



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA“ DIN BUCUREȘTI**



Str. Dionisie Lupu 37, sector 2, București, 020021, România, www.umfed.ro, email: rectorat@umfed.ro

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

**FACTORI MOLECULARI ȘI CLINICI IMPLICAȚI ÎN
EVOLUȚIA BOLII ȘI RĂSPUNSUL LA TRATAMENT ÎN MIELOMUL
MULTIPLU
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. DANIEL CORIU

Student-doctorand:

DR. RUXANDRA-MARIA IRIMIA

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE	3
LISTA DE ABREVIERI	5
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	10
1. Etiopatogeneza MM.....	10
1.1 Dezvoltarea normală a limfocitelor B.....	10
1.2 Evenimentele genetice implicate în malignizarea plasmocitelor.....	12
1.3. Rolul micromediului medular în evoluția MM.....	14
1.3.1. Celulele Stromale.....	15
1.3.2 Celulele osoase.....	16
1.3.3 Rețeaua vasculară.....	17
1.3.4 Factorii solubili	18
1.3.5 Exozomii	18
1.3.6 Alterări imune în micromediul medular	19
2. Gammapatiile monoclonale	21
2.1. Date epidemiologice	21
2.2 Gammapatiile monoclonale de semnificație necunoscută	22
2.3 Mielomul Multiplu Smoldering	23
2.4 Mielomul Multiplu activ	25
3. Clasele terapeutice utilizate în Mielomul Multiplu și mecanismele implicate în rezistența la terapie	27
3.1 Inhibitorii de proteazom.....	27
3.2. Mecanismele rezistenței la tratamentul cu inhibitori de proteazom	28
3.3. Agenții imunomodulatori.....	30
3.4. CELMoDs	31
3.5 Rezistența la agenții imunomodulatori	32
3.6 Anticorpii monoclonali	33
3.7 Rezistența la anticorpi monoclonali.....	35
3.8 Anticorpii bispecifici	36
3.9 Rezistența la anticorpi bispecifici	38
3.10 Terapia CAR-T cell.....	39
3.11 Rezistența la terapia CAR-T cell	40
CONTRIBUȚII PERSONALE.....	42
4. Ipoteza de lucru și obiective generale.....	42
5. Identificarea rolului CD38 în modularea evoluției tumorale în MM.....	44
5.1 Introducere	44
6.2. Materiale și metode.....	46
5.3 Rezultate	52
5.4 Discuții.....	72
6. Optimizarea tratamentului cu carfilzomib în cazul expunerii anterioare la bortezomib	78
6.1. Introducere	78
6.2 Metode	79

6.3. Rezultate	81
6.4. Discuții.....	96
7. Întârzierea de diagnostic în Mielomul Multiplu - evaluarea situației pacienților din România utilizând metoda Aarhus	99
7.1 Introducere	99
7.2 Metode	100
7.3 Rezultate	103
7.4 Discuții.....	107
8. Perspectiva pacienților din România cu privire la terapia continuă pentru Mielomul Multiplu	111
8.1 Introducere	111
8.2 Metode	112
8.3 Rezultate	114
8.4 Discuții.....	119
9. Concluzii și contribuții personale	123
Bibliografie	127

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Dezvoltarea MM este un proces ierarhic, ce include etape de diferențiere, proliferare, supraviețuire și de diseminare a celulelor maligne, ce rezultă ca urmare a interacțiunii dintre plasmocitele maligne și micromediul medular. Celula de origine este reprezentată de plasmocitele transformate malign, ce iau naștere prin mutațiile survenite în timpul pasajului limfocitelor B activate prin centrul germinativ. Originea post germinală a plasmocitelor maligne este demonstrată prin prezența mutațiilor hiper-somatice de la nivelul regiunii variabile a genelor imunoglobulinelor și prin switch-ul de clasa demonstrat în MM tip IgG, IgA, IgD dar nu și în rarele cazuri de MM IgM [1]. Cauzele de apariție a gammapatiilor monoclonale nu sunt pe deplin elucidate, însă modelul oncogenic general acceptat constă în apariția uneia din două posibile categorii de mutații fondatoare, ce sunt mutual exclusive [2]. Prima categorie este reprezentată de translocății la nivelul genelor lanțurilor grele ale imunoglobulinelor IgH, de pe cromozomul 14, de obicei între 14q32 și cromozomii 4, 6, 11, 16 și 20 [3-6]. A doua categorie este reprezentată de prezența hiperdiploidiilor care implică cel mai frecvent cromozomii 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 și 21 și se asociază cu un prognostic favorabil [3-6]. În contrast, translocățiile lanțurilor grele ale imunoglobulinelor cu diverși cromozomi parteneri sunt considerate în general mutații cu risc înalt ducând la potențarea expresiei unor oncogene ca Cyclin D1 (11q13 sau 6p21), MMSET (4p16) sau C-MAF (16q32) [5-7].

Plasmocitele maligne prezintă un burden mutațional intermediar între malignități considerate “simple” ca leucemiile acute sau leucemia mieloidă cronică și cele complexe așa cum sunt malignitățile solide [8-11]. O caracteristică importantă a pacienților cu MM, cu un impact puternic asupra răspunsului la tratament și a evoluției clinice, este heterogenitatea intraclonală care apare încă din stadiile incipiente ale bolii [9-11]. Evaluarea pacienților care suferă de MGUS a demonstrat existența a 2 populații celulare: o populație “stabilă” cu un burden mutațional semnificativ mai scăzut, și o populație “activă” sau “progresivă” [8-14]. În cazul pacienților cu predominanța populației “stabile”, boala se asociază cu un risc mai scăzut de progresie către MM activ, mutații secundare, “driver” determinând o evoluție mai rapidă și agresivă [8-13]. De asemenea, progresia MM pare să respecte un model darwinian de evoluție, celulele devenind heterogene ca urmare a presiunii de selecție aplicate de micromediu, resursele nutriționale limitate și tratament [12]. Astfel, evoluția genomică nu este aleatorie, achiziția de mutații adiționale fiind dictată de tipul mutațiilor fondatoare [13,14]. Pacienții cu hiperdiploidie tind să dezvolte supraexpresia căii de semnalizare NRAS [12-14]. Translocăția

(11;14) se asociază cu mutații în KRAS, IRF4 și CCND1 iar t(4;14) se asociază cu mutații în FGFR3, DIS3 și PRKD2 [12-14].

În ceea ce privește pacienții care prezintă boală recăzută, secvențierea genomică a pus în evidență 3 modele distincte de evoluție la recădere: stabilă, liniară și ramificată [12]. Modelul stabil implică persistența aceluiași spectru mutațional pe durata tratamentului, evoluția liniară apare prin apariția de noi alterări genetice ale clonei preexistente, în timp ce evoluția ramificată este caracterizată prin apariția de noi clone dominante, complet diferite de cele prezente la diagnostic [9]. Modelul de evoluție clonală este dictat de profunzimea răspunsului la linia anterioară de tratament. Pacienții care obțin mai mult decât VGPR prezintă o evoluție ramificată la recădere, în timp ce răspunsurile suboptimale sunt asociate cu un model stabil sau o evoluție liniară, sugerând astfel rolul jucat de tratament ca factor de selecție.

Micromediul medular este un alt factor important în apariția și evoluția MM. Acesta este o structură permisivă care susține inițierea procesului neoplazic, promovează rezistența la tratament și progresia bolii [15]. Micromediul medular este o structură complexă alcătuită din elemente celulare (celule osoase - osteoblaste, osteoclaste, osteocite, celule stromale, celule endoteliale, celule adipoase), matrixul extracelular (colagen, fibronectină, laminină, trombospondină, proteoglicani) și factori solubili (factori de creștere, chemokine, citokine) [16]. Interacțiunea dintre plasmocitele maligne și micromediul medular mediată prin legături celulare directe, secreție de citokine sau producție de exozomi este bidirecțională și determină o modulare mutuală a fenotipului, expresiei genice și secreției de proteine [16-11]. Rezultatul final este crearea unui cerc vicios, care are ca rezultat final expansiunea bolii.

Din punct de vedere clinic, mielomul multiplu evoluează dintr-o stare premalignă denumită gammapatie monoclonală de semnificație necunoscută (MGUS) [23,24]. MGUS este definită printr-un existența unui infiltrat medular plasmocitar de <10%, prezența de proteină monoclonală serică <3 g/dl, <500 mg/24 ore proteină monoclonală urinară și absența de semnelor de activitate (anemie, leziuni osteolitice, insuficiență renală, hipercalcemie sau prezența depozitelor de amiloid) [23-25].

MM smoldering (MMS), numit și MM asimptomatic, reprezintă o etapă de evoluție intermediară între MGUS și MM activ [104]. Această etapă este caracterizată printr-un infiltrat medular plasmocitar între 10% și 60%, prin prezența de proteină monoclonală serică ≥ 3 g/dl, prezența a ≥ 500 mg/24 ore proteină monoclonală urinară și absența semnelor de activitate (anemie, leziuni osteolitice, insuficiență renală, hipercalcemie, prezența depozitelor de amiloid, un raport al lanțurilor ușoare ≥ 100 sau a mai mult de o leziune osoasă focală la investigația IRM) [24].

În ceea ce privește MM activ, până în 2014, diagnosticul acestei entități necesita îndeplinirea cel puțin unui criteriu CRAB - hipercalcemie, anemie, insuficiență renală sau leziuni osoase osteolitice [26]. După aceasta dată, Grupul Internațional de Lucru în Mielom (IMWG) a revizuit definiția MM activ și a introdus criteriile SlimCRAB. Aceste criterii de activitate includ vechea clasificare CRAB, hipercalcemie (Ca seric >11 mg/dl), anemie (Hb <10g/dl), insuficiență renală (creatinina serica >2 mg/dl sau clearance creatinina < 40 ml/min) și leziuni osoase osteolitice, la care se adaugă două noi criterii, și anume, un infiltrat medular plasmocitar de peste 60% și prezența a cel puțin unei leziuni focale pe imagistica RMN osoasă [24,26].

Din punct de vedere al tratamentului, în ultimii 20 ani, opțiunile terapeutice pentru MM s-au îmbogățit remarcabil, supraviețuirea la cinci ani crescând de la sub 30% în anii 2000, până la peste 70% la momentul actual [27]. Inițial, singurele opțiuni terapeutice disponibile pentru pacienții cu MM erau agenții alchilanți și steroizii, la care se adauga autotransplantul medular. Primele progrese semnificative în supraviețuirea acestor pacienți au fost realizate odată cu introducerea inhibitorilor de proteazom și a agenților imunomodulatori, care au marcat și începutul dezvoltării de noi combinații terapeutice, a conceptelor de triplă terapie și tratamentelor de menținere. Următorul mare salt a fost înregistrat odată cu sintetizarea anticorpilor monoclonali anti CD38. Inițial, aceștia au fost utilizați în tratamentul pacienților cu MM recăzut, dar au fost rapid integrați și în schemele terapeutice dedicate pacienților nou diagnosticați. Acest moment a însemnat de asemenea și implementarea conceptului de cvadrupla terapie în managementul pacienților cu MM. În ultimii cinci ani, terapiile care utilizează efectele terapeutice ale limfocitelor T autologe au fost introduse în arsenalul teapeutic dedicat MM. Dintre acești agenți fac parte anticorpul bispecific și terapia CAR-T cell, care au demonstrat rezultate remarcabile în cazul pacienților pluritratați.

Cu toate acestea, MM rămâne o boală incurabilă. Deși cauzele exacte care contribuie la persistența și recăderea bolii post tratament nu sunt pe deplin elucidate, cercetările descriu o serie de posibili factori contribuabili care țin de caracteristicile celulelor tumorale. Dintre aceștia fac parte caracteristicile citogenetice, evoluția clonală și heterogenitatea tumorală, rolul protectiv oferit de micromediul tumoral sau spectrul de imunodeficiențe asociate bolii. În plus, eficiența terapeutică este influențată și de o serie de factori independenți, ca de exemplu stadiul bolii, tipul expunerii anterioare la tratament, vârsta și comorbiditățile pacientului sau complianța terapeutică.

Această teză își propune să contribuie la aprofundarea înțelegerii mecanismelor care contribuie la persistența MM și să aducă noi opțiuni pentru optimizarea strategiilor terapeutice.

CONTRIBUȚII PERSONALE

1. Ipoteza de lucru și obiective generale

În prima parte a lucrării de față am prezentat datele de literatură cu privire la mecanismele implicate în apariția și evoluția MM, criteriile de clasificare a gammapatiilor monoclonale, cât și principalele clase terapeutice și mecanismele generale de rezistență la tratament.

Partea a doua a acestei lucrări explorează, printr-o evaluare multistratificată și multidisciplinară, factori anterior neexplorați, care influențează evoluția și răspunsul la tratament în MM. Metodologia integrează cercetarea fundamentală, cercetarea clinică și chestionare pentru pacienți, abordând aspecte de sănătate publică, biologie moleculară și hematologie clinică, cu scopul de a dezvolta noi strategii pentru optimizarea terapiei personalizate în MM. Pentru caracterizarea de noi factori cu impact asupra răspunsului la tratament, am urmărit patru obiective generale, alocând fiecăruia câte un studiu de cercetare independent.

Obiectivul 1 constă în evaluarea rolului jucat de markerul de suprafață CD38 în biologia MM. Deși CD38 este exprimat uniform și în densitate mare pe suprafața celulelor tumorale, impactul său asupra evoluției bolii rămâne incomplet înțeles. Metodologia adoptată în acest studiu a inclus tehnici de cercetare fundamentală, precum culturi celulare, metabolomică și studii pe animale, utilizând modele preclinice in-vitro și in-vivo pentru a analiza comportamentul celulelor tumorale în prezența sau absența CD38 [28]. Rezultatele obținute oferă primele dovezi privind rolul CD38 în metabolismul celular, adaptarea la hipoxie și dezvoltarea tumorală a plasmocitelor maligne [28].

Obiectivul 2 urmărește investigarea impactului rezistenței la tratamentul cu bortezomib asupra eficacității inhibitorului de proteazom de generația a doua, carfilzomib. Deși utilizarea carfilzomib este considerată suboptimală la pacienții cu rezistență anterioară la bortezomib, datele disponibile privind eficacitatea sa în acest context sunt limitate [29]. Utilizând o metodologie bazată pe cercetare clinică, ne-am propus să definim profilul pacienților care ar putea beneficia de tratamente bazate pe combinații cu carfilzomib, în condițiile rezistenței anterioare la inhibitorul de proteazom de prima generație [29].

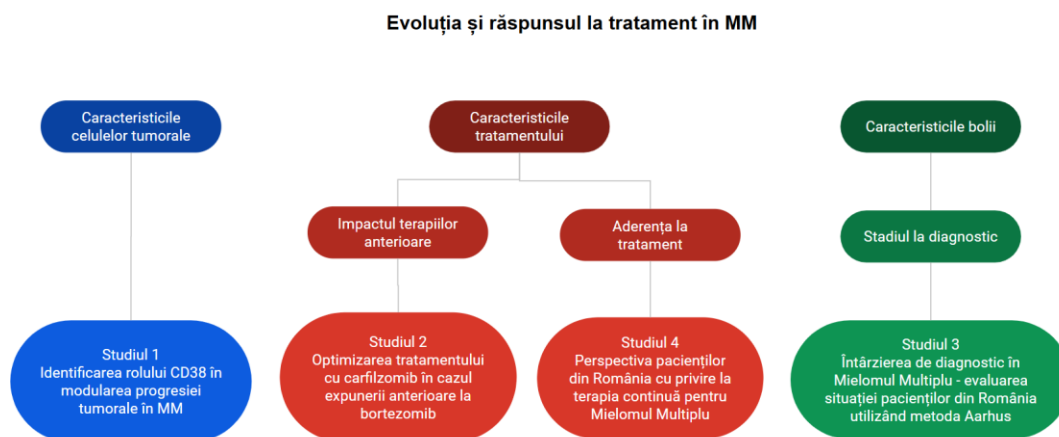
Obiectivul 3 a vizat evaluarea rutelor de diagnostic și a cauzelor întârzierii diagnosticului la pacienții cu MM în România. Stadiul bolii este dependent de rapiditatea cu

care se stabilește diagnosticul de MM și are un impact direct asupra răspunsului la tratament și a supraviețuirii globale. Datele disponibile sugerează că în România o proporție considerabilă de pacienți cu MM se confruntă cu erori sau întâmpină întârzieri semnificative în stabilirea diagnosticului [30]. Utilizând mijloace metodologice de cercetare clinică și epidemiologică, datele generate de acest studiu oferă în premieră informații privind rutele de diagnostic ale pacienților cu MM în România și întârzierile asociate procesului diagnostic [30].

Obiectivul 4 a fost să analizeze perspectiva pacienților asupra terapiei continue pentru MM, având în vedere că aceasta influențează direct aderența la tratament și, implicit, eficiența intervenției terapeutice. În contextul recomandărilor actuale pentru tratament continuu până la progresia bolii sau apariția toxicităților semnificative, rezultatele acestui studiu sunt inovatoare, oferind o perspectivă unică asupra modului în care pacienții percep impactul terapiei asupra vieții lor și oferă oportunitatea de a identifica subseturile de pacienți care ar putea beneficia de un tratament cu durată finită [31].

O reprezentare schematică a studiilor de cercetare este ilustrată în figura 1, iar detaliile complete ale studiilor sunt prezentate în capitolele următoare.

Figura 1.1 Reprezentare schematică a studiilor de cercetare



2. Identificarea rolului CD38 în modularea evoluției tumorale în MM

2.1 Introducere

Proteina CD38 a fost identificată în anul 1980 de către grupul de cercetători condus de Reinherz și Schlossman în timpul studiilor dedicate identificării și caracterizării TCR [32]. Expresia CD38 este întâlnită în concentrații ridicate pe suprafața plasmocitelor, dar și pe cea a

limfocitelor B și T activate sau a celulelor NK [33,34].Inițial, CD38 a fost descris ca fiind un receptor de suprafață, însă cu timpul, s-a descoperit ca acesta are și o activitate catalitică ecto și endoenzimatică [35,36]. Principalul rol enzimatic la nivel intracelular este reprezentat de catabolismul NAD⁺ și sinteza de ADPR și ADPR ciclic, cu rol în eliberarea calciului de la nivelul reticulului endoplasmic [36]. De asemenea, prin degradarea NAD⁺, CD38 modulează pe calea non-canonică cantitatea de adenzină de la nivel extracelular [35,37,38]. Adenzina este un reglator cheie al răspunsului imun prin puternicul sau efect imunosupresor ce include, printre altele, inhibarea activității celulelor NK, celulelor dendritice, a macrofagelor și a limfocitelor T helper sau citotoxice [39-41].

Administrarea anticorpului monoclonal daratumumab se asociază cu o scădere rapidă a expresiei CD38 pe suprafața plasmocitelor maligne [42]. Totuși, după întreruperea administrării de daratumumab sau pe măsură ce boala progresează, are rol o restaurare a expresiei CD38 la nivelurile anterioare tratamentului, indicând un posibil rol determinant al CD38 în evoluția MM [42].

2.2 Materiale și metode

Expresia CD38 a fost eliminată din liniile celulare umane și murine utilizând tehnologia CRISPR-Cas9. Șoareci imunocompetenți Balb/c și șoareci imunodeficienți NSG au fost injectați subcutanat fie cu celule J558 nemodificate (NT), fie cu celule pentru care s-a eliminat expresia CD38 (KO). Aderența la stromă a fost comparată utilizând celule NT și KO marcate, împreună cu celule stromale OP-9 de origine murină. Conținutul celular de NAD a fost cuantificat utilizând Promega Glo Assay. Mitocondriile au fost izolate folosind kitul de izolare a mitocondriilor (Thermo Scientific). Rata de consum de oxigen (OCR) și rata de acidificare extracelulară (ECAR) au fost cuantificate utilizând Seahorse Assay. Răspunsul la hipoxie a fost evaluat utilizând o cameră hipoxică modulară. Ciclul celular a fost cuantificat utilizând colorarea cu iodură de propidiu.

2.3 Rezultate

Pentru a investiga efectul CD38 asupra creșterii tumorale în prezența unui sistem imun competent, am utilizat șoareci tip Balb/c pe care i-am injectat cu celule de plasmocitom singeneice J558, fie CD38 negative (KO) fie pozitive (NT). Am observat astfel că în ciuda unei creșteri uniforme a celulelor J558 CD38 KO și NT în condiții de creștere in-vitro, in-vivo exista o diferență semnificativ statistică între volumele tumorale CD38 NT versus CD38 KO (1173.34 mm³ versus 235.08 mm³, p= 0.001). În următoarea etapă, am vrut sa evaluăm dacă

avantajul oferit de CD38 în creșterea tumorală se menține și în cazul în care eliminăm posibilul său efect modulator asupra sistemului imun. Ca și în cazul experimentului anterior, deși celulele J558 CD38 KO și NT prezentau o creștere sincronă în culturi celulare, dezvoltarea tumorală in-vivo arată o diferență dubla de volum între tumorile CD38 NT față de cele KO (volum mediu tumoral de 1591.81 mm³ față de 707.88 mm³ pentru KOs, $p = 0.02$)

După ce am demonstrat faptul că expresia CD38 determina un avantaj de proliferare tumoral, indiferent de activitatea sistemului imun, în următoarele etape am investigat posibile mecanisme care să explice acest fenomen. La momentul actual există date care susțin faptul că endocitoza CD38 mediată de daratumumab contribuie la pierderea adeziunii la celulele stromale, dar, până la acest moment nu a existat o evaluare directă a rolului CD38 în adeziune [43]. Pentru a determina comportamentul celulelor CD38 NT versus KO am utilizat linia celulară murină de plasmocitom J558 și celulele stromale murine OP-9. În concordanță cu așteptările noastre și datele preexistente, proporția de celule J558 CD38 NT atașate la stroma a fost dublă comparativ cu celulele care nu exprimă CD38.

Dat fiind faptul că micromediul tumoral se asociază în general cu nivele variabile de hipoxie, în următoarea etapă am evaluat comportamentul celular cultivând celulele în condiții de normoxie și hipoxie. În urma experimentului, am observat că expunerea prelungită la hipoxie determină un deficit semnificativ de proliferare al celulelor KO în comparație cu echivalentele lor NT. Pentru a explica diferențele, am analizat ciclul celular și am constatat că, în condiții de hipoxie, celulele CD38 KO prezintă un blocaj crescut în faza G₀-G₁ comparativ cu celulele CD38 NT.

În următoarea etapă a studiului am chestionat rolul activității enzimatice a CD38. În concordanță cu datele existente în literatură, în liniile celulare studiate, absența CD38 s-a corelat cu valori ale concentrațiilor NAD⁺ de până la de 2 ori mai mari comparativ cu celulele NT. Având în vedere influența NAD⁺ asupra biosintezei mitocondriale, am evaluat relația dintre expresia CD38 și concentrația mitocondrială. Pierderea CD38 s-a corelat cu o creștere semnificativă a numărului de mitocondrii în plasmocitele maligne, conform datelor din alte modele celulare. Următorul pas a fost evaluarea tipului de metabolism preferențial în modelele celulare studiate. Utilizând analizorul de flux extracelular Seahorse XF am demonstrat că pierderea CD38 corelează cu o dublare a nivelurilor de OXPHOS (rata de utilizare a fosforilării oxidative) în comparație cu celulele CD38 pozitive. Mai mult decât atât, raportul între OCR (rata de consum al oxigenului - marker al fosforilării oxidative) și ECAR (rata de formare a acidului lactic - marker al glicolizei aerobe) este de 2 până la 3 ori mai mare în celulele KO comparativ cu celulele CD38 WT). Aceste date susțin ideea că plasmocitele maligne care nu

prezinta CD38 pe suprafata membranara utilizează preferențial fosforilarea oxidativă ca sursă de energie, asemanator celulelor non-maligne, spre deosebire de celulele CD38 pozitive care utilizează un metabolism tipic celulelor neoplazice, bazat preponderent glicoliză aerobă.

În condiții de hipoxie, majoritatea celulelor eucariote își pot schimba strategia metabolică, principalul factor responsabil pentru răspunsul adaptativ fiind factorul inductibil de hipoxie-1 α (HIF-1 α). Având în vedere preferința celulelor CD38 KO către un metabolism predominant de tip fosforilare oxidativa, am dorit sa evaluăm expresia HIF-1 α în aceste linii celulare. În acest scop, după expunerea celulelor la condiții hipoxice, am evaluat prin tehnica Western Blot expresia HIF-1 α și am demonstrat faptul că nivelele de HIF-1 α sunt semnificativ mai scăzute în celulele CD38 KO versus NT.

De asemenea, pentru aceste tipuri de celule, crescute însă în anaerobioză, însă nu și în condiții de normoxie, am observat o diferență semnificativă între numărul de colonii formate de celulele CD38KO versus cele WT. Mai mult decât atât, atunci când am recultivat seriat probele, celule CD38 KO expuse anterior la hipoxie și-au menținut avantajul de a genera colonii comparativ cu celulele CD38 NT, demonstrând astfel un comportament mai agresiv și o capacitate de auto-regenerare și de clonogenicitate superioară.

În ultima etapă a studiului am evaluat efectul expunerii cronice la adenzină asupra plasmocitelor maligne. Conform cu datele existente, expunerea acută la NECA determină apoptoza liniilor celulare studiate. Cu toate acestea, la expunerea cronică, celulele dezvoltă nu numai toleranță dar și o dependență profundă de această semnalizare, în același timp demonstrand și o creștere a potențialului clonogenic.

2.4 Discuții

Studiul prezentat reprezintă prima caracterizare a rolului CD38 în dezvoltarea și persistența mielomului multiplu. Pierderea expresiei CD38 se asociază cu reducerea proliferării tumorale in-vivo, dar nu si in-vitro, în modele murine imunocompetente și imunodeficiente. Aceste date sugerează un rol dependent de context al CD38, ce implică modificări profunde ale metabolismului celulelor maligne, și deficite de adeziune la micromediul medular. În același timp, pierderea CD38, corelată cu expunerea la hipoxie, modelează comportamentul plasmocitar, dând naștere unei populații celulare extrem de agresive ce poate fi potențial considerată ca având trăsături de celulă stem malignă. Am demonstrat, de asemenea, că plasmocitele maligne devin dependente de stimularea cronică mediată de adenzină și, în același timp, își amplifică potențialul clonogenic sub influența acestui metabolit generat de activitatea enzimatică a CD38.

3. Optimizarea tratamentului cu carfilzomib în cazul expunerii anterioare la bortezomib

3.1. Introducere

Apariția inhibitorului de proteazom de primă generație, bortezomib, a reprezentat un punct de referință în tratamentul MM. Aprobabil pentru prima dată în 2003, acest inhibitor de proteazom de generația întâi a revoluționat terapia pacienților cu MM, crescând rata de supraviețuire la 5 ani la peste 50% [44]. În cazul pacienților care prezintă rezistență primară sau secundară la bortezomib, ghidurile actuale recomandă utilizarea anticorpilor monoclonali anti CD38 în linia următoare de tratament, tratamentul pe bază de inhibitorul de generația a doua carfilzomib fiind considerat suboptimal [45,46]. Odată cu introducerea noilor ghiduri ESMO de tratament în MM din 2021, combinația daratumumab–bortezomib a fost utilizată pe scară largă în linia întâi de tratament. În aceste condiții, opțiunile de terapeutice pentru pacienții care dezvoltă rezistență la combinația daratumumab–bortezomib devin limitate. Deși combinațiile pe bază de carfilzomib și-au dovedit eficiența în trialurile clinice, nu sunt disponibile suficiente date provenite fie din studii, fie din viața reală, care să clarifice fezabilitatea utilizării carfilzomib pentru pacienții cu rezistență anterioară la bortezomib.

3.2. Materiale și metode

Am desfășurat un studiu retrospectiv, observational, unicentric în cadrul secției de Hematologie din Institutul Clinic Fundeni. Datele au fost extrase prin examinarea fișelor electronice de observație ale pacienților. Studiul a inclus pacienți diagnosticați cu MM recăzut sau refractar conform criteriilor IMWG, care au primit cu cel puțin două cicluri complete de tratament bazat pe carfilzomib în perioada de referință, ianuarie 2018 și decembrie 2022. Toți pacienții incluși au fost expuși anterior la bortezomib cel puțin în timpul terapiei de primă linie.

3.3. Rezultate

Proporția de pacienți care au obținut cel puțin un răspuns parțial la schemele terapeutice pe baza de carfilzomib a fost semnificativ statistic mai mare în grupul pacienților responsivi la bortezomib (84, 95.5%) (grup 1) comparativ cu pacienții refractari la tratament (82.05%) (grup 2) (OR 4.593 [95% IC, 1.259, 16.758], $p = 0.032$).

Așa cum era de așteptat, ratele superioare de răspuns ale grupului 1 de pacienți s-au reflectat într-un PFS îmbunătățit. Supraviețuirea liberă de progresie în grupul pacienților

sensibili la bortezomib a fost de 523 zile, semnificativ statistic mai mare decât valoarea de 310 zile înregistrată în cazul pacienților refractari la bortezomib ($p = 0.003$). În grupul de pacienți tratați uniform cu combinația KRd, PFS-ul median în grupul sensibil la bortezomib a fost de 523 de zile (IC 95%: 372 până la 613) în comparație cu 399 de zile (IC 95%: 231 până la 506) în grupul refractar la bortezomib.

În ceea ce privește supraviețuirea fără progresie în răspuns la terapia cu carfilzomib la pacienții cu risc citogenetic ridicat, PFS-ul median a fost de 523 de zile (95% IC, 321 până la 863) în grupul 1, semnificativ statistic mai mare decât în grupul 2, 247 de zile (95% IC, 168 până la 692), $p = 0,012$. Însă, în ceea ce privește populația de pacienți cu risc citogenetic standard din studiul nostru, nu am observat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește PFS între Grupul 1 (482 zile) versus Grupul 2 (399 zile), $p = 0.125$. În ceea ce privește pacienții care au primit cel puțin 2 linii anterioare de terapie, PFS-ul median a fost de 523 de zile în grupul 1 (95% IC, 314 până la 587) în comparație cu 310 zile pentru grupul 2 (95% IC, 226 până la 453).

Un alt aspect important pe care l-am analizat a fost eficacitatea terapiilor bazate pe carfilzomib în cele două grupuri de pacienți în funcție de expunerea anterioară la imunomodulatori. În cohorta noastră, nu am observat nicio diferență semnificativă statistic în PFS între cele două grupuri, indiferent de statutul expunerii anterioare la IMiD. La pacienții cu expunere anterioară la medicamente imunomodulatoare, PFS-ul median a fost de 322 de zile în grupul 1 față de 301 de zile în grupul 2 ($p = 0,109$). În absența expunerii la IMiD, PFS-ul median a fost de 535 de zile în grupul 1 față de 544 de zile în grupul 2 ($p = 0,446$).

Un alt factor asociat cu răspunsul la tratament inclus în analiza noastră a fost stadializarea ISS. În populația noastră de studiu, pentru un stadiu ISS de I sau II, pacienții din grupul 1 au obținut un PFS median semnificativ statistic mai mare în comparație cu grupul 2 când au fost tratați cu o combinație bazată pe carfilzomib, 613 zile (95% CI, 392 până la 861) comparativ cu 247 zile (95% CI, 160 până la 480) ($p = 0,002$)(Figura 6). Cu toate acestea, pentru pacienții cu un stadiu ISS III, nu am observat o diferență semnificativă între cele două grupuri în ceea ce privește supraviețuirea liberă de progresie.

Pe lângă PFS, prelungirea OS este un alt obiectiv important al tratamentului pacienților cu MM. În studiul nostru, în total, OS-ul în grupul sensibil la bortezomib a fost de 1258 de zile față de 1411 în grupul 2, o diferență nesemnificativă din punct de vedere statistic, $p = 0,632$. De asemenea, nu am observat diferențe semnificative statistic indiferent de statutul de risc citogenetic, numărul anterior de linii de tratament sau stadiul ISS.

3.4. Discuții

Eficacitatea combinațiilor ce conțin carfilzomib în terapia pacienților cu MM recăzut este indiscutabilă. Cu toate acestea, rămân neclare datele referitoare la rezultatele obținute în subpopulația de pacienți refractari la tratamentul anterior cu bortezomib, deoarece majoritatea studiilor clinice care au evaluat astfel de combinații au exclus această subpopulație de la înrolare.

Datele generate de studiul nostru au indicat faptul că pacienții refractari la tratamentul anterior cu bortezomib au înregistrat rate de răspuns globale semnificativ mai scăzute comparativ cu pacienții sensibili la bortezomib. De asemenea, acest studiu identifică o populație de pacienți, caracterizată printr-un stadiu ISS III și risc un citogenetic standard, care are potențialul de a beneficia de tratamentul cu carfilzomib, indiferent de răspunsul anterior la bortezomib. În plus, analiza datelor sugerează că tratamentul carfilzomib este suboptimal în cazul pacienților cu un risc citogenetic înalt, ISS I sau II și rezistența anterioară la bortezomib.

4. Întârzierea de diagnostic în Mielomul Multiplu - evaluarea situației pacienților din România utilizând metoda Aarhus

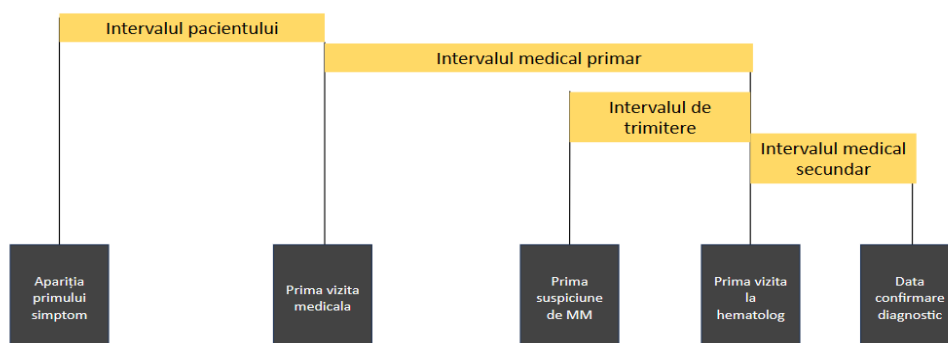
4.1 Introducere

Mielomul Multiplu este considerat a fi una dintre cele mai greu de diagnosticat malignități [47,48]. Cu toate că managementul pacienților cu MM se bazează pe un diagnostic corect stabilit într-o fază incipientă, la nivel global, peste o treime dintre pacienți sunt diagnosticați într-un stadiu avansat, cu manifestări ce necesită asistență medicală de urgență. De asemenea, datele statistice indică faptul că și în România, o proporție importantă de pacienți cu MM sunt diagnosticați eronat sau în etape avansate de boala [49-51]. Cu toate acestea, până la acest publicarea datelor generate de acest studiu, nu existau raportări privind parcursul pacienților cu MM din România de la apariția simptomelor până la stabilirea diagnosticului sau despre factorii asociați cu erorile de diagnostic.

4.2 Materiale și metode

Studiul a avut un design prospectiv, observațional, unicentric și s-a desfășurat în cadrul secției de Hematologie din cadrul Institutului Clinic Fundeni în perioada Ianuarie 2022 - Martie 2023. Studiul a inclus toți pacienții adulți diagnosticați cu MM în cadrul secției în intervalul de timp de referință. Pentru a determina corect cauzele întârzierilor de diagnostic am utilizat un chestionar bazat pe definițiile oferite de metoda standardizată Aarhus (Fig. 1).

Figura 4.1: Intervalele de diagnostic



4.3 Rezultate

Întârzierile în intervalul pacientului se datorează adesea incapacității subiecților de a recunoaște simptomele asociate cancerului. În studiul nostru, durata mediană a intervalului pacientului a fost de 162 zile. Cele mai frecvente simptome înainte de diagnostic au fost durerile osoase (78,64% dintre cazuri) și oboseala (57,28%). Deși că peste trei sferturi dintre pacienți au experimentat dureri osoase, doar 59,02% dintre aceștia au solicitat o evaluare medicală, iar durata mediană de la apariția durerilor și până la prima vizită medicală a fost de 191 zile.

Intervalul primar a reflectat particularitățile sistemului medical românesc, care permite pacienților să aibă o primă interacțiune cu un medic specialist fără o evaluare prealabilă de către medicul de familie. Dintre pacienții incluși în studiu, doar 42,71% s-au adresat prima dată medicului de familie pentru simptomele resimțite. Peste un sfert dintre pacienți au avut o primă prezentare ca urgență medicală. Au fost necesare, în medie, 3,7 vizite medicale (interval între 2 și 16) până când MM a putut fi suspectat. De asemenea, 18,44% dintre pacienți au necesitat cinci sau mai multe consulturi până la obținerea unei suspiciuni diagnostice. Este notabil că pacienții care au avut o primă prezentare la medicul de familie au avut o durată a acestui interval semnificativ statistic mai scurtă decât cei care au urmat alte rute diagnostice (mediană de 26 zile vs. 93 zile, $p = 0,004$).

În intervalul medical secundar nu au existat practic întârzieri de diagnostic, pacienților fiindu-le stabilit diagnosticul în primele 72 ore de la internare. Din întreg lotul, 31,06% dintre pacienți au necesitat îngrijiri medicale de urgență din cauza insuficienței renale acute, hipercalcemiei, sindromului de compresiune medulară sau anemiei severe. De asemenea, 60,19% dintre pacienți s-au prezentat cu un stadiu avansat de boală ISS III, iar 15,53% au necesitat inițierea hemodializei.

Tabelul 4.2. Intervalele de diagnostic conform metodei Aarhus

		Mediană (zile)
Intervalul pacientului		162
Intervalul medical primar	Prima vizită la medic / Prima dată când se ridică suspiciunea	66
	Prima dată când se ridică suspiciunea / Prima trimitere la hematolog	19
Intervalul medical secundar		0

4.4 Discuții

Studiul prezentat este prima evaluare a procesului de diagnostic al pacienților cu MM din România și a întârzierile rezultate. În lotul de studiu, cele mai mari întârzieri sunt întâmpinate în intervalul pacientului, posibil din cauza debutului insidios al bolii, a lipsei simptomelor alarmante și a amânării solicitării ajutorului medical. Deși intervalul medical primar contribuie, de asemenea, la prelungirea procesului de diagnostic, medicul de familie pare să joace un rol cheie în scurtarea întârzierilor din această etapă. O primă vizită la medicul de familie se asociază în lotul nostru cu o durată semnificativ mai scurtă a acestui interval, comparativ cu vizitele făcute inițial la alt tip de specialiști.

5. Perspectiva pacienților din România cu privire la terapia continuă pentru Mielomul Multiplu

5.1 Introducere

Prognosticul pacienților cu MM s-a îmbunătățit semnificativ în ultimele decenii, datorită introducerii noilor clase de tratament [52-54]. Eficacitatea sporită și profilul de siguranță bun al acestor molecule a permis continuarea tratamentului pe durate din ce în ce mai lungi de timp. În prezent strategiile terapeutice în această boală se bazează preponderent pe administrarea combinațiilor terapeutice continue, până la progresia bolii sau apariția de toxicități semnificative. Cu toate acestea, datele despre perspectiva pacienților asupra terapiei continue în MM sunt încă limitate.

5.2 Materiale și metode

În studiu au fost incluși pacienți adulți cu MM care primeau terapie continuă în cadrul secției de Hematologie din Institutului Clinic Fundeni. Datele au fost colectate pe parcursul a cinci luni, între Martie și Iulie 2023. Au fost considerați eligibili pacienții care primeau

tratament de cel puțin 6 luni la momentul inițierii studiului, fie în regim ambulatoriu, fie prin internări scurte (<72 h). Pentru a evalua impactul terapiei continue asupra diferitelor aspecte ale vieții pacienților, am dezvoltat un chestionar utilizând atât instrumente calitative, cât și cantitative. Chestionarul a fost elaborat pornind de la întrebărilor incluse în scalele validate existente (EORTC QLQ-C30, EORTC QLQ-MY20, Scala de evaluare a tulburării de anxietate generalizată 7), iar întrebările din chestionar au fost traduse și adaptate pentru a fi ușor accesibile pacienților cu diferite niveluri educaționale.

5.3 Rezultate

Atunci când au fost întrebați despre impactul asupra calității vieții, 74,83% din pacienți au declarat că tratamentul are un impact negativ. Când li s-a oferit opțiunea de a alege între o terapie cu intensitate mare dar de durată fixă versus o terapie continuă, doar 28,26% ar alege terapia cu durată fixă dacă eficacitatea sa ar fi inferioară terapiei continue. În plus, întrebați dacă se tem să întrerupă terapia continuă, 73,54% din participanți și-au exprimat îngrijorarea, în principal din cauza fricii de o recidivă mai rapidă sau mai agresivă a bolii. În grupul de studiu, doar 18,06% din pacienți au raportat un nivel ridicat sau foarte ridicat de anxietate asociată cu vizitele la spital, în timp ce 43,87% dintre pacienți consideră că vizitele frecvente la spital le oferă un nivel ridicat sau foarte ridicat de confort psihologic. Întrebați despre impactul financiar al tratamentului, 36,12% din pacienți au raportat că terapia continuă are un impact ridicat sau foarte ridicat asupra statutului lor economic. În ceea ce privește viața personală, un sfert dintre pacienți au raportat că terapia continuă pentru MM a avut un impact negativ mare sau foarte mare asupra bunăstării vieții lor de familie, iar 31,61% au considerat că efectul negativ s-a extins și asupra membrilor familiei lor.

În ceea ce privește efectele adverse resimțite, simptomele subiective de oboseală și insomnia au fost identificate ca fiind cele mai supărătoare, 54,19% respectiv 42,58% dintre pacienți declarând că sunt afectați într-o măsură mare sau foarte mare.

5.4 Discuții

Conform studiului nostru, terapia continuă se asociază pentru o proporție semnificativă de pacienți cu provocări personale, sociale, financiare și profesionale. Trei sferturi dintre pacienții intervievați consideră că tratamentul a avut un impact negativ asupra calității lor de viață și, dacă li s-ar oferi alegerea, aproape 60% dintre pacienți ar opta pentru o terapie cu termen fix dacă ar oferi același nivel de eficacitate. În ciuda acestor provocări, aproape toți pacienții și-au exprimat reticența de a întrerupe terapia, un sentiment posibil influențat de frica

de recidivă, dar și de relația cu personalul medical. Astfel, decizia de a opta între terapia continuă și cea pe termen limitat depinde de echilibrul obținut între controlul optim al bolii versus impactul asupra calității vieții și activităților zilnice ale pacienților. O abordare personalizată care ia în considerare în egală măsură caracteristicilor bolii cât și valorile și convingerilor pacienților este esențială în acest caz.

6. Concluzii și contribuții personale

Ultimele decenii au adus progrese importante în dezvoltarea unor noi clase terapeutice pentru MM care includ inhibitori de proteazom, agenți imunomodulatori, anticorpi monoclonali, anticorpii bispecifici dar și terapia CAR-T cell. Astfel, abordarea terapeutică a evoluat de la simplul obiectiv de a obține un răspuns terapeutic, către implementarea unor strategii personalizate, care integrează factori clinici și biologici cu rol demonstrat în modularea răspunsului la tratament. În acest context, identificarea de noi factori determinanți ai răspunsului la tratament devine esențială pentru optimizarea combinațiilor terapeutice, contribuind atât la creșterea eficienței tratamentului, cât și la îmbunătățirea supraviețuirii.

Această lucrare doctorală și-a propus să contribuie la înțelegerea mecanismelor care influențează evoluția bolii și răspunsul la tratament. Obiectivele cercetării au fost atinse printr-o abordare multidisciplinară, care a integrat cercetarea fundamentală, studiile clinice și analiza perspectivelor pacienților prin intermediul chestionarelor. Metodologia utilizată a abordat aspecte din domeniile sănătății publice, biologiei moleculare și hematologiei clinice, oferind o perspectivă multidisciplinară. Concluziile lucrării reflectă contribuții originale și relevante, care răspund în mod direct obiectivelor propuse pentru cercetare.

1. Confirmarea rolul markerului de suprafață CD38 în biologia tumorală a MM, oferind primele dovezi despre asocierea expresiei CD38 cu un avantaj proliferativ dependent de context (Capitolul 5).

1.1 Pierderea CD38 se corelează cu o scădere a proliferării celulare in-vivo și cu apariția unei populații agresive, cu trăsături de celule stem.

1.2 Absența CD38 determină reducerea adeziunii la celulele stromale din micromediul medular.

1.3 Pierderea CD38 se asociază cu o capacitate proliferativă redusă în condiții de hipoxie, cauzată de o dependență energetică crescută de respirația mitocondrială și de adoptarea unui metabolism celular bazat pe fosforilare oxidativă, similar celui al celulelor sănătoase.

1.4 Deficitul de adaptare la hipoxie în condițiile pierderii expresiei CD38 a fost obiectivat suplimentar printr-o expresie scăzută a HIF-1 α .

1.5 Cu toate că celulele CD38 KO au prezentat un deficit proliferativ în condiții de hipoxie, acestea au o viabilitate mai crescută în timp și o capacitate clonogenică și de auto-regenerare superioară comparativ cu omoloagele lor expresoare de CD38.

1.6 Prin expunerea cronică la adenzină, celulele dezvoltă toleranța și dependența față de semnalizarea prin receptorii adenzinici tip 2A .

1.7 Expunerea cronică la adenzină crește potențialul clonogenic al plasmocitelor maligne.

2. Definierea profilul pacienților care pot beneficia de tratamentul cu combinații pe baza de carfilzomib în contextul rezistenței anterioare la inhibitorul de proteazom de generația I, bortezumib (Capitolul 6).

2.1 Pacienții cu stadii avansate de boală și risc citogenetic standard demonstrează un răspuns favorabil la carfilzomib, independent de expunerea anterioară la bortezumib.

2.2 Pacienții cu risc citogenetic înalt sau aceia cu un stadiu ISS I sau II de boala, demonstrează un răspuns suboptimal la carfilzomib în cazul preexistenței rezistenței primare sau secundare la bortezumib.

3. Analiza rutelor de diagnostic ale pacienților cu MM din România a relevat întârzieri semnificative, ce afectează negativ stadiul bolii la momentul diagnosticului și, implicit, răspunsul la tratament (Capitolul 7).

3.1 Cele mai mari întârzieri au fost înregistrate în intervalul pacientului, cauzate probabil de factori precum lipsa educației medicale, absența obiceiului de a efectua controale medicale regulate, dar și de debutul insidios al bolii și simptomele nespecifice.

3.2 Pacienții din România au nevoie, în medie, de cinci consultații medicale înainte de stabilirea diagnosticului.

3.3 Medicul de familie joacă un rol cheie în scurtarea timpului necesar pentru diagnostic

4. Perspectiva pacienților asupra terapiei continue din MM influențează aderența la tratament și în consecință eficiența terapeutică (Capitolul 8).

4.1 Terapia continuă are un impact negativ asupra calității generale a vieții, dar majoritatea pacienților se tem să întrerupa tratamentul de teama unor recăderi mai rapide sau mai agresive

4.2 Majoritatea pacienților au declarat că vizitele frecvente la spital le oferă un grad de confort psihologic, crescând implicit aderența terapeutică.

4.3 Terapia continuă are un impact negativ asupra vieții profesionale și sociale, și a situației financiare în cazul pacienților activi profesional, identificând o subpopulație de pacienți pentru care terapia pe durată finită ar fi preferabilă.

4.4 Perspectiva pacienților trebuie integrată în procesul decizional terapeutic, cu accent pe echilibrul între eficiența tratamentului și impactul asupra vieții cotidiene.

În ansamblu, factorii identificați în cadrul studiilor de cercetare deschid noi perspective pentru optimizarea strategiilor terapeutice, punând accent pe o abordare personalizată. În acest context, considerăm că obiectivele cercetării au fost atinse cu succes.

Totuși, este important de subliniat câteva dintre limitările ridicate de activitatea de cercetare. Studiile componente ale acestei lucrări prezintă anumite limitări, printre care caracterul unicentric al studiilor II, III și IV, care poate influența generalizarea rezultatelor. De asemenea, numărul relativ mic de pacienți incluși poate afecta validitatea statistică a anumitor observații. În ceea ce privește primul studiu, experimente adiționale sunt necesare pentru a evalua rolul pierderii CD38 în răspunsul la tratament și pentru a dezvolta combinații terapeutice care să includă inhibitori enzimatici specifici.

Optimizarea terapiei pentru pacienții cu mielom multiplu aduce avantaje semnificative, cu un impact direct asupra supraviețuirii și calității vieții acestora. Prin integrarea terapiilor personalizate, care țin cont de factori care influențează eficiența terapeutică, este posibilă prelungirea supraviețuirii globale și a perioadei fără progresie a bolii, reducând în același timp povara simptomatică asociată MM. Noile regimuri terapeutice, cum sunt combinațiile bazate pe anticorpi monoclonali, inhibitori de proteazom și agenți imunomodulatori sau terapiile celulare, au demonstrat un potențial crescut în creșterea eficienței tratamentului și în îmbunătățirea rezultatelor pe termen lung. Din punct de vedere economic, optimizarea terapiei poate contribui la reducerea costurilor asociate cu spitalizările frecvente datorate complicațiilor și necesitatea tratamentelor suplimentare în caz de recădere. Totuși, dezavantajele includ costurile ridicate ale terapiilor moderne și necesitatea unor sisteme de sănătate capabile să asigure accesul egal la aceste tratamente performante. Cu toate acestea, beneficiile în supraviețuire și calitatea vieții justifică eforturile economice, reprezentând un progres remarcabil în gestionarea unei boli care rămâne incurabilă.

Bibliografie selectivă

- [1] Da Vià MC, Ziccheddu B, Maeda A, Bagnoli F, Perrone G, Bolli N. A Journey Through Myeloma Evolution: From the Normal Plasma Cell to Disease Complexity. *Hemasphere* 2020 November 24,;4[6]:e502.
- [2] Barwick BG, Gupta VA, Vertino PM, Boise LH. Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Front Immunol* 2019 May 21,;10:1121.
- [3] Anderson KC, Carrasco RD. Pathogenesis of myeloma. *Annu Rev Pathol* 2011;6:249–274.
- [4] Heider M, Nickel K, Högner M, Bassermann F. Multiple Myeloma: Molecular Pathogenesis and Disease Evolution. *Oncol Res Treat* 2021 -12;44[12]:672–681.
- [5] Went M, Duran-Lozano L, Halldorsson GH, Gunnell A, Ugidos-Damboriena N, Law P, et al. Deciphering the genetics and mechanisms of predisposition to multiple myeloma. *Nat Commun* 2024 August 5,;15[1]:6644.
- [6] Mejia Saldarriaga M, Darwiche W, Jayabalan D, Monge J, Rosenbaum C, Pearse RN, et al. Advances in the molecular characterization of multiple myeloma and mechanism of therapeutic resistance. *Front Oncol* 2022 -10-27;12:1020011.
- [7] Cardona-Benavides IJ, de Ramón C, Gutiérrez NC. Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma: Prognostic and Therapeutic Implications. *Cells* 2021 February 5,;10[2]:336.
- [8] Salomon-Perzyński A, Jamroziak K, Głodkowska-Mrówka E. Clonal Evolution of Multiple Myeloma—Clinical and Diagnostic Implications. *Diagnostics [Basel]* 2021 August 25,;11[9]:1534.
- [9] Corre J, Cleynen A, Robiou du Pont S, Buisson L, Bolli N, Attal M, et al. Multiple myeloma clonal evolution in homogeneously treated patients. *Leukemia* 2018 December 1,;32[12]:2636–2647.
- [10] Vo JN, Wu Y, Mishler J, Hall S, Mannan R, Wang L, et al. The genetic heterogeneity and drug resistance mechanisms of relapsed refractory multiple myeloma. *Nat Commun* 2022 June 29,;13[1]:3750.
- [11] John L, Poos AM, Brobeil A, Schinke C, Huhn S, Prokoph N, et al. Resolving the spatial architecture of myeloma and its microenvironment at the single-cell level. *Nat Commun* 2023 August 17,;14[1]:5011.
- [12] Bahlis NJ. Darwinian evolution and tiding clones in multiple myeloma. *Blood* 2012 -08-02;120[5]:927–928.
- [13] Poos AM, Giesen N, Catalano C, Paramasivam N, Huebschmann D, John L, et al. Comprehensive Comparison of Early Relapse and End-Stage Relapsed Refractory Multiple Myeloma. *Blood* 2020 -11-05;136:1.

- [14] Maura F, Bolli N, Angelopoulos N, Dawson KJ, Leongamornlert D, Martincorena I, et al. Genomic landscape and chronological reconstruction of driver events in multiple myeloma. *Nat Commun* 2019 August 23;10[1]:3835.
- [15] Galland S, Stamenkovic I. Mesenchymal stromal cells in cancer: a review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *J Pathol* 2020 April 1;250[5]:555–572.
- [16] García-Ortiz A, Rodríguez-García Y, Encinas J, Maroto-Martín E, Castellano E, Teixidó J, et al. The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression. *Cancers [Basel]* 2021 -01-09;13[2]:217.
- [17] Tanno T, Lim Y, Wang Q, Chesi M, Bergsagel PL, Matthews G, et al. Growth differentiating factor 15 enhances the tumor-initiating and self-renewal potential of multiple myeloma cells. *Blood* 2014 -1-30;123[5]:725–733.
- [18] Corre J, Mahtouk K, Attal M, Gadelorge M, Huynh A, Fleury-Cappellesso S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia* 2007 -5;21[5]:1079–1088.
- [19] Hou J, Wei R, Qian J, Wang R, Fan Z, Gu C, et al. The impact of the bone marrow microenvironment on multiple myeloma [Review]. *Oncol Rep* 2019 -10;42[4]:1272–1282.
- [20] García-Sánchez D, González-González A, Alfonso-Fernández A, Del Dujo-Gutiérrez M, Pérez-Campo FM. Communication between bone marrow mesenchymal stem cells and multiple myeloma cells: Impact on disease progression. *World J Stem Cells* 2023 -05-26;15[5]:421–437.
- [21] Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia* 2009 January 1;23[1]:10–24.
- [22] de Jong MME, Kellermayer Z, Papazian N, Tahri S, Hofste op Bruinink D, Hoogenboezem R, et al. The multiple myeloma microenvironment is defined by an inflammatory stromal cell landscape. *Nat Immunol* 2021 -06;22[6]:769–780.
- [23] Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, Cerhan JR, et al. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 2018 January 18;378[3]:241–249.
- [24] What Are MGUS, Smoldering Multiple Myeloma, and Active Myeloma? Available at: <https://www.myeloma.org/what-are-mgus-smm-mm>. Accessed Aug 17, 2024.
- [25] Landgren O. Advances in MGUS diagnosis, risk stratification, and management: introducing myeloma-defining genomic events. *Hematology* 2021 -12-10;2021[1]:662–672.

- [26] Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 2022 -08;97[8]:1086–1107.
- [27] Huang J, Chan SC, Lok V, Zhang L, Lucero-Prisno DE, Xu W, et al. The epidemiological landscape of multiple myeloma: a global cancer registry estimate of disease burden, risk factors, and temporal trends. *The Lancet Haematology* 2022 -09-01;9[9]:e670–e677.
- [28] **Irimia R**, Gerke M, Thakar M, Ren Z, Helmenstine E, Imus PH, Ghiaur G, Leone R, Gocke CB; CD38 Is a Key Regulator of Tumor Growth By Modulating the Metabolic Signature of Malignant Plasma Cells. *Blood* 2021; 138 (Supplement 1): 2652. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2021-148693>
- [29] **Irimia R**, Badelita SN, Barbu S, Zidaru L, Carlan IL, Coriu D. The Efficacy of Carfilzomib Treatment in Bortezomib-Refractory Patients-Real Life Experience in a Tertiary Romanian Hospital. *J Clin Med*. 2024 Apr 9;13(8):2171. doi: 10.3390/jcm13082171. PMID: 38673444; PMCID: PMC11050610.
- [30] **Irimia R**, Badelita S, Barbu S, Cirlan IL, Zidaru L, Coriu D. Determining diagnostic delays in Romanian multiple myeloma patients using the Aarhus statement. *Front Med (Lausanne)*. 2024 May 24;11:1372907. doi: 10.3389/fmed.2024.1372907. PMID: 38854669; PMCID: PMC11157957.
- [31] **Irimia R**, Badelita SN, Barbu S, Zidaru L, Carlan IL, Coriu D. The perspective of Romanian patients on continuous therapy for Multiple Myeloma
- [32] Van De Donk NWCJ, Richardson PG, Malavasi F. CD38 antibodies in multiple myeloma: Back to the future. *Blood*. 2018;131(1):13-29. doi:10.1182/blood-2017-06-740944
- [33] Costa F, Dalla Palma B, Giuliani N. CD38 Expression by Myeloma Cells and Its Role in the Context of Bone Marrow Microenvironment: Modulation by Therapeutic Agents. *Cells*. 2019;8(12):1632. doi:10.3390/cells8121632
- [34] Krejcik J, Frerichs KA, Nijhof IS, et al. Cancer Therapy: Clinical Monocytes and Granulocytes Reduce CD38 Expression Levels on Myeloma Cells in Patients Treated with Daratumumab. Published online 2017. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2027
- [35] Chini CCS, Peclat TR, Warner GM, et al. CD38 ecto-enzyme in immune cells is induced during aging and regulates NAD⁺ and NMN levels. *Nat Metab*. 2020;2(11):1284-1304. doi:10.1038/s42255-020-00298-z
- [36] Hogan KA, Chini CN, Chini EN. The Multi-faceted Ecto-enzyme CD38: Roles in Immunomodulation, Cancer, Aging, and Metabolic Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:1187. doi:10.3389/fimmu.2019.01187

- [37] Chini CCS, Peclat TR, Warner GM, et al. CD38 ecto-enzyme in immune cells is induced during aging and regulates NAD⁺ and NMN levels. *Nat Metab.* 2020;2(11):1284-1304. doi:10.1038/s42255-020-00298-z
- [38] Horenstein AL, Bracci C, Morandi F, Malavasi F. CD38 in adenosinergic pathways and metabolic re-programming in human multiple myeloma cells: In-tandem insights from basic science to therapy. *Front Immunol.* 2019;10:760. doi:10.3389/fimmu.2019.00760
- [39] Allard B, Allard D, Buisseret L, Stagg J. The adenosine pathway in immuno-oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(10):611-629. doi:10.1038/s41571-020-0382-2
- [40] Ohta A. A metabolic immune checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2016;7(MAR):109. doi:10.3389/fimmu.2016.00109
- [41] Xing J, Zhang J, Wang J. The Immune Regulatory Role of Adenosine in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2023;24(19):14928. doi:10.3390/IJMS241914928
- [42] Horenstein AL, Bracci C, Morandi F, Malavasi F. CD38 in adenosinergic pathways and metabolic re-programming in human multiple myeloma cells: In-tandem insights from basic science to therapy. *Front Immunol.* 2019;10:760. doi:10.3389/fimmu.2019.00760
- [43] Ghose J, Viola D, Terrazas C, et al. Daratumumab induces CD38 internalization and impairs myeloma cell adhesion. *Oncoimmunology.* 2018;7(10). doi:10.1080/2162402X.2018.1486948
- [44] Sharma A, Preuss CV. Bortezomib. StatPearls Treasure Island [FL]: StatPearls Publishing; 2024.
- [45] Dimopoulos, M.A.; Moreau, P.; Terpos, E.; Mateos, M.V.; Zweegman, S.; Cook, G.; Delforge, M.; Hájek, R.; Schjesvold, F.; Cavo, M.; et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up. *Ann. Oncol.* 2021, 32, 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.11.014>.
- [46] Kumar, S.K.; Callander, N.S.; Adekola, K.; Anderson, L.D.; Baljevic, M.; Baz, R.; Campagnaro, E.; Castillo, J.J.; Costello, C.; D'angelo, C.; et al. Multiple Myeloma, Version 2.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* 2023, 21, 1281–1301. <https://doi.org/10.6004/JNCCN.2023.0061>.
- [47] Howell D, Smith A, Appleton S, et al. Multiple myeloma: routes to diagnosis, clinical characteristics and survival – findings from a UK population-based study. *Br J Haematol.* 2017;177[1]:67. doi:10.1111/BJH.14513
- [48] Gildea TR, DaCosta Byfield S, Hogarth DK, Wilson DS, Quinn CC. A retrospective analysis of delays in the diagnosis of lung cancer and associated costs. *Clin Outcomes Res.* 2017;Volume 9:261-269. doi:10.2147/CEOR.S132259

- [49] Multiple myeloma Source: Globocan 2020. Published online 2020. Accessed July 25, 2023. <https://gco.iarc.fr/today>
- [50] Zhou L, Yu Q, Wei G, Wang L, Huang Y, Hu K, Hu Y, Huang H. Measuring the global, regional, and national burden of multiple myeloma from 1990 to 2019. *BMC Cancer*. 2021 May 25;21[1]:606. doi: 10.1186/s12885-021-08280-y. PMID: 34034700; PMCID: PMC8152089.
- [51] Ludwig H, Durie SN, Meckl A, Hinke A, Durie B. Multiple Myeloma Incidence and Mortality Around the Globe; Interrelations Between Health Access and Quality, Economic Resources, and Patient Empowerment. *Oncologist*. 2020;25[9]:e1406. doi:10.1634/THEONCOLOGIST.2020-0141
- [52] Herget GW, Kälberer F, Ihorst G, Graziani G, Klein L, Rassner M, Gehler C, Jung J, Schmal H, Wäsch R, Engelhardt M. Interdisciplinary approach to multiple myeloma - time to diagnosis and warning signs. *Leuk Lymphoma*. 2021 Apr;62[4]:891-898. doi: 10.1080/10428194.2020.1849681. Epub 2020 Nov 21. PMID: 33225781.
- [53] Eisfeld, C.; Kajüter, H.; Möller, L.; Wellmann, I.; Shumilov, E.; Stang, A. Time trends in survival and causes of death in multiple myeloma: A population-based study from Germany. *BMC Cancer* 2023, 23, 317. <https://doi.org/10.1186/S12885-023-10787-5>.
- [54] Kumar, S.K.; Rajkumar, S.V.; Dispenzieri, A.; Lacy, M.Q.; Hayman, S.R.; Buadi, F.K.; Zeldenrust, S.R.; Dingli, D.; Russell, S.J.; Lust, J.A.; et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008, 111, 2516–2520. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-10-116129>.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

Articole in extenso:

1. **Irimia R**, Badelita SN, Barbu S, Zidaru L, Carlan IL, Coriu D. The Efficacy of Carfilzomib Treatment in Bortezomib-Refractory Patients-Real Life Experience in a Tertiary Romanian Hospital. J Clin Med. 2024 Apr 9;13(8):2171. doi: 10.3390/jcm13082171. PMID: 38673444; PMCID: PMC11050610.

Articol original, ISI - indexed Journal Impact Factor – 3.0

Web-link: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38673444/>

Capitol 6, pagina 78-98

2. **Irimia R**, Badelita S, Barbu S, Cirlan IL, Zidaru L, Coriu D. Determining diagnostic delays in Romanian multiple myeloma patients using the Aarhus statement. Front Med (Lausanne). 2024 May 24;11:1372907. doi: 10.3389/fmed.2024.1372907. PMID: 38854669; PMCID: PMC11157957.

Articol original, ISI - indexed Journal Impact Factor – 3.1

Web-link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11157957/>

Capitol 7, pagina 99-110

3. **Irimia R**, Badelita SN, Barbu S, Zidaru L, Carlan IL, Coriu D. The perspective of Romanian patients on continuous therapy for Multiple Myeloma

Articol original, ISI - indexed Journal Impact Factor – 3.0

Web-link: <https://www.mdpi.com/2075-4426/14/9/910>

Capitol 8, pagina 111-122

Abstracte publicate:

1. **Irimia R**, Gerke M, Thakar M, Ren Z, Helmenstine E, Imus PH, Ghiaur G, Leone R, Gocke CB; CD38 Is a Key Regulator of Tumor Growth By Modulating the Metabolic Signature of Malignant Plasma Cells. *Blood* 2021; 138 (Supplement 1): 2652. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2021-148693>

Web-link: CD38 Is a Key Regulator of Tumor Growth By Modulating the Metabolic Signature of Malignant Plasma Cells | Blood | American Society of Hematology (ashpublications.org)

Capitol 5, pagini 44-77

2. Coriu D, Badelita S, **Irimia R**. Relevance of newly acquired mutations to the prognosis of patients with relapsed multiple myeloma. *Pol Arch Intern Med.* 2020; 130: 473-475. doi:10.20452/pamw.15446

Web-link: <https://www.mp.pl/paim/issue/article/15446/>