

---

TEZĂ DE DOCTORAT

# Boala osoasă în Mielomul multiplu

---

Doctorand **Ștefan Vlad Pop**

---

Conducător de doctorat Prof.dr. **Gheorghe Tomoaia**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE.....</b>	<b>3</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....</b>	<b>3</b>
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Studiul 1. Impactul Markerilor Osoși Moderni în Mielomul multiplu: Analize Prospectivepre și post terapeutic în linia I .....</b>	<b>4</b>
1.1. Ipoteză de lucru .....	4
1.2. Material și metodă.....	5
1.3. Rezultate.....	5
<b>2. Studiul 2. Relația dintre biomarkeri și outcome-ul răspunsului la tratament în Mielomul multiplu .....</b>	<b>6</b>
2.1. Ipoteză de lucru .....	6
2.2. Material și metodă.....	7
2.3. Rezultate.....	7
<b>3. Studiul 3. Relația dintre leziunile osoase, fracturi și eficacitatea tratamentului în Mielomul multiplu .....</b>	<b>8</b>
3.1. Ipoteză de lucru .....	8
3.2. Material și metodă.....	8
3.3. Rezultate.....	9
<b>4. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei.....</b>	<b>10</b>

**Cuvinte cheie:** Mielom multiplu, leziuni osteolitice, biomarkeri, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , Free RANK, RANKL, fosfataza alcalină osoasă, Betacrosslaps

## INTRODUCERE

Mielomul multiplu (MM) este afecțiunea caracterizată prin proliferarea malignă a plasmocitelor care invadează măduva osoasă producând leziuni osteolitice. Patologia acestei boli este complexă, implicând atât aspecte imunologice cât și mecanisme de distrucție osoasă cu repercursiuni clinice notabile pentru diagnostic, tratament și prognostic.

Pe parcursul evoluției bolii, boala osoasă afectează aproximativ 90% dintre pacienții diagnosticați cu mielom multiplu. Prezența leziunilor osteolitice în mielomul multiplu poate determina dureri osoase, osteoporoză și chiar fracturi pe os patologic contribuind semnificativ la creșterea morbidității și alterării calității vieții pacienților.

Această lucrare își propune să evalueze impactul biomarkerilor moderni și clasici asupra bolii osoase în mielomul multiplu. Aprofundarea mecanismelor prin care mielomul multiplu afectează sistemul osos și identificarea biomarkerilor semnificativi sunt primordiale pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice mai eficiente. Studiile propuse vor contribui la o potențială evoluție a cunoștințelor cu privire la patogenza bolii osoase în mielom și ar putea oferi perspective valoroase pentru dezvoltarea managementului clinic. Continuarea cercetărilor a inclus realizarea a două studii retrospective care ar putea să ofere informații importante despre răspunsul terapeutic în diferite linii de tratament și informații suplimentare cu privire la statusul leziunilor osteolitice și al fracturilor, respectiv posibila influență a acestora asupra eficienței tratamentului și evoluției bolii.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Mielomul multiplu este a doua cea mai frecventă afecțiune malignă hematologică reprezentând aproximativ 10-17% din totalul tumorilor maligne. Mielomul multiplu este o boală asociată cu o calitate scăzută a vieții și se manifestă printr-o varietate de semne și simptome, în funcție de stadiul bolii și de organele afectate. Una dintre caracteristicile distinctive ale mielomului, este prezența leziunilor osteolitice, care pot determina dureri osoase, fracturi și osteoporoză. De asemenea, faza simptomatică a bolii este asociată cu anemie, afectare renală și hipercalcemie.

Odată cu progresia MM, apare un dezechilibru între activitatea osteoblastelor și osteocastelor, caracterizat prin creșterea activității osteoclastelor și suprimarea formării osoase de către osteoblaste. Boala osoasă, inclusiv leziunile osteolitice și osteoporoza, reprezintă o preocupare semnificativă în MM, deoarece poate duce la dureri severe, fracturi osoase și compresie a maduvei spinării.

Leziunile osteolitice reprezintă zone de pierdere a țesutului osos fiind cauzate de o activitate crescută a osteoclastelor, celule cu rol în descompunerea osoasă, astfel acestea distrug local sistemul osos producând cavități.

Progrese relevante au fost raportate în ultima perioadă referitor la tehnologia și tehnicile imagistice. Fiecare metodă imagistică conferă avantaje și dezavantaje. Utilizarea unei metode optime imagistice trebuie să cuprindă informații despre disponibilitatea echipamentului imagistic, costul examinării, timpul de efectuare al procedurii și progresia bolii. Optimizarea metodei implică individualizarea examinării fiecărui pacient.

În mielomul multiplu, markerii moderni joacă un rol crucial în diagnosticare, evaluarea prognosticului și monitorizarea răspunsului la tratament. Acești indicatori biologici și moleculari reflectă activitatea bolii și efectele sale asupra sistemului osos, permițând o abordare mai personalizată a tratamentului și îmbunătățind speranța de viață a pacienților. Dezechilibrul dintre citokinele inflamatorii și antiinflamatorii în MM determină o creștere a citokinelor proinflamatorii, care favorizează perturbarea căilor de semnalizare și proliferarea celulelor maligne. Studiile arată o corelație între nivelurile serice ale citokinelor și stadiul bolii, oferind informații esențiale despre mecanismele bolii și biomarkerii relevanți pentru deciziile terapeutice. Citokinele implicate includ interleukinele, limfokinele, factorii de necroză tumorală și interferonii.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### **1. Studiul 1. Impactul Markerilor Osoși Moderni în Mielomul multiplu: Analize Prospective pre și post terapeutic în linia I**

#### **1.1. Ipoteză de lucru**

Obiectivul principal al acestui studiu a fost de a analiza corelația dintre nivelurile serice ale unor biomarkeri moderni (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , Free RANK, RANKL, fosfataza alcalină osoasă și Betacrosslaps) și evoluția leziunilor osteolitice la pacienții cu mielom multiplu, înainte și după tratamentul de primă linie.

Studiul se concentrează asupra biomarkerilor moderni având ca scop evaluarea acestora și furnizarea de noi informații raportat la markerii clasici în MM. Prin analiza corelațiilor transversale și longitudinale între biomarkerii clasici și moderni, clasificați în funcție de statusul leziunilor osteolitice, cercetarea își propune să evidențieze modul în care biomarkerii moderni pot completa valoarea predictivă a markerilor clasici.

## 1.2. Material și metodă

Studiul a inclus un eșantion de 35 de pacienți cu mielom multiplu, recrutați între 2019 și 2021. Colectarea probelor de sânge periferic a fost realizată în tuburi cu activator de coagulare, iar serul a fost obținut prin centrifugare și stocat la  $-80^{\circ}\text{C}$  până la procesare.

Biomarkerii serici (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , Free RANK, RANKL) au fost analizați prin teste ELISA. Compararea punctelor temporale și longitudinale a distribuțiilor biomarkerilor măsurați la începutul studiului și post prima linie de tratament, în raport cu modificările în leziunile osteolitice postprima linie de tratament, a fost efectuată folosind testul t Student, testul Mann-Whitney U sau testul t Student pereche sau testul Wilcoxon.

Direcția, magnitudinea și semnificația corelațiilor între biomarkerii moderni (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , RANKL liber, RANKL, fosfataza alcalină osoasă, Betacrosslaps) și biomarkerii clasici (Albumină, Beta2microglobulina, LDH, VSH, Calciu, Hemoglobină) analizați la fiecare punct temporal și grupați după statusul leziunilor osteolitice au fost estimate folosind coeficientul de corelație non-parametric Spearman.

Pentru estimarea corelațiilor longitudinale între biomarkerii moderni și clasici, în fiecare grup cu leziuni osteolitice prezente, am calculat modificarea fiecărui biomarker exprimată ca variabilitate procentuală absolută față de valoarea de bază.

## 1.3. Rezultate

Dintre cei 35 de pacienți diagnosticați cu mielom multiplu incluși în acest studiu, 7 respectiv (20%) dintre aceștia au fost clasificați ca având modificări osoase post administrării primei linii de tratament (prezența leziunilor osteolitice preterapeutice și absența leziunilor osteolitice post terapeutice), în timp ce 28 respectiv (80%) dintre aceștia nu au prezentat modificări ale leziunilor osteolitice post terapeutice.

Prin compararea biomarkerilor serici analizați după prima linie de tratament, la pacienții cu modificări ale leziunilor osteolitice (absența acestor leziuni post terapeutice) s-a observat o diferență semnificativă în cadrul nivelurilor albuminei și calciului. În acest caz, valorile albuminei și calciului erau mai mari decât valorile la pacienții fără modificări la nivelul leziunilor (mediană [IQR]: 4,2 [4,0, 4,3] vs. 3,5 [3,1, 3,7] pentru albumină și 9,2 [8,9, 9,5] vs. 8,7 [8,3, 9,0] pentru calciu). Comparând valorile biomarkerilor înainte și după prima linie de tratament, pacienții fără modificări ale leziunilor osteolitice au avut valorile albuminei și hemoglobinei mai crescute și valorile b2microglobulinei și calciului mai scăzute la pacienții post-tratament.

Distribuțiile răspunsului terapeutic în prima linie de tratament în cadrul

grupurilor studiate au fost următoarele: 17 pacienți respectiv (60,7%) boală progresivă, 2 pacienți respectiv (7,1%) au fost staționari, 9 pacienți respectiv (32,1%) în remisiune completă în grupul cu statusul leziunilor osteolitice neschimbat și 2 pacienți respectiv (28,6%) cu boală progresivă, 1 pacient respectiv (14,3%) și 4 pacienți respectiv (57,1%) cu remisiune completă în grupul cu statusul leziunilor osteolitice schimbat. Nu s-a identificat o asociere semnificativă între statusul leziunilor osteolitice și răspunsul terapeutic în prima linie de tratament (testul exact Fisher,  $p = 0,2713$ ).

Corelații monotone pozitive și semnificative au fost observate între valorile de bază ale RANKL și betacrosslaps ( $p=0,78$ ,  $p=0,0393$ ), IFN și valorile FreeRank ( $p=0,86$ ,  $p=0,0137$ ), IL-6 și TNF  $\alpha$  ( $p=0,77$ ,  $p=0,408$ ) la pacienții cu modificări în statusul leziunilor osteolitice. Valorile inițiale ale IL-6 au demonstrat o corelație pozitivă, semnificativă cu IFN, TNF  $\alpha$  și fosfataza alcalină osoasă la pacienții fără modificări în statusul leziunilor osteolitice. În același grup s-a constatat faptul că valorile inițiale ale IFN au evidențiat o corelație negativă semnificativă cu Beta2microglobulina și o corelație pozitivă, semnificativă cu TNF  $\alpha$ .

După prima linie de tratament, valorile scăzute ale IL-6 au fost corelate cu valorile crescute ale albuminei ( $p=-0,96$ ,  $p=0,0005$ ) la pacienții cu modificări în statusul leziunilor osteolitice. Post terapeutic valorile IFN au evidențiat o corelație pozitivă semnificativă cu hemoglobina ( $p=0,47$ ,  $p=0,0124$ ), IL-6 ( $p=0,55$ ,  $p=0,0026$ ) și valorile TNF  $\alpha$  ( $p=0,054$ ,  $p=0,0029$ ).

La monitorizare, modificările valorilor betacrosslaps au fost asociate pozitiv cu valorile calciului ( $p=0,96$ ,  $p=0,0005$ ) și valorile albuminei ( $p=0,86$ ,  $p=0,0137$ ), în timp ce modificările valorilor VSH-ului au fost corelate negativ cu modificările valorilor RANKL ( $p=-0,81$ ,  $p=0,049$ ) la pacienții cu schimbări în statusul leziunilor osteolitice. În același grup s-au observat că modificările valorilor IL-6 au fost corelate negativ cu schimbările în hemoglobină având o semnificație statistică marginală ( $p=0,051$ ).

## **2. Studiul 2. Relația dintre biomarkeri și outcome-ul răspunsului la tratament în Mielomul multiplu**

### **2.1. Ipoteză de lucru**

Studiul de față explorează asocierea dintre outcome-ul primei linii de tratament, respectiv a doua linie de tratament și biomarkeri. Aceste asocieri pot oferi informații despre modul în care pacienții cu MM răspund la diferitele linii de tratament, iar variația nivelurilor acestor biomarkeri poate evidenția probabilitatea unor remisiuni parțiale, complete, boală staționară sau progresivă.

Se presupune că outcome-ul tratamentului în mielomul multiplu este influențat de valorile serice ale parametrilor clasici, precum beta2microglobulina, albumina, calciul, LDH, hemoglobina și VSH. Nivelurile anormale ale acestor biomarkeri sunt

asociate cu un răspuns mai slab la tratament, iar modificările acestor valori pot servi drept indicatori predictivi pentru evaluarea eficacității tratamentului.

## 2.2. Material și metodă

Acest studiu retrospectiv a inclus un număr de 136 de pacienți diagnosticați și tratați cu MM. Pacienții înrolați în studiu au fost diagnosticați și tratați între anii 2014-2022, aflându-se în evidența secției de Hematologie din cadrul Institutului Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță” din Cluj Napoca. Pentru includerea în studiu a fost obligatorie îndeplinirea criteriilor de diagnostic pentru mielomul multiplu.

În această bază de date au fost introduse următoarele variabile: vârsta, sexul, mediul de proveniență, tipul imunoglobulinelor, tipul lanțurilor ușoare al imunoglobulinelor, valoarea VSH-ului, LDH-ului, hemoglobinei, calciului, albuminei, beta2microglobulinei, tratamentul efectuat. Pe baza valorilor albuminei și beta2microglobulinei s-a calculat scorul Sistemului Internațional de Stadializare (ISS) având ca și scop stadializarea.

Analiza statistică inferențială și descriptivă s-a realizat în mediul avansat de calcul statistic R, v. 4.4.0. Testele statistice folosite au fost teste bilaterale având un nivel de semnificație  $\alpha$  egal cu 0,05, un rezultat fiind considerat cu semnificație statistică dacă nivelul de semnificație estimat  $p < 0,05$ .

## 2.3. Rezultate

### *Asocierea dintre outcome-ul primei linii de tratament și markeri*

Analiza bivariată a aratat ca distribuția valorilor calciului a fost semnificativ diferită la pacienții aflați în remisie completă după prima linie de tratament, cei aflați în remisie parțială, boală staționară respectiv cei cu boală progresivă (test Kruskal-Wallis,  $p = 0,0441$ ). Analiza post-hoc a identificat diferențe semnificative în privința valorilor calciului doar între pacienții MM aflați în remisie parțială și cei cu boală progresivă ( $p$ -ajustat = 0,0412), pacienții aflați în remisie parțială având valori ale calciului mai mici decât cei cu boală progresivă.

Valorile VSH au fost semnificativ diferite, în medie, pe cele 4 subgrupuri de răspuns la tratament (statistica F (3,128)=3,10,  $p = 0,0292$ ), analiza post-hoc identificând diferențe doar între grupurile de pacienți cu boală staționară și cei cu boală progresivă ( $p$ -ajustat = 0,05), pacienții cu boală staționară având VSH-ul în medie mai mare decât cei cu boală progresivă.

### *Asocierea dintre outcome-ul tratamentului de linia 2 și markeri*

Analiza bivariată a arătat că distribuția valorilor calciului la pacienții aflați în

remisie completă după prima linie de tratament, cei aflați în remisie parțială, boală staționară respectiv cei cu boală progresivă după a doua linie de tratament a avut o tendință spre semnificație statistică (test Kruskal-Wallis,  $p = 0,0974$ ), pacienții aflați în remisie parțială și cei cu boală staționară având tendința de a avea valori mai mari ale calciului comparativ cu restul pacienților aflați în remisie completă sau boală progresivă.

Am observat că frecvența  $VSH > 20 \text{ mm/h}$  a fost mai mare la pacienții aflați în remisie completă și cei cu remisie parțială, diferența între frecvențe având tendința spre semnificație statistică.

### **3. Studiul 3. Relația dintre leziunile osoase, fracturi și eficacitatea tratamentului în Mielomul multiplu**

#### **3.1. Ipoteză de lucru**

Acest studiu a plecat de la ipoteza că în Mielomul multiplu există o asociere semnificativă între statusul leziunilor osteolitice, frecvența fracturilor și valorile serice ale biomarkerilor. În acest studiu s-au analizat frecvența leziunilor osteolitice, fracturilor pre și post prima linie de tratament, frecvența leziunilor osteolitice pre și post tratament de linia 2, asocierea dintre fracturi și biomarkeri pre linia întâi de tratament, asocierea dintre statusul leziunilor osteolitice post prima linie de tratament și biomarkeri.

S-a urmărit ca aceste asocieri să ofere informații suplimentare despre statusul leziunilor osteolitice și fracturilor și influența acestora asupra eficacității terapeutice și evoluției bolii.

#### **3.2. Material și metodă**

Acest studiu retrospectiv a inclus un număr de 136 de pacienți diagnosticați cu MM. Pacienții înrolați în studiu au fost diagnosticați și tratați între anii 2014-2022 aflându-se în evidența secției de Hematologie din cadrul Institutului Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță” din Cluj Napoca. Pentru includerea în studiu a fost obligatorie îndeplinirea criteriilor de diagnostic pentru mielomul multiplu.

Comparația valorilor markerilor de studiu în funcție de fracturile preexistente înaintea tratamentului de primă linie s-a realizat cu ajutorul testului Student. Comparația valorilor markerilor de studiu în funcție de statusul leziunilor la tratamentul de linia 1, s-a realizat cu ajutorul analizei de variantă univariată (ANOVA) sau testul Kruskal-Wallis.



Testarea diferențelor între frecvența leziunilor osteolitice înainte și după tratamentul de linia 1 s-a realizat cu ajutorul testului McNemar având ca ipoteză nulă absența diferențelor între frecvențele leziunilor înainte și după tratament. Testarea asocierilor între statusul leziunilor după tratament și răspunsul la tratamentul de linia 1 s-a realizat prin testul Hi-pătrat (dacă minim 80% dintre frecvențele teoretice  $>5$ ) sau testul exact al lui Fisher, în caz contrar. Testele statistice folosite au fost teste bilaterale având un nivel de semnificație  $\alpha$  egal cu 0,05, un rezultat fiind considerat cu semnificație statistică dacă nivelul de semnificație estimat  $p < 0,05$ .

### 3.3. Rezultate

#### *Frecvența leziunilor osteolitice înainte și după prima linie de tratament*

Deși am observat că 55 /69 de pacienți cu leziuni pre-tratament au avut leziuni și după tratament față de 22/48 care nu au avut leziuni osteolitice pre dar au avut leziuni osteolitice post-prima linie de tratament, diferențele observate nu au fost semnificative statistic (test McNemar,  $p=0,2433$ ).

#### *Frecvența fracturilor pre și post prima linie de tratament*

Deși am observat că 4 /119 de pacienți cu fracturi pre-tratament au avut fracturi și după tratament față de 1/10 care nu au avut fracturi pre dar au avut fracturi post-prima linie de tratament, diferențele observate nu au fost semnificative statistic (test McNemar,  $p=0,2673$ ).

#### *Asocierea dintre statusul leziunilor osteolitice post prima linie de tratament și markeri*

Statusul leziunilor osteolitice a fost definit astfel: grup 1: pacienți cu leziuni atât pre cât și post prima linie de tratament; grup 2: pacienți care au avut leziuni osteolitice pre dar nu au avut leziuni post-tratament ; grup 3: pacienți MM care nu au avut leziuni osteolitice nici pre și nici post tratament ; grup 4: pacienți cu MM care nu au avut leziuni pre dar au avut leziuni post tratament . Am observat că distribuția parametrilor paraclinici în cele 4 subgrupuri definite de statusul leziunilor osteolitice post prima linie de tratament a fost similară cu excepția VSH pentru care am observat o tendință spre semnificație statistică ( $p = 0,06$ ), pacienții care au avut leziuni osteolitice pre dar nu au avut leziuni post-tratament având în medie, VSH-ul mai mare decât în restul grupurilor.

#### *Asocierea dintre fracturile pre-tratament și markeri*

Nu am găsit diferențe semnificative statistic ale markerilor studiați la pacienții cu fracturi osoase înainte de tratament și cei care nu au avut fracturi.

#### *Frecvența leziunilor osteolitice înainte și după tratamentul de linia 2*

Nu am găsit diferențe semnificative statistic între frecvența leziunilor osteolitice înainte și după tratamentul de linia 2 (test McNemar,  $p=1.000$ ).

#### *Asocierea dintre statusul leziunilor osteolitice după tratamentul de linie 2 și markeri*

Statusul leziunilor osteolitice după tratamentul de linie 2 a fost definit astfel: grup 1 (pacienți cu leziuni atât pre cât și post tratament L2); grup 2 : pacienți care au avut leziuni osteolitice pre dar nu au avut leziuni post-tratament L2; grup 3 : pacienți MM care nu au avut leziuni osteolitice nici pre și nici post tratament L2 ; grup 4 =pacienți MM care nu au avut leziuni pre dar au avut leziuni post tratament. Nu am avut diferențe semnificative statistic ( $p>0.05$ ) în privința distribuțiilor valorilor albuminei, calciului, hemoglobinei și LDH-ului în cele 4 subgrupuri definite de statusul leziunilor osteolitice după tratamentul de linie 2.

#### **4. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

Lucrarea de față cuprinde un prim studiu observațional și longitudinal, având ca obiectiv principal evaluarea corelațiilor între leziunile osteolitice și nivelurile biomarkerilor moderni și clasici.

Una din principalele contribuții ale studiului a inclus evaluarea biomarkerilor moderni (IL-6, RANKL, Free RANK, TNF  $\alpha$ , IFN- $\beta$ , fosfataza alcalină osoasă, betacrosslaps) și leziunile osteolitice contribuind la o posibilă perspectivă asupra modului în care acești markeri moderni pot completa valoarea markerilor clasici (albumina, Beta2microglobulina, calciu, VSH, LDH, hemoglobina) oferind o imagine de ansamblu mai completă asupra evoluției bolii și integrității osoase. Acest studiu a evidențiat corelații semnificative între valorile inițiale ale biomarkerilor moderni și remisiunea sau progresia leziunilor osteolitice. Statistic, rezultatele au fost analizate prin intermediul testelor Mann Whitney și Fischer.

Al doilea studiu, retrospectiv are ca obiectiv principal evaluarea corelațiilor dintre outcome-ul terapeutic în linia întâi respectiv linia doi și biomarkerii (albumina, beta2microglobulina, calciu, hemoglobina, LDH, VSH). Outcome-ul a cuprins: boala staționară – BS, remisiunea parțială – RP, remisiunea completă – RC, boala progresivă – BP).

Corelarea între biomarkeri și outcome-ul tratamentului a oferit o înțelegere mai bună a evoluției clinice în funcție de răspunsul terapeutic. Explorarea variațiilor valorilor acestor parametri în raport cu outcome-ul terapeutic au sugerat faptul că modificările parametrilor acestor markeri ar putea fi utilizate ca indicatori predictivi ai eficacității terapeutice.

Al treilea studiu, retrospectiv are ca obiectiv principal analiza evoluției leziunilor osteolitice pre și post prima și a doua linie de tratament, respectiv a fracturilor pre și post terapeutic în linia întâi și valorile biomarkerilor (albumina,

beta2microglobulina, calciu, hemoglobina, LDH, VSH).

Cu toate că nu s-au găsit diferențe semnificativ statistice, corelarea acestor leziuni cu răspunsul la tratament oferă o înțelegere mai profundă a efectului terapeutic asupra bolii osoase.

PhD THESIS SUMMARY

# Bone disease in Multiple myeloma

---

PhD Student **Ștefan Vlad Pop**

---

PhD Supervisor Prof.dr. **Gheorghe Tomoaia**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>14</b>
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE.....</b>	<b>14</b>
<b>PERSONAL CONTRIBUTION.....</b>	<b>15</b>
<b>1. Study 1. The Impact of Modern Bone Markers in Multiple Myeloma: Prospective Pre- and Post-Therapeutic Analyses in First-Line Treatment.....</b>	<b>15</b>
1.1. Working Hypothesis.....	15
1.2. Materials and Methods.....	15
1.3. Results.....	16
<b>2. Study 2. The Relationship Between Biomarkers and Treatment Outcome in Multiple Myeloma.....</b>	<b>17</b>
2.1. Working Hypothesis.....	17
2.2. Materials and Methods.....	17
2.3. Results.....	17
<b>3. Study 3. The Relationship Between Bone Lesions, Fractures, and Treatment Efficacy in Multiple Myeloma .....</b>	<b>18</b>
3.1. Working Hypothesis.....	18
3.2. Materials and Methods.....	18
3.3. Results.....	19
<b>4. Originality and Innovative Contributions of the Thesis .....</b>	<b>20</b>

**Keywords:** Multiple myeloma, osteolytic lesions, biomarkers, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , Free RANK, RANKL, bone alkaline phosphatase, Betacrosslaps

## **INTRODUCTION**

Multiple myeloma is a condition characterized by the malignant proliferation of plasma cells that invade the bone marrow, leading to osteolytic lesions. The pathology of this disease is complex, involving both immunological aspects and mechanisms of bone destruction, with notable clinical implications for diagnosis, treatment, and prognosis.

Throughout the disease's progression, bone disease affects approximately 90% of patients diagnosed with multiple myeloma. The presence of osteolytic lesions in multiple myeloma can lead to bone pain, osteoporosis, and even fractures of pathological bone, significantly contributing to increased morbidity and decreased quality of life for patients.

This paper aims to evaluate the impact of modern and classic biomarkers on bone disease in multiple myeloma. Understanding the mechanisms by which multiple myeloma affects the skeletal system and identifying significant biomarkers are essential for developing more effective therapeutic strategies. The proposed studies will contribute to a potential advancement in knowledge regarding the pathogenesis of bone disease in myeloma and could provide valuable insights for developing clinical management.

The continuation of research includes the completion of two retrospective studies that may offer important information about therapeutic response across different treatment lines, as well as additional insights into the status of osteolytic lesions and fractures, and their potential influence on treatment efficacy and disease progression.

## **CURRENT STATE OF KNOWLEDGE**

Multiple myeloma is the second most common malignant blood disorder, accounting for approximately 10–17% of all hematologic malignancies. It is a disease associated with a low quality of life and presents a variety of signs and symptoms, depending on the stage of the disease and the affected organs. One of the distinctive features of multiple myeloma is the presence of osteolytic lesions, which can lead to bone pain, fractures, and osteoporosis. Additionally, the symptomatic phase of the disease is associated with anemia, renal impairment, and hypercalcemia.

As multiple myeloma (MM) progresses, there is an imbalance between the activity of osteoblasts and osteoclasts, characterized by increased osteoclast activity and suppressed bone formation by osteoblasts. Bone disease, including osteolytic lesions and osteoporosis, is a significant concern in MM, as it can lead to severe pain, bone fractures, and spinal cord compression.

Osteolytic lesions are areas of bone tissue loss caused by increased osteoclast activity, which destroys local bone tissue, creating cavities. Relevant advances have recently been reported regarding imaging technology and techniques. Each imaging method has its advantages and disadvantages. The use of an optimal imaging method

must consider the availability of imaging equipment, the cost of the examination, the time required for the procedure, and disease progression. Optimizing the method involves personalizing the examination for each patient.

In multiple myeloma (MM), modern biomarkers play a crucial role in diagnosis, prognostic assessment, and monitoring treatment response. These biological and molecular indicators reflect disease activity and its effects on the skeletal system, allowing for a more personalized approach to treatment and improving patients' life expectancy. The imbalance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines in MM leads to an increase in pro-inflammatory cytokines, which disrupts signaling pathways and promotes malignant cell proliferation. Studies show a correlation between serum cytokine levels and disease stage, providing essential information about disease mechanisms and relevant biomarkers for therapeutic decisions. Cytokines involved include interleukins, lymphokines, tumor necrosis factors, and interferons.

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

### **1. Study 1. The Impact of Modern Bone Markers in Multiple Myeloma: Prospective Pre- and Post-Therapeutic Analyses in First-Line Treatment**

#### **1.1. Working Hypothesis**

The main objective of this study was to analyze the relationship between serum levels of certain modern biomarkers (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , Free RANK, RANKL, bone alkaline phosphatase, and Beta-crosslaps) and the progression of osteolytic lesions in patients with multiple myeloma, before and after first-line treatment. The study focuses on modern biomarkers, aiming to evaluate them and provide new information in relation to classic markers in MM. By analyzing cross-sectional and longitudinal correlations between classic and modern biomarkers, classified based on the status of osteolytic lesions, the research aims to highlight how modern biomarkers can enhance the predictive value of classic markers.

#### **1.2. Materials and Methods**

The study included a sample of 35 patients with multiple myeloma, recruited between 2019 and 2021. Peripheral blood samples were collected in tubes with a coagulation activator, and serum was obtained through centrifugation and stored at -80 °C until processing. Serum biomarkers (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , Free RANK, RANKL) were analyzed using ELISA tests. The comparison of temporal and longitudinal distributions of biomarkers measured at the beginning of the study and post-first-line treatment, in relation to changes in osteolytic lesions post-first-line treatment, was performed using the Student's t-test, Mann-Whitney U test, paired Student's t-test, or

Wilcoxon test. The direction, magnitude, and significance of correlations between modern biomarkers (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , Free RANKL, RANKL, bone alkaline phosphatase, Beta-crosslaps) and classic biomarkers (Albumin, Beta2-microglobulin, LDH, ESR, Calcium, Hemoglobin) analyzed at each time point and grouped by osteolytic lesion status were estimated using the non-parametric Spearman correlation coefficient.

To estimate longitudinal correlations between modern and classic biomarkers in each group with present osteolytic lesions, we calculated the change of each biomarker expressed as absolute percentage variability from baseline values.

### 1.3. Results

Among the 35 patients diagnosed with multiple myeloma included in this study, 7 (20%) were classified as having bone changes post-administration of first-line treatment (presence of osteolytic lesions pre-treatment and absence of osteolytic lesions post-treatment), while 28 (80%) showed no changes in osteolytic lesions post-treatment.

By comparing the serum biomarkers analyzed after first-line treatment, patients with changes in osteolytic lesions (absence of these lesions post-treatment) showed a significant difference in albumin and calcium levels. In this case, albumin and calcium values were higher than those of patients without changes in lesions (median [IQR]: 4.2 [4.0, 4.3] vs. 3.5 [3.1, 3.7] for Albumin and 9.2 [8.9, 9.5] vs. 8.7 [8.3, 9.0] for Calcium). Comparing biomarker values before and after first-line treatment, patients without changes in osteolytic lesions had higher values for albumin and hemoglobin, and lower values for beta2-microglobulin and calcium post-treatment.

The distributions of therapeutic responses in the first-line treatment among the studied groups were as follows: 17 patients (60.7%) had progressive disease, 2 patients (7.1%) were stable, and 9 patients (32.1%) achieved complete remission in the group with unchanged osteolytic lesion status. In contrast, in the group with changed osteolytic lesion status, 2 patients (28.6%) had progressive disease, 1 patient (14.3%) was stable, and 4 patients (57.1%) achieved complete remission. No significant association was found between osteolytic lesion status and therapeutic response in first-line treatment (Fisher's exact test,  $p = 0.2713$ ).

Positive and significant monotonic correlations were observed between baseline RANKL and Beta-crosslaps values ( $p=0.78$ ,  $p=0.0393$ ), IFN and Free RANKL values ( $p=0.86$ ,  $p=0.0137$ ), and IL-6 and TNF- $\alpha$  ( $p=0.77$ ,  $p=0.408$ ) in patients with changes in osteolytic lesion status. Initial IL-6 values demonstrated a significant positive correlation with IFN, TNF- $\alpha$ , and bone alkaline phosphatase in patients without changes in osteolytic lesion status. In this group, initial IFN values showed a significant negative correlation with Beta2-microglobulin and a significant positive correlation with TNF- $\alpha$ .

After first-line treatment, low IL-6 values were correlated with high albumin values ( $p=-0.96$ ,  $p=0.0005$ ) in patients with changes in osteolytic lesion status. Post-therapy, IFN values showed a significant positive correlation with hemoglobin ( $p=0.47$ ,  $p=0.0124$ ), IL-6 ( $p=0.55$ ,  $p=0.0026$ ), and TNF- $\alpha$  values ( $p=0.054$ ,  $p=0.0029$ ). During monitoring, changes in Beta-crosslaps values were positively associated with calcium values ( $p=0.96$ ,  $p=0.0005$ ) and albumin values ( $p=0.86$ ,  $p=0.0137$ ), while



changes in ESR values were negatively correlated with changes in RANKL values ( $p=-0.81$ ,  $p=0.049$ ) in patients with changes in osteolytic lesion status. In the same group, changes in IL-6 values were negatively correlated with changes in hemoglobin, with marginal statistical significance ( $p=0.051$ ).

## **2. Study 2. The Relationship Between Biomarkers and Treatment Outcome in Multiple Myeloma**

### **2.1. Working Hypothesis**

This study explores the association between the outcomes of first-line and second-line treatments and biomarkers. These associations may provide insights into how patients with multiple myeloma (MM) respond to different treatment lines, and variations in the levels of these biomarkers may highlight the likelihood of partial or complete remissions, stable disease, or progressive disease. It is hypothesized that treatment outcomes in multiple myeloma are influenced by serum levels of classic parameters such as beta2-microglobulin, albumin, calcium, LDH, hemoglobin, and ESR. Abnormal levels of these biomarkers are associated with poorer treatment responses, and changes in these values may serve as predictive indicators for evaluating treatment efficacy.

### **2.2. Materials and Methods**

This retrospective study included 136 patients diagnosed and treated for MM. Patients enrolled in the study were diagnosed and treated between 2014 and 2022 and were recorded at the Hematology Department of the "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Oncology Institute in Cluj Napoca. Fulfillment of diagnostic criteria for multiple myeloma was mandatory for inclusion in the study.

The following variables were entered into the database: age, sex, place of origin, type of immunoglobulins, type of light chains of immunoglobulins, and values for ESR, LDH, hemoglobin, calcium, albumin, and beta2-microglobulin, as well as the treatments administered. Based on the values of albumin and beta2-microglobulin, the International Staging System (ISS) score was calculated for staging purposes. Inferential and descriptive statistical analyses were conducted using the advanced statistical computing environment R, version 4.4.0. The statistical tests used were bilateral tests with a significance level  $\alpha$  set at 0.05, considering a result statistically significant if the estimated  $p$ -value was  $<0.05$ .

### **2.3. Results**

#### *Association Between First-Line Treatment Outcome and Biomarkers*

Bivariate analysis showed that the distribution of calcium values was significantly different among patients in complete remission after first-line treatment, those in partial remission, those with stable disease, and those with progressive

disease (Kruskal-Wallis test,  $p = 0.0441$ ). Post-hoc analysis identified significant differences in calcium values only between MM patients in partial remission and those with progressive disease (adjusted  $p = 0.0412$ ), with patients in partial remission having lower calcium values than those with progressive disease.

ESR values were significantly different, on average, across the four response subgroups (F statistic (3,128) = 3.10,  $p = 0.0292$ ), with post-hoc analysis identifying differences only between the stable disease group and the progressive disease group (adjusted  $p = 0.05$ ), with patients in stable disease having higher average ESR values than those with progressive disease.

#### *Association Between Second-Line Treatment Outcome and Biomarkers*

Bivariate analysis indicated that the distribution of calcium values among patients in complete remission after the first line of treatment, those in partial remission, those with stable disease, and those with progressive disease after the second line of treatment showed a trend toward statistical significance (Kruskal-Wallis test,  $p = 0.0974$ ). Patients in partial remission and those with stable disease tended to have higher calcium values compared to the rest of the patients in complete remission or progressive disease.

We observed that the frequency of ESR > 20 mm/h was higher in patients in complete remission and those with partial remission, with the difference in frequencies trending toward statistical significance.

### **3. Study 3. The Relationship Between Bone Lesions, Fractures, and Treatment Efficacy in Multiple Myeloma**

#### **3.1. Working Hypothesis**

This study was based on the hypothesis that there is a significant association in multiple myeloma between the status of osteolytic lesions, fracture frequency, and serum biomarker values. The study analyzed the frequency of osteolytic lesions and fractures before and after first-line treatment, the frequency of osteolytic lesions before and after second-line treatment, the association between fractures and biomarkers before first-line treatment, and the association between the status of osteolytic lesions after first-line treatment and biomarkers. These associations aimed to provide additional insights into the status of osteolytic lesions and fractures and their influence on therapeutic efficacy and disease progression.

#### **3.2. Materials and Methods**

This retrospective study included 136 patients diagnosed with multiple myeloma (MM). Patients enrolled in the study were diagnosed and treated between 2014 and 2022, recorded at the Hematology Department of the "Prof. Dr. Ion Chiricuța" Oncology Institute in Cluj Napoca. Fulfillment of diagnostic criteria for multiple myeloma was mandatory for inclusion in the study.

Comparison of biomarker values based on pre-existing fractures before first-line treatment was performed using the Student's t-test. Comparison of biomarker values based on the status of lesions during first-line treatment was conducted using univariate analysis of variance (ANOVA) or the Kruskal-Wallis test. Testing for differences in the frequency of osteolytic lesions before and after first-line treatment was performed using the McNemar test, with the null hypothesis being the absence of differences in frequencies before and after treatment. Testing the associations between lesion status after treatment and response to first-line treatment was carried out using the chi-squared test (if at least 80% of theoretical frequencies >5) or Fisher's exact test otherwise. The statistical tests used were bilateral tests with a significance level  $\alpha$  set at 0.05, considering a result statistically significant if the estimated p-value was <0.05.

### 3.3. Results

#### *Frequency of Osteolytic Lesions Before and After First-Line Treatment*

Although we observed that 55 out of 69 patients with pre-treatment lesions had lesions after treatment, compared to 22 out of 48 who did not have osteolytic lesions pre-treatment but developed them post-first-line treatment, the observed differences were not statistically significant (McNemar test,  $p = 0.2433$ ).

#### *Frequency of Fractures Pre- and Post-First-Line Treatment*

We found that 4 out of 119 patients with pre-treatment fractures had fractures after treatment, while 1 out of 10 patients who did not have pre-treatment fractures experienced fractures post-first-line treatment. However, these differences were not statistically significant (McNemar test,  $p = 0.2673$ ).

#### *Association Between Osteolytic Lesion Status Post-First-Line Treatment and Markers*

The status of osteolytic lesions was defined as follows: Group 1: patients with lesions both pre- and post-first-line treatment; Group 2: patients who had pre-treatment osteolytic lesions but no post-treatment lesions; Group 3: MM patients who had no osteolytic lesions pre- or post-treatment; Group 4: MM patients who had no pre-treatment lesions but developed lesions post-treatment. We observed that the distribution of paraclinical parameters across the four subgroups defined by post-first-line treatment osteolytic lesion status was similar, with the exception of the erythrocyte sedimentation rate (ESR), which showed a trend toward statistical significance ( $p = 0.06$ ). Patients with pre-treatment osteolytic lesions but no post-treatment lesions had a higher average ESR than the other groups.

#### *Association Between Pre-Treatment Fractures and Markers*

No statistically significant differences in the studied markers were found between patients with pre-treatment bone fractures and those without fractures .

#### *Frequency of Osteolytic Lesions Before and After Second-Line Treatment*

We found no statistically significant differences in the frequency of osteolytic lesions before and after second-line treatment (McNemar test,  $p = 1.000$ ).

#### *Association Between Osteolytic Lesion Status After Second-Line Treatment and Markers*

The status of osteolytic lesions after second-line treatment was defined as follows: Group 1 (patients with lesions both pre- and post-second-line treatment); Group 2: patients who had pre-treatment osteolytic lesions but no post-treatment lesions; Group 3: MM patients who had no osteolytic lesions pre- or post-second-line treatment; Group 4: MM patients who had no pre-treatment lesions but developed lesions post-treatment. We found no statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) regarding the distribution of albumin, calcium, hemoglobin, and LDH values among the four subgroups defined by osteolytic lesion status after second-line treatment.

## **4. Originality and Innovative Contributions of the Thesis**

This work presents the first observational and longitudinal study aimed primarily at evaluating the correlations between osteolytic lesions and the levels of modern and classical biomarkers.

One of the main contributions of the study includes the evaluation of modern biomarkers (IL-6, RANKL, Free RANK, TNF  $\alpha$ , IFN- $\beta$ , alkaline phosphatase, betacrosslaps) and osteolytic lesions, contributing to a possible perspective on how these modern markers can complement the value of classical markers (albumin, Beta2-microglobulin, calcium, ESR, LDH, hemoglobin), providing a more comprehensive overview of disease progression and bone integrity. This study highlighted significant correlations between the baseline values of modern biomarkers and the remission or progression of osteolytic lesions. Statistically, the results were analyzed using Mann-Whitney and Fisher tests.

The second, retrospective study aims to evaluate the correlations between therapeutic outcomes in first-line and second-line treatments and biomarkers (albumin, beta2-microglobulin, calcium, hemoglobin, LDH, ESR). The outcomes included: stable disease (SD), partial remission (PR), complete remission (CR), and progressive disease (PD).

The correlation between biomarkers and treatment outcomes provided a better understanding of clinical progression based on therapeutic response. Exploring the variations in these parameter values in relation to therapeutic outcomes suggested that changes in these markers could be used as predictive indicators of therapeutic efficacy.

The third retrospective study primarily aims to analyze the evolution of osteolytic lesions before and after first-line and second-line treatments, as well as fractures before and after first-line treatment and the values of biomarkers (albumin, beta2-microglobulin, calcium, hemoglobin, LDH, ESR).

Although no statistically significant differences were found, the correlation of these lesions with treatment response offers a deeper understanding of the therapeutic effect on bone disease.