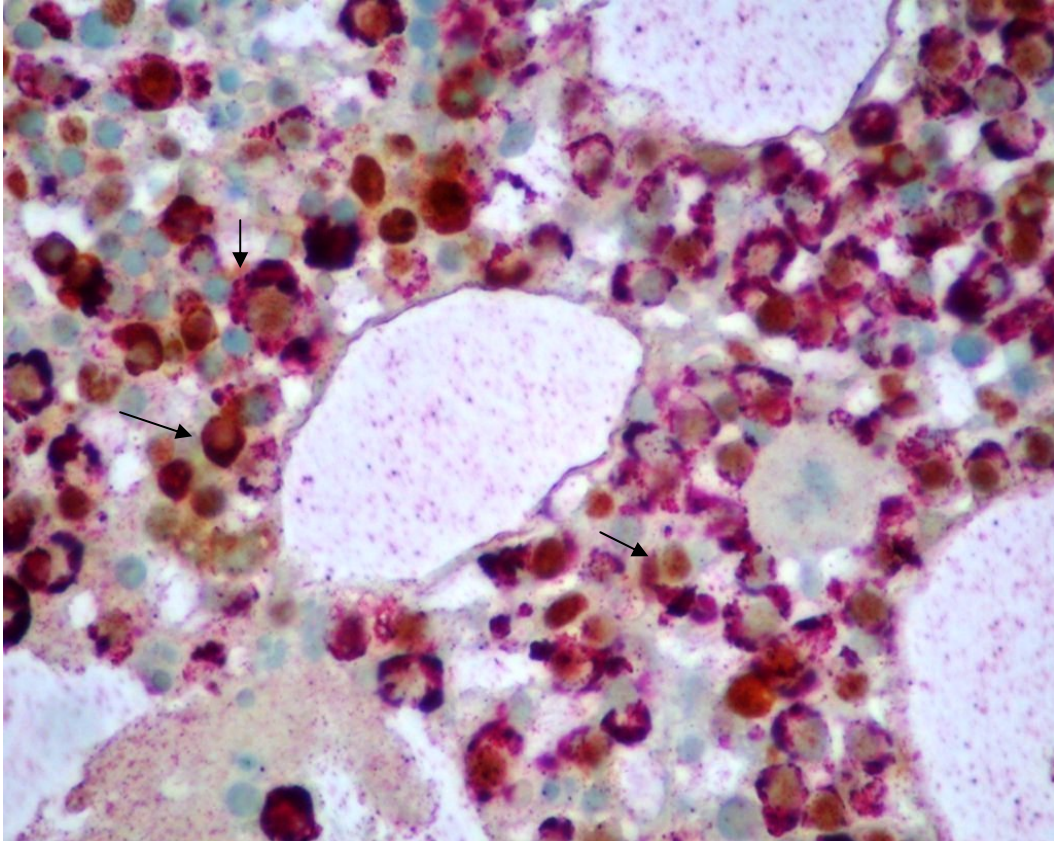
Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η αυξημένη έκφραση του Ki-67 (καφέ πυρήνες) στον πυρήνα των μυελωματικών πλασματοκυττάρων, που λόγω της διπλής χρώσης με το αντι-CD38, έχουν ερυθρό κυτταρόπλασμα (ενδεικτικό βέλους). Δείγμα οστικού κυλίνδρου με πλασματοκυτταρική διήθηση, (διπλή χρώση με το αντι-CD38 και το Ki-67, μεγέθυνση X600).



Εκτίμηση του PCNA

Η έκφραση του PCNA εκτιμήθηκε με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντικό M 0879, DK-2600, Dako, Glostrup, Denmark), χρησιμοποιώντας ανοσολογική τεχνική αλκαλικής φωσφατάσης. Το αντίσωμα για το PCNA εφαρμόστηκε σε αραιώση 1:300, ενώ το σύμπλεγμα APAAP (DAKO, D-0651, DAKO-DK 2600) σε αραιώση 1:25. Μετά από επώαση με το Dako EnVision παράγοντα/πολυμερές συζευγμένο με πολυμεράση χρένου (Kit 5007; Dako), τα δείγματα εκτέθηκαν σε διάλυμα diaminobenzidine tetrahydrochloride. Μετά από πλύση με το διάλυμα TBS, ακολούθησε έκθεση στο δεύτερο αντίσωμα, έναντι του CD38 (M-7077; Dako), σε αραιώση 1:50, επώαση με το Dako EnVision παράγοντα/πολυμερές συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση (Kit 1396; Dako) και ακολούθως με το Fast Red χρωμογόνο με levamisole. Οι τομές βάφτηκαν με χρώση αιματοξυλλίνης Parapanikolaou και Harris (KGaA 64271; Merck), και τελικά επικαλύφθηκαν με σταθεροποιητικό υλικό Glycergel (C-05630, Dako, Carpinteria, CA 93013, USA). Ακολούθησε εκτίμηση των πλασματοκυττάρων (ερυθρή χρώση του κυτταροπλάσματος με το αντι-CD38 αντίσωμα) και επί του συνόλου τους, εκτίμηση των καφέ βαμμένων πυρήνων (χρώση με το αντι-PCNA), σε μεγεθυνση X400.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η αυξημένη έκφραση του PCNA (καφέ πυρήνες) στον πυρήνα των μυελωματικών πλασματοκυττάρων, που λόγω της διπλής χρώσης με το αντι-CD38, έχουν ερυθρό κυτταρόπλασμα (ενδεικτικά βέλη). Δείγμα οστικού κυλίνδρου με πλασματοκυτταρική διήθηση, (διπλή χρώση με το αντι-CD38 και το PCNA αντίσωμα, μεγέθυνση X600).



δ. Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές \pm SD και σε μεμονωμένες περιπτώσεις, όπου η διασπορά των τιμών στο δείγμα δεν ακολουθούσε κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκαν οι διάμεσες. Για την ανάλυση των διαφορών ανάμεσα στις ομάδες χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση ANOVA, με τη Kruskal-Wallis ή τη Mann-Whitney U δοκιμασία ως μη παραμετρικές εναλλακτικές. Η δοκιμασία Student-Newman-Keuls χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των υποομάδων ανά ζεύγη, προκειμένου να διαπιστωθούν διαφορές στις παραμέτρους ανάμεσα στα στάδια της νόσου. Η μη παραμετρική δοκιμασία συσχέτισης Spearman's rho χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμήσει τη συσχέτιση των προ-θεραπείας τιμών των εξεταζόμενων παραμέτρων. Πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Kaplan-Meier. Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS 12.0/PC (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5%.

ε. Βιβλιογραφικά δεδομένα για τους υπό μελέτη επαγωγικούς παράγοντες

1. sCD105

Η ενδογλίνη (CD105) είναι μια μεμβρανική ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη, με MB περίπου 180 kDa, που συνδέεται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα ενεργοποιημένα μακροφάγα, στους ινοβλάστες και στις λείες μυϊκές ίνες. Αποτελεί τμήμα του συμπλέγματος του υποδοχέα του transforming growth factor- β (TGF- β R) και συνεπώς εμπλέκεται στη σύνδεση με τους αντίστοιχους συνδέτες (TGF- β 1, TGF- β 3, ακτιβίνη-A, BMP-2 και BMP-7). Το μονοπάτι του TGF- β εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης, διαφοροποίησης, απόπτωσης και ομοιόστασης [1]. Εκτός όμως από τη συμμετοχή της στο μονοπάτι του TGF- β , η ενδογλίνη πιθανώς εμπλέκεται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού, που με τη σειρά της επηρεάζει τη μορφολογία του κυττάρου και τη δυνατότητά του για μετανάστευση [2]. Επιπλέον, η ενδογλίνη φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος και στην αγγειακή αναδιαμόρφωση. Έτσι, σε πειραματικό μοντέλο, τα ποντίκια χωρίς έκφραση ενδογλίνης πεθαίνουν λόγω καρδιαγγειακών ανωμαλιών [2]. Στον άνθρωπο, η ενδογλίνη εμπλέκεται στην αυτοσωματικά επικρατούσα κληρονομική διαταραχή γνωστή ως *κληρονομική αιμορραγική τηλεαγγειεκτασία τύπου 1*, που προκαλεί αιμορραγική διάθεση και αρτηριοφλεβικές δυσπλασίες σε ζωτικά όργανα [1].

Η ενδογλίνη εκφράζεται κυρίως και έντονα στα αγγειογενετικά, δηλαδή στα πολλαπλασιαζόμενα, αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Η έκφρασή της ρυθμίζεται από την υποξία και αποτελεί έναν ισχυρό δείκτη εκτίμησης της αγγειογένεσης του όγκου [3, 4]. Αποτελεί τμήμα του υποδοχέα του TGF- β και συνδέεται με μεγάλη συγγένεια με τον TGF- β 1 [5]. Ο ώριμος TGF- β 1 συντίθεται από μεγάλη ποικιλία φυσιολογικών και νεοπλασματικών κυττάρων, όπως τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα [6]. Είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, 25 kDa, συνδέεται με δισουλφιδικούς δεσμούς [7] και ασκεί πολλαπλές λειτουργίες σε πολλαπλές παθολογικές καταστάσεις. Η διέγερση της αγγειογένεσης γίνεται αφενός μεν έλκοντας φλεγμονώδη κύτταρα, αφετέρου δε επάγοντας την απελευθέρωση αγγειογενετικών παραγόντων [8]. Η ενδογλίνη και ο

TGF-β1 δημιουργούν συμπλέγματα στην επιφάνεια των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, απ' όπου μπορούν να απελευθερωθούν στην κυκλοφορία. Έχει ήδη ανακοινωθεί ότι η ανίχνευση υψηλών επιπέδων διαλυτού CD105 (sCD105) στον ορό ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου σχετίζεται με κακή πρόγνωση [9-11]. Επίσης αυτά τα επίπεδα είναι αυξημένα σε ασθενείς με απομακρυσμένες μεταστάσεις [9]. Παρολαυτά, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για τη σημασία των επιπέδων του sCD105 στον ορό ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες. Η παρούσα εργασία είναι η πρώτη που προσπαθεί να μελετήσει τη σημασία των επιπέδων του sCD105 στον ορό ασθενών με ΠΜ και τη συσχέτισή τους με δείκτες δραστηριότητας νόσου και κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά και με αγγειογενετικούς παράγοντες.

Κάτω από αυτό το πρίσμα, η μελέτη σχεδιάστηκε προκειμένου να εκτιμηθούν τα επίπεδα του sCD105 στον ορό ασθενών με ΠΜ και MGUS, να συσχετισθούν με τα επίπεδα ορού του TGF-β1 καθώς και με δείκτες δραστηριότητας της νόσου, όπως την IL-6 και το δείκτη πολλαπλασιασμού των πλασματοκυττάρων Ki-67 PI αλλά και με την καθαυτή αγγειογένεση στο μυελό, όπως αυτή μπορεί να εκτιμηθεί άμεσα με τη μέτρηση της MVD. Επίσης, σκοπός της μελέτης ήταν η εκτίμηση της αλλαγής των επιπέδων του sCD105 μετά από αποτελεσματική θεραπεία. Έτσι μπορούμε να πάρουμε σημαντικές πληροφορίες για τη βιολογική σχέση και την προγνωστική σημασία των επιπέδων του sCD105 στους ασθενείς με ΠΜ.

2. sCD40L

Ο συνδέτης του CD40 (CD40 ligand-CD40L-CD154) είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη, 33kD, και ανήκει στην οικογένεια του TNF. Είναι ο φυσικός συνδέτης του CD40 και εκφράζεται κυρίως στα ενεργοποιημένα CD4(+) T λεμφοκύτταρα, στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και λιγότερο στα μαστοκύτταρα, μακροφάγα, βασεόφιλα, NK και B λεμφοκύτταρα, καθώς και σε μη αιμοποιητικά κύτταρα, όπως λείες μυϊκές ίνες, ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα [12-16]. Οι αλληλοεπιδράσεις του CD40 με το CD40L παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση, αλλά και στην κυτταροτοξικότητα των όγκων που εκφράζουν το CD40 [17-19].

Το CD40 εκφράζεται στη μεμβράνη πολλών κακοηθών αιματολογικών κυττάρων και η σύνδεσή του με το CD40L μπορεί να προκαλέσει ποικίλα αποτελέσματα [20, 21]. Έτσι, και ανάλογα με το είδος του κυττάρου, μπορεί να αυξηθεί ή να ελαττωθεί η κακοήθης ανάπτυξη του [22, 23]. Το CD40, αν και συμμετέχει στη διαφοροποίηση των φυσιολογικών B λεμφοκυττάρων προς ώριμα πλασματοκύτταρα [24-26], δεν εκφράζεται στα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα [18, 20]. Αντίθετα, εκφράζεται συχνά στα μυελωματικά πλασματοκύτταρα [18, 27], οπότε και η σύνδεσή του με το CD40L μπορεί να προκαλέσει αναστολή ανάπτυξης ή/και απόπτωση [20, 27].

Κάτω από αυτό το πρίσμα, η μελέτη σχεδιάστηκε προκειμένου να εκτιμηθούν τα επίπεδα του CD40L στον ορό ασθενών με ΠΜ κατά τη διάγνωση, στα διάφορα στάδια της νόσου, και να συσχετισθούν με δείκτες δραστηριότητας της νόσου, όπως την IL-6, τη διήθηση του μυελού από τα πλασματοκύτταρα και το δείκτη πολλαπλασιασμού των πλασματοκυττάρων Ki-67 PI, αλλά και με δείκτες αγγειογένεσης, όπως το VEGF και τον HGF. Επίσης, σκοπός της μελέτης ήταν η εκτίμηση της αλλαγής των επιπέδων του CD40L, μετά από αποτελεσματική θεραπεία αλλά και με βάση το είδος ανταπόκρισης στη θεραπεία. Έτσι μπορούμε να πάρουμε σημαντικές πληροφορίες για τη βιολογική σχέση και την προγνωστική σημασία των επιπέδων του CD40L στους ασθενείς με ΠΜ.

3. PDGF-AB

Ο platelet-derived growth factor (PDGF) είναι μια διμερής γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από δύο A (-AA), δύο B (-BB) ή από το συνδυασμό τους (-AB), συνδεδεμένες με δισουλφιδικούς δεσμούς [28]. Ο PDGF ενεργοποιεί μια ειδική οικογένεια υποδοχέων τυροσινικής κινάσης (PDGFR α και PDGFR β) και εμπλέκεται στην αγγειογένεση [29, 30].

Η αγγειογενίνη (ANG) είναι ένας δυνητικός διεγέρτης της αγγειογένεσης, όχι μόνο σε συμπαγείς αλλά και σε αιματολογικές κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένου του ΠΜ [31]. Η ANG είναι μέλος της υπεροικογένειας των ριβονουκλεασών και παράγεται φυσιολογικά από το ήπαρ [32]. Η ANG λειτουργεί ως ειδική tRNA-ριβονουκλεάση που συνδέεται με την ακτίνη στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ακολούθως εισέρχεται εντός του κυττάρου, καταλήγει στον πυρήνα, όπου τελικά ενεργοποιεί τον ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου. Έτσι δημιουργείται πλασμίνη, που διασπά τη λαμινίνη και τη φιμπρονεκτίνη της βασικής μεμβράνης [33]. Με αυτόν τον τρόπο, η διάσπαση της βασικής μεμβράνης διευκολύνει την απαραίτητη για τη νεοαγγείωση μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [34]. Η ANG ανευρίσκεται σε νεοπλασματικά κύτταρα και φαίνεται ότι συμμετέχει στην ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων [34].

Η μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να εκτιμηθούν τα επίπεδα στον ορό του PDGF-AB σε νεοδιαγνωσμένους ασθενείς με ΠΜ, στα διάφορα στάδια της νόσου, καθώς και μετά από αποτελεσματική θεραπεία, στην πλατώ φάση. Επίσης, στόχος ήταν η εκτίμηση της σχέσης αυτών των επιπέδων με την αγγειογενετική δραστηριότητα στο μυελό, τόσο άμεσα με εκτίμηση της MVD, όσο και έμμεσα με αγγειογενετικούς δείκτες, όπως είναι η ANG, ο b-FGF. Επιπρόσθετα, στόχος ήταν και η συσχέτιση με δείκτες που εκτιμούν το φορτίο της νόσου, όπως είναι η IL-6 και η β 2 μικροσφαιρίνη (B2M). Τέλος, έγινε προσπάθεια να διαπιστωθεί αν κάποια από τις μετρούμενες παραμέτρους έχουν προγνωστική σημασία, που θα επηρέαζε την επιβίωση των ασθενών. Έτσι μπορούμε να πάρουμε σημαντικές πληροφορίες για τη βιολογική σχέση και την προγνωστική σημασία των επιπέδων ορού του PDGF-AB στους ασθενείς με ΠΜ.

4. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες

Αρκετές πυρηνικές πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστεί ως δείκτες πολλαπλασιασμού τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε νεοπλασματικά κύτταρα [35]. Το proliferating cell nuclear antigen (PCNA) συσχετίζεται καλά με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τόσο σε καλοήθη όσο και σε κακοήθη νεοπλάσματα, συμπεριλαμβανομένων των αιματολογικών κακοηθειών [36, 37]. Το επίπεδο της έκφρασής του ποικίλλει κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, γεγονός που υποδηλώνει ότι, υπό ορισμένες προϋποθέσεις, το PCNA είναι ένας δείκτης των κυττάρων της S-φάσεως [38].

Η IL-6 είναι ο κύριος αυξητικός παράγοντας για τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα, προάγοντας την επιβίωση και την αγγειογένεση στο μυελικό μικροπεριβάλλον [39]. Η IL-1β έχει αμφιλεγόμενο ρόλο στην παθογένεια του ΠΜ. Έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδά της σε ασθενείς με ΠΜ, υποδηλώνοντας ότι ίσως παράγεται από τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα [40]. Η IL-1β είναι ένας δυναμικός επαγωγέας παραγωγής IL-6 από τα στρωματικά κύτταρα και τα μονοκύτταρα [41] και παίζει ρόλο στην οστική μυελωματική νόσο [42]. Επιπλέον, φαίνεται να είναι επαγωγέας της παραγωγής IL-8 από τα μαστοκύτταρα, προάγοντας έμμεσα την αγγειογένεση [43]. Η IL-8 είναι μια χυμοκίνη που δρα στα ουδετερόφιλα και τα λεμφοκύτταρα. Τα στρωματικά κύτταρα, όταν συνκαλλιεργηθούν με υπερκείμενα από κύτταρα του μυελού των οστών των ασθενών με ενεργό μύελωμα, παράγουν αυξημένες ποσότητες IL-8 [44]. Η IL-8, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή, στην αγγειογένεση αλλά και στην εξέλιξη του όγκου [45]. Η φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων-1α (MIP-1α) είναι μια χυμοκίνη που διεγείρει τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα [46]. Η MIP-1α ανήκει στην οικογένεια των χυμοκινών RANTES, που δρουν χημειοτακτικά και ως ενεργοποιητές των μονοκυττάρων [47]. Η MIP-1α αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς CCR2 και ενεργοποιεί την έκκριση πολλών προφλεγμονωδών σημάτων [48]. Επιπλέον, η MIP-1α που εκκρίνεται από τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα διεγείρει την οστική απορρόφηση [49, 50] και σχετίζεται με την αγγειογενετική δραστηριότητα της νόσου [51].

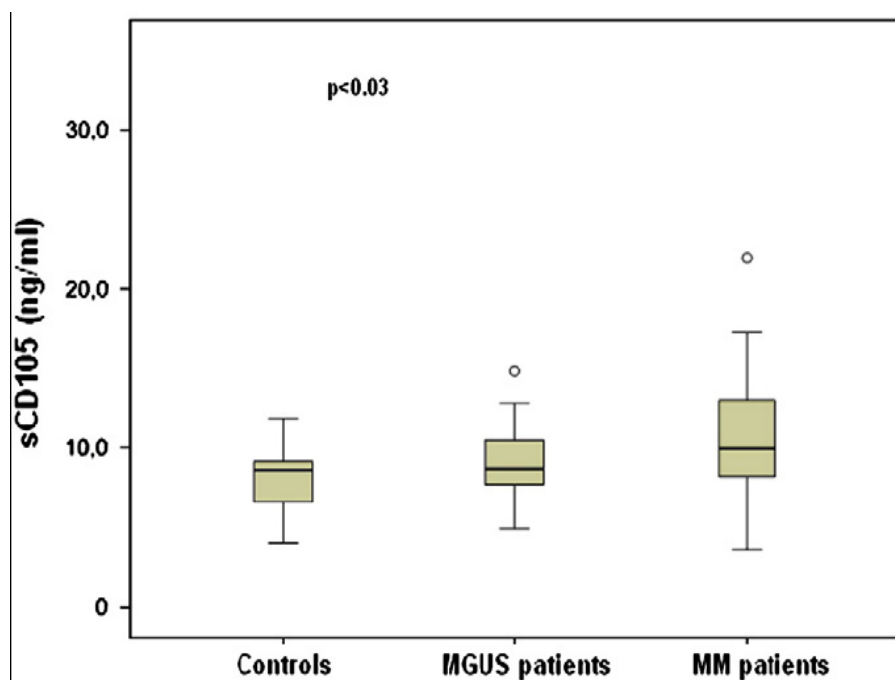
Η μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να μετρηθούν τα επίπεδα στον ορό των προφλεγμονωδών κυτταροκινών με αγγειογενετική δράση IL-1β, IL-8, IL-6, και MIP-1α, καθώς και των LDH και B2M, που είναι ισχυροί και ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες για το ΠΜ [52, 53], προκειμένου να εκτιμηθεί ο ρόλος τους στην εξέλιξη της

νόσου. Επίσης, σκοπός είναι να εκτιμηθεί άμεσα η πολλαπλασιαστική δραστηριότητα της νόσου, με την ανοσοϊστοχημική χρώση των πλασματοκυττάρων για το PCNA. Έτσι μπορούμε να πάρουμε σημαντικές πληροφορίες για τη βιολογική σχέση και την προγνωστική σημασία των επιπέδων ορού των παραπάνω παραγόντων στους ασθενείς με ΠΜ.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. sCD105

Τα επίπεδα ορού του sCD105 ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με ΠΜ σε σχέση με τους ασθενείς με MGUS και τους φυσιολογικούς μάρτυρες ($p<0.03$), όπως φαίνεται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1: Επίπεδα ορού του sCD105 (ng/ml) στους ασθενείς με ΠΜ (MM), με μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδευκρίνισης σημασίας (MGUS) και στους μάρτυρες.

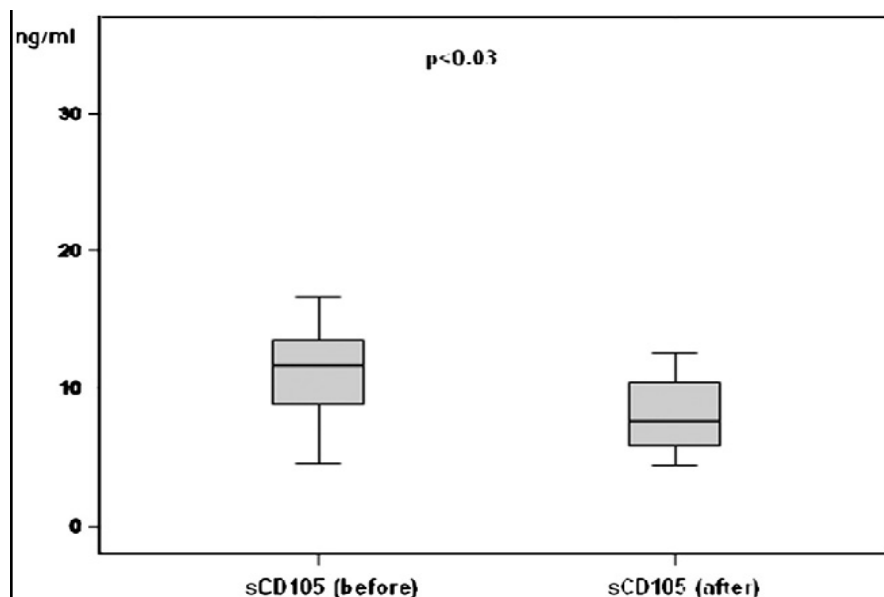
Οι μέσες \pm SD τιμές του sCD105 ήταν: για τους ασθενείς με ΠΜ 11.0 ± 5.3 ng/ml, για τους ασθενείς με MGUS 9.0 ± 2.7 ng/ml και για τους φυσιολογικούς μάρτυρες 8.0 ± 2.1 ng/ml. Τα επίπεδα του sCD105 ήταν σημαντικά υψηλότερα στα προχωρημένα στάδια της νόσου ($p<0.002$). Από την άλλη, τα επίπεδα του sTGF- β 1 στο σύνολο των ασθενών με ΠΜ ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τους ασθενείς με MGUS και τους μάρτυρες ($p<0.001$). Αντίθετα, τα μέσα επίπεδά του στους ασθενείς με MGUS ήταν υψηλότερα σε σχέση με τους μάρτυρες ($p<0.001$). Επιπλέον, ως

αναμενόμενο, τα επίπεδα της IL-6 ήταν υψηλότερα στο σύνολο των ασθενών με ΠΜ σε σχέση με τους MGUS και τους μάρτυρες ($p < 0.001$) και επίσης αυξάνονταν με την πρόοδο του σταδίου της νόσου ($p < 0.001$). Ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki-67 PI και η MVD ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με ΠΜ σε σχέση με τους μάρτυρες ($p < 0.001$ και για τις δυο περιπτώσεις) και αυξάνονταν σημαντικά με την πρόοδο του σταδίου της νόσου ($p < 0.003$, $p < 0.001$ αντίστοιχα), όπως φαίνεται στον πίνακα 1.

	Ki-67 (%)	MVD	sCD105 (ng/ml)	sTGF-β ₁ (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
Controls	1.8 ± 1.3	2.3 ± 1.0	8.0 ± 2.1	20.36 ± 5.61	1.2 ± 0.5
MGUS			9.0 ± 2.7	41.47 ± 27.05	2.0 ± 1.0
MM	13.2 ± 9.2	8.3 ± 3.6	11.0 ± 5.3	16.01 ± 10.92	6.6 ± 5.5
p *	<0.001	<0.001	<0.03	<0.001	<0.001
Stage I	6.7 ± 4.5	6.0 ± 1.6	8.7 ± 3.5	9.95 ± 9.89	3.0 ± 1.3
Stage II	13.6 ± 10.8	7.1 ± 2.3	9.2 ± 2.5	15.68 ± 13.21	5.5 ± 3.1
Stage III	17.6 ± 7.6	11.1 ± 3.8	14.5 ± 6.6	20.96 ± 6.52	10.5 ± 6.9
p **	<0.003	<0.001	<0.002	<0.004	<0.001

Πίνακας 1: Μέσες ± SD τιμές των μετρούμενων παραμέτρων σε ολόκληρη την ομάδα των ασθενών με ΠΜ, επιμέρους στα στάδια της νόσου, στους ασθενείς με MGUS και στους μάρτυρες. (* p τιμές ανάμεσα σε ασθενείς με ΠΜ, MGUS και μάρτυρες. ** p τιμές ανάμεσα στα στάδια της νόσου).

Στο σύνολο των ασθενών με ΠΜ, οι τιμές των sCD105 (Εικόνα 2), Ki-67 PI, MVD και IL-6 ήταν σημαντικά υψηλότερες πριν τη θεραπεία, κατά τη διάγνωση, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές μετά από αποτελεσματική θεραπεία, στην πλατώ φάση ($p < 0.03$ για το sCD105, $p < 0.001$ για τις υπόλοιπες περιπτώσεις). Αντίθετα οι τιμές του sTGF-β₁ ήταν υψηλότερες στην φάση του πλατώ σε σχέση με τα επίπεδα κατά τη διάγνωση ($p < 0.001$).

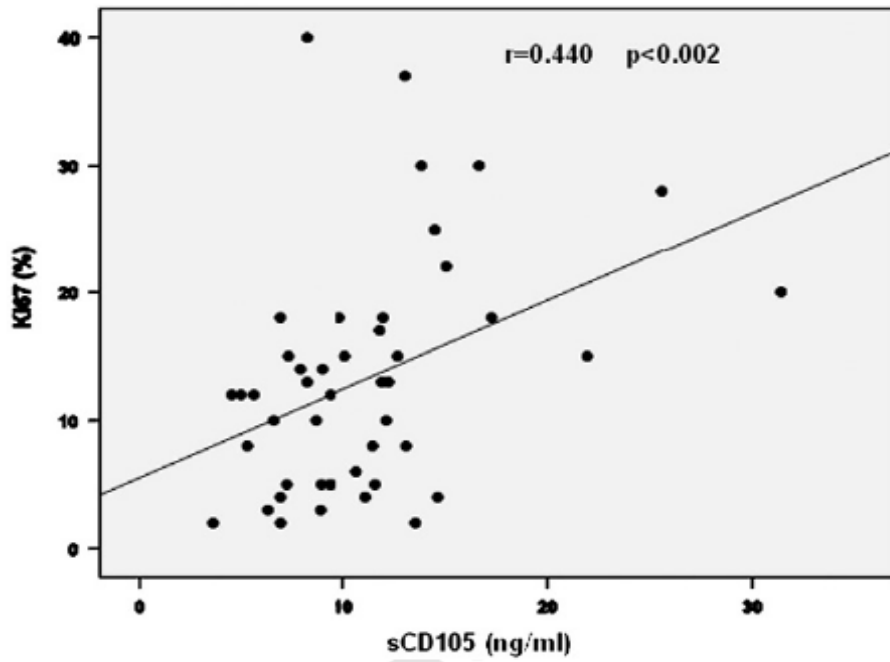


Εικόνα 2: Επίπεδα ορού του sCD105 (ng/ml) στους ασθενείς με ΠΜ, πριν (before) και μετά (after) από αποτελεσματική θεραπεία.

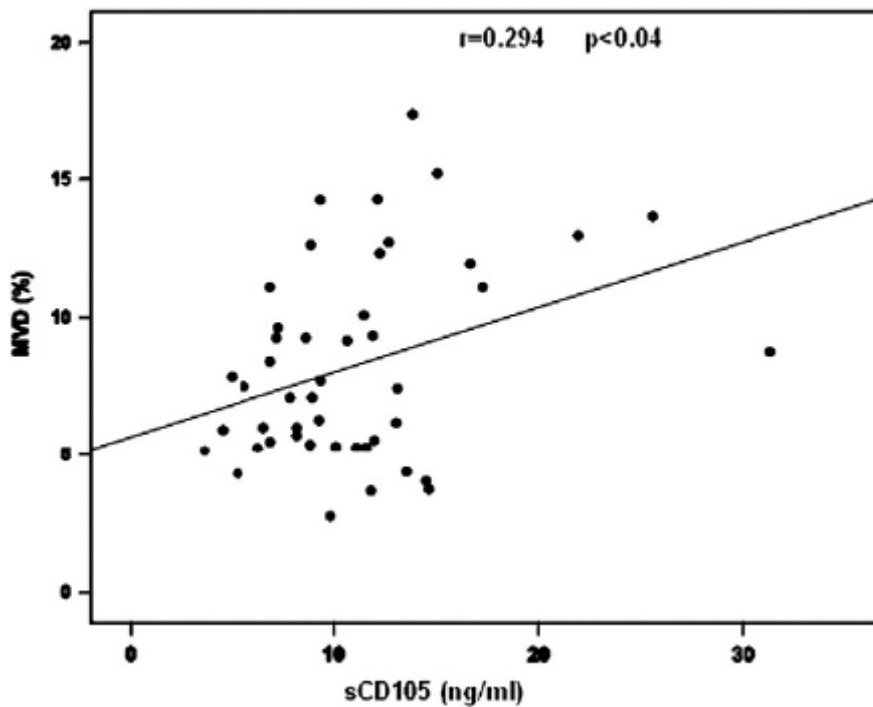
Η ανάλυση συσχετίσεων έδειξε ότι το sCD105 συσχετίστηκε με τον Ki-67 PI ($r=0.440$ $p<0.002$) (Εικόνα 3), την MVD ($r=0.294$ $p<0.04$) (Εικόνα 4) και την IL-6 ($r=0.476$ $p<0.001$) (Εικόνα 5). Συνοπτικά οι συσχετίσεις του sCD105 φαίνονται και στον Πίνακα 2.

sCD105	Ki-67 PI	MVD	IL-6	TGF- β_1
r	0.440	0.294	0.476	NS
p	<0.002	<0.04	<0.001	

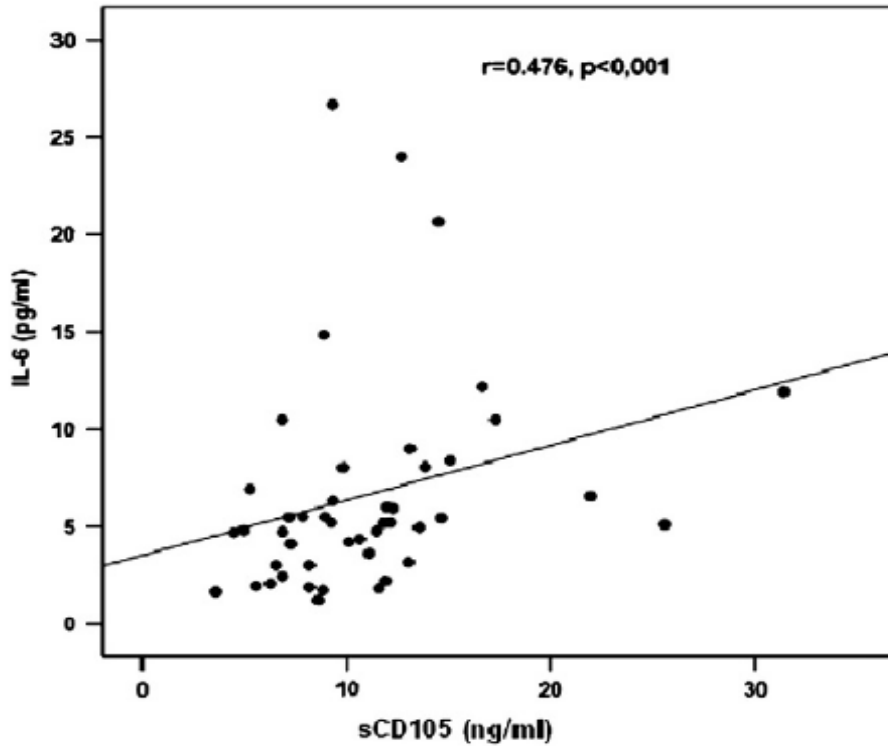
Πίνακας 2: Συσχετίσεις του sCD105 με τον Ki-67 PI, την μικροαγγειακή πυκνότητα στο μυελό (MVD), την ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και τον transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1). (NS: μη σημαντική)



Εικόνα 3: Θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα ορού του sCD105 με τον Ki-67 PI στους ασθενείς με ΠΙΜ.



Εικόνα 4: Θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα ορού του sCD105 με την μικροαγγειακή πυκνότητα του μυελού (MVD) στους ασθενείς με ΠΙΜ.

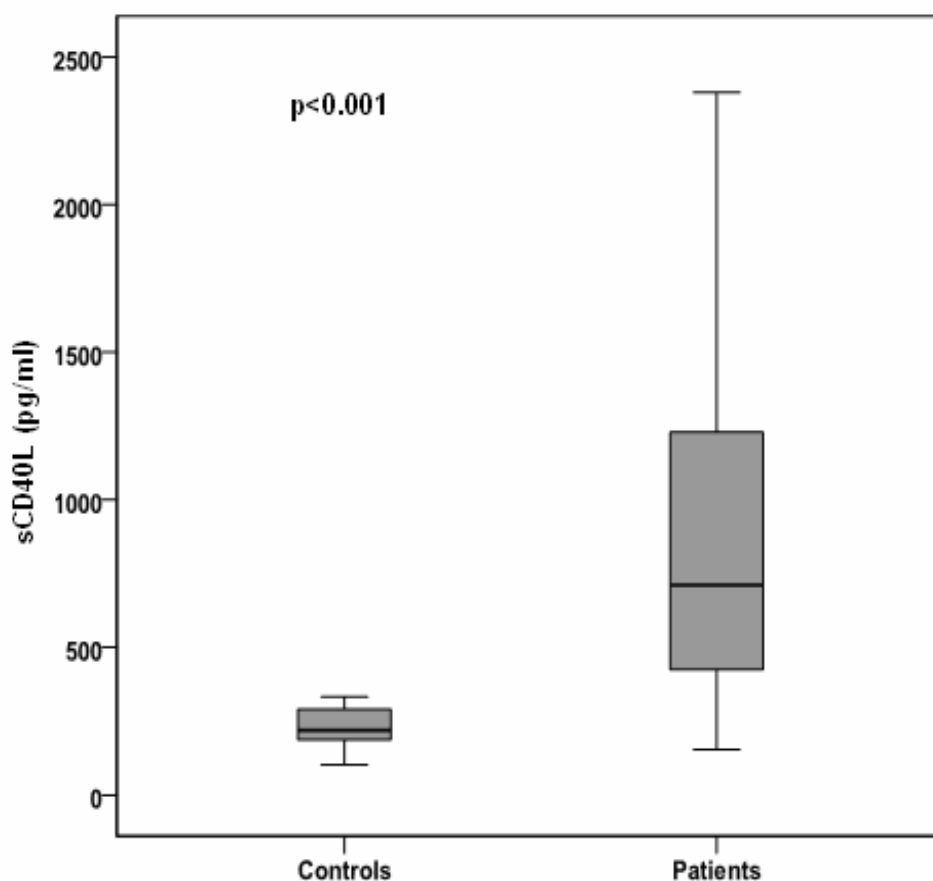


Εικόνα 5: Θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα ορού του sCD105 με της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) στους ασθενείς με ΠΙΜ.

Παρόμοια, ο Ki-67 PI συσχετίστηκε με την MVD ($r=0.321$ $p<0.03$) και την IL-6 ($r=0.391$ $p<0.001$). Επίσης, διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον sTGF- β 1 και την MVD ($r=0.335$ $p<0.02$), ενώ υπήρχε τάση συσχέτισης με την IL-6 ($p=0.07$). Αντίθετα, δε βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στον sTGF- β 1 με το CD105 και τον Ki-67 PI.

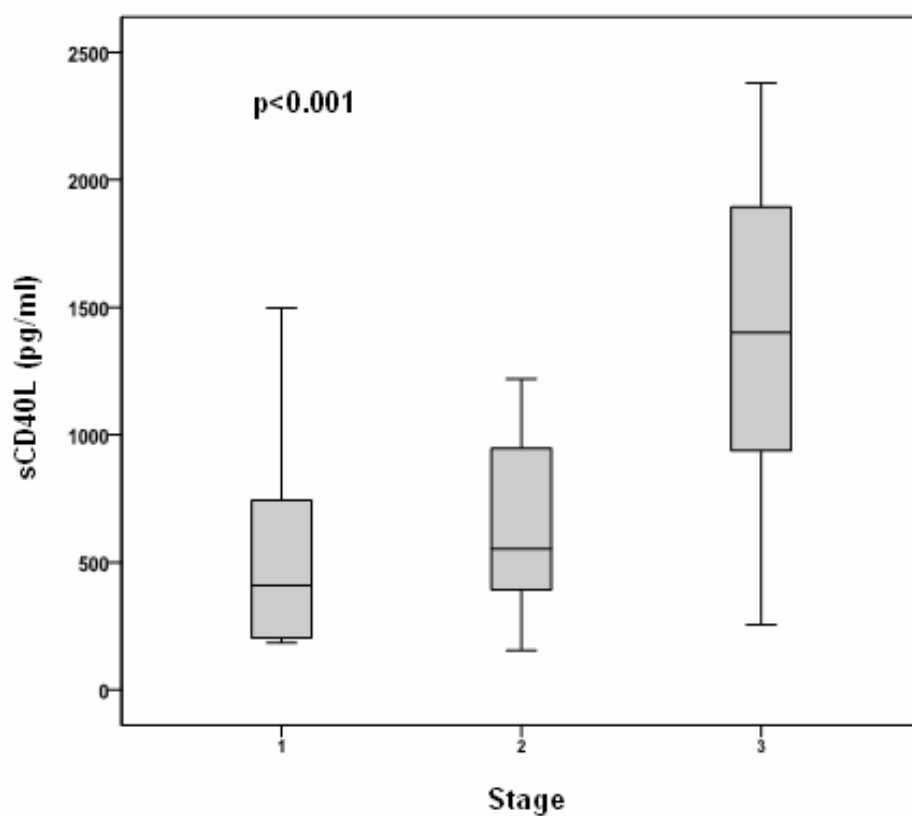
2. sCD40L

Οι διάμεσες τιμές (και το εύρος) των μετρούμενων παραμέτρων στο σύνολο των ασθενών, κατά τη διάγνωση ήταν: για το sCD40L 710.8 (195.2-2380.3) pg/ml, για τον HGF 1531.9 (485.2-5872) pg/ml, για το VEGF 214.7 (72.11-748.67) pg/ml, για την IL-6 5.4 (1.33-24.01) pg/ml, για τον Ki-67 PI 8.0 (2-30) και για τη διήθηση μυελού 37.8 (15-70) %. Όλες οι μετρούμενες παράμετροι ήταν υψηλότερες στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες ($p < 0.001$ για όλες τις περιπτώσεις) (Εικόνα 6 για το sCD40L).



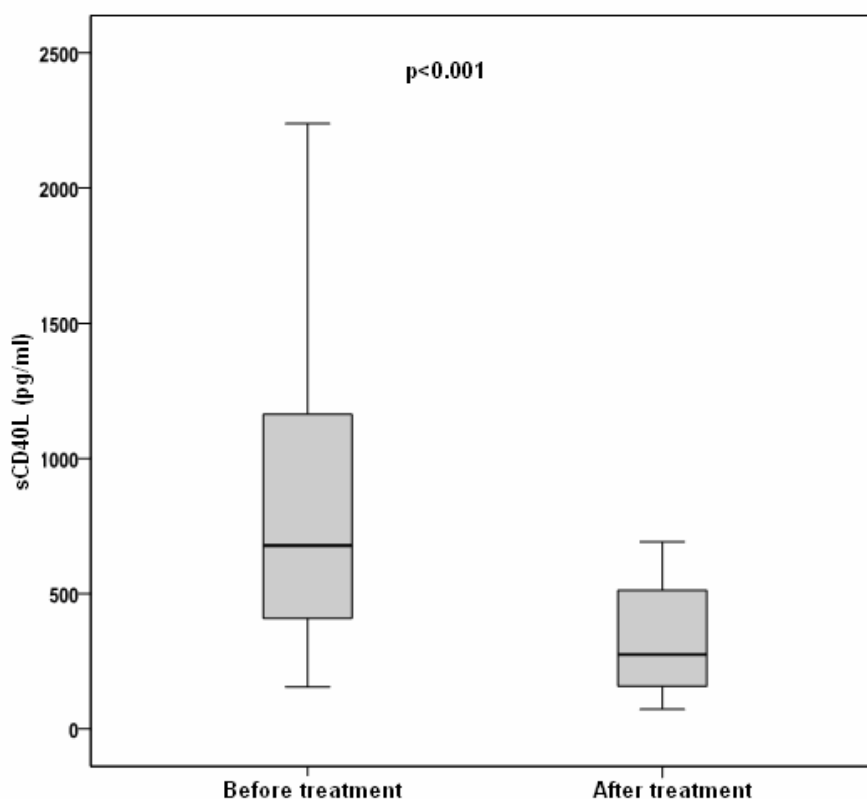
Εικόνα 6: Σημαντικές διαφορές στην τιμή του διαλυτού CD40L (sCD40L) ανάμεσα στους ασθενείς (Patients) και τους μάρτυρες (Controls)

Επίσης οι τιμές όλων των παραμέτρων ήταν υψηλότερες με την πρόοδο του σταδίου της νόσου ($p < 0.001$ για όλες τις περιπτώσεις) (Εικόνα 7 για το sCD40L).



Εικόνα 7: Σημαντικές διαφορές στην τιμή του διαλυτού CD40L (sCD40L) ανάμεσα στα στάδια της νόσου.

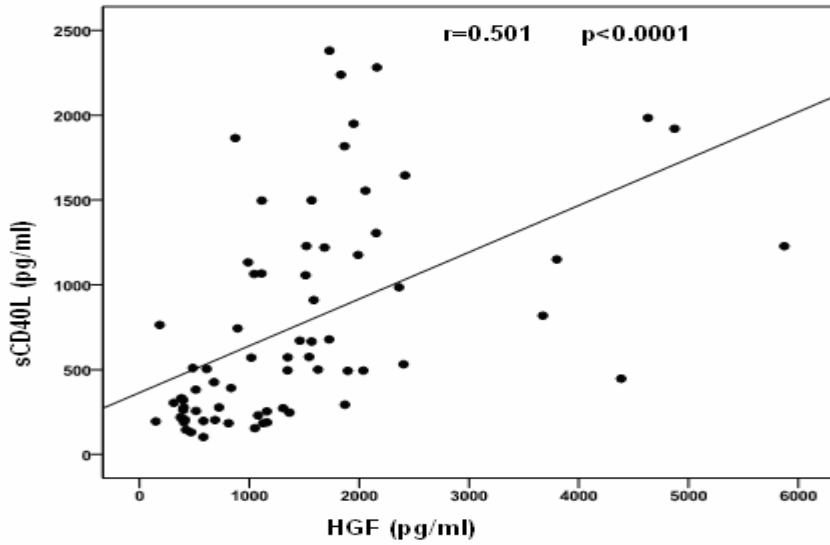
Επίσης οι τιμές των sCD40L (Εικόνα 8), HGF, VEGF, IL-6 και Ki-67 PI ελαττώθηκαν σημαντικά μετά από αποτελεσματική θεραπεία και οι ασθενείς ήταν σε ύφεση ($p < 0.001$ για όλες τις περιπτώσεις).



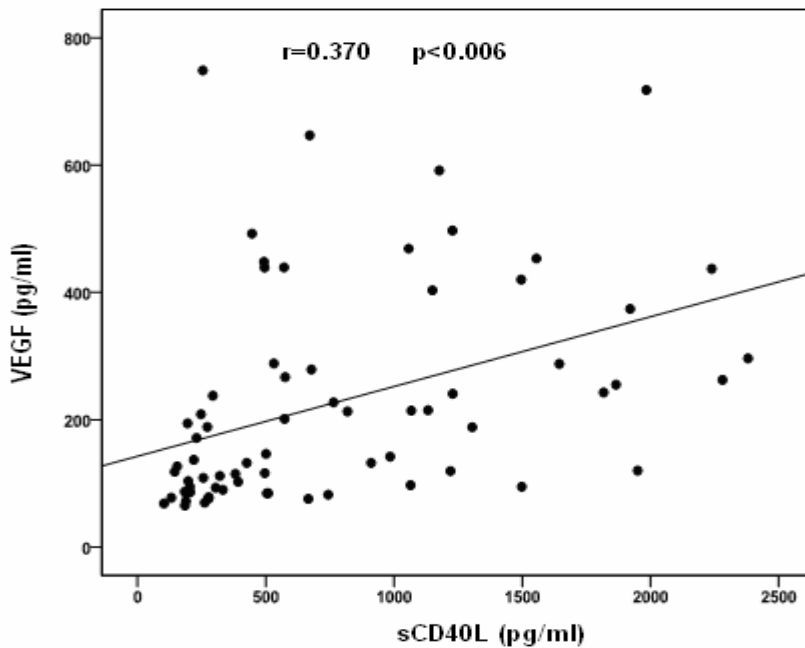
Εικόνα 8: Σημαντική ελάττωση της τιμής του διαλυτού CD40L (sCD40L) μετά την αποτελεσματική θεραπεία (After treatment).

Είναι αξιοσημείωτο ότι οι ασθενείς που μπήκαν σε μερική ύφεση (PR) είχαν υψηλότερες τιμές sCD40L μετά τη θεραπεία σε σχέση με αυτούς που μπήκαν σε πλήρη ή πολύ καλή μερική ύφεση (CR, VGPR αντίστοιχα) ($p=0.025$)

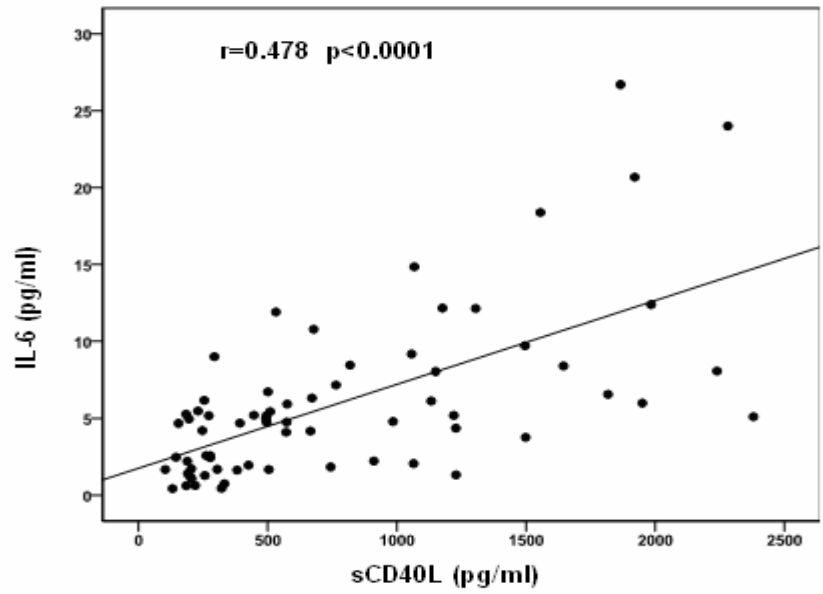
Βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα του sCD40L με του HGF ($r=0.501$ $p<0.0001$) (Εικόνα 9), του VEGF ($r=0.370$ $p<0.006$) (Εικόνα 10), της IL-6 ($r=0.478$ $p<0.0001$) (Εικόνα 11) και του Ki-67 PI ($r=0.491$ $p<0.0001$) (Εικόνα 12), ενώ δε συσχετίστηκε με το βαθμό διήθησης του μυελού. Επιπλέον το Ki-67 PI συσχετίστηκε με τον HGF ($r=0.479$ $p<0.0001$), το VEGF ($r=0.626$ $p<0.0001$), την IL-6 ($r=0.567$ $p<0.0001$) και το βαθμό διήθησης του μυελού ($r=0.369$ $p<0.006$).



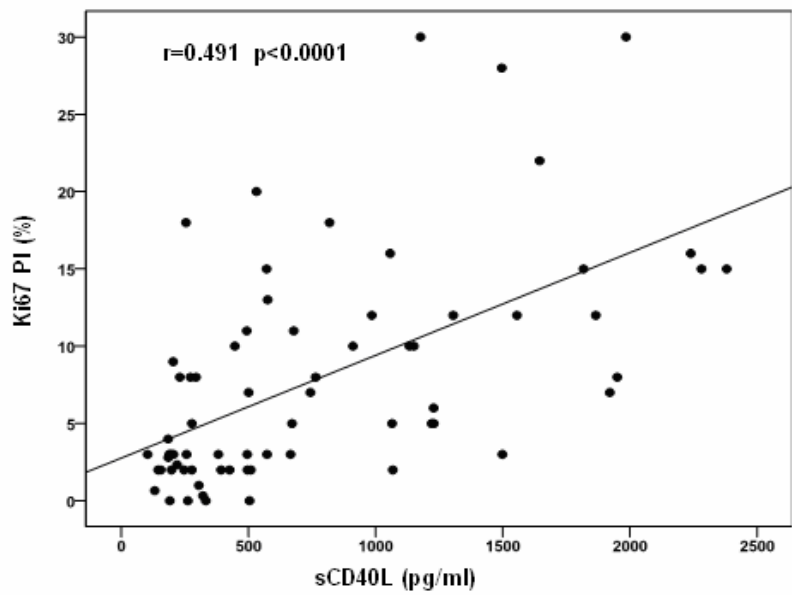
Εικόνα 9: Θετική συσχέτιση ανάμεσα στο διαλυτό CD40 ligand (sCD40L) και τον hepatocyte growth factor (HGF).



Εικόνα 10: Θετική συσχέτιση ανάμεσα στο διαλυτό CD40 ligand (sCD40L) και το vascular endothelial growth factor (VEGF).



Εικόνα 11: Θετική συσχέτιση ανάμεσα στο διαλυτό CD40 ligand (sCD40L) και την ιντερλευκίνη-6 (IL-6).



Εικόνα 12: Θετική συσχέτιση ανάμεσα στο διαλυτό CD40 ligand (sCD40L) και τον Ki-67 PI.

3. PDGF-AB

Οι μέσες συγκεντρώσεις στον ορό του PDGF-AB και του b-FGF ήταν υψηλότερες στους ασθενείς με ΠΜ σε σχέση με τους μάρτυρες, καθώς και με την πρόοδο του σταδίου της νόσου ($p < 0.001$ για όλες τις περιπτώσεις) (Πίνακας 3).

	<u>Ομάδα ΠΜ</u>			<u>Μάρτυρες</u>
	Στάδιο I	Στάδιο II	Στάδιο III	
	Μέση (\pm SD)	Μέση (\pm SD)	Μέση (\pm SD)	
b-FGF (pg/ml)	3.1 \pm 2.2	5.7 \pm 3.7	15.3 \pm 20.2 ^{**}	1.1 \pm 0.6 ⁺
PDGF-AB (pg/ml)	960.4 \pm 581.9	1361.9 \pm 586.0	3187.6 \pm 1531.3 [*]	222.7 \pm 153.3 ⁺
ANG (pg/ml)	354.1 \pm 73.0	780.4 \pm 247.3	820.3 \pm 351.4 [*]	178.4 \pm 89.9 ⁺
MVD	6.0 \pm 1.6	9.3 \pm 6.2	11.7 \pm 5.6 ^{**}	2.2 \pm 0.8 ⁺
IL-6 (pg/ml)	3.1 \pm 1.2	5.8 \pm 3.5	11.6 \pm 6.7 [*]	1.2 \pm 0.7 ⁺
B₂M (μ g/ml)	1.7 \pm 0.4	2.8 \pm 1.3	4.7 \pm 3.1 [*]	1.4 \pm 0.6 ⁺

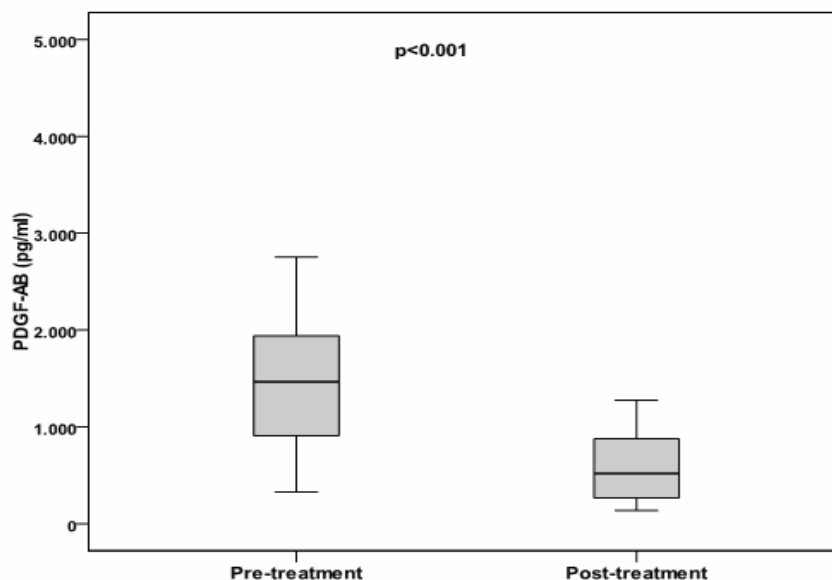
* Στάδιο III συγκριτικά με τα στάδια I και II ($p < 0.0001$).

** Στάδιο III συγκριτικά με τα στάδια I και II ($p < 0.001$).

+ Μάρτυρες συγκριτικά με την ομάδα του ΠΜ ($p < 0.001$)

Πίνακας 3: Μέσες \pm SD τιμές για τους basic-fibroblast growth factor (b-FGF), platelet derived growth factor-AB (PDGF-AB), αγγειογενίνη (ANG), μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD), ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και β 2 μικροσφαιρίνη (B₂M) για τους ασθενείς με ΠΜ, σύμφωνα με το στάδιο της νόσου, και για τους μάρτυρες.

Επιπλέον, τα επίπεδα ορού του PDGF-AB ελαττώθηκαν σημαντικά μετά από αποτελεσματική θεραπεία, στην πλατώ φάση ($p < 0.001$) (Εικόνα 13).

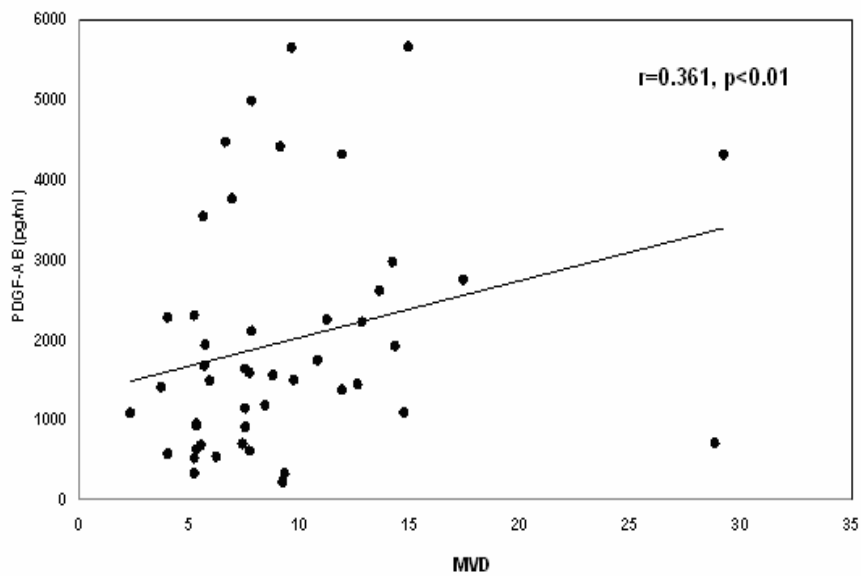


Εικόνα 13: Επίπεδα ορού του PDGF-AB στους νεοδιαγνωσμένους ασθενείς (*pre-treatment*) συγκριτικά με την πλατώ φάση (*post-treatment*).

Βρέθηκαν σημαντικές θετικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα ορού του PDGF-AB (Πίνακας 4) με τα επίπεδα των bFGF ($r=0.324$, $p < 0.02$), ANG ($r=0.437$, $p < 0.002$), IL-6 ($r=0.491$, $p < 0.001$), B2M ($r=0.365$, $p < 0.01$) και MVD ($r=0.361$, $p < 0.01$) (Εικόνα 14).

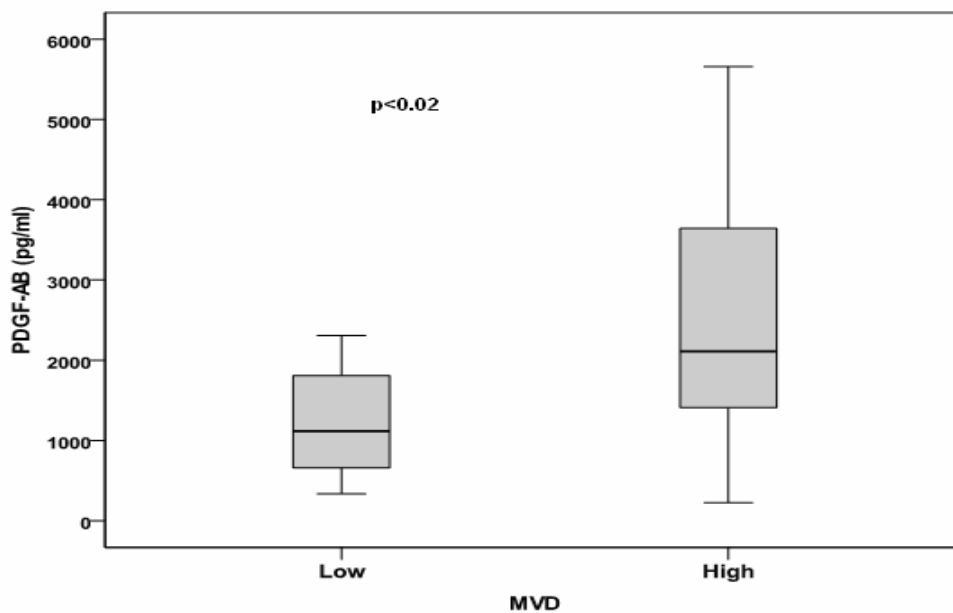
		B2M ($\mu\text{g/ml}$)	b-FGF (pg/ml)	MVD	IL-6 (pg/ml)	ANG (pg/ml)
PDGF-AB (pg/ml)	r	0.365	0.324	0.361	0.491	0.437
	p	<0.01	<0.02	<0.01	<0.001	<0.002

Πίνακας 4: Συσχετίσεις του platelet derived growth factor-AB (PDGF-AB) με τη $\beta 2$ μικροσφαιρίνη (B2M), το basic-fibroblast growth factor (b-FGF), τη μικροαγγειακή πυκνότητα στο μυελό (MVD), την ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και την αγγειογενίνη (ANG).



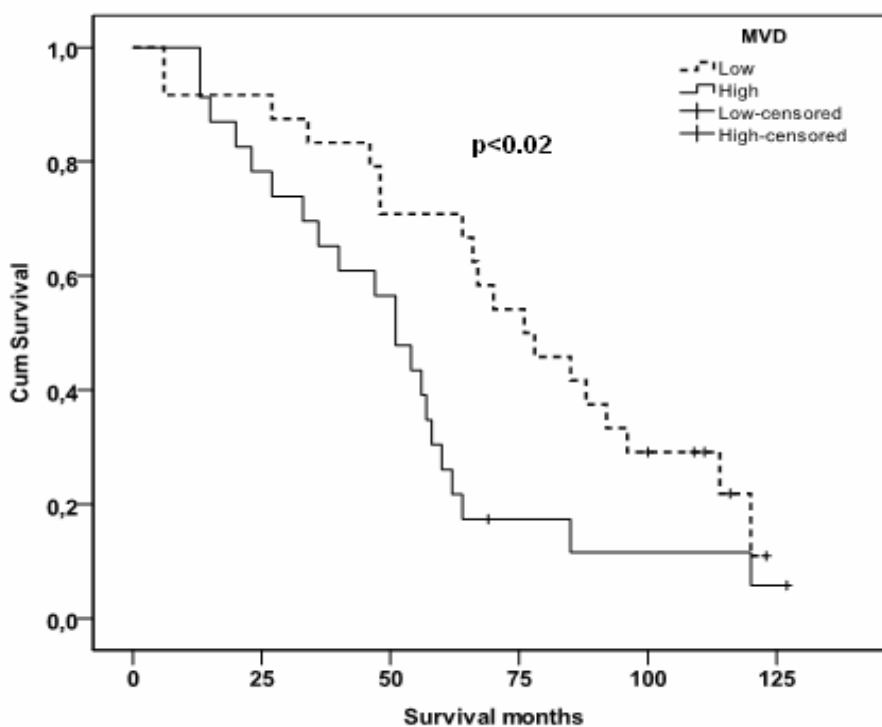
Εικόνα 14: Συσχέτιση των επιπέδων ορού του PDGF-AB με τη μικροαγγειακή πυκνότητα μυελού (MVD).

Επιπλέον βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα ορού της ANG με τη MVD ($r=0.376, p<0.001$). Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι οι ασθενείς με υψηλή MVD είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα PDGF-AB ($p<0.02$) στον ορό τους, όταν χρησιμοποιήθηκε σαν cutoff σημείο η διάμεση τιμή της MVD 7.7 (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Επίπεδα ορού του PDGF-AB στους ασθενείς με χαμηλή (low) και υψηλή (high) τιμή MVD (cutoff σημείο: η διάμεση τιμή της MVD).

Οι συγκεντρώσεις της ANG σε ολόκληρη την ομάδα των ασθενών με ΠΜ κυμάνθηκε από 246.40-1615.4 pg/ml, με μέση± SD τιμή 669.6±332.5 pg/ml. Αυτές οι τιμές ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες των μαρτύρων ($p<0.001$), των οποίων κυμάνθηκαν από 105.78-354.63 pg/ml. Επίσης, οι μέσες τιμές της ANG στην ομάδα των ασθενών με ΠΜ ήταν σημαντικά υψηλότερες με την πρόοδο του σταδίου νόσου ($p<0.001$). Επιπλέον, και οι μέσες τιμές της MVD ήταν υψηλότερες στους ασθενείς συγκριτικά με τους μάρτυρες ($p<0.0001$) και μάλιστα στο στάδιο ΙΙΙ υψηλότερες από το στάδιο Ι ($p<0.01$). Τέλος, βρέθηκαν διαφορές στην επιβίωση των ασθενών που είχαν αυξημένα έναντι χαμηλών επίπεδα PDGF-AB (51 έναντι 66 μηνών) και ANG (57 έναντι 67 μηνών), αλλά οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Αντίθετα, σημαντικές ήταν οι διαφορές στην ομάδα της MVD (76 έναντι 51 μηνών, $p<0.02$) (Εικόνα 16), χρησιμοποιώντας σε κάθε περίπτωση τη διάμεση τιμή.



Εικόνα 16: Kaplan-Meier εκτίμηση της συνολικής επιβίωσης, συγκρίνοντας τους ασθενείς με υψηλή (*high* >7.7) και χαμηλή τιμή (*low* <7.7) MVD.

4. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες

Οι μέσες συγκεντρώσεις των μετρούμενων παραγόντων φαίνονται στον Πίνακα 5.

	Μάρτυρες	ΠΜ Ασθενείς	Στάδιο I	Στάδιο II	Στάδιο III
B₂M (mg/l)	1.2±0.5 ^a	3.1±.7	2.0±0.6	2.5±0.8	4.2±2.0 ^b
LDH (IU/ml)	176.2±27.3 ^a	284.0±103.1	200.4±38.7	258.8±51.7	349±113.7 ^c
IL-1β (pg/ml)	0.7±0.5 ^a	2.8±1.3	1.5±0.6	2.8±1.0	3.7±1.0 ^b
PCNA (%)	2.0±1.7 ^a	26.8±24.7	6.6±5.2	24.0±12.4	41.4±29.0 ^b
IL-8 (pg/ml)	27.6±5.8 ^a	39.3±15.6	28.6±18.1	37.4±12.2	47.3±18.1 ^b
MIP-1α (pg/ml)	22.4±4.2 ^a	51.7±34.9	33.9±21.7	39.4±20.5	71.4±40.2 ^d
IL-6 (pg/ml)	0.9±0.4 ^a	6.2±5.9	1.8±0.4	3.6±1.8	10.9±6.4 ^b

^a Ασθενείς με ΠΜ έναντι μαρτύρων, $p < 0.001$,

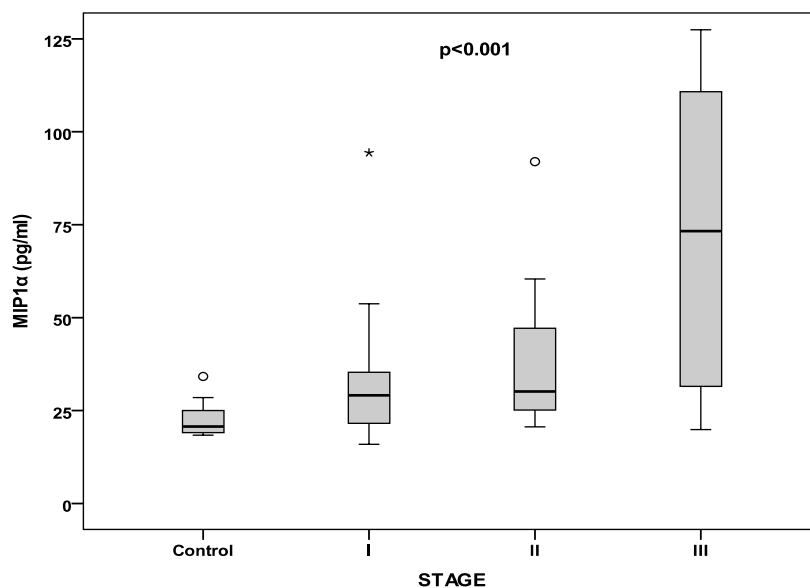
^b Ανάμεσα στα στάδια της νόσου, $p < 0.001$,

^c Ανάμεσα στα στάδια της νόσου, $p < 0.02$,

^d Ανάμεσα στα στάδια I και II $p = 0.896$ και ανάμεσα στα στάδια I και III $p < 0.001$

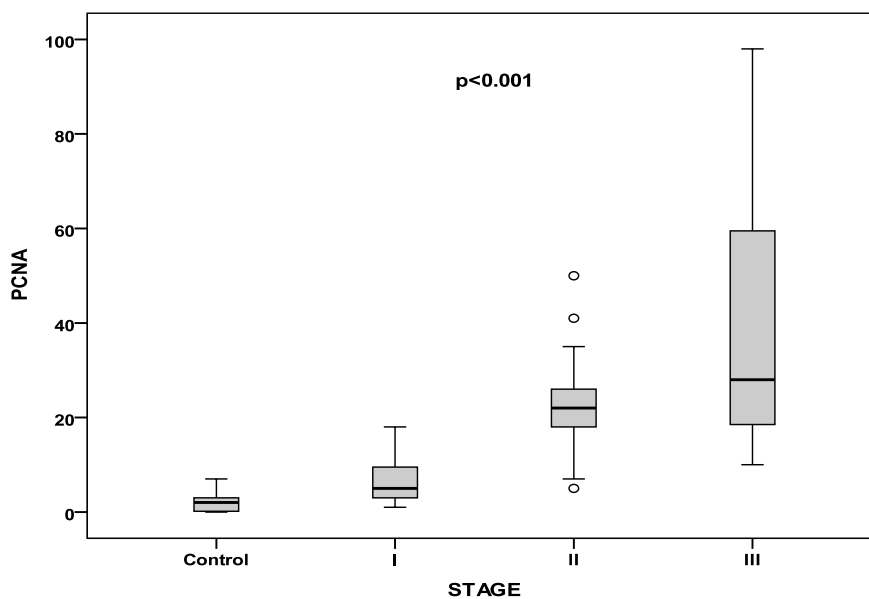
Πίνακας 5: Μέσες±SD τιμές για τις μετρούμενες παραμέτρους για τους μάρτυρες και τους ασθενείς με ΠΜ, ανάλογα με το στάδιο της νόσου.

Όλες οι παραπάνω παράμετροι διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στα 3 στάδια της νόσου, με υψηλότερες τιμές στα προχωρημένα στάδια (Εικόνα 17 για τη MIP-1α, εικόνα 18 για το PCNA).



Ανάμεσα στα στάδια ($p<0.001$). Ανάμεσα στους μάρτυρες και τους ασθενείς ($p<0.001$)

Εικόνα 17: Επίπεδα της MIP-1α στους μάρτυρες και στα 3 στάδια της μυελωματικής νόσου.

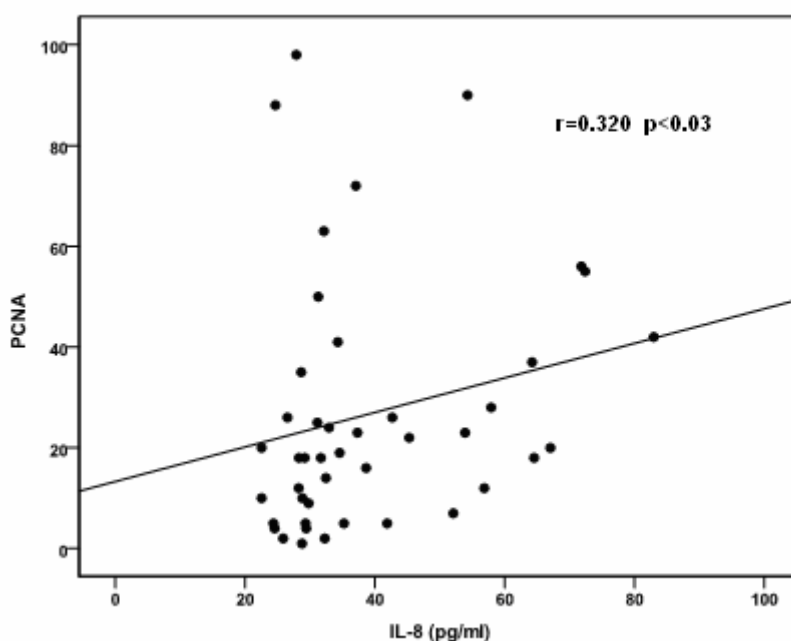


Ανάμεσα στα στάδια ($p<0.001$). Ανάμεσα στους μάρτυρες και τους ασθενείς ($p<0.001$)

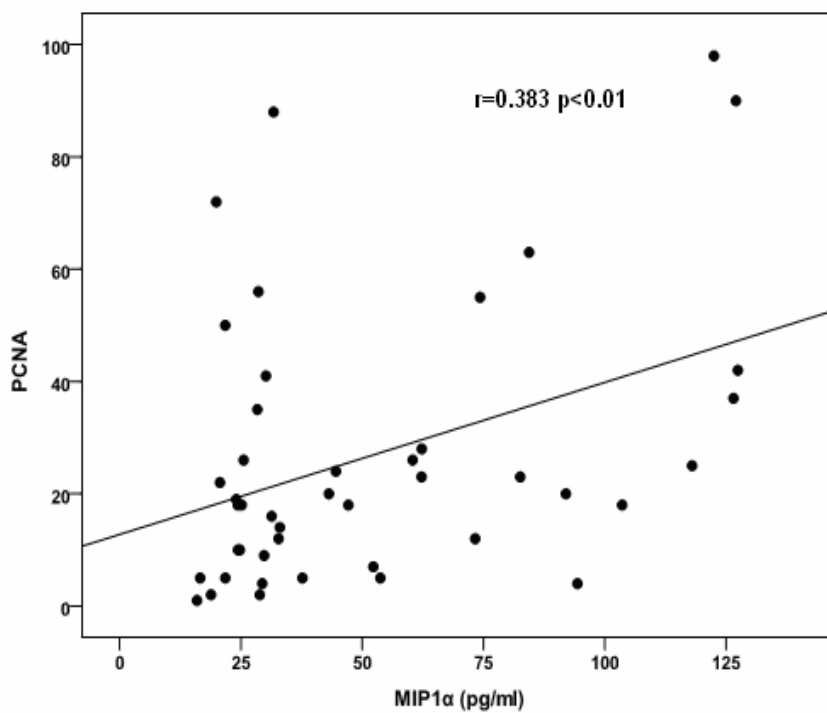
Εικόνα 18: Έκφραση του PCNA στους μάρτυρες και στα 3 στάδια της μυελωματικής νόσου.

Επιπλέον και οι τιμές των IL-6, IL-1β, IL-8 και MIP-1α ήταν υψηλότερες στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες.

Βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στην IL-6 με την IL-1β ($r=0.462$ $p<0.002$), την IL-8 ($r=0.358$ $p<0.01$) και με την MIP-1α ($r=0.380$ $p<0.001$). Παρόμοια, οι IL-8 και MIP-1α συσχετίστηκαν με τους δείκτες δραστηριότητας της νόσου B2M ($r=0.502$ $p<0.001$, $r=0.413$ $p<0.005$, αντίστοιχα) και LDH ($r=0.415$ $p<0.006$, $r=0.475$ $p<0.001$, αντίστοιχα). Η έκφραση του PCNA επίσης συσχετίστηκε με τη B2M και την LDH ($r=0.406$ $p<0.006$, $r=0.581$ $p<0.0001$, αντίστοιχα), όπως επίσης και με τις μετρούμενες κυτταροκίνες IL-6, IL-1β, IL-8 (Εικόνα 19) και MIP-1α (Εικόνα 20) ($r=0.520$ $p<0.0001$, $r=0.545$ $p<0.0001$, $r=0.320$ $p<0.03$ και $r=0.383$ $p<0.01$, αντίστοιχα).



Εικόνα 19: Συσχέτιση του PCNA με την ιντερλευκίνη-8 (IL-8).



Εικόνα 20: Συσχέτιση του PCNA με την MIP-1α.

Η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η IL-1β και η B2M είναι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες (7.89 95% CI: 1.75-35.66 για την IL-1β και 7.47 95% CI 1.66-33.65 για τη B2M).

4. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. sCD105

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα επίπεδα του sCD105 στον ορό συμβαδίζουν με την πρόοδο του ΠΜ, κατά την εκτίμηση των επιπέδων τους, στα διάφορα στάδια της νόσου, στην MGUS και σε φυσιολογικά άτομα. Έτσι, βρέθηκε ότι τα επίπεδα αυξάνονταν με την εξέλιξη της MGUS σε ΠΜ και ακολούθως με την πρόοδο του σταδίου της νόσου. Επιπλέον, βρέθηκε σημαντική συσχέτιση με την πολλαπλασιαστική δυναμική της νόσου, όπως αυτή εκφράζεται με το δείκτη Ki-67 PI. Αυτά τα δεδομένα υπονοούν ότι τα αυξημένα επίπεδα του sCD105 μπορούν να αντιπροσωπεύουν ένα δείκτη προόδου της νόσου.

Το CD105 μπορεί να υπερεκφράζεται στα αγγεία, στις θέσεις νεοαγγείωσης [54], υποδηλώνοντας έτσι ότι μπορεί να εμπλέκεται στην αγγειογένεση και εν τέλει στην πρόοδο του όγκου [9]. Οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για την αυξημένη έκφραση του CD105 στα ενδοθηλιακά κύτταρα του όγκου δεν έχουν διευκρινισθεί, πιθανώς επειδή η έκφρασή του μπορεί να ρυθμίζεται από ποικίλους αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες [55].

Όσον αφορά τις αιματολογικές κακοήθειες, έχουν ανιχνευθεί αυξημένα επίπεδα του sCD105 στον ορό ασθενών με οξεία και χρόνια μυελογενή λευχαιμία [56]. Καθότι το CD105 εκφράζεται σε διάφορα κύτταρα του μυελικού μικροπεριβάλλοντος που σχετίζονται με τη διαδικασία της αγγειογένεσης, όπως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, τα στρωματικά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, και καθότι και στις δύο μορφές λευχαιμίας υπάρχει αυξημένη MVD στο μυελό, είναι αναμενόμενη η ανίχνευση αυξημένων επιπέδων sCD105 [56-58]. Επιπλέον, φαίνεται ότι τα καθαυτά λευχαιμικά κύτταρα μπορούν να απελευθερώσουν μεγάλα ποσά sCD105 στον ορό [10, 11, 59].

Βρήκαμε αυξημένα επίπεδα sCD105 στους ασθενείς σε σχέση με τα άτομα με MGUS, που με τη σειρά τους ήταν υψηλότερα από αυτά των μαρτύρων. Τα επίπεδα αυτά στη συνέχεια, μετά από αποτελεσματική θεραπεία, έπεσαν σημαντικά. Επιπλέον, βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του sCD105 και της MVD, η οποία επίσης ελαττώθηκε σημαντικά μετά από τη θεραπεία. Συνεπώς, τα επίπεδα στον ορό θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναν αξιόπιστο, έμμεσο δείκτη αγγειογενετικής δραστηριότητας, η οποία με τη σειρά της συμβαδίζει με το φορτίο και τη δυναμική της νόσου. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθότι το CD105 αποπίπτει

στην κυκλοφορία, από τη μεμβράνη των αγγειογενετικών ενδοθηλιακών κυττάρων και τα επίπεδα της διαλυτής πλέον μορφής φαίνεται ότι είναι ανάλογα των νεοσυσταθέντων αγγείων. Επιπρόσθετα, τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα (CD34⁺/CD146⁺/CD105⁺/CD11b⁻), που είναι αυξημένα στους ασθενείς με ΠΜ, με την ποσότητά τους να συσχετίζεται με το επίπεδο της M πρωτεΐνης και της B2M [60], θα μπορούσαν επίσης να αποτελέσουν μία άλλη πηγή για το sCD105. Έτσι, το sCD105 που κυκλοφορεί γίνεται ένας αξιόπιστος δείκτης της αγγειογενετικής διαδικασίας.

Επιπρόσθετα τα επίπεδα του sCD105 συσχετίστηκαν και με τους δείκτες δραστηριότητας (IL-6) και πολλαπλασιασμού (Ki-67 PI), δηλώνοντας έτσι ότι θα μπορούσαν να αποτελέσουν και ένα επιπλέον έμμεσο δείκτη δραστηριότητας της νόσου. Και είναι προφανώς αναμενόμενη αυτή η συσχέτιση, καθώς προκειμένου να αναπτυχθεί ο όγκος απαιτούνται νέα αγγεία. Όμως η διαδικασία της αγγειογένεσης είναι πιο σύνθετη. Το CD105 αποτελεί τμήμα του υποδοχέα του TGF-β (TGF-βR), ο οποίος συνδέεται με τον TGF-β1 με μεγάλη συγγένεια [5]. Ο TGF-β1 φαίνεται ότι δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη των πλασματοκυττάρων, ελαττώνοντας τον πολλαπλασιασμό και επάγοντας την απόπτωσή τους [61]. Παράγεται από πληθώρα κυττάρων, κυρίως όμως από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και φλεγμονώδη κύτταρα. Επίσης, στην ιδιοπαθή θρομβοκυττάρωση, όπου χαρακτηριστικά κυκλοφορεί αυξημένος αριθμός ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα sTGF-β1 [10]. Στους ασθενείς με ΠΜ βρέθηκαν χαμηλά επίπεδα, τα οποία με τη σειρά τους αυξήθηκαν μετά από αποτελεσματική θεραπεία. Τα χαμηλά επίπεδα του sTGF-β1 στους ασθενείς με ΠΜ είναι σε συμφωνία με δεδομένα από συμπαγείς κακοήθειες [9]. Θα μπορούσαν να εξηγηθούν από το σχηματισμό σταθερών κυκλοφορούντων συμπλεγμάτων με το sCD105 (sCD105/TGF-β1), που καθότι βρίσκεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις, ελαττώνει τελικά τη συγκέντρωση του ελεύθερου TGF-β1. Αντίστοιχα προκύπτουν και τα υψηλά επίπεδα του μετά τη θεραπεία. Όταν λοιπόν το νόσημα είναι ενεργό, με αυξημένη αγγειογένεση και αυξημένα επίπεδα sCD105, τα επίπεδα του TGF-β1 είναι χαμηλά και συνεπώς έτσι περιορίζεται η ανασταλτική δράση του στην ανάπτυξη του μυελωματικού όγκου [62]. Με αυτή τη λογική εξηγείται ένας τρόπος με τον οποίο η αυξημένη αγγειογένεση επηρεάζει και έμμεσα την ανάπτυξη του μυελωματικού όγκου. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα του sTGF-β1 ήταν χαμηλότερα στους μάρτυρες σε σχέση με την ομάδα της

MGUS, πιθανώς λόγω των σχετικά υψηλότερων μέσων τιμών των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων στην τελευταία ομάδα.

Μια άλλη σύνδεση της αγγειογένεσης με το φορτίο της νόσου έχει να κάνει και με την ελάττωση των μετρούμενων, αγγειογενετικών και πολλαπλασιαστικών, παραμέτρων μετά από τη θεραπεία. Η σημαντική μείωση όλων αυτών των παραμέτρων στη φάση του πλατώ είναι πιθανώς το αποτέλεσμα της κυτταροτοξικής δράσης των χημειοθεραπευτικών παραγόντων στα μυελωματικά αλλά και στα ενδοθηλιακά κύτταρα [63, 64].

Τα αποτελέσματα της μελέτης συνδέουν τον πλασματοκυτταρικό πολλαπλασιασμό με την αγγειογενετική δραστηριότητα στο ΠΜ, καθότι και ο δείκτης Ki-67 συσχετίζεται με την MVD. Επιπλέον, η μελέτη μας, αν και με περιορισμένο αριθμό δειγμάτων, είναι η πρώτη που υποστηρίζει άμεσα τη σχέση ανάμεσα στην πολλαπλασιαστική δραστηριότητα των μυελωματικών πλασματοκυττάρων με τα επίπεδα ορού του sCD105, που αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη νεοαγγειογένεση [4, 65, 66].

Είναι γνωστό ότι η IL-6 έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του ΠΜ, επιτρέποντας την επιβίωση και πολλαπλασιασμό των μυελωματικών πλασματοκυττάρων [66]. Έτσι, διεγείρει την παραγωγή του VEGF από τα νεοπλασματικά και τα στρωματικά κύτταρα [67, 68], που με τη σειρά του, διεγείρει την παραγωγή IL-6 [67]. Βρέθηκε συσχέτιση των επιπέδων ορού της IL-6 με τον Ki-67 PI, σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα [69].

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι το CD105 θα μπορούσε να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση και την εξέλιξη του ΠΜ, με πολλαπλούς τρόπους. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα του sCD105 θα μπορούσαν να είναι χρήσιμος δείκτης για τη δραστηριότητα της νόσου, ιδιαίτερα σε εκείνους τους ασθενείς που λαμβάνουν αντιαγγειογενετικές ή κυτταροτοξικές θεραπείες.

2. sCD40L

Το CD40L είναι ο φυσικός συνδέτης του CD40. Εκφράζεται κυρίως στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, απ' όπου απελευθερώνεται στην κυκλοφορία ως διαλυτή μορφή (sCD40L). Τόσο το μεμβρανικό όσο και το διαλυτό CD40L αλληλεπιδρούν με το CD40, που εκφράζεται στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονωδών και προθρομβωτικών απαντήσεων. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών CD40/CD40L μπορεί να αυξήσει την έκφραση του ιστικού παράγοντα, που μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στους, επαγομένους από τον όγκο, μηχανισμούς ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και ακολούθως στη θρόμβωση [70].

Το CD40L εκφράζεται επίσης στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων. Η αλληλεπίδραση CD40/CD40L θα μπορούσε να συμμετέχει τόσο στην ανοσοδιέγερση, όσο και στην κυτταροτοξικότητα έναντι των όγκων που εκφράζουν το CD40 [71]. Επιπλέον, αυτή η αλληλοεπίδραση μπορεί να συμμετέχει και στους μηχανισμούς φλεγμονής, προκαλώντας παραγωγή κυτταροκινών, χυμοκινών και αυξητικών παραγόντων, όπως των VEGF και HGF από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [15, 72, 73]. Τέλος, τα μυελωματικά, αντίθετα από τα φυσιολογικά, πλασματοκύτταρα εκφράζουν το CD40 και έχουν ενεργό CD40, μονοπάτι, ρυθμιστικό της ανάπτυξης [74].

Έχει αναφερθεί ο σημαντικός ρόλος των αλληλεπιδράσεων CD40/CD40L στη ρύθμιση της έκφρασης του VEGF σε ανθρώπινες μυελωματικές σειρές, σε πρόσφατα απομονωμένα ανθρώπινα μυελωματικά πλασματοκύτταρα αλλά και στην αγγειογένεση του όγκου [75, 76]. Στη μελέτη βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα του sCD40L στους ασθενείς με ΠΜ, σε σχέση με τους μάρτυρες. Επίσης βρέθηκαν θετικές συσχετίσεις ανάμεσα σε αυτά τα αυξημένα επίπεδα με αγγειογενετικές κυτταροκίνες (VEGF, HGF, IL-6), προτείνοντας έτσι μια πιθανή συμμετοχή του συστήματος CD40/CD40L στην αγγειογενετική διαδικασία. Έχει αναφερθεί ότι το CD40L μπορεί να προάγει την έκφραση αρκετών αγγειογενετικών κυτταροκινών *in vivo*, μέσω του VEGF [72].

Ένα άλλο ενδιαφέρον στοιχείο της μελέτης είναι η σύνδεση της αγγειογενετικής δραστηριότητας του μυελού με τον πλασματοκυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθότι η έκφραση του Ki-67 PI συσχετίστηκε με τα επίπεδα των HGF, VEGF και της IL-6. Έτσι επιβεβαιώνεται ότι η αγγειογένεση προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό του

μυελωματικού όγκου, κάτι που γίνεται τόσο άμεσα, λόγω της παροχής οξυγόνου και τροφής από τα νεοσύστατα αγγεία, όσο και έμμεσα, λόγω της παραγωγής αγγειογενετικών κυτταροκινών που μπορούν να δράσουν και ως αυξητικοί παράγοντες για τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα.

Επιπλέον, τα επίπεδα του sCD40L συσχετίστηκαν τόσο με το προχωρημένο στάδιο, όσο και με το Ki-67, που με τη σειρά του συσχετίστηκε με την πλασματοκυτταρική διήθηση στο μυελό, δηλαδή έμμεσα με το φορτίο της νόσου. Κάτω από αυτό το πρίσμα, είναι ενδιαφέρον ότι η πτώση των επιπέδων του sCD40L μετά από αποτελεσματική θεραπεία, εξαρτήθηκε από το είδος της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Έτσι, τα επίπεδα στους ασθενείς με μερική ύφεση ήταν σημαντικά υψηλότερα από αυτά των ασθενών σε πολύ καλή μερική ή σε πλήρη ύφεση, όπου το φορτίο της νόσου ήταν ελάχιστο, προτείνοντας ότι τα επίπεδα του sCD40L μετά από τη θεραπεία ίσως να έχουν προγνωστική σημασία. Από την άλλη, τα επίπεδα του sCD40L δε συσχετίστηκαν με το βαθμό πλασματοκυτταρικής διήθησης στο μυελό, που θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει ακριβέστερα το φορτίο της νόσου. Όμως, είναι γνωστό ότι η διήθηση στο ΠΜ είναι πολυεστιακή και όχι διάχυτη, συνεπώς ο βαθμός διήθησης, όπως προκύπτει από την οστεομυελική βιοψία στην οπίσθια άνω λαγόνια άκανθα, είναι ενδεικτικός μόνο για το βαθμό διήθησης. Επιπλέον, το CD40L δεν παράγεται από τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα, αλλά στην ουσία αντιπροσωπεύει το φλεγμονώδες στοιχείο που προκαλεί η πλασματοκυτταρική νεοπλασία. Τέλος, και αντίθετα, για παράδειγμα από την IL-6 που δρα προάγοντας τον πλασματοκυτταρικό πολλαπλασιασμό και συνεπώς τα επίπεδά της συσχετίζονται με την πλασματοκυτταρική διήθηση, το CD40L δρα επάγοντας την απόπτωση των πλασματοκυττάρων [27], άρα περιορίζοντας το φορτίο νόσου. Είναι συνεπώς σημαντικό ότι το CD40L θα μπορούσε να έχει ανασταλτική δράση στον όγκο, όπως έχει επιβεβαιωθεί σε αρκετές συμπαγείς κακοήθειες [24, 77, 78].

Τα δεδομένα της μελέτης δείχνουν ότι οι ασθενείς με ΠΜ έχουν αυξημένα επίπεδα sCD40L στην κυκλοφορία. Ως μέλος της υπεροικογένειας του TNF, η ενεργοποίηση του CD40 από το CD40L παίζει σημαντικό ρόλο για την ανάπτυξη και την εξέλιξη μιας ποικιλίας φλεγμονωδών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της αγγειογένεσης [72]. Βρέθηκε επίσης μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του CD40L και της IL-6, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [79, 80], υποστηρίζοντας έτσι τη σύνδεση του συστήματος CD40-CD40L με την υποκείμενη φλεγμονώδη κατάσταση. Επιπλέον, τα μυελωματικά πλασματοκύτταρα και άλλοι τύποι κυττάρων του

μυελικού μικροπεριβάλλοντος παράγουν αρκετές προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του ΠΜ και της αγγειογένεσης [81, 82].

Ο HGF είναι μια κυτταροκίνη με πλειότροπες δράσεις, ικανή να διεγείρει την ανάπτυξη πολλών επιθηλιακών κυττάρων και την αιμοποίηση [83]. Ο HGF και ο υποδοχέας του c-met εκφράζονται ταυτόχρονα στα μυελωματικά πλασματοκύτταρα [84]. Ο HGF έχει εμπλακεί στη διαδικασία ανάπτυξης των μυελωματικών πλασματοκυττάρων, εξαιτίας της ικανότητάς του να προκαλεί σχηματισμό νέων αγγείων και να προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και εισβολή [85, 86]. Η μέση τιμή του HGF ήταν αυξημένη στον ορό ασθενών με προχωρημένο στάδιο νόσου και μια συσχετίστηκε θετικά με τον Ki-67 PI και την πλασματοκυτταρική διήθηση του μυελού. Με αυτά τα δεδομένα υποστηρίζεται ο σημαντικός του ρόλος στην αγγειογένεση και την εξέλιξη της μυελωματικής νόσου.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι αυξημένα επίπεδα sCD40L βρίσκονται σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο νόσου και μπορούν να μειωθούν μετά τη θεραπεία. Τα αυξημένα επίπεδα αυτού του μεσολαβητή συσχετίζονται με αγγειογενετικές κυτταροκίνες, παρέχοντας ενδείξεις ότι οι αλληλοεπιδράσεις CD40L-CD40 παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς της αγγειογένεσης.

3. PDGF-AB

Όλοι οι αγγειογενετικοί παράγοντες που μετρήθηκαν ήταν υψηλότεροι στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις του PDGF-AB αυξάνονταν με την πρόοδο του σταδίου της νόσου και έπεσαν σημαντικά μετά από αποτελεσματική θεραπεία, στην φάση του πλατώ. Έτσι, συμπεραίνεται ότι τα επίπεδα του PDGF-AB σχετίζονται με τη δραστηριότητα της νόσου. Επιπλέον, τα επίπεδα του PDGF-AB έβαιναν παράλληλα με την τιμή της MVD, συσχετίστηκε με την τιμή της IL-6, ενός σημαντικού ενεργοποιητή της αγγειογένεσης και της ανάπτυξης των μυελωματικών πλασματοκυττάρων [87], αλλά και με την τιμή της B2M, ενός δείκτη φορτίου νόσου [88]. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις συμφωνούν ότι ο PDGF-AB παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της μυελωματικής νόσου [89]

Ο PDGF-AB και οι υποδοχείς του δρουν ως μιτογόνα για το συνδετικό ιστό, ειδικά για τους ινοβλάστες κατά την επούλωση του τραύματος. Ο PDGF-AB είναι ένας αυξητικός παράγοντας που εμπλέκεται στον αυξημένο πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των περικυττάρων και εκφράζεται σε πληθώρα κυττάρων, όπως ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα, οστεοβλάστες και κύτταρα του όγκου [90-92]. Η οικογένεια του PDGF αλληλεπιδρά με 2 υποδοχείς τυροσινικής κινάσης, τους PDGFR α και PDGFR β , που ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες σε κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης, όπως τα περικύτταρα, ινοβλάστες και λείες μυϊκές ίνες κατά την ανάπτυξη [93].

Τα επίπεδα στον ορό του b-FGF, ενός αυξητικού παράγοντα με αγγειογενετικές ιδιότητες, ήταν αυξημένα στη διάγνωση των ασθενών, καθώς και στα προχωρημένα στάδια, όπως έχει ήδη διαπιστωθεί [94, 95]. Συσχετίστηκαν με τη B2M και τον PDGF-AB. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε ζωικά μοντέλα ο συνδυασμός των b-FGF και PDGF-AB σε *in vivo* αγγειογένεση, ήταν σε θέση να σταθεροποιήσει τα νεοσυσταθέντα αγγεία προσλαμβάνοντας περικύτταρα, ενώ ο PDGF-AB από μόνος του δεν αρκούσε γι' αυτή τη διαδικασία. Ο b-FGF λοιπόν, που δρα σε διάφορα και κυρίως ενδοθηλιακά κύτταρα [96, 97] φαίνεται ότι δρα συνεργικά με τον PDGF-AB [97].

Οι συγκεντρώσεις ορού της ANG ήταν επίσης αυξημένες στους ασθενείς με PIM και έβαιναν παράλληλα με το στάδιο της νόσου. Η θετική συσχέτισή της με την MVD υποδεικνύει ότι είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την αγγειογένεση στο PIM. Η ANG αλληλεπιδρά με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας. Η δράση της πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης του

ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα με τη ακτίνη, που τελικά οδηγεί στη διάσπαση της βασικής μεμβράνης, που απαιτείται για τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά τη διαδικασία της αγγειογένεσης [34, 98]. Τα επίπεδά της λοιπόν έπεσαν σημαντικά μετά από αποτελεσματική θεραπεία. Επίσης συσχετίστηκαν με δείκτες δραστηριότητας της νόσου, όπως τη B2M και την IL-6. Αυτό είναι σε συμφωνία με δεδομένα από συμπαγείς όγκους, όπου τα επίπεδά της, σε μερικές περιπτώσεις, ανεβαίνουν κατά την υποτροπή [99, 100], προτείνοντας ότι η μέτρηση των επιπέδων της θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα για την παρακολούθηση της νόσου. Επίσης, τα επίπεδά της συσχετίστηκαν με τον PDGF-AB και την MVD. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι η ANG παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση, προάγοντας τη διηθητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων [87], καθώς είναι και άμεσο μιτογόνο για τα ενδοθηλιακά κύτταρα [101].

Επίσης βρέθηκε στους ασθενείς αυξημένη αγγειογένεση στο μυελό, όπως εκτιμήθηκε με την MVD, που επίσης έβαινε παράλληλα με την πρόοδο του σταδίου. Είναι ενδιαφέρουσα η σημαντική διαφορά στην επιβίωση των ασθενών με αυξημένη έναντι χαμηλότερης τιμής MVD, όπου αυτοί με υψηλότερη διάμεση τιμή είχαν και μικρότερη επιβίωση, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [102, 103]. Επιπλέον, διαπιστώθηκε σημαντική σχέση ανάμεσα στην αγγειογένεση και στην ανταπόκριση στη θεραπεία, επίσης σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [103, 104]. Επιπρόσθετα, βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές στην πλατώ φάση και στις υπόλοιπες παραμέτρους που μετρήθηκαν. Τέλος, βρέθηκε σημαντική συσχέτιση της MVD στο μυελό με τα επίπεδα ορού των PDGF-AB, IL-6 και ANG. Έτσι, το γεγονός ότι ο PDGF-AB σχετίζεται άμεσα και έμμεσα με την αγγειογένεση στο μυελό, υποστηρίζει ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αγγειογένεσης στη μυελωματική νόσο.

Συμπερασματικά, διαπιστώσαμε μια θετική συσχέτιση ανάμεσα στην MVD μυελού με τον PDGF-AB, υποδεικνύοντας ένα ρόλο του PDGF-AB στο σύνθετο δίκτυο κυτταροκινών που εμπλέκεται στην επαγωγή της νεοαγγείωσης στο ΠΜ. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που μελετά τη σχέση του PDGF-AB με την MVD και άλλες αγγειογενετικές κυτταροκίνες στη σύνθετη ρύθμιση της αγγειογένεσης στο ΠΜ. Παρολαυτά, απαιτείται περισσότερη μελέτη σχετικά με το ρόλο του PDGF-AB και των υποδοχέων του για την εκτίμησή τους ως δείκτες προόδου της μυελωματικής νόσου.

4. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες

Τα δεδομένα της μελέτης δείχνουν ότι οι συγκεντρώσεις στον ορό των IL-6, IL-8, IL-1β MIP-1α, LDH και B2M είναι σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με ΠΜ σε σχέση με τους μάρτυρες. Επίσης, αυτές οι παράμετροι συσχετίστηκαν με το στάδιο της νόσου. Βρέθηκε λοιπόν σημαντική συσχέτιση των επιπέδων της IL-6 με το στάδιο της νόσου, επιβεβαιώνοντας ότι η IL-6 είναι ένας κύριος αυξητικός παράγοντας που συμβάλλει στην επιβίωση των μυελωματικών πλασματοκυττάρων.

Η IL-1β είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που διεγείρει την παραγωγή της IL-6 και IL-8 από τα στρωματικά κύτταρα και έχει εμπλακεί σε φλεγμονώδεις και κακοήθεις διαταραχές [41, 105]. Παρά το ότι η IL-1β είναι ο κύριος διεγέρτης των οστεοκλαστών, δεν έχει επιβεβαιωθεί ο ρόλος της στην οστική μυελωματική νόσο [47]. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα επίπεδά της στον ορό αυξήθηκαν σημαντικά στην προχωρημένη νόσο και συσχετίστηκαν με δείκτες δραστηριότητας της νόσου, όπως την LDH και τη B2M, επί φυσιολογικής νεφρικής λειτουργίας. Επιπρόσθετα βρέθηκε να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας.

Η IL-8 είναι ένα σημαντικό μόριο στη φλεγμονή αλλά και στην αγγειογένεση του όγκου [106, 107]. Έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να αυξήσει τη μικροαγγειακή πυκνότητα σε διάφορα συστήματα. Επιπρόσθετα, είναι χημειοτακτικός και αυξητικός παράγοντας για διάφορους όγκους [108, 109]. Όσον αφορά το ΠΜ, φαίνεται ότι μεταξύ των άλλων διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των μυελωματικών πλασματοκυττάρων [110]. Βρέθηκαν λοιπόν αυξημένα επίπεδα στους ασθενείς, συγκριτικά με τους μάρτυρες, τα οποία συσχετίστηκαν με το στάδιο και τη δραστηριότητα της νόσου.

Όσον αφορά το PCNA, οι τιμές του αυξήθηκαν στα προχωρημένα στάδια της νόσου και συσχετίστηκαν σημαντικά με προγνωστικούς παράγοντες, όπως τη B2M και την LDH. Επίσης συσχετίστηκε με την MIP-1α, ένα σημαντικό μεσολαβητή για την οστική καταστροφή στη μυελωματική νόσο. Η συσχέτισή της με το προχωρημένο στάδιο της νόσου και τις υπόλοιπες μετρούμενες παραμέτρους, υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο που παίζει στη βιολογία του μυελώματος, αφού φαίνεται η επίδρασή της στον πλασματοκυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη [36, 53].

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η πολλαπλασιαστική δραστηριότητα αυξάνεται στα προχωρημένα στάδια. Η θετική συσχέτιση του PCNA με τις μετρούμενες παραμέτρους υποστηρίζει τη συμμετοχή τους στη βιολογία της μυελωματικής

ανάπτυξης. Επίσης συνδέουν έμμεσα αυτή την πλασματοκυτταρική ανάπτυξη με την αγγειογένεση, αφού υπάρχουν συσχετίσεις των έμμεσων αγγειογενετικών παραγόντων με τους δείκτες δραστηριότητας της νόσου. Τέλος, οι μετρήσεις τους θα ήταν χρήσιμες, ειδικά της IL-1β, καθότι φάνηκε να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αγγειογένεση επηρεάζει σημαντικά την εξέλιξη του ΠΜ. Αυτό φαίνεται επειδή τόσο η μικροαγγειακή πυκνότητα, όσο και οι γνωστοί αγγειογενετικοί δείκτες που μελετήθηκαν (HGF, VEGF, ANG, bFGF), ανιχνεύθηκαν σε αυξημένα επίπεδα στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες, τα επίπεδά τους αυξάνονταν παράλληλα με την πρόοδο του σταδίου νόσου και επιπλέον τα επίπεδά τους έπεφταν μετά από αποτελεσματική θεραπεία.

Οι παράγοντες που μελετήθηκαν στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή (sCD105, sCD40L, PDGF-AB, καθώς και οι προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες με έμμεση αγγειογενετική δραστηριότητα IL-6, IL-8, IL-1 β , MIP-1 α) επίσης ακολούθησαν αυτή την πορεία: ήταν αυξημένοι στους ασθενείς με ΠΜ, τα επίπεδά τους έβαιναν παράλληλα με το στάδιο της νόσου και έπεσαν σημαντικά μετά από αποτελεσματική θεραπεία. Επιπλέον, αυτοί οι παράγοντες συσχετίστηκαν σημαντικά με την αγγειογενετική διαδικασία, τόσο άμεσα (οι sCD105 και PDGF-AB με την MVD) όσο και έμμεσα (οι sCD40L και PDGF-AB με γνωστούς αγγειογενετικούς παράγοντες).

Έτσι, συμπεραίνει κανείς ότι οι υπό μελέτη παράγοντες (sCD105, sCD40L, PDGF-AB) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες εκτίμησης του αγγειογενετικού φορτίου των ασθενών με ΠΜ. Επιπλέον, η συσχέτισή τους τόσο με το στάδιο όσο και με τη δραστηριότητα της νόσου (IL-6, B2M, LDH, Ki-67 PI, διήθηση) δηλώνει ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και ως δείκτες εκτίμησης και της μυελωματικής δραστηριότητας.

Η παραπάνω διαπίστωση είναι αναμενόμενη, καθότι η αγγειογένεση προάγει την ανάπτυξη του μυελώματος, τόσο άμεσα, μέσω προσφοράς οξυγόνου και τροφής από τα νεοσυσταθέντα αγγεία, όσο και έμμεσα, μέσω παραγωγής αγγειογενετικών παραγόντων που δρουν και ευοδωτικά για την πλασματοκυτταρική ανάπτυξη. Αυτή η έμμεση δράση των αγγειογενετικών παραγόντων είναι αρκετά σύνθετη, πολυπαραγοντική και λίαν ενδιαφέρουσα. Από την άλλη, υπάρχουν και αυξητικοί παράγοντες που ασκούν έμμεση αγγειογενετική δράση (πχ IL-6, IL-8, IL-1 β , MIP-1 α) και που σχετιζόμενοι με το φορτίο της νόσου (στάδιο, B2M, LDH, PCNA), συμμετέχουν στο σύνθετο δίκτυο κυτταροκινών και χυμοκινών που τροποποιούν το μυελωματικό μικροπεριβάλλον και που προάγουν την εξέλιξη της νόσου.

Τα δεδομένα της μελέτης προσφέρουν πληροφορίες για καινούριους αγγειογενετικούς παράγοντες που συμμετέχουν στη μυελωματική νόσο, που, όπως

και με τους υπόλοιπους, καλύτερα μελετημένους (VEGF, HGF, FGF κτλ), συνδέουν την αγγειογενετική δραστηριότητα με την εξέλιξη της νόσου. Τα δεδομένα προσφέρουν πληροφορίες για τις αλλαγές στο μυελικό μικροπεριβάλλον, βοηθώντας έτσι σε μια καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της εξέλιξης της μυελωματικής νόσου. Επίσης, ίσως να συμβάλλουν στη δημιουργία παρεμβατικών μοντέλων για την τροποποίηση της πορείας της νόσου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

1. Warrington K, Hillarby MC, Li C, et al. Functional role of CD105 in TGF-beta1 signalling in murine and human endothelial cells. *Anticancer Res.* 2005;25:1851-1864.
2. Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, et al. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem.* 2004 ;279:32858-32868
3. Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, et al. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 2002;277:43799–43808.
4. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 2003;17:984–992.
5. Cheifetz S, Bellón T, Calés C, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992;267:19027–19030.
6. Urashima M, Ogata A, Chauhan D, et al. Transforming growth factor-beta1: differential effects on multiple myeloma versus normal B cells. *Blood* 1996;87:1928–1938.
7. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab* 1998;24:111–119.
8. Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:21–43.
9. Li C, Guo B, Wilson PB, et al. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 2000;89:122–126.
10. Calabrò L, Fonsatti E, Bellomo G, et al. Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J Cell Physiol* 2003; 194:171–175.
11. Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, et al. Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol* 2001;188:1–7.
12. Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58:4-43.
13. Grewal IS, Flavell RA. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. *Immunol Today.* 1996; 17:410-414.
14. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M et al. RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 1998; 391:591-594.
15. Melter M, Reinders ME, Sho M et al. Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood.* 2000; 96:3801-3808.
16. Denton MD, Reul RM, Dharnidharka VR, et al. Central role for CD40/CD40 ligand (CD154) interactions in transplant rejection. *Pediatr Transplant.* 1998; 2:6-15.
17. Danese S, de la Motte C, Reyes BM, et al. Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification. *J Immunol.* 2004; 172:2011-2015.
18. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.* 2000; 67:2-17.

19. Dallman C, Johnson PW, Packham G. Differential regulation of cell survival by CD40. *Apoptosis*. 2003; 8:45-53.
20. Tong AW, Stone MJ. Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer. *Cancer Gene Ther*. 2003; 10:1-13.
21. Brouwer RE, Hoefnagel J, Borger van Der Burg B et al. Expression of co-stimulatory and adhesion molecules and chemokine or apoptosis receptors on acute myeloid leukaemia: high CD40 and CD11a expression correlates with poor prognosis. *Br J Haematol*. 2001; 115:298-308.
22. Eliopoulos AG, Young LS. The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2004; 4:360-367.
23. Hock BD, McKenzie JL, Patton NW et al. Circulating levels and clinical significance of soluble CD40 in patients with hematologic malignancies. *Cancer*. 2006; 106:2148-2157.
24. Kim Y, Strehl JW, Sievers E, et al. CD40L-transfected myeloma cells transfer prolonged immunity in vivo. *In Vivo*. 2010; 24:45-48.
25. Haenssle H, Buhl T, Knudsen S et al. CD40 ligation during dendritic cell maturation reduces cell death and prevents interleukin-10-induced regression to macrophage-like monocytes. *Exp Dermatol*. 2008; 17:177-187.
26. Voorzanger-Rousselot N, Alberti L, Blay JY. CD40L induces multidrug resistance to apoptosis in breast carcinoma and lymphoma cells through caspase independent and dependent pathways. *BMC Cancer*. 2006; 6:75.
27. Fernandes MS, Gomes EM, Butcher LD et al. Growth inhibition of human multiple myeloma cells by an oncolytic adenovirus carrying the CD40 ligand transgene. *Clin Cancer Res*. 2009;15:4847-4856.
28. Heldin CH. Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *EMBO J*. 1992;11:4251-4259.
29. Wiens KM, Lee HL, Shimada H, et al. Platelet-derived growth factor receptor beta is critical for zebrafish intersegmental vessel formation. *PLoS One*. 2010 25; 5(6):e11324
30. Nissen LJ, Cao R, Hedlund EM, et al. Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. *J Clin Invest*. 2007; 117:2766-2777.
31. Verstovsek S, Kantarjian H, Aguayo A, et al. Significance of angiogenin plasma concentrations in patients with acute myeloid leukaemia and advanced myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 2001; 114:290-295.
32. Weiner HL, Weiner LH, Swain JL. Tissue distribution and developmental expression of the messenger RNA encoding angiogenin. *Science*. 1987; 237:280-282.
33. Hu GF, Riordan JF. Angiogenin enhances actin acceleration of plasminogen activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 197:682-687.
34. Hu GF, Chang SI, Riordan JF, Vallee BL. An angiogenin-binding protein from endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88:2227-2231.
35. Skopelitou A, Tselenis S, Theocharis S, et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and nucleolar organizer regions (NORs) in multiple myeloma. *Anticancer Res*. 1994; 14:787-892.
36. Alexandrakis MG, Passam FH, Pappa CA, et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in multiple myeloma: its relationship to bone marrow microvessel density and other factors of disease activity. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2004; 17:49-56.
37. Wilkins BS, Harris S, Waseem NH, et al. A study of cell proliferation in formalin-fixed, wax-embedded bone marrow trephine biopsies using the monoclonal

- antibody PC10, reactive with proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *J Pathol.* 1992; 166:45-52.
38. Zölzer F, Basu O, Devi PU, et al. Chromatin-bound PCNA as S-phase marker in mononuclear blood cells of patients with acute lymphoblastic leukaemia or multiple myeloma. *Cell Prolif.* 2010; 43:579-583.
 39. Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol.* 1998; 16:249-284.
 40. Lacy MQ, Donovan KA, Heimbach JK, et al. Comparison of interleukin-1 beta expression by in situ hybridization in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Blood.* 1999; 93:300-305.
 41. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996; 87:2095-2147.
 42. Dinarello CA. Blocking interleukin-1 β in acute and chronic autoinflammatory diseases. *J Intern Med.* 2011; 269:16-28.
 43. Kim GY, Lee JW, Ryu HC, et al. Proinflammatory cytokine IL-1beta stimulates IL-8 synthesis in mast cells via a leukotriene B4 receptor 2-linked pathway, contributing to angiogenesis. *J Immunol.* 2010;184:3946-3954.
 44. Kline M, Donovan K, Wellik L, et al. Cytokine and chemokine profiles in multiple myeloma; significance of stromal interaction and correlation of IL-8 production with disease progression. *Leuk Res.* 2007; 31:591-598.
 45. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, et al. Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J Leukoc Biol.* 1995; 57:752-762.
 46. Cook DN. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 1996; 59:61-66.
 47. Choi SJ, Cruz JC, Craig F, et al. Macrophage inflammatory protein 1-alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. *Blood.* 2000; 96:671-675.
 48. Vande Broek I, Asosingh K, Vanderkerken K, Straetmans N, Van Camp B, Van Riet I. Chemokine receptor CCR2 is expressed by human multiple myeloma cells and mediates migration to bone marrow stromal cell-produced monocyte chemotactic proteins MCP-1, -2 and -3. *Br J Cancer.* 2003; 88:855-862.
 49. Uneda S, Hata H, Matsuno F, et al. Macrophage inflammatory protein-1 alpha is produced by human multiple myeloma (MM) cells and its expression correlates with bone lesions in patients with MM. *Br J Haematol.* 2003; 120:53-55.
 50. Cao Y, Luetkens T, Kobold S, et al. The cytokine/chemokine pattern in the bone marrow environment of multiple myeloma patients. *Exp Hematol.* 2010; 38:860-867.
 51. Roussou M, Tasidou A, Dimopoulos MA, et al. Increased expression of macrophage inflammatory protein-1alpha on trephine biopsies correlates with extensive bone disease, increased angiogenesis and advanced stage in newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Leukemia.* 2009;23:2177-2181.
 52. Suguro M, Kanda Y, Yamamoto R, et al. High serum lactate dehydrogenase level predicts short survival after vincristine-doxorubicin-dexamethasone (VAD) salvage for refractory multiple myeloma. *Am J Hematol.* 2000;65:132-135.
 53. Terpos E, Katodritou E, Roussou M, et al. Greek Myeloma Study Group, Greece. High serum lactate dehydrogenase adds prognostic value to the international myeloma staging system even in the era of novel agents. *Eur J Haematol.* 2010; 85:114-119.
 54. Pruneri G, Ponzoni M, Ferreri AJ, et al. Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 2002;118:817-820

55. Weidner N. Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol* 1998;184:119–122.
56. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000; 96:2240–2245.
57. Lundberg LG, Lerner R, Sundelin P, et al. Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. *Am J Pathol* 2000;157:15–19.
58. Alexandrakis MG, Passam FH, Kyriakou DS, et al. Expression of the proliferation-associated nuclear protein MIB-1 and its relationship with microvascular density in bone marrow biopsies of patients with myelodysplastic syndromes. *J Mol Histol* 2004;35:857–863.
59. Vacca A, Ribatti D. Angiogenesis and vasculogenesis in multiple myeloma: role of inflammatory cells. *Recent Results Cancer Res* 2011;183:87–95.
60. Zhang H, Vakil V, Braunstein M, Smith EL, Maroney J, Chen L, et al. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood* 2005;105:3286–3294.
61. Leberman DA, Edmiston JS. The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect.* 1999;1:1297-1304
62. Li C, Hampson IN, Hampson L, et al. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 2000;14:55–64.
63. Oh HS, Choi JH, Park CK, et al. Comparison of microvessel density before and after peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma patients and its clinical implications: multicenter trial. *Int J Hematol* 2002;76:465–470.
64. Kumar S, Fonseca R, Dispenzieri A, et al. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: effect of therapy. *Br J Haematol* 2002;119: 665–671.
65. El-Gohary YM, Silverman JF, Olson PR, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol* 2007;127:572–579.
66. Li C, Gardy R, Seon BK, et al. Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *Br J Cancer* 2003;88:1424–1431.
67. Dankbar B, Padró T, Leo R, et al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 2000;95:2630–2636.
68. Anderson KC. Moving disease biology from the laboratory to the clinic. *Semin Oncol* 2002;29:17–20.
69. Thaler J, Fechner F, Herold M, Huber H. Interleukin-6 in multiple myeloma: correlation with disease activity and Ki-67 proliferation index. *Leuk Lymphoma* 1994;12:265–271.
70. Roselli M, Mineo TC, Basili S et al. Soluble CD40 ligand plasma levels in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:610-614.
71. Ottaiano A, Pisano C, De Chiara A et al. CD40 activation as potential tool in malignant neoplasms. *Tumori.* 2002; 88:361-366.
72. Reinders ME, Sho M, Robertson SW, et al. Proangiogenic function of CD40 ligand-CD40 interactions. *J Immunol.* 2003; 171:1534-1541.
73. Danese S, Scaldaferrri F, Vetrano S et al. Critical role of the CD40 CD40-ligand pathway in regulating mucosal inflammation-driven angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2007;56:1248-1256.

74. Hollmann CA, Owens T, Nalbantoglu J, et al. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase predisposes diffuse large B-cell lymphoma cell lines to CD40-mediated cell death. *Cancer Res.* 2006; 66:3550-3557.
75. Tai YT, Podar K, Gupta D et al. CD40 activation induces p53-dependent vascular endothelial growth factor secretion in human multiple myeloma cells. *Blood.* 2002; 99:1419-1427.
76. Cho CS, Cho ML, Min SY et al. CD40 engagement on synovial fibroblast up-regulates production of vascular endothelial growth factor. *J Immunol.* 2000; 164:5055-5061.
77. Willimott S, Baou M, Naresh K, Wagner SD. CD154 induces a switch in pro-survival Bcl-2 family members in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2007; 138:721-732.
78. Melichar B, Patenia R, Gallardo S, et al. Expression of CD40 and growth-inhibitory activity of CD40 ligand in ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol.* 2007; 104:707-713.
79. Lim HS, Blann AD, Lip GY. Soluble CD40 ligand, soluble P-selectin, interleukin-6, and tissue factor in diabetes mellitus: relationships to cardiovascular disease and risk factor intervention. *Circulation.* 2004; 109:2524-2528.
80. Déchanet J, Grosset C, Taupin JL et al. CD40 ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelial cells. *J Immunol.* 1997; 159:5640-5647.
81. Alexandrakis MG, Passam FH, Ganotakis ES et al. The clinical and prognostic significance of erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum interleukin-6 (IL-6) and acute phase protein levels in multiple myeloma. *Clin Lab Haematol.* 2003;25:41-46.
82. Lauta VM. A review of the cytokine network in multiple myeloma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer.* 2003; 97:2440-2442.
83. Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo G et al. Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. *Haematologica.* 2000; 85:800-805.
84. Borset M, Lien E, Espevik T, et al. Concomitant expression of hepatocyte growth factor/scatter factor and the receptor c-MET in human myeloma cell lines. *J Biol Chem.* 1996; 271:24655-24661.
85. Seidel C, Børset M, Turesson I, et al. Elevated serum concentrations of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma. The Nordic Myeloma Study Group. *Blood.* 1998; 91:806-812.
86. Alexandrakis MG, Passam FJ, Ganotakis E et al. Bone marrow microvascular density and angiogenic growth factors in multiple myeloma. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42:1122-1126.
87. Dong X, Han ZC, Yang R. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007; 62:105-118.
88. Bataille R, Durie BG, Grenier J. Serum beta2 microglobulin and survival duration in multiple myeloma: a simple reliable marker for staging. *Br J Haematol.* 1983; 55:439-547.
89. Kara IO, Sahin B, Gunesacar R, Unsal C. Clinical significance of hepatocyte growth factor, platelet-derived growth factor-AB, and transforming growth factor-alpha in bone marrow and peripheral blood of patients with multiple myeloma. *Adv Ther.* 2006;23:635-645.
90. Passam FH, Alexandrakis MG, Kafousi M, et al. Histological expression of angiogenic factors: VEGF, PDGFRalpha, and HIF-1alpha in Hodgkin lymphoma. *Pathol Res Pract.* 2009; 205:11-20.

91. Zhang J, Cao R, Zhang Y, et al., Wahlberg E. Differential roles of PDGFR-alpha and PDGFR-beta in angiogenesis and vessel stability. *FASEB J.* 2009; 23:153-163.
92. McCarty MF, Somcio RJ, Stoeltzing O, et al. Overexpression of PDGF-BB decreases colorectal and pancreatic cancer growth by increasing tumor pericyte content. *J Clin Invest.* 2007; 117:2114-2122.
93. Paulsson J, Sjöblom T, Micke P, et al. Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor beta-receptor expression in human breast cancer. *Am J Pathol.* 2009; 175:334-341.
94. Alexandrakis MG, Passam FH, Boula A, et al. Relationship between circulating serum soluble interleukin-6 receptor and the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in multiple myeloma. *Ann Hematol.* 2003; 82:19-23.
95. Negaard HF, Iversen N, Bowitz-Lothe IM, et al. Increased bone marrow microvascular density in haematological malignancies is associated with differential regulation of angiogenic factors. *Leukemia.* 2009; 23:162-169.
96. Moschetta M, Di Pietro G, Ria R, et al. Bortezomib and zoledronic acid on angiogenic and vasculogenic activities of bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *Eur J Cancer.* 2010;46:420-429.
97. Kitami Y, Inui H, Uno S, Inagami T. Molecular structure and transcriptional regulation of the gene for the platelet-derived growth factor alpha receptor in cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1995; 96:558-567.
98. Alexandrakis MG, Passam FH, Sfiridaki A, et al. Elevated serum angiogenin in multiple myeloma. *Hematol J.* 2003; 4:454-455.
99. Li D, Bell J, Brown A, Berry CL. The observation of angiogenin and basic fibroblast growth factor gene expression in human colonic adenocarcinomas, gastric adenocarcinomas, and hepatocellular carcinomas. *J Pathol.* 1994; 172:171-175.
100. Anagnostopoulos A, Eleftherakis-Papaiakovou V, Kastiritis E, et al. Serum concentrations of angiogenic cytokines in Waldenstrom macroglobulinaemia: the ration of angiopoietin-1 to angiopoietin-2 and angiogenin correlate with disease severity. *Br J Haematol.* 2007; 137:560-568.
101. Strydom DJ. The angiogenins. *Cell Mol Life Sci.* 1998; 54:811-824.
102. Sezer O, Niemöller K, Eucker J, et al. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol.* 2000; 79:574-577.
103. Kumar S, Gertz MA, Dispenzieri A, et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in patients with multiple myeloma undergoing high-dose therapy. *Bone Marrow Transplant.* 2004;34:235-239.
104. Sucak GT, Aki SZ, Yüzbaşıoğlu B, et al. Prognostic value of bone marrow microvessel density and angiogenic cytokines in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplant. *Leuk Lymphoma.* 2011;52:1281-1289.
105. Donovan KA, Lacy MQ, Gertz MA, Lust JA. IL-1beta expression in IgM monoclonal gammopathy and its relationship to multiple myeloma. *Leukemia.* 2002; 16:382-385.
106. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med.* 2001;250:91-104.
107. Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12:375-391.

108. Li A, Dubey S, Varney ML, et al. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol.* 2003; 170:3369-3376.
109. Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, et al.. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol.* 2004; 25:201-209.
110. Pellegrino A, Ria R, Di Pietro G, et al. Bone marrow endothelial cells in multiple myeloma secrete CXC-chemokines that mediate interactions with plasma cells. *Br J Haematol.* 2005;129:248-256.

Παράρτημα

Πίνακας 1: Διάγνωση του ΠΜ

Θα πρέπει να υπάρχουν τα τρία παρακάτω κριτήρια για τη διάγνωση του συμπτωματικού μυελώματος:

1. Η παρουσία Μ πρωτεΐνης στον ορό και /ή στα ούρα.

Σημείωση: δε χρησιμοποιείται ειδικό επίπεδο Μ πρωτεΐνης σαν κατώτερη τιμή αφού το 40% των ασθενών με συμπτωματικό μυέλωμα θα έχουν επίπεδα Μ πρωτεΐνης λιγότερο από 3 g/dL. Επίσης στο πραγματικό μη εκκριτικό μυέλωμα (σχεδόν το 3% των διαγνώσεων) η Μ πρωτεΐνη δε θα ανιχνεύεται στον ορό ή στα ούρα. Σ' αυτή την περίπτωση απαιτούνται $\geq 30\%$ μονοκλωνικά πλασματοκύτταρα στο μυελό ή/και ιστολογικά επιβεβαιωμένο πλασμοκύττωμα.

2. Η παρουσία $\geq 10\%$ μονοκλωνικών πλασματοκυττάρων στο μυελό.

Σημείωση: σχεδόν το 3% των ασθενών μπορεί να έχει λιγότερο από 10% πλασματοκύτταρα, αφού η συμμετοχή του μυελού των οστών μπορεί να είναι τοπική και όχι διάχυτη. Σε αυτές τις περιπτώσεις, αν πληρούνται άλλα διαγνωστικά κριτήρια, η διάγνωση μπορεί να γίνει μετά από ιστοπαθολογική επιβεβαίωση οστικού ή εξωοστικού πλασμοκυττώματος. Επίσης θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν η επανάληψη της βιοψίας.

3. Η συμμετοχή βλάβης οργάνου ή ιστού

Μπορεί να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων του ασβεστίου του πλάσματος (>10.5 mg/l), νεφρική ανεπάρκεια (Κρεατινίνη ορού >2 mg/dl), αναιμία (Hb <10 g/dl ή $2g >$ από την κατώτερη φυσιολογική τιμή), και οστικές λυτικές βλάβες ανιχνεύσιμες με ακτινογραφικό έλεγχο (αποκαλείται συχνά με το ακρωνύμιο CRAB- increased plasma Calcium level, Renal insufficiency, Anemia and lytic Bone lesions).

Από το: Smith A, Wisloff F, Samson D. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. Br J Haematol 132:410, 2006.

Πίνακας 2: Σταδιοποίηση του ΠΜ

1. Σταδιοποίηση κατά Durie-Salmon

Στάδιο I:

- Χαμηλά επίπεδα M- πρωτεΐνης : IgG<5g/dL, IgA<3g/dL, BJ ούρων <4 g/24hr
- Απουσία ή μονήρης οστική βλάβη
- Φυσιολογική αιμοσφαιρίνη, ασβέστιο ορού, επίπεδα Ig (όχι M πρωτεΐνη)

Στάδιο II:

- Όλες οι τιμές μεταξύ I και II

Στάδιο III: Ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω:

- Υψηλά επίπεδα M πρωτεΐνης: IgG>7g/dL, IgA>5g/dL, ελαφρές άλυσοι ούρων >12 g/24hr
- Προχωρημένες, πολλαπλές λυτικές οστικές βλάβες
- Αιμοσφαιρίνη <8,5g/ dL, ασβέστιο ορού >12 mg/dL

Υποταξινόμηση: Βασισμένη στη νεφρική λειτουργία

A= κρεατινίνη ορού <2 mg/dL, B= κρεατινίνη ορού ≥2 mg/dL

Από το: Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. Cancer. 36:842, 1975.

2. Το διεθνές προγνωστικό σύστημα σταδιοποίησης- International staging system (ISS)

- **Στάδιο I:** B2M <3.5 mg/L και αλβουμίνη ορού ≥3.5 g/dL
- **Στάδιο II:** ούτε στάδιο I ούτε στάδιο III
- **Στάδιο III:** B2M ≥5.5 mg/L

Από το: Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma. J Clin Oncol 23:3412, 2005.

Πίνακας 3: Κριτήρια ανταπόκρισης στη θεραπεία

Πλήρης ορολογική ύφεση (sCR): Φυσιολογική αναλογία ελαφρών αλυσίδων στον ορό και απουσία κλωνικών κυττάρων στο μυελό (με ανοσοϊστοχημεία ή ανοσοφθορισμό)

Πλήρης ύφεση (CR): Αρνητική ανοσοκαθήλωση ορού και ούρων και εξαφάνιση οποιουδήποτε πλασματοκυττώματος και πλασματοκυτταρική παρουσία στο μυελό < 5%.

Πολύ καλή μερική ύφεση (VGPR): Η Μ-πρωτεΐνη ανιχνεύεται μόνο στην ανοσοκαθήλωση ορού ή/και ούρων, αλλά όχι στην ηλεκτροφόρηση, ή ελάττωση $\geq 90\%$ της Μ-πρωτεΐνης στον ορό με Μ-πρωτεΐνη ούρων < 100 mg/24ώρου.

Μερική ύφεση (PR): Ελάττωση της Μ-πρωτεΐνης ορού $\geq 50\%$ και ελάττωση της Μ-πρωτεΐνης ούρων 24ώρου κατά $\geq 90\%$ ή σε < 200 mg/24ωρο.

Αν η Μ-πρωτεΐνη δεν ανιχνεύεται στον ορό και στα ούρα, τότε στη θέση της χρησιμοποιείται η ελάττωση κατά $\geq 50\%$ της διαφοράς ανάμεσα στις εμπλεκόμενες και μη εμπλεκόμενες ελεύθερες ελαφρές αλυσίδες. Αν αυτή η μέτρηση δεν είναι ανιχνεύσιμη, τότε στη θέση της Μ-πρωτεΐνης χρησιμοποιείται η ελάττωση κατά $\geq 50\%$ της πλασματοκυτταρικής διήθησης στο μυελό, εφόσον η αρχική διήθηση ήταν $\geq 30\%$. Επιπρόσθετα, αν στη διάγνωση υπήρχαν πλασματοκυττώματα, απαιτείται ελάττωση $\geq 50\%$ του μεγέθους τους.

Σταθερή νόσος (SD): Χωρίς να πληρεί τα κριτήρια για CR, VGPR, PR ή για πρόοδο νόσου.

Πρόοδος νόσου (PD): Αύξηση $\geq 25\%$ από τη χαμηλότερη τιμή ανταπόκρισης σε κάποιο από τα παρακάτω:

- Μ-πρωτεΐνη ορού ή/και (η απόλυτη αύξηση πρέπει να είναι ≥ 0.5 g/dL)
- Μ-πρωτεΐνη ούρων ή/και (η απόλυτη αύξηση πρέπει να είναι ≥ 200 mg/24ώρου)
- Μόνο για τους ασθενείς που δεν είχαν ανιχνεύσιμες τιμές Μ-πρωτεΐνης στον ορό και στα ούρα: Διαφορά στα επίπεδα των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων (εμπλεκόμενων από μη εμπλεκόμενων) Η απόλυτη αύξηση πρέπει να είναι > 10 mg/dL.
- Πλασματοκυτταρική διήθηση μυελού: η απόλυτη αύξηση πρέπει να είναι $\geq 10\%$.
- Επίσημη ανάπτυξη νέων οστικών βλαβών, ή πλασματοκυττωμάτων, ή απόλυτη αύξηση προϋπαρχόντων οστικών βλαβών ή πλασματοκυττωμάτων.
- Εμφάνιση υπερασβεστιαμίας (διορθωμένη τιμή ασβεστίου ορού > 11.5 mg/dL ή 2.65 mmol/L) οφειλόμενης αποκλειστικά στην πλασματοκυτταρική διαταραχή.

Υποτροπή: Η κλινική υποτροπή απαιτεί ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω, που προσφέρει άμεση ένδειξη επιδείνωσης της νόσου ή/και εμφάνιση βλάβης τελικού οργάνου (χαρακτηριστικά CRAB):

- Ανάπτυξη νέου πλασματοκυττώματος ή οστικής βλάβης
- Απόλυτη αύξηση μεγέθους προϋπάρχοντος πλασματοκυττώματος ή οστικής βλάβης, δηλαδή αύξηση 50% (και τουλάχιστον κατά 1 cm).
- Υπεραβεστιαμία (> 11.5 mg/dL ή 2.65 mmol/L)
- Πτώση της αιμοσφαιρίνης ≥ 2 g/dL ή 1.25 mmol/L
- Αύξηση της τιμής κρεατινίνης ορού ≥ 2 mg/dL ή 177 mmol/L

Από το www.myeloma.org, βασισμένο στο: Durie BGM et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006 1-7.