

# КОСТНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ МНОЖЕСТВЕН МИЕЛОМ

## Клинично и прогностично значение



д-р Владимир Тодоров Геров<sup>1</sup>, доц. д-р Даниела Иванова Герова<sup>2</sup>, гм. доц. д-р Илина Димитрова Мичева<sup>1</sup>, гм. проф. Бистра Цанева Галунска-Калчева<sup>3</sup>, гф

<sup>1</sup>УС по хематология, Втора катедра по Вътрешни болести, Факултет по Медицина, МУ-Варна

<sup>2</sup>Катедра по Клинична лаборатория, Факултет по Медицина, МУ-Варна

<sup>3</sup>Катедра по Биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика, Фармацевтичен факултет, МУ-Варна

### МУЛТИПЛЕНИЯТ МИЕЛОМ (ММ) Е ЗЛОКАЧЕСТВЕНО ЗАБОЛЯВАНЕ,

характеризиращо се с клонална пролиферация на неопластични плазматични клетки в костния мозък със съпътстваща костна деструкция. Един от най-характерните белези на ММ е костната болест, като 80% от пациентите са с доказани остеолитични лезии още при поставяне на диагноза, а 60% претърпяват костни фрактури в хода на заболяването. Ключова роля в патогенезата на костната болест при ММ има повишената остеокластна активност и потиснатата остеобластна функция,

дължащи се на дисрегулация на редица интра- и интерцелуларни сигнални пътища. Сигнални пътища като RANK/RANKL/OPG, Notch, Wnt, RUNX2, EphrinB2/EphB4 и TNF път, както и сигналните молекули, DKK1, склеростин, периостин, остеопонтин, GF11, BMPs, TGFβ, актин А, annexin II, адипонектин, BTK, SDF1a, хемокини и интерлевкини, са обект на изследванията от последните години с цел изясняване патогенезата на костната болест при ММ. Такива сигнални молекули като RANK/RANKL, склеростин, остеопонтин, DKK1 и други цитокини, участващи в регулацията на остеокласти, остеобласти и остеоцити биха могли да послужат

като нови биомаркери за диагностика и мониториране на костната болест при пациенти с ММ. Ефективното лечение на пациентите с ММ и подобряване на качеството им на живот е свързано с дълбоко познаване на патогенетичните механизми на костна деструкция, което е предпоставка за разкриване на нови диагностични биомаркери и таргети за лечение.

### Въведение

Мултипленият миелом (ММ) е хематологично неопластично заболяване, характеризиращо се с натрупване на клонални плазматични клетки в костния мозък (Plasma Cells, PCs). Социалната значимост на ММ се определя от епидемиологията на заболяването. ММ съставлява 1% от всички онкологични и около 10% от онкохематологичните заболявания. През последните години се установява повишаване на честотата му. Така за 2018 г. в Американския регистър за ракови заболявания са отчетени 30 770 нови случая, а очакваната честота за 2021 г. е 34 920 нови случая<sup>[1]</sup>. Годишната заболеваемост от ММ в Европа е 4.5-6.0/100 000/година, средната възраст при поставяне на диагнозата 63-70 години, а смъртността е 4.1/100 000/

година<sup>[2]</sup>. В Българския онкологичен регистър през 2014 г. са вписани 209 новорегистрирани случая. Въпреки ниския процент на болните от ММ спрямо общата заболеваемост от онкологични заболявания, честотата на заболяването постепенно нараства. Така например за последните 20-25 години броят на новозаболените в Обединеното кралство нараства с около 30%<sup>[3]</sup> и подобна тенденция се наблюдава във всички европейски страни.

През последните години бяха регистрирани редица нови високоефективни лекарствени средства за лечение на миеломната болест. Въпреки това заболяването остава нелечимо и е с хронично прогресиращ ход. Основни инвалидизиращи фактори са костната болест, тежката неврологична симптоматика и хроничната бъбречна недостатъчност.

Генетичният фон и клиничното протичане на множествения миелом са много хетерогенни при различните пациенти. Въпреки големия напредък в познаването на молекулните механизми на заболяването все още неговата патогенеза не е напълно изяснена. Инициацията на заболяването и неговата прогресия е в резултат на множество фактори. Установен е многостъпален нелинеен ход на болестта, с множество соматични

**Ключови думи:**  
мултиплен миелом,  
костна болест,  
биомаркери

мутации, епигенетични нарушения, транслокации, промени в броя на хромозомите<sup>[4]</sup>. Друг аспект, обуславящ прогресията на заболяването е тясната връзка на плазматичните клетки с микрообкръжението, което играе важна роля за акумулирането на плазматичните клетки. Клинично изявеният мултиплен миелом се предшества от индолентни състояния като моноклонална гамопатия с неопределено значение (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, MGUS) и тлеещ миелом (Smoldering Myeloma, SMM). Прогресията им до симптоматични стадии се съпровожда с поредица от генетични промени в малигнения клон, както и промени в обкръжението на костния мозък, водещи до пролиферация на малигнените PCs, неоангиогенеза и остеолитични лезии<sup>[5,6]</sup>.

Биомаркерите са неотменна част при поставяне на диагнозата, проследяването и определяне прогнозата на MM. В светлината на нарасналите познания за патогенезата на MM и за взаимоотношенията на миеломните клетки с клетки от микросредата в костния мозък е необходимо характеризирането на нови костни биомаркери, с помощта на които би могло както да се стратифицират по-точно рисковите групи, така и да се разработват нови таргетни терапии.

## Биомаркери, свързани с хипоксия и неоангиогенеза при мултиплен миелом

Прогресията на MM се характеризира с аваскуларна фаза, отговаряща

на двата индолентни стадия – SMM и MGUS, следвани от неоангиогенеза, водеща до активен MM. За прогресията на заболяването съществено значение има хипоксичната среда в костния мозък и способността на миеломните клетки да свърхекспресират HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) – главен фактор, отговорен за адаптация на клетките към хипоксичен стрес<sup>[7,8]</sup>. Освен хипоксията в костния мозък и свърхекспресията на HIF-1, неоангиогенезата при MM се съпътства и с продукция на проангиогенни молекули от плазматичните клетки и от стромалните клетки на костния мозък (Bone Marrow Stromal Cells, BMSCs), такива като съдов ендотелен растежен фактор A (VEGFA), фибробластен растежен фактор (FGF), хепатоцитен растежен фактор (HGF), ангиопоетин-1 (ANG-1) и остеоопонтин (OPN). Последните действат като хемоатрактанти или се свързват с рецептори върху ендотелните клетки и стимулират тяхната пролиферация<sup>[9]</sup>. Освен ангиогенни молекули тези клетки секретират и протеолитични ензими металопротеинази-1, 2 и 9 (MMP-1, MMP-2, MMP-9), които ремоделират екстрацелуларния матрикс и благоприятстват миграцията на ендотелните клетки. Всички тези клетъчни взаимодействия благоприятстват заселването и преживяемостта на PCs в костния мозък.

Важна роля в този процес играе оста на хемокиновия рецептор CXCR4 (CD 184) и неговият лиганд CXCL12<sup>[10]</sup>. CXCL12, определян още като SDF-1 (Stromal Cell Derived Factor-1) е хемостатичен хемокин, конститутивно секретирани от мезенхимни или костномозъчни стромални клетки, естествени компоненти на костния мозък. Той

осъществява действието си чрез своя рецептор CXCR4, експресиращ се от хематопоеични и нехематопоеични туморни клетки. Взаимодействието на CXCR4 със CXCL12 води до метастазирание на туморните клетки чрез улесняване прилепването им към хематопоеичните костномозъчни ниши чрез стимулиране растежа и пролиферацията на неопластичните клетки по паракринен механизъм и активира туморната ангиогенеза<sup>[11]</sup>. Има доказателства, че миеломни клетки от болни в активен стадий експресират високи нива на CXCR4 в периферна кръв, докато в костен мозък тази експресия е потисната чрез лиганда му CXCL12. Освен това експресията на CXCR4 в миеломни клетки обратно корелира с активността на заболяването<sup>[12]</sup>. Оста CXCR4-CXCL12 представлява не само нов маркер за взаимодействието на миеломните клетки с микрообкръжението, но и таргет за разработване на нови терапевтични средства.

Друга възможност за таргетна терапия предостава повърхностната молекула CD229, позната и като SLAMF3 (Signaling Lymphocyte Activation Molecule Family member 3). Тя се експресира по повърхността на миеломните клетки и е член от семейството на SLAM-имунните рецептори. Интересно е, че CD229 се експресира и в стадията на MGUS и тлеещия миелом<sup>[13]</sup>. Така CD229 може да бъде надеждна алтернатива на CD38 и CD138 при идентифицирането на миеломните клетки<sup>[14]</sup>. Освен това високи серумни нива на разтворимата форма sSLAMF3 биха могли да отразяват прогресията на заболяването и да бъдат полезен прогностичен фактор и терапевтичен таргет за имунотерапия<sup>[15]</sup>.

## Биомаркери, свързани с остеокластна и остеобластна функция

Една от съществените характеристики на клинично проявения ММ е наличието на костни лезии, породени от дисбаланс между остеокластна/остеобластна диференциация и активност<sup>[16]</sup>. Агхезията на миеломни клетки към стромалните клетки индуцира секрецията на остеокласт-индуциращи фактори като TNF- $\alpha$ , Il-6, Il-1, матриксни металопротеинази, хепатоцит-растежни фактори, паратиреоид-подобен хормон, RANKL-L, VEGF, IGF, макрофагно-инфламаторен протеин 1- $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ).

## RANKL

Известно е, че сигналният път RANK (Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ B) и неговият лиганд RANKL е първичният медиатор на остеокластното активиране при ММ и от своя страна благоприятства пролиферацията и преживяемостта на миеломните РСс. В последните години обект на интензивни проучвания са разтворимият sRANKL и неговият инхибитор остеопротегерин (OPG). Високата биологична вариабилност на OPG вероятно обяснява неубедителните резултати относно промените в серумните нива на OPG при ММ и се предполага, че серумният OPG е малко специфичен за костните лезии при неоплазии<sup>[17,18]</sup>. Много по-чувствителен и специфичен по отношение на костната болест при ММ е циркулиращият sRANKL. Установени са високи нива на циркулиращия sRANKL при болни с ММ не

само в сравнение с MGUS и здрави контроли, но и при прогресия на заболяването. Освен това серумните нива на sRANKL корелират с утвърдени прогностични туморни маркери като  $\beta$ 2-микроглобулин и с броя на РСс в костен мозък (Bone Marrow Plasma Cells, BMPC). Доказано е, че серумните нива на циркулиращия sRANKL зависят от наличието или отсъствието на костни лезии, още повече, че този биомаркер се обявява като прогностичен фактор за общата преживяемост (Overall Survival, OS). Установено е също, че той има по-висока прогностична стойност от конвенционалната скелетна радиография. Интересен е фактът, че намалението на sRANKL с над 50% след проведена терапия има прогностична стойност по отношение на удължаване на свободното от прогресия заболяване (Progression-Free Survival, PFS)<sup>[19]</sup>.

## DKK-1 и склеростин – инхибитори на Wnt-сигналния път

Wnt-лигандите играят ключова роля в костния метаболизъм чрез тяхното взаимодействие с рецепторен комплекс, състоящ се от трансмембранни протеини, асоциирани към специфичен белтък, взаимодействие с LDL-рецептора (LRP5/6). Активирането на Wnt-сигналния път индуцира транслокация на цитозолния  $\beta$ -катенин в ядрото и активиране на транскрипцията на гени, участващи в остеобластната диференциация<sup>[20]</sup>.

Инхибитор на Wnt-сигналния път се явява белтъкът Dkk-1, който е основен фактор за изчерпването на остеобласти при миеломна болест. Dickkopf-1 (DKK1) е секреторен про-

теин, който специфично инхибира сигналния път Wnt/ $\beta$ -катенин като се свързва с ко-рецептора LRP-6. Изследвания от последните години показват, че нивата на DKK1 при пациенти с ММ корелират с наличието на литични костни лезии<sup>[21]</sup>. Освен това имунохистохимичен анализ на биопсичен материал от костен мозък показва, че само в миеломните клетки се доказва DKK1. В *in vitro* изследвания е установена потисната диференциация на остеобластни прекурсори от човешки рекомбинантен DKK1, както и от DKK1, изолиран от костен мозък. Обещаваща таргетна терапия на костните лезии би могла да бъде с антитела срещу DKK1, доказали намаление на туморния растеж в миши модели на миеломна болест<sup>[22]</sup>.

Склеростинът се кодира от SOST гена и представлява малък гликопротеин, секретирани от остеоцитите<sup>[23]</sup>. Той също се свързва с ко-рецептора LRP5/6 и инхибира сигналния път Wnt/ $\beta$ -катенин<sup>[24]</sup>. Като резултат се инхибират остеобластите, индуцира се апоптозата им и се потиска костното формиране<sup>[25]</sup>. Негативният му ефект върху костна тъкан се усилва и от факта, че склеростин стимулира продукцията на RANKL от остеоцитите<sup>[20]</sup>. Има проучвания, които доказват увеличени нива на склеростин при метаболитна костна болест и при постменопаузни жени<sup>[26]</sup>, но данните в литературата за ролята му при ММ са сравнително оскъдни. *Terros* и *сътр.*<sup>[25]</sup> установяват негативна корелация със специфичната костна алкална фосфатаза (маркер за костно образуване) и позитивна корелация С-телопептида на колаген тип-1 (маркер за костна резорбция). Посочените автори установяват, че нивата на склеростин са много



# НОВИНИ

Високи при пациенти с установена ММ и фрактури при диагнозата, както и пациентите с рецидив на ММ са с по-високи нива на склеростин, отколкото новодиагностицираните. Експерименталните данни на *Ega* и *сътр.* потвърждават ролята на склеростин като потенциален терапевтичен таргет при ММ и обосновават идеята относно проучвания за приложение на комбинирана терапия антитела срещу склеростин (scl-Ab)/протеазомни инхибитори, особено при състояния с установен костен катаболизъм<sup>[27]</sup>.

## Периостин

Периостинът, познат още с името остеобласт-специфичен фактор 2 (OSF-2) е белтък от екстрацелуларния матрикс. Фактът, че притежава домени, богати на остатъци от  $\gamma$ -карбоксиглутамат (Gla), получени при витамин К зависимото посттранслационно модифициране на белтъка, го причислява към групата на матриксните Gla-протеини<sup>[28]</sup>. Принадлежи към фасцилиновата фамилия, произвежда се предимно от стромалните клетки и се експресира основно в периоста (откъдето идва и името му). Участва в костното образуване и нормалните процеси на костно ремоделиране особено в условия на механичен стрес на костната тъкан<sup>[29,30]</sup>. Механичното натоварване на костите значително повишава експресията на периостин, което корелира с подобрени биомеханични свойства на дългите кости чрез увеличаване на костобразуващата активност особено в периосталната зона. Тези резултати предполагат, че периостин може да бъде биомаркер на периосталния метаболизъм, процес, който не може

да бъде определен от конвенционалните маркери на костния търновър, повечето от които са биомаркери на ремоделиране на ендосталната кост<sup>[20]</sup>. Точната роля на периостин в костното ремоделиране все още е неясна. Освен че периостин е структурна молекула в костния матрикс, едновременно с това тя играе и роля на сигнална молекула чрез интегринавите рецептори и Wnt/ $\beta$ -catenin сигналния път и така стимулира остеобласната функция и образуването на костна тъкан<sup>[31]</sup>. По време на ранната диференциация на остеобластите е установена *in vitro* култури по-ранна експресия на периостин в сравнение с остеокалцин и костна алкална фосфатаза, което го превръща в по-ранен биомаркер<sup>[32]</sup>. Значението на периостин за костната патология става очевидно от установената връзка между серумните нива на периостин и костната загуба. Високо серумно ниво на периостин е свързано с повишен риск от фрактури при жени в менопауза<sup>[20,33]</sup>, както и при анкилозираш спондилит<sup>[34]</sup>. Известно е, че периостин стимулира метастатичния растеж като благоприятства преживяемостта, инвазията и ангиогенезата на туморните клетки<sup>[35,36]</sup>. Костните метастази при рак на гърда индуцират свръхекспресия на периостин от стромалните клетки, което води до повишени нива на серумен периостин<sup>[37]</sup>. Експресията на периостин се повишава от наличието на активин А, представител на суперфамилията на TGF- $\beta$ . Изглежда, че активин А е deregулиран при първични костни тумори и костни метастази, както и при множествен миелом. Активин А се повишава в серума на ММ пациенти с остеолитична костна болест и взаимодействието между PCs и стромални

## Статините могат да забавят образуването на МЕТАСТАЗИ

Медицински наблюдения сред онкоболни пациенти показват, че смъртността се дължи много по-често на метастазите, отколкото на първичния тумор. Това е така, защото раковите клетки се разпространяват в други части на тялото още в началото на заболяването, когато туморът е много малък и неустановен. За да направят това, раковите клетки трябва да се откъснат от извънклетъчния матрикс и да мигрират чрез лимфата и кръвта в други тъкани, където се установяват и пролиферират. Разбирането на молекулярните механизми на метастазите е ключова част от пъзела в борбата с рака.

Преди повече от десет години проф. Улрике Щайн и нейната лаборатория в Центъра за експериментални и клинични изследвания (ECRC) успяха да открият важен двигател на този процес при човешкия колоректален рак: гена, свързан с метастази на рак на дебелото черво 1 (MCC1). Когато раковите клетки експресират MCC1, тяхната способност да пролиферират, да се движат из тялото и да нахлуват в други тъкани се засилва. „Много видове рак се разпространяват само при пациенти с висока експресия на MCC1“, обяснява Щейн. Сега, заедно с д-р Робърт Прейснер от Charité, Щайн открива какво може да наруши метастатичната прогресия в такива случаи: статините, които се предписват като лекарства за понижаване на холестерола, инхибират експресията на MCC1 в туморните клетки. Учените представят своите открития в *сп. Клинична и транслационна медицина*. Робърт Прейснер и учени от Университета на Вирджиния са изследвали данни от общо 300 000 пациенти, на които са били предписани статини. Този анализ установява връзка: „Пациентите, приемащи статини, имат 1/2 по-малко случаи на рак в сравнение с общата популация“, обяснява Прейснер.

клетки индуцира секреция на активин А. Проведени са две проучвания при миши модели, при които успешно се предотвратява развитието на остеолитични лезии и се инхибира растежът на тумора с помощта на антагонисти на активин А<sup>[21]</sup>.

## Витамин D дефицит при мултиплен миелом

Витамин D дефицитът играе важна роля за увеличението на редица остеоласт-активиращи фактори такива като хемокиновия лиганд 3/макрофажен инфламаторен протеин 1-алфа (Chemokine Ligand 3/Macrophage Inflammatory Protein 1-alpha, CCL3/MIP-1α), RANKL, OPG и на остеоласт-супресивните фактори (Dickkopf-протеин 1 и склеростин) при ММ<sup>[25,38]</sup>. Данни от последните години показват, че 17-32% от болните с ММ са с тежък витамин D дефицит (<10 ng/ml), 40% са с дефицит (<20 ng/ml), а 13-39% са с оптимални нива на витамин D (30 ng/ml)<sup>[39-41]</sup>. По данни на Mayo клиниката, честотата на витамин D дефицита се увеличава с напредване на стадия на заболяването<sup>[42]</sup>. Извън значението му за калциевата хомеостаза, витамин D има съществена имуномодулаторна роля: супресира имунните отговори, медирани чрез Th1 клетки, индуцира Tregs клетките, инхибира Th17 клетките, отговорни за синтеза на IL-17. Така витамин D спомага за диференциацията на Th клетките от Th1 към Th2 фенотип. Освен това потиска NK-клетките, потиска матурацията на T-клетките чрез инхибиране на дендритните клетки и подобрява хемотаксисния и фагоцитен отговор на макрофа-

гите, включително продукцията на антимикробни пептиди<sup>[43,44]</sup>. Интересен е фактът, че витамин D потиска пролиферацията на активираните В-клетки и диференцирането им до плазматични клетки. Установени са и директни ефекти на витамин D върху миеломни плазматични клетки, експресиращи рецептор за активната му форма (1.25-дихидрокси витамин D3)<sup>[45]</sup>. Витамин D дефицитът и повишеният PTH стимулират експресията на RANKL, а раковите клетки секретират PTH-подобен протеин. В резултат се стимулира костната остеолiza и освобождаването на растежни фактори от костния матрикс като инсулино-подобни растежни фактори, TGF-β и други, благоприятстващи развитието на туморните клетки<sup>[46]</sup>.

## Заклучение

Над 90% от пациентите с ММ развият миеломна костна болест, при която се нарушава динамичният баланс между костно формиране и костна резорбция с повишена остеоластна диференциация и активност и намалена активност и брой на остеобласти. Изучаването на ролята на различни белтъци от костното микроокръжение за формирането на костните лезии и прогресията на заболяването, би хвърлило нова светлина върху механизмите, водещи до тези усложнения с възможност за разработване на нови биологични агенти за таргетна терапия. Разкриването на такива молекули биомаркери би имало значима роля в развитието на транслационния подход в съвременната онкохематология. ■

## КНИГОПУС:

1. [https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?\\_ga=2.89432658.896576618.1612697996-1078188875.1612697996#/#](https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?_ga=2.89432658.896576618.1612697996-1078188875.1612697996#/)
2. Morosio P, San Miguel J, Sonneveld P, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017 Jul;28(Suppl 4):iv52-iv61.
3. <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/myeloma/>
4. Cosmans C, Oben B, Arijis I, et al. Prognostic Biomarkers in the Progression from MGUS to Multiple Myeloma: a Systematic Review. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018 Apr;18(4):235-248.
5. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011 Mar 17;364(11):1046-1060.
6. Kuehl WM, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J Clin Invest*. 2012 Oct;122(10):3456-3463.
7. Storti P, Bolzoni M, Donofrio G, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1α suppression in myeloma cells blocks tumoral growth in vivo inhibiting angiogenesis and bone destruction. *Leukemia*. 2013 Aug;27(8):1697-1706.
8. Colia S, Storti P, Donofrio G, et al. Low bone marrow oxygen tension and hypoxia-inducible factor-1α overexpression characterize patients with multiple myeloma: role on the transcriptional and proangiogenic profiles of CD138(+) cells. *Leukemia*. 2010 Nov;24(11):1967-1970.
9. Giuliani N, Storti P, Bolzoni M, et al. Angiogenesis and multiple myeloma. *Cancer Microenviron*. 2011;4(3):325-337.
10. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*. 2006 Mar;107(5):1761-1767.
11. Bao L, Lai Y, Liu Y, et al. CXCR4 is a good survival prognostic indicator in multiple myeloma patients. *Leuk Res*. 2013 Sep;37(9):1083-1088.
12. Alsayed Y, Ng H, Rummels J, et al. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood*. 2007 Apr;109(7):2708-2717.
13. Yousef S, Kovacsics-Bankowski M, Salama ME, et al. CD229 is expressed on the surface of plasma cells carrying an aberrant phenotype and chemotherapy-resistant precursor cells in multiple myeloma. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(7):1606-1611.
14. Pojero F, Flores-Montero J, Sanoja L, et al. Utility of CD54, CD229, and CD319 for the identification of plasma cells in patients with clonal plasma cell diseases. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016 Jan;90(1):91-100.
15. Ishibashi M, Takahashi R, Tsubota A, et al. SLAMF3-Mediated Signaling via ERK Pathway Activation Promotes Aggressive Phenotypic Behaviors in Multiple Myeloma. *Mol Cancer Res*. 2020 Apr;18(4):632-643.
16. Rowland GD. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia*. 2009 Mar;23(3):435-441.
17. Goranova-Marinova V, Goranov S, Pavlov P, et al. Serum levels of OPG, RANKL and RANKL/OPG ratio in newly-diagnosed patients with multiple myeloma. *Clinical correlations. Haematologica*. 2007 Jul;92(7):1000-1001.
18. Semmls HP, Jacobsen S, Jensen T, et al. Biological variation and reference intervals for circulating osteopontin, osteoprotegerin, total soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and high-sensitivity C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest*. 2007 Apr;67(8):821-835.
19. Jakob C, Goerke A, Terpos E, et al. Serum levels of total-RANKL in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009 Dec;9(6):430-435.
20. Kim BJ, Lee SH, Koh JM. Potential Biomarkers to Improve the Prediction of Osteoporotic Fractures. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2020 Mar;35(1):55-63.
21. Terpos E, Christoulas D, Gavriatopoulou M, et al. Mechanisms of bone destruction in multiple myeloma. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2017 Nov;26(6).
22. Qian J, Xie J, Hong S, et al. Dickkopf-1 (DKK1) is a widely expressed and potent tumor-associated antigen in multiple myeloma. *Blood*. 2007 Sep;110(5):1587-94.
23. Lewiecki EM. Role of sclerostin in bone and cartilage and its potential as a therapeutic target in bone diseases. *Rev Adv Musculoskelet Dis*. 2014;6(2):48-57.
24. Li X, Zhang Y, Kang H, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem*. 2005;280(20):19883-19887.
25. Terpos E, Christoulas D, Kalodirou E, et al. Elevated circulating sclerostin correlates with advanced disease features and abnormal bone remodeling in symptomatic myeloma: reduction post-bortezomib monotherapy. *Int J Cancer*. 2012 Sep;131(6):1466-1471.
26. Polyzos SA, Anastasiakis AD, Stratigakos C, et al. Serum sclerostin levels positively correlate with lumbar spinal bone mineral density in postmenopausal women – the six-month effect of risendronate and teriparatide. *Osteoporos Int*. 2012 Mar;23(3):1171-1176.
27. Edeh H, Santo L, Wein MN, et al. Regulation of Sclerostin Expression in Multiple Myeloma by Dkk-1: A Potential Therapeutic Strategy for Myeloma Bone Disease. *J Bone Miner Res*. 2016 Feb;31(6):1225-1234.
28. González-González L, Alonso J. Periostin: A Matricellular Protein With Multiple Functions in Cancer Development and Progression. *Front Oncol*. 2018 Jun;8:225.
29. Norris RA, Moreno-Rodriguez R, Hoffman S, et al. The many facets of the matricellular protein periostin during cardiac development, remodeling, and pathophysiology. *J Cell Commun Signal*. 2009 Dec;3(3-4):275-86.
30. Cabo T, Vitoria CG, Solares L, et al. Role of periostin in adhesion and migration of bone remodeling cells. *PLoS One*. 2016 Jan;11:e0147837.
31. Bonnet N, Garnero P, Ferrari S. Periostin action in bone. *Mol Cell Endocrinol*. 2016 Sep;432:75-82.
32. Merle B, Bouet G, Rousseau JC, et al. Periostin and transforming growth factor β-induced protein (TGFBIP) are both expressed by osteoblasts and osteoclasts. *Cell Biol Int*. 2014 Mar;38(3):398-404.
33. Rousseau JC, Somay-Rendu E, Bertholon C, et al. Serum periostin is associated with fracture risk in postmenopausal women: a 7-year prospective analysis of the OFELY study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Jul;99(7):2533-9.
34. Sakellariou GT, Anastasiakis AD, Bibinas J, et al. Circulating periostin levels in patients with AS: association with clinical and radiographic variables, inflammatory markers and molecules involved in bone formation. *Rheumatology (Oxford)*. 2015 May;54(5):908-14.
35. Kapoor S. Periostin and its emerging role in systemic carcinogenesis. *Osteoporos Int*. 2014 Apr;25(4):1423-4.
36. Underwood TJ, Hayden AL, Derouet M, et al. Cancer-associated fibroblasts predict poor outcome and promote periostin-dependent invasion in oesophageal adenocarcinoma. *J Pathol*. 2015 Feb;235(3):466-77.
37. Contlé S, Voorzanger-Rousselot N, Litvin J, Clézardin P, Garnero P. Increased expression and serum levels of the stromal cell-secreted protein periostin in breast cancer metastases. *Int J Cancer*. 2011 Jan;129(2):352-60.
38. Ng AC, Khwaja S, Chaturvedi S, et al. Bone microstructural changes revealed by high-resolution peripheral quantitative computed tomography imaging and elevated DKK1 and MIP-1α levels in patients with MGUS. *Blood*. 2011 Dec;118(25):6529-6534.
39. Lauter B, Schmidt-Wolf IG. Prevalence, Supplementation, and Impact of Vitamin D Deficiency in Multiple Myeloma Patients. *Cancer Invest*. 2015;33(10):505-9.
40. Hudzik S, Snaod B, Mousa L, et al. The majority of myeloma patients are vitamin D deficient, unrelated to survival or cytogenetics. *Blood*. 2015;126(23):5336.
41. Badros A, Golubeva O, Terpos E, et al. Prevalence and significance of vitamin D deficiency in multiple myeloma patients. *Br J Haematol*. 2008 Jul;142(3):492-494.
42. Ng AC, Kumar SK, Rajkumar SV, et al. Impact of vitamin D deficiency on the clinical presentation and prognosis of patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Am J Hematol*. 2009 Jul;84(7):397-400.
43. Wei R, Christakos S. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. *Nutrients*. 2015;7(10):8251-8260.
44. Weeres MA, Robben K, Ahn YQ, et al. The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on in vitro human NK cell development from hematopoietic stem cells. *J Immunol*. 2014 Oct;193(7):3456-3462.
45. Burwick N. Vitamin D and plasma cell dyscrasias: reviewing the significance. *Ann Hematol*. 2017 Aug;96(8):1271-1277.
46. Maier GS, Horas K, Kurth AA, et al. Prevalence of Vitamin D Deficiency in Patients with Bone Metastases and Multiple Myeloma. *Anticancer Res*. 2015 Nov;35(11):6281-6285.