Izraženost proteina NOTCH1 i JAGGED1 u monoklonalnoj gamapatiji neodređenog značenja i multiplom mijelomu

Škrtić, Anita

Doctoral thesis / Disertacija

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:897235

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository



Središnja medicinska knjižnica

Škrtić, Anita (2011) ***Izraženost proteina NOTCH1 i JAGGED1 u monoklonalnoj gamapatiji neodređenog značenja i multiplom mijelomu.*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/979

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Anita Škrtić

Izraženost proteina NOTCH1 i JAGGED1 u monoklonalnoj gamapatiji neodređenog značenja i multiplom mijelomu

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Merkur.

Voditelj rada: prof.dr.sc. Mara Dominis, dr.med.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentoru prof.dr.sc. Mariji Dominis, dr.med. na strpljivosti, trudu, vremenu, pomoći i stručnim savjetima u realizaciji rada.
Stručni savjeti, strpljivost i moralna podrška Sonje Džebro, dr.med. i dr.sc. Ane Borovečki, dr.med. pomogli su mi u pisanju ovoga rada te im se zahvaljujem na tome.
Zahvaljujem prof.dr.sc. Davoru Ivankoviću, dr.med. na nesebičnoj i stručnoj pomoći te osebujnom stilu kojim je obogatio moj pristup znanstvenom radu i životu.
Stručna pomoć i moralna podrška Delfe Radić Krišto, dr.med., Radmile Ajduković Stojisavljević, dr.med., Jasminke Sinčić Petričević, dr.med. i dr.sc. Tajane Štoos Veić, dr.med. omogućila je i olakšala moj put u znanstvenom radu.
Gospođi Ankici Ajduković i Smilji Bumber (A&B, d.o.o.) zahvaljujem se na profesionalnom odnosu i pomoći u realizaciji rada.
Velika hvala svim dragim i bliskim osobama koje su mi pružale podršku, pomoć i bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.
Najveću zahvalu upućujem svojim najdražim i najbitnijim osobama u životu- svojoj obitelji – koji su moj najveći poticaj i inspiracija i kojima dugujem zahvalnost za neopisivo nesebičnu ljubav, vjeru i podršku.

„Just as treasures are uncovered from the earth, so virtue appears from good deeds, and wisdom appears from a pure and peaceful mind. To walk safely through the maze of human life, one needs the light of wisdom and the guidance of virtue.“

(Siddhārtha Gautama, Buddha, 563 BCE - 483 BCE)

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1 Plazmastanične novotvorine 1

1.2 Multipli mijelom (MM) 3

1.3 Monoklonalna gamapatija neodređenog značenja (MGUS) 8

1.4 Terapijski pristup MM-u i MGUS-u 10

1.5 Citogenetičke promjene u MM-u i MGUS-u 12

1.6. Izraženost proteina CIKLIN D1, CD20, PAX5, NOTCH1 i JAGGED1 u MM-u i MGUS-u 15

1.6.1 Izraženost proteina CIKLIN D1 u MM-u i MGUS-u 15

1.6.2 Izraženost proteina CD20 u MM-u i MGUS-u 17

1.6.3 Izraženost proteina PAX5 u MM-u i MGUS-u 18

1.6.4 Izraženost proteina NOTCH1 i JAGGED1 u MM-u i MGUS-u 19

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA 26

2.1 HIPOTEZA 26

2.2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA 27

3. BOLESNICI I METODE 28

3.1. Bolesnici 28

3.2. Imunohistokemijsko bojanje na parafinskim rezovima biopsije koštane srži 30

3.3 Interfazna fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) na parafinskim rezovima i citološkim razmazima koštane srži 33

3.3.1 Priprema preparata 33

3.3.2 Analiza preparata 35

3.4 Statistička analiza 36

4. REZULTATI 37

4.1.1 Morfološke karakteristike MGUS-a u koštanoj srži 37

4.1.2 Morfološke skupine MM-a u koštanoj srži 37

4.2.1 Izraženost proteina NOTCH1, JAGGED1, CIKLIN D1, CD20 i PAX5 u MGUS-u 40

4.2.2 Izraženost proteina
NOTCH1, JAGGED1, CIKLIN D1, CD20 i PAX5 u MM-u 41

4.3.1 Prisutnost t(11;14)(q13;q32); t(4;14)(p16;q32);
t(14;16)(q32;q23); delecije 13(13q34);
translokacije *PAX5*(9p13) u MGUS-u 45
4.3.2 Prisutnost t(11;14)(q13;q32); t(4;14)(p16;q32);
t(14;16)(q32;q23); delecije 13(13q34);
translokacije *PAX5*(9p13) u MM-u 47
4.4.1 Usporedba morfoloških obilježja tumorskih plazma stanica
u koštanoj srži u podskupinama MM-a
s citogenetičkim promjenama i bez citogenetičkih promjena 50
4.4.2 Usporedba izraženosti proteina NOTCH1, JAGGED1,
CIKLIN D1, CD20 i PAX5 u podskupinama MM-a
s citogenetičkim promjenama i bez citogenetičih promjena 51
4.4.3 Usporedba kliničkih, radioloških i laboratorijskih pokazatelja
u podskupinama MM-a s citogenetičkim promjenama i
bez citogenetičkih promjena 53
4.5.1 Usporedba morfoloških, imunohistokemijskih i FISH rezultata
s kliničkim i laboratorijskim pokazateljima u MGUS-u i MM-u 55
4.5.2 Usporedba utjecaja morfoloških i fenotipskih obilježja
te citogenetičkih abnormalnosti na preživljenje bolesnika
s MGUS-om i MM-om 60
5. RASPRAVA 65
6. ZAKLJUČCI 75
7. SAŽETAK 76
8. SUMMARY 78
9. LITERATURA 80
10. ŽIVOTOPIS 91

Popis oznaka i kratica

A	-	Adriamicin
B	-	Bleomicin
BCR	-	*BCR, B-cell receptor*
bHLH	-	*helix-loop-helix genes*
BMS	-	stromalne stanice koštane srži
BSAP	-	*B-cell-related acitvator protein/ PAX5*
C	-	Ciklofosfamid
CCND1/2/3	-	*cyclin D 1/2/3 gene*
C-MAF	-	*v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)*
CRP	-	C- reaktivni protein
D	-	Deksametazon
DS	-	Durie Salmon stadij
DSL domena	-	Delta Serrate-LAG-2 domain
F	-	fuzijski signal
FGFR3/MMSET	-	*fibroblast growth factor receptor 3 gene/ multiple myeloma SET gene*
G	-	zeleni signal (*greeen signal*)
H&E	-	hemalaun & eozin
HES	-	*Hairy/Enhancer of split genes*
IGH	-	*immunoglobulin heavy locus*
ISS	-	*International Staging System for Multiple Myeloma*
JAGGED	-	*jagged gene*
KS	-	koštana srž
LDH	-	laktat dehidrogenaza
LSAB HRP+	-	vizualizacijski set streptavidin- biotin plus
LSAB HRP	-	vizualizacijski set streptavidin-biotin
LSI	-	lokus specifična proba
MAFB	-	*v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene*

		homolog B (avian)
MGUS	-	monoklonalna gamapatija neodređenog značenja
M	-	Melfalan
MM	-	multipli mijelom
mSMART	-	*Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy*
NIC	-	unutarstanična domena Notch receptora
NOTCH	-	*notch gene*
O	-	narančasti signal (*orange signal*)
p	-	kratki krak kromosoma
POEMS sindrom	-	osteosklerotični mijelom s polineuropatijom, organomegalijom, endokrinopatijom, monoklonalnom gamapatijom i kožnim promjenama
P	-	Prednizon
PS	-	plazma stanica
q	-	dugi krak kromosoma
RB1	-	*retinoblastoma 1gene*
Rb	-	protein retinoblastom
R	-	crveni signal (*red signal*)
ROTI	-	*myeloma-related organ and tissue impairment*
s.s.	-	stupnjevi slobode
SZO	-	Svjetska zdravstvena organizacija
$s\beta_2m$	-	serumski β_2 mikroglobulin
T-ALL	-	T- stanična limfoblastična leukemija
TC grupe	-	prognostičke grupe u multiplom mijelomu na osnovu *IGH* translokacija (T) i izraženosti CIKLIN D (C)
T	-	Talidomid
V	-	Vinkristin

1. UVOD

1.1 Plazmastanične novotvorine

Tumorske stanice plazmastaničnih novotvorina su nekompletno diferencirane plazma stanice „zamrznute“ u stadiju terminalne diferencijacije B-stanica (**1**).

Poremećaj u shemi normalne diferencijacije B-stanica u plazma stanice najvjerojatnije se događa unutar germinativnog centra u vrijeme somatske mutacije varijabilne regije imunoglobulina i izotipskog prekapčanja gena teškog lanca imunoglobulina (*IGH*) što rezultira klonalnom proliferacijom plazma stanica (**2**). Tumorske plazma stanice, za razliku od normalnih plazma stanica, zadržavaju mogućnost samoobnove. Nekontrolirana samoobnova tumorskih stanica odgovorna je za progresiju i relaps bolesti. Nadalje, tumorske plazma stanice ne cirkuliraju te se akumuliraju u koštanoj srži zbog neadekvatne apoptoze (deregulacija CD40L i BlyS *(engl. B lymphocyte stimulator)* u mijelomskim stanicama). Unutar germinativnog centra terminalna diferencijacija B-stanica u plazma stanice predstavlja složen proces koji se odvija u više koraka i zahtijeva točnu koordinaciju u staničnoj diferencijaciji, staničnom ciklusu i apoptozi. S obzirom na njegovu složenost, tijekom navedenog procesa, može doći do složenih numeričkih i strukturalnih citogenetičkih promjena koje se tipično nalaze u tumorskim plazma stanicama.

Zajedničko osnovno obilježje plazmastaničnih novotvorina je klonalna proliferacija plazma stanica s prekomjernim stvaranjem monoklonalnih imunoglobulina, paraproteina ili M-proteina (monoklonalna gamapatija).

Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) limfoidnih novotvorina, skupina plazmastaničnih novotvorina uključuje (**1**):

1. Monoklonalnu gamapatiju neodređenog značenja (MGUS)
2. Multipli mijelom (MM)

    Varijante:

        Asimptomatski (šuljajući) mijelom

        Nesekretorni mijelom

        Plazmastanična leukemija
3. Plazmacitom

    Solitarni plazmacitom kostiju

    Ekstramedularni (ekstraosealni) plazmacitom
4. Bolesti odlaganja imunoglobulina

    Primarna amiloidoza

    Bolesti odlaganja lakih i teških lanaca
5. Osteosklerotični mijelom (POEMS sindrom).

Na osnovu biološkog ponašanja unutar navedene heterogene skupine plazmastaničnih novotvorina MM i MGUS predstavljaju dva različita entiteta koja ipak dijele određena zajednička obilježja; dobnu pojavnost tumora, spolnu zastupljenost, visinu proliferativnog indeksa i apoptoze u tumorskim stanicama, izraženost staničnih biljega i citogenetičke promjene.

1.2 Multipli mijelom (MM)

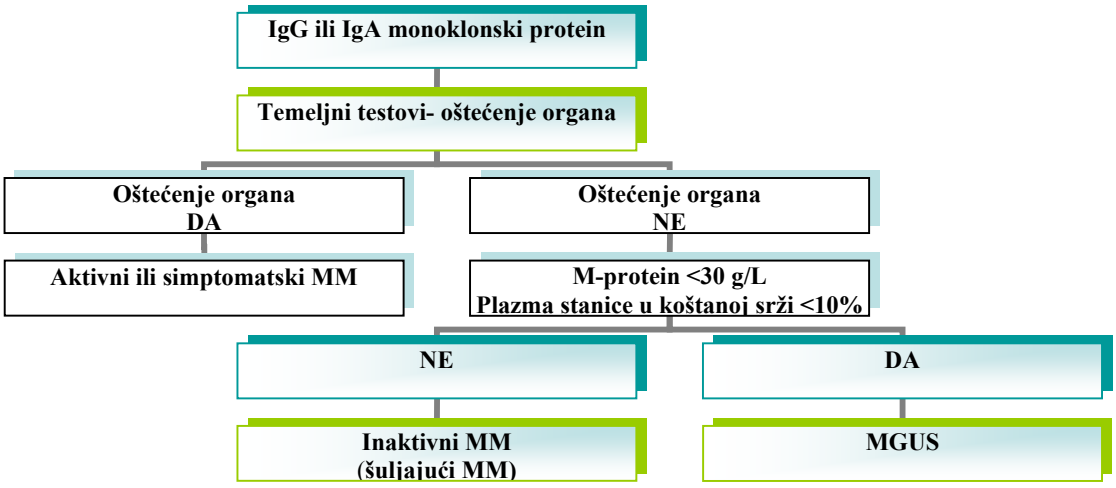
Multipli mijelom je multifokalna klonalna novotvorina plazma stanica lokalizirana u koštanoj srži koja se klinički može prezentirati u obliku asimptomatske bolesti do klinički potpuno razvijene slike MM-a (**3**). Bolest se pojavljuje podjednako u oba spola zrele do starije životne dobi (za muškarce $\overline{X}$ ±SD = 68 godina, za žene $\overline{X}$ ±SD = 70 godina) (**4**). Aktivni ili simptomatski MM definiran je prisutnošću znakova oštećenja organa, *ROTI* (*engl. myeloma-related organ and tissue impairment*): hiperkalcemija, bubrežna insuficijencija, anemija, osteolitičke lezije ili osteoporoza s kompresivnim frakturama. Oko 10% bolesnika s MM-om razvije primarnu amiloidozu (**5-8**).

MM je česta hematološka bolest; 15% svih hematoloških bolesti otpada na MM.

Dijagnoza MM-a temelji se na kombinaciji morfoloških, radioloških i kliničkih nalaza.

Dijagnostički postupak u bolesnika s MM-om je složen. Potrebno je učiniti testove za procjenu veličine tumorske mase i prognoze bolesti kao i testove za procjenu *ROTI*. U bolesnika s negativnim temeljnim testovima za procjenu *ROTI* a prema količini M-proteina u serumu i postotku plazma stanica u koštanoj srži postavlja se dijagnoza asimptomatskog MM-a (šuljajućeg MM-a).

Predložen dijagnostički algoritam za multipli mijelom (**slika 1**) (**9**):



Slika 1. Dijagnostički algoritam za multipli mijelom.

Preuzeto po uzoru na http://www.mijelom.hr/o_bolesti/?p=dijagnoza (pristupljeno 2. 6. 2010.)

Prema klasifikaciji SZO-e dijagnostički kriteriji za MM su (**1,5**):

Simptomatski/aktivni MM

1. M- komponenta imunoglobulina (Ig) G>30 g/L, IgA>25 g/L u serumu;

   Bence-Jonce (BJ) protein u urinu >1 g/L
2. >10% plazma stanica u koštanoj srži
3. *ROTI* (hiperkalcemija, bubrežna insuficijencija, anemija, osteolitičke lezije), hiperviskoznost krvi, amiloidoza, infekcije

Asimptomatski (šuljajući) MM

1. M- komponenta IgG>30 g/L, IgA>25 g/L u serumu;

   Bence-Jonce protein u urinu >1 g/L

i/ili

2. 10% plazma stanica u koštanoj srži
3. Odsustvo *ROTI* (hiperkalcemije, bubrežne insuficijencije, anemije, osteolitičkih lezija), hiperviskoznosti krvi, amiloidoze, infekcija.

Prema vrijednostima dijagnostičkih parametara bolesnici s MM-om mogu biti u različitim stadijima bolesti (**1**). Postoji nekoliko predloženih prognostičkih podjela kliničkog stadija bolesti u MM-u te je danas Internacionalni sistem stadija bolesti najznačajniji među njima (ISS engl. *International Staging System for Multiple Myeloma*) (**10**). No, još uvijek se klinički stadij bolesnika oboljelih od MM-a najčešće određuje prema Durie Salmonu (DS) (**11,12**).

Durie Salmon klinički stadij MM-a:

Stadij I

IgG< 50g/L, IgA< 30g/L; BJ protein u urinu <4 g/24h
Odsustvo ili solitarna osteolitička lezija
Normalna vrijednost hemoglobina, kalcija u serumu, imunoglobulina (ne-M-komponenta)

Stadij II

Prosječne vrijednosti parametara između I i III stadija

Stadij III

IgG>70 g/L, IgA>50 g/L; BJ protein u urinu >12g/24h
Multiple osteolitičke lezije
Hemoglobin <85 g/L, kalcij u serumu >12 g/L.

Subklasifikacija (bubrežna funkcija)

A= kreatinin u serumu <200 g/L
B= kreatinin u serumu ≥200 g/L.

M-komponenta u serumu ili urinu nalazi se u oko 97% bolesnika s MM-om od čega 50% IgG, 20% IgA, 20% laki lanci imunoglobulina, <10% IgD, IgE i IgM, a oko 3% slučajeva MM-a su nesekretornog tipa (**5**).

MM je u pravilu neizlječiva bolest bez obzira na poboljšanja učinjena u terapijskom pristupu bolesnika s MM-om. Preživljenje bolesnika varira od nekoliko tjedana do više od deset godina. Medijan preživljenja je tri godine. Takva različitost povezana je s prognostičkim čimbenicima i specifičnim obilježjima kako tumora tako i samog bolesnika. Identifikacija tih obilježja te njihova povezanost s prognozom tijeka bolesti vrlo je važan dio analize bolesti kako bi odabir terapije bio što učinkovitiji (**13**). Negativni prediktivni čimbenici su: povišena vrijednost serumskog β_2 mikroglobulina, laktat dehidrogenaze i C-reaktivnog proteina te niska vrijednost serumskog albumina, visoka proliferativna aktivnost plazma stanica, visok postotak tumorskih plazma stanica u koštanoj srži, morfološka plazmablastična diferencijacija stanica kao i citogenetičke promjene koje grupiraju bolesnike u visokorizičnu skupinu (**tablica 1**) (**10,15-23**).

Tablica 1. Citogenetičke prognostičke grupe u MM-u.

Visokorizična skupina	Delecija 13 ili aneuploidija (citogenetička analiza metafaza) t(4;14); t(14;16), t(14;20) (analiza interfaznim FISH**) Delecija 17p13 (analiza interfaznim FISH**) Hipodiploidija
Niskorizična skupina	Odsustvo negativnih prediktivnih citogenetičkih čimbenika* Hiperdiploidija t(11;14); t(6;14) (analiza interfaznim FISH**)

Preuzeto po uzoru na literaturu (**1**), strana 208, tablica 10.9.

* citogenetičke promjene visokorizične skupine

** FISH - fluorescentna *in situ* hibridizacija (*engl. fluorescence in situ hybridization*)

Morfološki, koštana srž u bolesnika s MM-om infiltrirana je intersticijski u manjim nakupinama, nodularno ili difuzno tumorskim plazma stanicama (**24,25**). Ostatna količina stanica hemocitopoeze ovisi o tipu infiltrata i količini tumorskog tkiva u koštanoj srži. Udio tumorskih plazma stanica je minimalno 30%. Uz koštane gredice nalazi se pojačana osteoklastična aktivnost. Morfološki tumorske plazma stanice mogu imati obilježja dobro diferenciranih do slabo diferenciranih stanica (**24-27**).

Tumorske plazma stanice izražavaju jedan tip citoplazmatskih imunoglobulina dok su imunoglobulini na površini stanice negativni. Fenotipski tumorske plazma stanice su CD79a, VS38c, CD138, CD38strong pozitivne, dok su CD19 negativne. Isto tako aberantno izražavaju CD56, CD117, CD20, CD52 i CD10 (**28-32**).

1.3 Monoklonalna gamapatija neodređenog značenja (MGUS)

Monoklonalna gamapatija neodređenog značenja je plazmastanična novotvorina s monoklonalnom proliferacijom plazma stanica u koštanoj srži bez oštećenja ciljnih organa; bez osteolitičkih promjena kostiju, anemije i kroničnog oštećenja bubrega. Promjena se zato i naziva „benigna gamapatija“ ili asimptomatska premaligna bolest (**33-35**).

Učestalost MGUS-a u općoj populaciji iznad 50 godina života je u oko 3%. Incidencija se povećava s uznapredovalom životom dobi (1,7% za dob od 50-59 godina prema 5% za one od 70 i više godina). Progresija MGUS-a u MM je 1% godišnje. Količina i tip M-komponente u serumu, omjer lakih lanaca imunoglobulina, udio monoklonalnih plazma stanica, DNA aneuploidija i hipoglobulinemija klinički predstavljaju čimbenike rizika progresije bolesti (**5,36,37**). S obzirom na rizik progresije MGUS-a u MM ova bolest smatra se preneoplastičnom bolešću (**37**).

Tumorske stanice MGUS-a kao i tumorske stanice MM-a su nekompletno diferencirane plazma stanice čiji se inicijalni događaj odvija unutar germinativnog centra u vrijeme somatske hipermutacije varijabilne regije imunoglobulina i izotipskog prekapčanja *IGH* gena što rezultira ekspanzijom monoklonalnih plazma stanica.

Dijagnoza MGUS-a temelji se također na kombinaciji morfoloških, radioloških i kliničkih nalaza.

U bolesnika s negativnim temeljnim testovima za procjenu *ROTI*, te prema količini M-proteina u serumu i postotku plazma stanica u koštanoj srži postavlja se dijagnoza MGUS-a (**slika 1**).

Dijagnostički kriteriji određeni su prema klasifikaciji SZO-e (**1**).

Dijagnostički kriteriji MGUS-a (**1**):

1. M- komponenta u serumu ≤30 g/L
2. <10% plazma stanica u koštanoj srži
3. odsutnost anemije, hiperkalcemije, ostelitičkih lezija te bubrežne insuficijencije
4. isključivanje drugih B-limfoproliferativnih bolesti.

Oko 70% bolesnika s MGUS-om ima IgG tip M-proteina, 15% IgM, 12% IgA. Gotovo 20% bolesnika s MGUS-om sadrži samo lake lance imunoglobulina (**3,38**). Hipogamaglobulinemija se nalazi u 30-40% bolesnika s MGUS-om.

Morfološki u koštanoj srži nalazi se tek minimalno tumorskih plazma stanica, manje od 10%, pojedinačno ili u manjim nakupinama u intersticiju koštane srži (**5**). Tumorske plazma stanice su morfološki dobro diferencirane, tek ponegdje se mogu vidjeti citoplazmatske inkluzije i nukleoli u jezgri. U aspiratu koštane srži nalazi se oko 3% tumorskih plazma stanica.

Iako plazma stanice u MGUS-u morfološki ne pokazuju različitost, metodom protočne citometrije moguće je razlikovati dvije populacije plazma stanica, poliklonalnu s normalnim fenotipom (CD38strong, CD19+, CD56-) i monoklonalnu populaciju s aberantnim fenotipom (CD19-/CD56+; CD19-/CD56-; CD38weak). Udio poliklonalne populacije plazma stanica u MGUS-u je u prosjeku 27% (**39,40**).

1.4 Terapijski pristup MM-u i MGUS-u

Bolesnici s MGUS-om i asimptomatskim MM-om ne zahtijevaju liječenje već kliničko praćenje uz kontrolne laboratorijske nalaze u vremenskom razdoblju od dva do tri mjeseca. Indikacija za liječenje postavlja se kad se pojave znaci progresije bolesti: porast vrijednosti M-komponente u serumu/urinu, anemija, hiperkalcemija, bubrežna insuficijencija, pojava koštanih lezija, nalaz ekstamedularnog plazmacitoma.

Bolesnike s aktivnim ili simptomatskim MM-om potrebno je liječiti s ciljem postizanja kompletne remisije koja se definira odsutnošću M-proteina u serumu i urinu metodom imunofiksacije najmanje šest tjedana, manje od 5% tumorskih plazma stanica u koštanoj srži, odsutnošću osteolitičkih lezija i plazmacitoma u mekim tkivima (**41**). Prije početka liječenja potrebno je ocijeniti funkcije drugih organa kako bi se moglo procijeniti koliko agresivnu terapiju bolesnik može podnijeti odnosno procijeniti da li je bolesnik kandidat za terapiju transplantacijom perifernih matičnih krvotvornih stanica.

Transplantacija autolognih (vlastitih) matičnih krvotvorih stanica nakon kondicioniranja visokim dozama Melfalana danas se smatra standardnom terapijom u bolesnika mlađih od 65 godina starosti, odnosno u nekim centrima i do 70 godina. Zbog iznimno male toksičnosti danas se obično primjenjuju dvije uzastopne autologne transplantacije matičnih krvotvornih stanica („tandem transplantacija“) u vremenskom razmaku od dva do tri mjeseca. Prema dosadašnjim podacima „tandem transplantacija“ pokazuje bolje rezultate od jednostruke autologne transplantacije matičnih krvotvornih stanica (**42**).

U mlađih bolesnika koji imaju tkivno podudarnog srodnika, može se primijeniti transplantacija alogenih matičnih krvotvornih stanica no uz visoki rizik komplikacija i smrtnosti.

Posljednjih su godina u kliničkoj primjeni novi lijekovi. Talidomid predstavlja skupinu imunomodulatornih lijekova koji inhibiraju angiogenezu u MM-u te je danas standardni lijek u liječenju bolesnika s MM-om. Talidomid se sve češće primjenjuje u kombinaciji s ostalim citostaticima u prvoj liniji terapije. Zbog njegove izrazite neurotoksičnosti istražuju se njegovi derivati kao što je Lenalidomid (**43**). Proteosomalni inhibitor, Bortezomib, predstavnik je nove generacije „pametnih“ lijekova koji pokazuje učinkovitost u bolesnika s refraktornom bolešću (**44**).

Bolesnici iznad 65 godina, odnosno 70 godina starosti liječe se izabranom kemoterapijom ovisno o pridruženim bolestima (komorbiditetima).

Najčešće prvi izbor liječenja za ovu skupinu bolesnika je MP* protokol. Ostale terapijske mogućnosti su sljedeće: VAD/CVAD* protokol, VMCP/VBAP*, ABCM*, VBCMP-M2* protokoli, Deksametazon ili drugi kortikosteroidi. U novije vrijeme primjenjuju se MPT*, B**D*, VTM* protokoli (**45**).

(*M - Melfalan; P - Prednizon; V - Vinkristin; A - Adriamicin; D - Deksametazon; C - Ciklofosfamid; B - Bleomicin; T - Talidomid; **B - Bortezomib).

Osim gore navedene terapije, suportivna terapija bisfosfonatima ima važnu ulogu u liječenju MM-a u smislu inhibicije djelovanja osteoklasta, resorpcije kosti i hiperkalcemije. Pojedini bisfosfonati (Pamidronat, Zolendronat) imaju i specifično antitumorsko djelovanje; inhibiraju produkciju interleukina-6 u stromalnim stanicama koštane srži (**46**). In vitro mogu inducirati apoptozu tumorskih plazma stanica (**46**).

U bolesnika kod kojih je došlo do relapsa tj. ponovne pojave ili progresije bolesti izbor liječenja ovisi o terapijskim linijama koje je bolesnik do tada primio (**47**).

Nasuprot navedenim dijagnostičkim algoritmima i liječenju bolesnika oboljelih od MM-a prijedlog novog pristupa dijagnozi i liječenju bolesnika oboljelih od MM-a, „mSMART“ algoritam (*engl. Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy*) zasnovan je na citogenetičkim aberacijama tumorskih plazma stanica kao dijagnostičkom obilježju temeljem kojeg se bolest klasificira i određuje tip terapije u bolesnika s MM-om (**48**).

1.5 Citogenetičke promjene u MM-u i MGUS-u

MM obilježavaju složene numeričke i strukturalne citogenetičke promjene. MGUS također pokazuje slične ili iste citogenetičke promjene. *IGH* translokacije predstavljaju najranije genetičke promjene koje se pojavljuju u stanicama germinativnog centra te na taj način definiraju jednu subpopulaciju MM-a/MGUS-a. Druga subpopulacija MM-a/MGUS-a obilježena je numeričkim citogenetičkim promjenama.

Na osnovu dosadašnjih istraživanja ploidije postoje četiri skupine MM-a/MGUS-a od kojih su dvije najčešće (**49-55**):

1. "Nehiperdiploidna“ skupina (50%) povezana s visokom prevalencijom *IGH* translokacija (>85%) i delecijom kromosoma 13.

Primarni partneri *IGH* translokacija su (**tablica 2**):

a. 11q13 (*CCND1*)
b. 4p16.3 (*FGFR3/MMSET*)
c. 6p21 (*CCND3*)
d. 16q23 (*C-MAF*)
e. 20q11(*MAFB*)

Ostali partneri *IGH* translokacija imaju <1% udjela u MM-u.

Najčešći primarni partneri *IGH* translokacija su *CCND1, FGFR3/MMSET* i *C-MAF*. *IGH* translokacije najčešće imaju mjesto cijepanja unutar *"switch"* i JH regija koji se mogu dogoditi tijekom izotipskog prekapčanja gena za teški lanac imunoglobulina ili manjim dijelom tijekom somatske mutacije varijabilne regije, te se smatraju primarnim događajem. Jukstapozicijom navedenih gena kao primarnih partnera *IGH* translokacija rezultira pojačanom ekspresijom gena.

Dvije trećine nehiperdiploidne skupine MM-a ima poremećenu izraženost CIKLIN D1/2/3 kao posljedicu:

- *IGH* translokacija koje mogu direktno poremetiti ekspresiju *CCND1/3* (20%)
- Aktivacije MAF/MAFB transkripcijskih faktora čiji je ciljni gen *CCND2* (7%)
- Bialelne ekspresije *CCND1* (40%)

Promijenjena ekspresija gena *CCND1/2/3* ima sličnu pojavnost i u MGUS-u (**49**).

2. “Hiperdiploidna" skupina (50%) povezana je s multiplim trisomijama, dok je pojavnost *IGH* translokacija relativno niska (<30%).

Tablica 2. Učestalost citogenetičkih promjena u MGUS-u i MM-u.

Citogenetičke promjene	MGUS (%)	MM (%)
Translokacije *IGH* gena	35-50	50-70
t(4;14)(p16;q32)	2-10	15
t(11;14)(q13;q32)	15-30	16
t(14;16)(q32;q23)	2-5	5
delecija 13q34	23	43

Poznato je da su “hiperdiploidna skupina” te ekspresija *CCND1* povezani s boljom prognozom bolesti, dok su aktivacija *MAF, MAFB, FGFR3/MMSET* te delecija kromosoma 13 i 17 povezani s lošom prognozom bolesti (**17,20,22,51,52,56-62**). Tek je nedavno t(4;14)(p16;q32) postala neovisan prognostički čimbenik i vjerojatno najbitniji citogenetički prognostički čimbenik u bolesnika s MGUS-om i MM-om (**63**). Opisane aberacije kromosoma koreliraju s razvojem bolesti, imunološkim i kliničkim statusom te prognozom (**49,63-66**).

Prema pojavnosti *IGH* translokacija (T) i izraženosti CIKLIN D (C) proteina multipli mijelom se može podijeliti u osam prognostički definiranih grupa (TC grupe). Podjela se zasniva na najčešćim ranim citogenetičkim i epigenetičkim promjenama koje sudjeluju u patogenezi bolesti (**tablica 3**) (**1,67**).

Tablica 3. *TC* grupe u multiplom mijelomu.

Grupa	Primarna translokacija	Gen	D-Ciklin	Ploidnost*	%	Prognoza
6p21	6p21	*CCND3*	D3	NH	3	Dobra
11q13	11q13	*CCND1*	D1	D, NH	16	Dobra
D1	nema	nema	D1	H	34	Dobra
D1+D2	nema	nema	D1+D2	H	6	? Loša
D2	nema	nema	D2	H, NH	17	?
Nema	nema	nema	nema	NH	2	? Dobra
4p16	4p16	*FGFR3/MMSET*	D2	NH>H	15	Loša
maf	16q23	*c-amf*	D2	NH	5	Loša
	20q11	*mafB*	D2	NH	2	Loša

Preuzeto po uzoru na literaturu (**1**), strana 206, tablica 10.6.

* *TC* - translokacija, izraženost CIKLIN D proteina; D - diploidan; H - hiperdiploidan; NH - nehiperdiploidan

Nakon primarne citogenetičke promjene tumorska stanica je genetički nestabilna uz veću mogućnost pojavnosti sekundarnih citogenetičkih promjena. Osim opisanih postoje i druge citogenetičke promjene koje mogu utjecati na progresiju bolesti u obje skupine; u hiperdiploidnoj i nehiperdiploidnoj skupini. Radi se o „sekundarnim *IGH* translokacijama“: deleciji 17p13 (*TP53*), translokaciji gena *MYC*, amplifikaciji 1q ili deleciji 1p, mutaciji gena *NF-kB*, inaktivaciji $p18^{INK4c}$ ili *RB1* (**18, 67-73**).

1.6. Izraženost proteina CIKLIN D1, CD20, PAX5, NOTCH1 i JAGGED1 u MM-u i MGUS-u

1.6.1 Izraženost proteina CIKLIN D1 u MM-u i MGUS-u

CIKLIN D1 pripada obitelji ciklin proteina koji kontroliraju stanični ciklus aktivacijom o ciklinu ovisnih kinaza (CDK) (**74**).
U obitelji ciklina postoje različiti subtipovi ciklina koji se aktiviraju u određenim fazama staničnog ciklusa aktivirajući različite CDK-e i time različite ciljne proteine. Postoje dvije glavne skupine ciklina:

1. G1/S ciklini
    - Ciklin A/CDK2- aktivni u G1 fazi staničnog cikusa
    - Ciklin D/CDK4, Ciklin D/CDK6, Ciklin E/CDK2- aktivni u prijelazu G1 u S fazu staničnog ciklusa
2. G2/M ciklini
    - Ciklin B/CDK1- regulira prijelaz G2 u M fazu staničnog cikusa

Gen *CCND1* smješten je na kromosomu 11q13. CIKLIN D1 pripada skupini ciklina koji reguliraju prijelaz G1 u S fazu staničnog cikusa. Kompleks CIKLIN D1 i CDK djeluje na Retinoblastom (Rb), tumor supresor protein, čija je ekspresija *RB1* gena pozitivno regulirana Rb proteinom. Protein CIKLIN D1 izražen je u većini tkiva osim u limfatičnom tkivu gdje ne postoji ekspresija *CCND1* već *CCND2* i/ili *CCND3*. Mutacije, amplifikacije i pojačana ekspresija *CCND1* gena, posljedica čega je promjena kinetike staničnog ciklusa, pojavljuju se u različitim tumorima i mogu sudjelovati u tumorigenezi. Translokacija t(11;14)(q13;q32) nalazi se u tumorskim stanicama neHodgkinova limfoma plaštene zone pri čemu *CCND1* lokus dolazi u područje pojačivača transkripcije *IGH* gena što rezultira pojačanom izraženosti CIKLIN D1 proteina (**75,76**). Translokacija t(11;14)(q13;q32) nalazi se i u 15% slučajeva multiplog mijeloma te MGUS-a što također rezultira pojačanom izraženosti CIKLIN D1 proteina (**76,77**). No u 30% slučajeva MM-a

s pojačanom izraženosti CIKLIN D1 proteina u tumorskim stanicama ne nalaze se citogenetičke promjene kromosoma 11q13 (**60,76,78**). U tim slučajevima mehanizam koji uzrokuje pojačanu izraženost proteina još uvijek nije u potpunosti razjašnjen.

1.6.2 Izraženost proteina CD20 u MM-u i MGUS-u

CD20 je transmembranski, neglikozilirani protein koji je izražen na površini membrane B-staničnih prekursorkih i zrelih limfatičnih stanica te se gubi pri diferencijaciji plazma stanica (**34**). Dugački N- i C-terminalni krajevi proteina nalaze se na unutarnjoj, citoplazmatskoj strani membrane dok je vrlo mali dio proteina izražen na površini stanice. CD20 ima glavnu ulogu u regulaciji transmembranskog protoka kalcija u B-limfocitima što ukazuje na njegovu funkciju kao regulatora proliferacije i diferencijacije (**34**).

U koštanoj srži CD20 se pojavljuje od pro-B razvojnog stadija limfocita nakon preuredbe *IGH* gena. Ostaje izražen i u daljnjim stadijima diferencijacije B-stanica. U limfnom čvoru CD20 izražen je u B-staničnim područjima, stanicama centra klijanja, limfocitima plaštene zone kao i u rijetkim interfolikularnim stanicama, histiocitima a negativan je u plazma stanicama i T-limfocitima (**10,12**).

Oko 10-15% MM-a izražavaju biljeg CD20 i najčešće su povezani s morfološki dobro diferenciranim plazma stanicama i primarnom translokacijom t(11;14)(q13;q32) u tumorskim plazma stanicama (**79**). S druge strane, oko 50% plazmastaničnih leukemija izražavaju CD20 u sklopu „nezrelijeg“ fenotipskog profila u odnosu na tumorske stanice MM-a što je povezano s kraćim preživljenjem bolesnika (**80,81**).

1.6.3 Izraženost proteina PAX5 u MM-u i MGUS-u

PAX5 gen smješten je na kromosomu 9p13. Član je skupine transkripcijskih faktora koji kodiraju B-stanično-specifični aktivacijski protein (*engl. BSAP, B-cell-related activator protein/PAX5*).

PAX5/BSAP ima središnju ulogu u razvoju B-stanica. U ranom razvoju B-stanične linije PAX5 sudjeluje kao jedan od tri transkripcijska čimbenika (E2A, EBF1 i PAX5) potrebna za diferencijaciju usmjerenih prekursorskih limfatičnih stanica u koštanoj srži u B-limfocite.

PAX5 ima dvostruku ulogu u razvoju B-stanične linije: aktivaciju transkripcije B-staničnih specifičnih biljega kao što je CD19 koji kodiraju molekule potrebne za pre-BCR (*engl. BCR, B-cell receptor*), a s druge strane suprimira transkripciju ostalih ne-B-limfoidnih gena koji se pojavljuju u prekursorskim stanicama od kojih je jedan i *NOTCH1* (**82**).

PAX5 također sudjeluje i u diferencijaciji B-limfocita od pro-B, zrelih B-stanica u plazma stanice. Proces je složen, te ga prate fenotipske i funkcionalne promjene kao što je pojava i gubitak izraženosti različitih staničnih biljega (izraženost CD38 i CD138; gubitak CD19, CD20) te izraženost imunoglobulina.

PAX5 gen kodira BSAP (PAX5) protein koji je izražen u koštanoj srži odrasle osobe u ranim stadijima diferencijacije od pro-B-limfocita, kao i ostalim zrelijim stadijima razvoja B-limfocita sve do plazma stanica u kojima se gubi izraženost navedenog proteina dok se pojačava aktivnost *PRDM1* gena potrebnog za plazmastaničnu diferencijaciju B-limfocita (**83**).

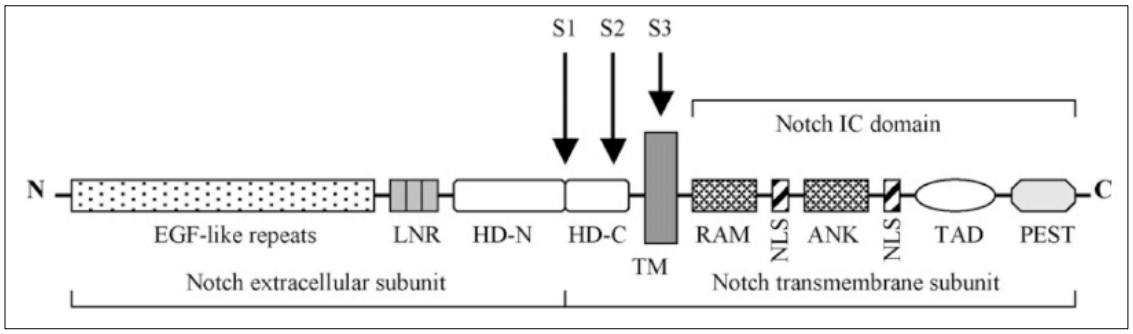
BSAP aktivira brojne specifične B-stanične gene: CD19, CD79a, CD20, J-lanac imunoglobulina, *RAG-2*, *IGH* i *IGL*.

PAX5/BSAP korelira s izraženošću CD20 biljega te je u velikom broju slučajeva vrlo dobar biljeg u diferencijaciji pojedinih B-staničnih neoplazmi od plazmastaničnih tumora. Analizom imunohistokemijskog bojanja P. Lin i suradnici pokazali su izraženost PAX5 proteina u tumorskim plazma stanicama bolesnika s MM-om. Izraženost PAX5 proteina gotovo u potpunosti korelira s izražajem CD20 no različitog intenziteta bojanja (**28,79,84,85**).

1.6.4 Izraženost proteina NOTCH1 i JAGGED1 u MM-u i MGUS-u

NOTCH1 je član obitelji Notch receptora koji pripadaju tipu I transmembranskih proteina. U sisavaca obitelj Notch receptora sastoji se od četiri člana Notch receptora: Notch1/2/3/4 i 5 Notch liganda (Jagged1/2, Delta- like 1/3/4). Gen receptora Notch1 (*NOTCH1)* smješten je na kromosomu 9q34.3 (**86-88**).

Notch receptori građeni su od velike ekstracelularne domene koja je potrebna za vezanje liganda i unutarstanične domene odgovorne za signalizaciju unutar stanice (**slika 2**).



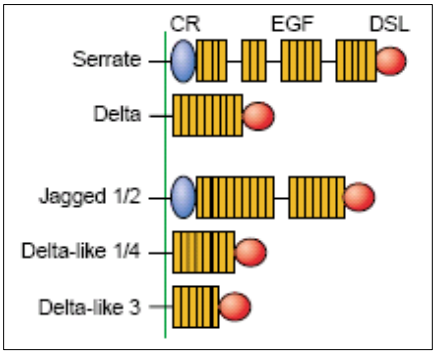
Slika 2. Shematski prikaz Notch receptora (**89**).

IC, intracelularna domena; EGF, epidermalni faktor rasta; LNR, Lin12/Notch sekvence; HD-N, N-terminalni kraj heterodimerne domene; HD-c, C-terminalni kraj heterodimerne domene; TM-transmembranska domena; NSL, *nuclear localizing signals*; RAM, Ram domena; ANK, domena Ankryrin sekvence; TAD, transaktivirajuća domena; PEST, regija bogata prolinom (P), glutaminom (E), serinom (S) i treoninom (T). Mjesta cijepanja receptora furinu sličnim proteazama (S1), ADAM metaloproteinazama (S2), i γ-sekretazom (S3)

Notch ligand JAGGED1 pripada obitelji Notch proteina, tipu I transmembranskih proteina. Gen JAGGED1 liganda smješten je na kromosomu 20p12-p11 (**86**).

Notch receptori i ligandi dio su signalnog sustava u stanici koji evolucijski i filogenetički sadržavaju konstantne funkcionalne domene u svojoj građi, od *Drosophila* do kralježnjaka. Sudjeluju u razvoju brojnih tkiva i organa u tijeku organogeneze, fetalnom i postnatalnom periodu, kao i u odrasloj dobi (**90**).

Notch ligandi kao transmembranski proteini građeni su od velike ekstracelularne regije s Delta-Serrate-LAG-2 (DSL) domenom i ponavljajućim EGF-*like* domenama. Serrate/Jagged ligandi imaju i cisteinom bogatu domenu (**slika 3**) (**91**). Funkcija unutarstaničnih domena liganda je nepoznata, a građene su od kratkih sekvenci (**86,92,93**).



Slika 3. Shematski prikaz građe Notch receptora Serrate (*Drosophila melanogaster)*; Delta (*Drosophila melanogaster)*; Jagged 1/2; Delta-like 1/3/4 (**91**).

Aktivacija Notch signalnog puta posredovana je vezanjem liganda (**94**). Iako se NOTCH proteini i njihovi ligandi često nalaze na površini iste stanice, Notch receptor aktivira se vezanjem liganda na susjednoj stanici (**86**). Poznato je da se različiti Notch ligandi mogu fizički vezati za različite Notch receptore, no s različitim afinitetom vezivanja (**95**). K. Shimizu i suradnici pokazali su da najizraženiji afinitet vezivanja za NOTCH1 i NOTCH3 receptore ima Notch ligand Delta-like1, zatim Jagged2 i Jagged1. Jačina vezivanja je ovisna o koncentraciji liganda i receptora na stanici.

Notch unutarstanična domena (NIC) veže se s citoplazmatskim i nuklearnim proteinima omogućujući prijenos signala. *HES* geni *(Hairy/Enhancer of split)* i citoplazmatski protein Deltex glavni su ciljni geni i proteini Notch signalnog puta. Oni djeluju kao represori transkripcije obitelji tkivno-specifičnih bazičnih *helix-loop-helix* (*bHLH*) gena (**87,95-97**).

Notch sudjeluje u razvoju brojnih tkiva i organa u tijeku organogeneze, fetalnom i postnatalnom periodu, kao i u odrasloj dobi (**90**). Brojne stanične funkcije kao i

međustanični odnosi posredovani su Notch signalnim putem, uključujući proliferaciju, apoptozu, adheziju i angiogenezu (**86,90,98**).

Međustanična signalizacija posredovana Notch signalnim putem utječe na različitu sudbinu ekvipotentnih matičnih stanica izloženih čimbenicima rasta u mikrookolišu u smislu proliferacije, diferencijacije i sazrijevanja pojedinih staničnih linija. Aktivnost Notch signalnog puta ovisi o vrsti Notch receptora na površini stanice i njegovoj koncentraciji (**94**). Aktivirani Notch signalni put rezultira lateralnom inhibicijom ako je riječ o istom tipu stanica (homotipna stanična signalizacija) ili pojačanom signalizacijom ako je riječ o različitim tipovima stanica (heterotipna stanična signalizacija) (**86**).

Notch signalni put sudjeluje u hematopoezi, razvoju i diferencijaciji limfoidne, mijeloidne te eritroidne prekursorske populacije stanica (**86,99,100**). U studiji L. A. Milner i suradnika NOTCH1 regulira hematopoezu inhibicijom stanične diferencijacije. Promjena kinetike staničnog ciklusa smatra se mogućim mehanizmom inhibicije diferencijacije posredovano Notch1 signalnim putem (**100,101**).

JAGGED1 je izražen na površini samo određenog tipa stanica, kao što su stromalne stanice u timusu i adventicijske retikularne stanice u koštanoj srži, mastociti, megakariociti (**86,102,103**) i pluripotentne matične stanice (**104**).

Izraženost JAGGED1 u stromalnim stanicama koštane srži te NOTCH1 u hematopoetskim prekursorskim stanicama upućuje na mogućnost međustanične interakcije između stromalnih i hematopoetskih stanica posredovano Jagged1-Notch1 signalnim putem. Sukladno tome izraženost JAGGED1 proteina u staničnoj kulturi HS-27 stromalnih stanica pospješuju proliferaciju i inhibiraju diferencijaciju hematopoetskih matičnih stanica ovisno o jačini Jagged1-Notch1 signalnog puta (**86,103**).

Smatra se da konstitutivno trajno aktivirani NOTCH signalni put promjenom kinetike staničnog ciklusa sudjeluje u onkogenezi pri čemu je ciljni gen *CCND1* (**105**). Ciljni protein NIC domene je $p21^{/WAF1/CIP1}$, jedan od dvaju ključnih regulatora staničnog ciklusa (**106,107**). Nepromijenjena (nemutirana) NIC domena ne može aktivirati traskripciju *CCND1* gena (**105**).

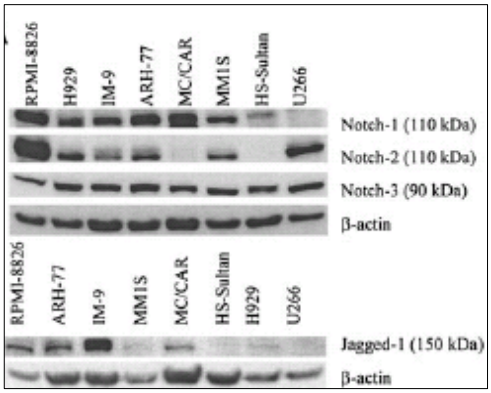
Poznata je uloga *NOTCH1* gena u razvoju akutne T-stanične limfoblastične leukemije (T-ALL). Analizama tumorskog tkiva u bolesnika s T-ALL potvrđena je translokacija t(7;9)(q34:q34.3) pri čemu se kodirajuća regija C-terminalnog kraja *NOTCH1* gena

postavlja uz lokus T-staničnog receptora-β. Time NOTCH1 protein postaje trajno aktivan. Opisana translokacija pojavljuje se u manje od 1% T-ALL, međutim mutacije *NOTCH1* gena, neovisne o navedenoj translokaciji, utvrđene su u više od 50% T-ALL s jednakom učestalošću u djece i odraslih, dakle deregulacija Notch1 signalnog puta ima jednu od glavnih uloga u etiologiji humane T-ALL (**108**).

Uloga Notch signalnog puta u razvoju B-staničnih novotvorina nije u potpunosti razjašnjena.

Postoji kontroverzno mišljenje o djelovanju Notch signalnog puta i aberantne izraženosti proteina NOTCH1 i JAGGED1 na ponašanje tumorskih plazma stanica u MM-u (**107,109-114**). U normalnim plazma stanicama nema izraženosti navedenih proteina, ili tek pojedinačne stanice pokazuju slab intenzitet (**110,111**).

Izraženost NOTCH proteina i JAGGED1 liganda u tumorskim plazma stanicama humanih staničnih kultura je različita (**slika 4**) (**107**).



Slika 4. *Western blott*; izraženost proteina NOTCH i JAGGED1 liganda u osam različitih humanih staničnih kultura multiplog mijeloma (NCI H929, U266, RPMI-8226, HS-Sultan, ARH-77, IM-9, i MC/CAR) (**107**).

β-actin, kontrola; kDa, veličina markera u kilodaltonima

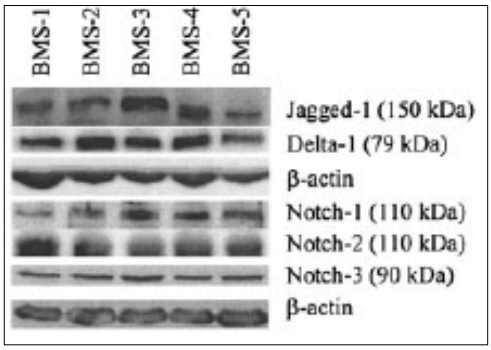
Prema studijama Y. Nefedove i suradnika te P. A. Zweidler-McKaya i suradnika aktivirani Notch signalni put inhibira proliferaciju te inducira apoptozu humanih staničnih kultura tumorskih plazma stanica (**107,114**). Suprotno navedenim studijama F.

Jundt i suradnici opisuju indukciju proliferacije tumorskih stanica aktivacijom Notch signalnog puta posredovano JAGGED1 (**110,115**).

U studiji Y. Nefedove i suradnika aktivacija Notch1 i Notch2 signalnog puta posredovano vezanjem JAGGED1 liganda u različitim humanim staničnim kulturama tumorskih plazma stanica nespecifičan je proces, no rezultat je bitno različit (**107**).

Aktivirani Notch1 signalni put imao je inhibitorni učinak na proliferaciju tumorskih plazma stanica, dok aktivirani Notch2 signalni put nije imao učinak na proliferaciju stanica. Ključni i ciljni protein staničnog ciklusa u aktiviranom Notch1 signalnom putu je $p21^{/WAF1/CIP1}$. Djelovanje Melfalana ili Mitoksantrona *in vitro*, koji induciraju apoptozu u tumorskim plazma stanicama, bilo je neučinkovito u stanicama koje su imale aktivirani Notch1 signalni put. Suprotno tome, djelovanje navedenih lijekova induciralo je apoptozu u tumorskim stanicama s aktiviranim Notch2 signalnim putem, što potvrđuje djelotvornost lijeka.

Rezultati upućuju na mogući utjecaj Notch1 signalnog puta u rezistenciji tumorskih plazma stanica MM-a liječenih konvencionalnom kemoterapijom pri čemu mikrookoliš u koštanoj srži ima važnu ulogu. Istovjetan učinak na tumorske plazma stanice mogu imati JAGGED1 pozitivne stromalne stanice koštane srži koje vezivanjem na NOTCH1 protein tumorskih plazma stanica aktiviraju Notch1 signalni put (**slika 4, slika 5**) (**107,116,117**).



Slika 5. *Western blott*; izraženost NOTCH proteina i liganda u stromalnim stanicama koštane srži u pet različitih davatelja koštane srži (**107**).

BMS, stromalne stanice koštane srži; β-actin, kontrola; kDa, veličina markera u kilodaltonima

P. A. Zweidler-McKay i suradnici također opisuju inhibiciju proliferacije i indukciju apoptoze tumorskih B-limfocita (**114**). Rezultati su djelomično sukladni sa studijom Y. Nefedove i suradnika (**107**). Suprotno njihovim rezultatima, P. A. Zweidler-McKay i suradnici aktivacijom Notch2 signalnog puta u humanoj staničnoj kulturi MM-a U266 utvrdili su inhibiciju proliferacije i indukciju apoptoze u tumorskih plazma stanica. U navedenoj staničnoj kulturi izražen je samo NOTCH2 protein u tumorskim plazma stanicama za razliku od ostalih prikazanih staničnih kultura MM-a (**slika 5**) (**114**). Nisu uspjeli objasniti mehanizam kojim aktivirani Notch signalni putevi utječu na proliferaciju i apoptozu tumorskih stanica, iako E2A protein, ključan u razvoju B-limfocita, predstavlja moguću ciljnu molekulu (**112**).

U studiji F. Jundt i suradnika aktivirani Notch signalni put posredovan JAGGED1 inducira proliferaciju tumorskih stanica u humanim staničnim kulturama Hodgkinova limfoma i multiplog mijeloma (**110,115**). No i tu postoji razlika između različitih humanih staničnih linija multiplog mijeloma. U humanoj staničnoj kulturi MM-a U266 nije inducirana proliferacija tumorskih plazma stanica (**slika 4**) (**110,115**).

U istoj studiji, u biopsiji koštane srži te ekstramedularno u jetri, analizirana je imunohistokemijska izraženost proteina NOTCH1/2 i JAGGED1 u tumorskim plazma stanicama bolesnika s MM-om (**110**). Sva tri navedena proteina bila su izražena u plazma stanicama svih bolesnika bez obzira na lokalizaciju tumora. Pojedine netumorske stanice u koštanoj srži, ponajprije megakariociti, izražavali su proteine NOTCH1 i JAGGED1, no slabog intenziteta bojanja (**110**). Imunohistokemijskim bojanjem proteini NOTCH1, NOTCH2, i JAGGED1 nisu bili izraženi u netumorskim plazma stanicama CD38+++/CD19++ izoliranim iz koštane srži zdravih davatelja (**110**).

Tumorske plazma stanice multiplog mijeloma mogu izražavati više od jednog NOTCH receptora i/ili liganda pa priroda Notch signalnog puta ovisi o: ukupnom profilu svih Notch receptora/liganda; tipu stanice; specifičnim citokinima/čimbenicima rasta u mikrookolišu i količini aktiviranog Notch signala (**118**).

S obzirom na navedeno Notch signalni put i aberantna izraženost NOTCH1 i JAGGED1 proteina u tumorskim plazma stanicama multiplog mijeloma nije u potpunosti razjašnjena. Rezultati dosadašnjeg malog broja originalnih radova o Notch signalnom

putu učinjenih na humanim staničnim kulturama tumorskih stanica MM-a su kontroverzni.

Ovim istraživanjem željeli smo utvrditi razliku u izraženosti NOTCH1 i JAGGED1 proteina u tumorskim plazma stanicama MGUS-a i MM-a kao pokazatelja jedne od promjena u razvoju tumora.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1 HIPOTEZA

U slučaju istovjetne izraženosti proteina u tumorskim plazma stanicama MGUS-a i multiplog mijeloma intenzitet izraženosti NOTCH1 i JAGGED1 proteina razlikovao bi se u korist multiplog mijeloma. U slučaju različite pojavnosti izraženosti proteina u tumorskim plazma stanicama MGUS-a i multiplog mijeloma izraženost bi bila veća u skupini bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma. Razlike u izraženosti proteina NOTCH1 i JAGGED1 te njihov utjecaj na Notch signalni put unutar stanice mogle bi biti dostatne za promjenu diferencijacije, proliferacije i apoptoze u tumorskim plazma stanicama.

2.2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. U MGUS-u odrediti:
    a. morfološke karakteristike MGUS-a u koštanoj srži
    b. izraženost proteina NOTCH1, JAGGED1, CIKLIN D1, CD20 i PAX5 u tumorskim stanicama MGUS-a
    c. učestalost prisutnosti t(11;14)(q13;q32); t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23); delecije 13(13q34) i translokacije *PAX5*(9p13)
2. U MM-u odrediti:
    a. morfološke skupine u MM-a
    b. izraženost proteina NOTCH1, JAGGED1, CIKLIN D1, CD20 i PAX5 u tumorskim stanicama MM-a
    c. učestalost prisutnosti t(11;14)(q13;q32); t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23); delecije 13(13q34) i translokacije *PAX5*(9p13)
3. Definirati dvije podskupine MM-a:
    a. podskupinu MM-a s prisutnom barem jednom citogenetičkom promjenom
    b. podskupinu MM-a bez citogenetičkih promjena
    c. usporediti izraženost proteina NOTCH1, JAGGED1, CIKLIN D1, CD20 i PAX5 u dvije navedene podskupine MM-a
4. Morfološki, imunohistokemijski rezultati kao i rezultati FISH metode biti će uspoređeni s kliničkim i laboratorijskim pokazateljima: dob, spol, serumski β_2 mikroglobulin, albumin, ukupni kalcij, hemoglobin, kreatinin, C-reaktivni protein (CRP), laktat dehidrogenaza (LDH), elektroforeza proteina, imunoelektroforeza proteina s/u, radioimunodifuzija imunoglobulina, stanje oštećenja koštanog tkiva, klinički stadij bolesti u multiplom mijelomu (Durie Salmon sistem stadija bolesti).
5. Prema morfološkim karakteristikama tumora, tipu infiltrata u koštanoj srži, izraženosti navedenih proteina, zastupljenosti pojedinih translokacija u MGUS-u i MM-u utvrditi međusobni odnos MGUS-a i MM-a te definirati podskupine MM-a s različitim kliničkim i prognostičkim obilježjima.

3. BOLESNICI I METODE

3.1 Bolesnici

Istraživanje je obuhvatilo 100 bolesnika od kojih 20 s klinički potvrđenom dijagnozom MGUS-a i 80 s klinički potvrđenom dijagnozom MM-a. Bolesnici su liječeni u KB Merkur, KB Dubrava te KB Osijek u razdoblju od 2004. - 2008. godine.

Dijagnoze MGUS-a i MM-a postavljene su prema dijagnostičkim kriterijima klasifikacije SZO-e (**1**).

Svakom bolesniku učinjena je biopsija te citološki razmazi aspirata koštane srži u vrijeme dijagnostičkog postupka u sklopu postavljanja dijagnoze, a prije početka liječenja.

Biopsija koštane srži obrađena je rutinski: hemalaun & eozinom (H&E), Giemsom, Berlinskim modrilom, PAS, Masson i Gömorii metodom (**119**). Serijski rezovi cilindara biopsije koštane srži debljine 4 μm korišteni su za imunohistokemijsko bojanje te interfaznu fluorescentnu *in situ* hibridizaciju (FISH).

Citološki razmazi aspirata koštane srži na standardnim i silaniziranim predmetnim staklima bojani May-Grünwald Giemsom upotrijebljeni su za morfološku analizu tumorskih stanica: stupanj diferencijacije i određivanje postotka tumorskih stanica (**119**).

Neobojani citološki razmazi aspirata koštane srži upotrijebljeni su za analizu FISH signala delecije 13(13q34).

Podaci o vremenskom praćenju bolesnika bili su dostupni za 90/100 bolesnika (71/80 bolesnika s MM-om i 19/20 bolesnika s MGUS-om) sa srednjim vremenom praćenja od 19 mjeseci (1-1712 dana).

U deset bolesnika vremensko praćenje bolesnika nije bilo dostupno nakon postavljene dijagnoze. Jedan bolesnik s MGUS-om te devet s MM-om nisu bili kontrolirani, liječeni i praćeni u tri navedene kliničke bolnice.

Unutar skupine od 71 bolesnika s MM-om koji su praćeni, 11/71 bolesnika nisu primili terapiju, a podaci o liječenju bolesnika bili su dostupni za 58/71 bolesnika. 18/58 bolesnika liječeni su inicijalnom konvencionalnom terapijom MP protokolom, 36/58

bolesnika inicijalnom agresivnom kemoterapijom, a 4/58 bolesnika liječeni su Deksametazonom i/ili zračenjem.

Unutar skupine MGUS, 19/20 bolesnika bili su vremenski praćeni. Samo je jedan bolesnik primio terapiju Deksametazonom pri dijagnozi dok ostali bolesnici nisu primili terapiju. Tijekom vremenskog razdoblja od 3,7-29,5 mjeseci (medijan 17,65 mjeseci) četiri bolesnika s MGUS-om razvila su kliničku sliku multiplog mijeloma prema dijagnostičkim kriterijima klasifikacije SZO-e. Dva od četiri bolesnika liječeni su inicijalnom terapijom prema MP protokolu dok preostala dva bolesnika s MM-om nisu primili terapiju već su kontrolirani i praćeni.

3.2 Imunohistokemijsko bojanje na parafinskim rezovima biopsije koštane srži

Pri postavljanju dijagnoze MM-a i MGUS-a serijski rezovi bili su imunohistokemijski bojani protutijelima CD138 (Novocastra; UK, 5F7, monoklonalno, razrijeđenje 1:25) i CD38 (Labvision; 38C03, monoklonalno, razrijeđenje 1:50), koristeći LSAB HRP set za vizualizaciju izražaja navedenih proteina, primarno membranski i citoplazmatski, te pozitivne kontrole prema uputama proizvođača.

Pri imunohistokemijskom bojanju korištena su sljedeća protutijela:

- NOTCH1 (Santa Cruz Biotechnology; sc-6014, poliklonalno, razrijeđenje 1:400) obilježava epitope na C-terminalnom kraju receptora;
- JAGGED1 (Santa Cruz Biotechnology; sc-6011, poliklonalno, razrijeđenje 1:150) obilježava C-terminalni kraj liganda;
- CIKLIN D1 (Lab Vision; SP4, monoklonalno, razrijeđenje 1:100), obilježava C-terminalni kraj CIKLIN D1 proteina;
- CD20 (Dako Cytomation; L26, monoklonalno, razrijeđenje 1:200), obilježava citoplazmatske epitope CD20cy;
- PAX5 (Santa Cruz Biotechnology; sc-1974, poliklonalno, razrijeđenje 1:100), obilježava epitope C-terminalnog kraja PAX5 proteina.

Postupci demaskiranja proteina NOTCH1, JAGGED1, CD20, CIKLIN D1 i PAX5 bili su: lonac pod pritiskom *Pascal (DakoCytomation, Denmark)* +125°C/2 minute, otopina *Borg Decloaker, RTU (Biocare Medical, LLC, US)*.
Vizualizacija izražaja proteina CD20 i CIKLIN D1 provedena je korištenjem streptavidin-biotin seta (LSAB HRP), dok je u vizualizaciji izražaja proteina NOTCH1, JAGGED1 i PAX5 korišten streptavidin- biotin plus set (LSAB HRP+) uz blokirajući protein (DakoCytomation, Denmark).
Izraženost proteina NOTCH1, JAGGEED1 i CD20 primarno je membransko i citoplazmatsko dok je izražaj proteina PAX5 i CIKLIN D1 primarno nuklearno te su uspoređivani s izražajem istih u rezovima tkiva koji su korišteni kao pozitivne kontrole

prema preporuci proizvođača protutijela. Za negativnu kontrolu korišteni su imunohistokemijski bojani rezovi analiziranog proteina bez primarnog protutijela.

Izraženost proteina CIKLIN D1, CD20, PAX5, NOTCH1 i JAGGED1 smatrana je pozitivnim rezultatom ako je utvrđena u više od 30% tumorskih stanica u odnosu na ukupni broj tumorskih stanica. Prag pozitiviteta za CIKLIN D1 (**120-123**) i PAX5 (**85**) bio je viši u odnosu na druga istraživanja navedenih proteina u tumorskim stanicama MM-a kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati te bojanje fenotipski normalnih, poliklonalnih plazma stanica u MGUS-u (**40**).

Prag pozitiviteta izraženosti NOTCH1 i JAGGED1 proteina imunohistokemijskim bojanjem u više od 30% plazma stanica određen je srednjom vrijednosti postotka pozitivnih stanica –2 SD u svih 100 bolesnika (NOTCH1 $\overline{X}$ –2 SD=28%; JAGGED1 $\overline{X}$ –2 SD=25%) kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati te imunohistokemijsko bojanje fenotipski normalnih, poliklonalnih plazma stanica u MGUS-u (**40**).

Simultano dvostruko imunohistokemijsko bojanje (*engl. double labelling*) CD138 i NOTCH1 ili JAGGED1 nije učinjeno, već je učinjena usporedba izraženosti navedenih biljega na serijskim rezovima biopsije koštane srži u tumorskim plazma stanicama. Time je analiza izraženosti NOTCH1 i JAGGED1 proteina bila validna/dostatna što se posebno odnosi na analizu proteina u tumorskim plazma stanicama MGUS-a s obzirom na nizak udio stanica u koštanoj srži (<10%). Morfološke karakteristike plazma stanica u MGUS-u, s obzirom da se radi o stanicama morfološkog stupnja diferenciranosti I, dodatno su olakšale analizu imunohistokemijskog bojanja NOTCH1 i JAGGED1.

Imunohistokemijsko bojanje proteina NOTCH1 i JAGGED1 analizirano je informatičkim programom "AnalySIS" (Olympus, Soft Imaging ystem GmbH, Germany). Pregledano je onoliko reprezentativnih vidnih polja povećanja 40x10, površine 144436,18 μm^2, pri čemu je brojano minimalno 1000 tumorskih stanica. Ukupan broj tumorskih plazma stanica uspoređivan je s brojem CD138 i CD38 imunohistokemijski pozitivnih plazma stanicama te se usporedbom nije našlo razlike u broju tumorskih stanica kako u MM-u tako i u MGUS-u. Pri brojanju stanica koristila se mrežica "AnalySIS" programa koja je površinu cijelog vidnog polja podijelila u deset podpolja, visine i širine od 50 μm. Unutar ukupno izbrojanih tumorskih stanica brojane su pozitivne tumorske stanice uz računanje omjera pozitivno obilježenih stanica u odnosu na ukupan broj tumorskih stanica.

Semikvantitativno određivan je intenzitet izraženosti proteina NOTCH1 i JAGGED1. Rezultati su podijeljeni u tri skupine: 0 = negativno; + = slabi intenzitet; +++ = jaki intenzitet. Slabim intenzitetom se smatrala vizualizacija pozitivno obojenih stanica tek u vidnom polju povećanja 40x10 (**123**).

3.3 Interfazna fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) na parafinskim rezovima i citološkim razmazima koštane srži

3.3.1 Priprema preparata

Analiza t(11;14)(q13;q32); t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23) i translokacije *PAX5*(9p13) FISH metodom provedene su na serijskim rezovima cilindara biopsije koštane srži uklopljenih u parafin, debljine 4 μm te fiksiranim na silaniziranim predmetnim staklima (*DakoCytomation, Denmark*).

Za analizu delecije regije 13q34 FISH metodom korišteni su neobojani citološki razmazi aspirata koštane srži na standardnim ili silaniziranim predmetnim staklima *(DakoCytomation, Denmark)*. Analiza delecije pojedine regije ili cijelog kromosoma provodila se na citološkim razmazima kako bi se izbjeglo preklapanje jezgara i analiza samo dijelova jezgre što se može pojaviti u parafinskim rezovima, a predstavljaju problem u smislu lažno pozitivnih ili negativnih rezultata.

Rezovi su tretirani otopinom *Borg Decloaker, RTU (Biocare Medical, LLC, US)* u loncu pod pritiskom *Pascal (DakoCytomation, Denmark)* na +125 °C, dvije minute, pri čemu se odvija postupak deparafinizacije, rehidracije i kuhanja, nakon čega slijedi tretiranje pepsinom 0,1 g/mL (*Sigma, Germany*) na +37 °C, 20 minuta, kako bi se uklonili proteini, te postupak dehidracije i sušenja na zraku prije stavljanja probe.

Citološke razmaze aspirata koštane srži koji su bili pohranjeni u ledenici na -20 °C bilo je potrebno ostaviti pola sata prije fiksacije na sobnoj temperaturi. Fiksacija preparata provodila se u tri svježe pripremljene otopine octene kiseline i metanola (50 : 50), zatim je slijedilo sušenje i postupak dehidracije.

Direktno obilježene probe pripremljene su prema uputama proizvođača. Pripremljeni rezovi i citološki razmazi s probama stavljeni su u aparat za hibridizaciju, *Hybridizer (DakoCytomation, Denmark)*, pri čemu dolazi do denaturacije pet minuta te hibridizacije preko noći na temperaturama prema protokolu za parafinske rezove i citološke razmaze. Nakon hibridizacije rezovi se ispiru tri puta slijedom pufera: 0,0003% Tween/0,4xSSC;

0,0001% Tween/2xSSC; 2xSCC. Za kontrastiranje DNA upotrijebljeno je 10 µL otopine *Vectashield (Vector Laboratories Inc., USA)* koja sadržava 10^{-5} g/L fluorescentne boje 4′,6-diamidino-2-fenilindol *(DAPI)*.

LSI *IGH/CCND1 dual color, dual fusion translocation probe (Vysis Inc, Abbott Molecular, US*) proba je dizajnirana za detekciju jukstapozicije lokusa teškog lanca imunoglobulina i *CCND1* gena uključenih u t(11;14)(q13;q32). Proba je dizajnirana od dva dijela, LSI *IGH* probe obilježene SpectrumGreen i LSI *CCND1* probe obilježene SpectrumOrange (http://www.abbottmolecular.com/LSIIGHCCND1DualColorDualFusionTranslocationProbe_5455.aspx) (pristupljeno 7. 9. 2010.).

LSI *IGH/FGFR3 dual color, dual fusion translocation probe (Vysis Inc, Abbott Molecular, US*) proba je dizajnirana za detekciju jukstapozicije *IGH* lokusa i sekvence *FGFR3* gena uključenih u t(4;14)(p16;q32). Sadržava dvije probe: LSI *IGH* probu obilježene SpectrumGreen i LSI *FGFR3* probu obilježene SpectrumOrange (http://www.abbottmolecular.com/LSIIGHFGFR3DualColorDualFusionTranslocationProbe_5561.aspx) (pristupljeno 7. 9. 2010.).

LSI *IGH/MAF dual color, dual fusion probe (Vysis Inc, Abbott Molecular, US*) proba je dizajnirana za jukstapoziciju *IGH* lokusa i sekvence *MAF* gena uključene u t(14;16)(q32;q23). Proba je dizajnirana od dva dijela: probe LSI *IGH* i LSI *MAF*. LSI *IGH* proba je obilježena SpecrumGreen. LSI *MAF* proba sadržava dvije probe obilježene SpectrumOrange (http://www.abbottmolecular.com/LSIIGHMAFDualColorDualFusionProbe_5529.aspx) (pristupljeno 7. 9. 2010.).

PAX5 FISH DNA Probe, Split Signal (Code Y541, DakoCytomation, Denmark) proba je dizajnirana za detekciju lomova *PAX5* lokusa u regiji 9p13 povezanih s različitim translokacijama. Proba sadržava 354 kb 3´ PAX5-TR probu od mjesta loma *PAX5* lokusa regije 9p13 obilježene Texas-Red i 621 kb 5´ PAX5-Flu probu od mjesta loma *PAX5* lokusa regije 9p13 obilježene fluoresceinom (http://dist.dako.com/index/prod_search/prod_products.htm?productareaid=42&baseprodidver=A234696005) (pristupljeno 7. 9. 2010.).

LSI *13q34 SpectrumGreenProbe (Vysis Inc, Abbott Molecular, US*) proba omogućuje detekciju gubitka regije 13q14 kromosoma 13 (http://www.abbottmolecular.com/LSI13q34SpectrumGreenProbe_5549.aspx) (pristupljeno 7. 9. 2010.).

3.3.2 Analiza preparata

Pri analizi preparata korišten je fluorescentni mikroskop Olympus BX51. U svakom uzorku analizirano je 200 morfološki očuvanih tumorskih plazma stanica. Pozitivnim rezultatom smatrana je prisutnost karakterističnih promjena signala u više od 10% jezgara tumorskih plazma stanica, što odgovara vrijednosti pozitivnog praga (**65,124**).
Vrijednost pozitivnog praga određena je kao srednja vrijednost +3 SD frekvencije karakterističnih promjena interfaznih FISH signala u 500 stanica koštane srži bolesnika s MM-om i MGUS-om.

3.4 Statistička analiza

Kvalitativni podaci opisani su i analizirani postupcima za analizu tablica kontingencija (χ^2 test i prema potrebi Fisherov egzaktni test).

Kaplan-Meierovom analizom procijenjeno je ukupno preživljenje bolesnika (**125**). Usporedba ukupnog preživljenja između uspoređivanih skupina bolesnika analizirana je Log-rank testom (**126**). Ukupno preživljenje je vremensko razdoblje od datuma postavljanja dijagnoze do dana smrti ili zadnje kontrole bolesnika. Cenzorirano praćeni bolesnici odnose se na bolesnike koji su uključeni u analizu ukupnog preživljenja, a bili su živi u vrijeme zadnje liječničke kontrole.

Za razinu statističke značajnosti odabrana je α=0,05.
Pri statističkoj analizi podataka korišten je informatički program STATISTICA data analysis software system, [version 8.0, www.statsoft.com, StatSoft, Inc. (2008)].

4. REZULTATI

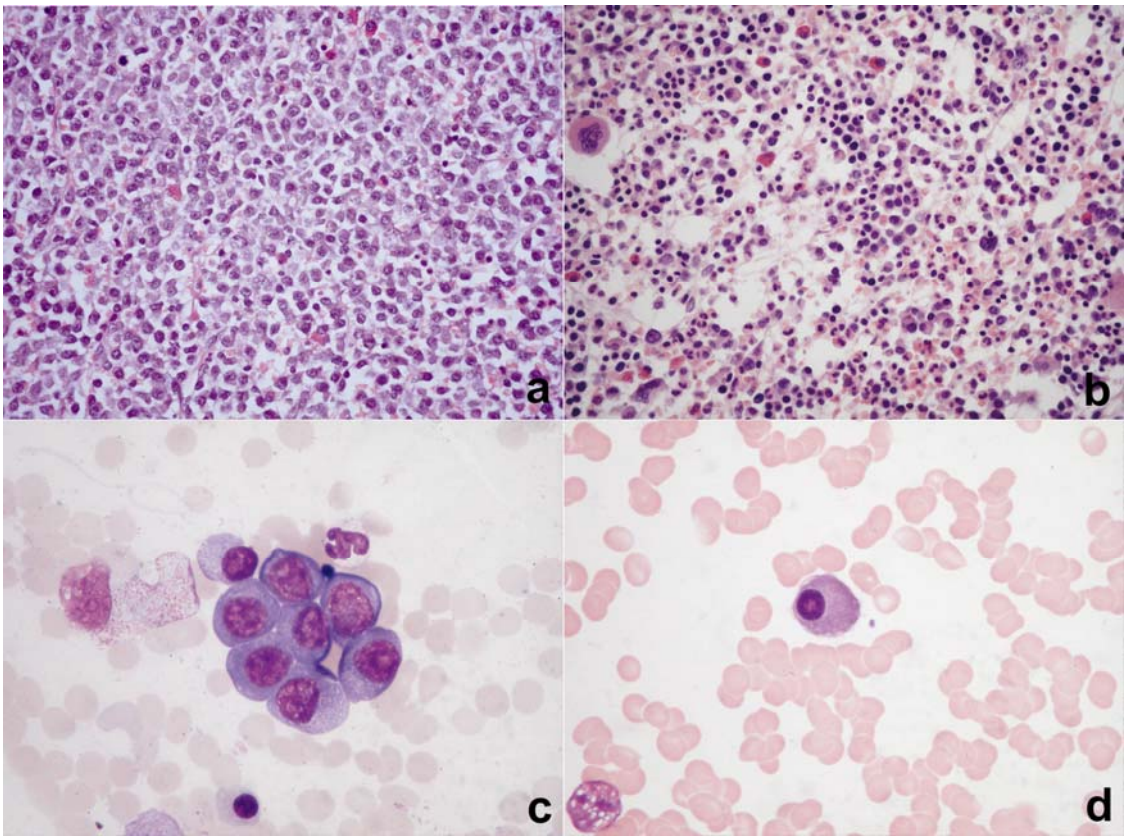
4.1.1 Morfološke karakteristike MGUS-a u koštanoj srži

Morfološka analiza tumorskih plazma stanica učinjena je na uzorcima biopsije i citološkim razmazima aspirata koštane srži u svih 20 bolesnika. U svih bolesnika koštana srž bila je infiltrirana intersticijski pojedinačnim ili u manjim nakupinama morfološki dobro diferenciranim, stupanj diferenciranosti I, plazma stanicama u udjelu do 10% stanica.

U četiri bolesnika koji su nakon klinički postavljene dijagnoze MGUS-a u razdoblju od 3,7 do 29,5 mjeseci (medijan 17,65 mjeseci) razvili kliničku sliku MM-a učinjena je usporedba uzoraka prve (dijagnoza MGUS-a) i druge (dijagnoza MM-a) biopsije i citoloških razmaza aspirata koštane srži. Morfološkom analizom nije bilo razlike u stupnju diferenciranosti tumorskih plazma stanica niti u tipu infiltrata koštane srži. Tumorske stanice bile su morfološki dobro diferencirane, stupanj diferenciranosti I, te su također intersticijski infiltrirale koštanu srž. Udio tumorskih stanica se razlikovao. U prvoj biopsiji udio tumorskih stanica bio je manji od 10%, dok je u drugoj biopsiji udio bio viši, od 25 do 30%.

4.1.2 Morfološke skupine u MM-a u koštanoj srži

Morfološka analiza učinjena je u svih 80 uzoraka biopsije i u citološkim razmazima aspirata koštane srži u bolesnika s MM-om. U 14/80 (17,5%) slučajeva MM-a tumorske plazma stanice bile su slabo diferencirane, odnosno bila je riječ o stupnju diferenciranosti III plazma stanica, dok su u 66/80 (82,5%) slučajeva tumorske stanice bile dobro i srednje diferencirane (stupanj diferenciranosti I i II). U 31/80 (38,7%) slučajeva tumorske stanice difuzno su infiltrirale koštanu srž, a nedifuzni tip infiltrata nađen je u 49/80 (61,3%) slučajeva. Morfološka obilježja tumorskih plazma stanica MM-a u koštanoj srži prikazana su na **slici 6**.



Slika 6. Morfološka obilježja tumorskih plazma stanica MM-a u koštanoj srži.

a, PHD#2633/08 difuzni tip infiltrata u koštanoj srži; b, PHD#2227/08 nedifuzni tip infiltrata u koštanoj srži; c, PHD#2633/08 morfološki stupanj diferenciranosti III tumorskih plazma stanica; d, PHD#2227/08 morfološki stupanj diferenciranosti I tumorskih plazma stanica

Usporedbom rezultata morfološke analize uzoraka MGUS-a i MM-a nađena je statistički značajno veća učestalost difuznog tipa infiltrata u MM-u nego u MGUS-u (χ^2= 11,232; s.s.=1; **P<0,001**) (**tablica 4**) dok se nije našla razlika prema stupnju diferenciranosti tumorskih plazma stanica.

Tablica 4. Tip infiltracije koštane srži u MGUS-u i MM-u tumorskim plazma stanicama.

χ^2= 11,232; s.s.=1; P<0,001		**MGUS**	**MM**	**Σ**
Tip infiltracije KS*	Difuzni	0	31	31
	Nedifuzni	20	49	69
	Σ	20	80	100

*KS – koštana srž

4.2.1 Izraženost proteina NOTCH1, JAGGED1, CIKLIN D1, CD20 i PAX5 u MGUS-u

Imunohistokemijska analiza izraženosti proteinskih biljega učinjena je na uzorcima svih 20 bolesnika s MGUS-om.

Svi uzorci bili su NOTCH1 i JAGGED1 negativni. Rijetke plazma stanice bile su NOTCH1 i JAGGED1 pozitivne, no ispod praga pozitivnosti od 30% (NOTCH1 medijan 3,2%; JAGGED1 medijan 2,3%) te slabog intenziteta bojanja. Svi uzroci bili su PAX5 negativni. U 7/20 uzoraka plazma stanice bile su CD20 pozitivne te su u 6/20 uzoraka bile CIKLIN D1 pozitivne.

U četiri bolesnika oboljelih od MM-a nakon prethodno postavljene dijagnoze MGUS-a učinjena je usporedba imunohistokemijske analize proteinske izraženosti u uzorcima prve (dijagnoza MGUS-a) i druge (dijagnoza MM-a) biopsije koštane srži. Sva četiri uzorka prve biopsije koštane srži bila su NOTCH1 i JAGGED1 negativna. Rijetke plazma stanice bile su NOTCH1 i JAGGED1 pozitivne, slabog intenziteta bojanja (NOTCH1 medijan 4,7%; JAGGED1 medijan 4,1%). Medijan pozitivnosti bio je nešto veći od ukupnog medijana pozitivnosti proteinskih biljega skupine bolesnika s MGUS-om (NOTCH1 medijan 3,2%; JAGGED1 medijan 2,3%), no još ispod praga pozitivnosti od 30%. Suprotno tome, u drugoj biopsiji sva četiri uzorka bila su NOTCH1 i JAGGED1 pozitivna (NOTCH1 medijan 76%; JAGGED1 medijan 78%), slabog intenziteta bojanja. Usporedbom izraženosti preostalih proteina u uzorcima prve i druge biopsije koštane srži proteini PAX5 i CIKLIN D1 bili su pozitivni u po jednom uzorku MM-a. CD20 bio je pozitivan u 1/4 uzorka prve biopsije, dok su tumorske stanice u drugoj biopsiji bile CD20 negativne.

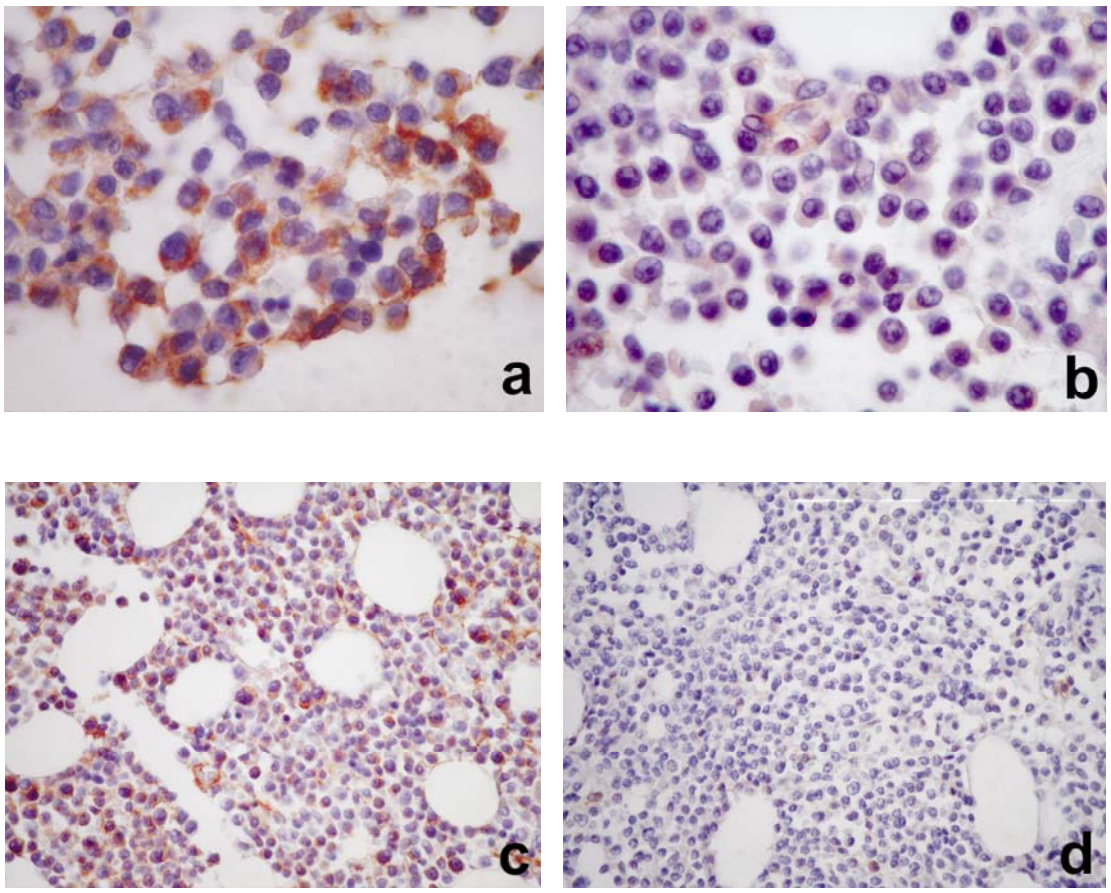
4.2.2 Izraženost NOTCH1, JAGGED1, CIKLIN D1, CD20 i PAX5 proteina u MM-u

U dva slučaja MM-a nije bila moguća adekvatna analiza izraženosti NOTCH1 proteina, a u tri slučaja MM-a analiza proteina JAGGED1 zbog loše kvalitete preparata.
Analizom imunohistokemijskog bojanja pozitivan rezultat izraženosti proteina NOTCH1 utvrđen je u 73/78 (93,6%) slučajeva, a proteina JAGGED1 u 71/77 (92,1%) slučajeva.
Semikvantitativnom analizom intenziteta imunohistokemijskog bojanja proteina NOTCH1 i JAGGED1 u tumorskim plazma stanicama MM-a 45/78 (57,7%) slučajeva izražavali su jaki intenzitet NOTCH1 te 22/77 (28,6%) JAGGED1 imunohistokemijskog bojanja (**tablica 5**).

Tablica 5. Intenzitet izraženosti NOTCH1 i JAGGED1 proteina u MM-u.

	NOTCH1		**JAGGED1**	
	INTENZITET		INTENZITET	
	JAKI	SLABI	JAKI	SLABI
n/∑ (%)	45 / 78 (57,7)	33 / 78 (42,3)	22 / 77 (28,6)	55 / 77 (71,4)

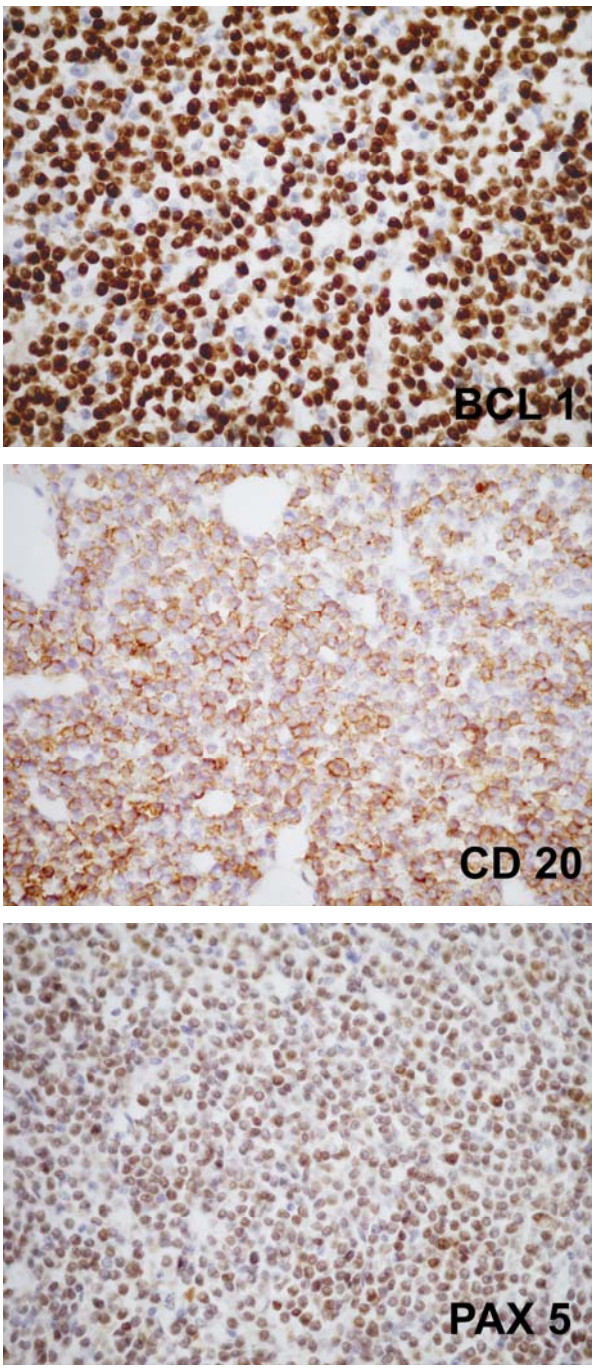
Semikvanitativni intenzitet izraženosti NOTCH1 i JAGGEED1 proteina imunohistokemijskim bojanjem prikazan je na **slici 7**.



Slika 7. Intenzitet imunohistokemijskog bojanja NOTCH1 i JAGGED1 proteina u tumorskim plazma stanicama.

a, PHD#1414/07- NOTCH1 jaki intenzitet bojanja; b, PHD#2399/08- NOTCH1 slabi intenzitet bojanja; c, PHD#1414/07- JAGGGED1 jaki intenzitet bojanja; d, PHD# 5540/07- JAGGED1 slabi intenzitet bojanja

Izraženost CIKLIN D1, CD20 i PAX5 proteina imunohistokemijskim bojanjem prikazani su na **slici 8**.



Slika 8. Imunohistokemijsko bojanje CD20, BCL1, PAX5 proteina u tumorskim plazma stanicama. PHD#104/07

U svih 80 slučajeva MM-a učinjena je analiza imunohistokemijskog bojanja proteina CIKLIN D1, CD20 i PAX5 te je utvrđena pozitivna izraženost proteina CIKLIN D1 u 32/80 (40%) slučajeva, proteina CD20 u 14/80 (17,5%) slučajeva te proteina PAX5 u 5/80 (6,3%) slučajeva.

Usporedbom rezultata imunohistokemijskog bojanja NOTCH1 i JAGGED1 proteina u uzorcima MGUS-a i MM-a nađena je statistički značajna razlika (**P<0,001**) (**tablica 6**).

Nije nađena statistički značajna razlika usporedbom rezultata imunohistokemijskog bojanja CIKLIN D1 (χ^2= 0,679; s.s.=1; P=0,410), CD20 (χ^2= 2,953; s.s.=1; P=0,122) i PAX5 proteina (χ^2= 1,315; s.s.=1; P=0,580) u uzorcima MGUS-a i MM-a.

Tablica 6. Imunohistokemijsko bojanje NOTCH1 i JAGGED1 proteina u MGUS-u i MM-u.

Fisherov egzaktni test P<0,001	NOTCH1		Σ	JAGGED1		Σ
	+	-		+	-	
MGUS	0	20	20	0	20	20
MM	73	5	78	71	6	77

+ pozitivna izraženost

- negativna izraženost

4.3.1 Prisutnost t(11;14)(q13;q32); t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23); delecije 13(13q34); translokacije *PAX5*(9p13) u MGUS-u

Analiza FISH signala *IGH* traslokacija i translokacije *PAX5(9p13)* učinjenih u svih 20 bolesnika s MGUS-om pokazala je navedenu prisutnost citogenetičkih promjena (**tablica 7**).

Tablica 7. Prisutnost citogenetičkih promjena u MGUS-u.

	Interfazni FISH signali				
	t(11;14)(q13;q3)	t(4;14)(p16;q32)	t(14;16)(q32;q23)	del 13(13q34)	*PAX5* (9p13)
n/∑	3 /20	4 /20	1 / 20	0 / 10*	2 / 20

* Analiza nije bila moguća u 10/20 (50%) slučajeva zbog neadekvatne pohrane citoloških stakala, većim dijelom nesilaniziranih, posebice u razdoblju 2004. – 2006.

U četiri bolesnika usporedbom uzoraka prve biopsije s dijagnozom MGUS-a i druge biopsije MM-a nema razlike u prisutnosti analiziranih citogenetičkih promjena u tumorskim plazma stanicama (**tablica 8**).

Tablica 8. Prisutnost citogenetičkih promjena u MM-u s prethodnom dijagnozom MGUS-a.

Interfazni FISH signali	1. biopsija koštane srži (MGUS) n/Σ	2. biopsija koštane srži (MM) n/Σ
t(11;14)(q13;q32)	1 / 4	1 / 4
t(4;14)(p16;q32)	1 / 4	1 / 4
t(14;16)(q32;q23)	0 / 0	0 / 0
del 13(13q34)	0 / 2*	0 / 2**
PAX5 (9p13)	1 / 4	1 / 4

* Analiza nije bila moguća u dva slučaja zbog neadekvatne pohrane citoloških stakala, većim dijelom nesilaniziranih, posebice u razdoblju 2004. - 2006.

** Analiza nije učinjena zbog nedostupnosti citoloških razmaza.

4.3.2 Prisutnost t(11;14)(q13;q32); t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23); delecije 13(13q34); translokacije *PAX5*(9p13) u MM-u

U analiziranim slučajevima MM-a utvrdila se prisutnost citogenetičkih promjena u tumorskim stanicama MM-a (**tablica 9**).

Tablica 9. Prisutnost citogenetičkih promjena u MM-u.

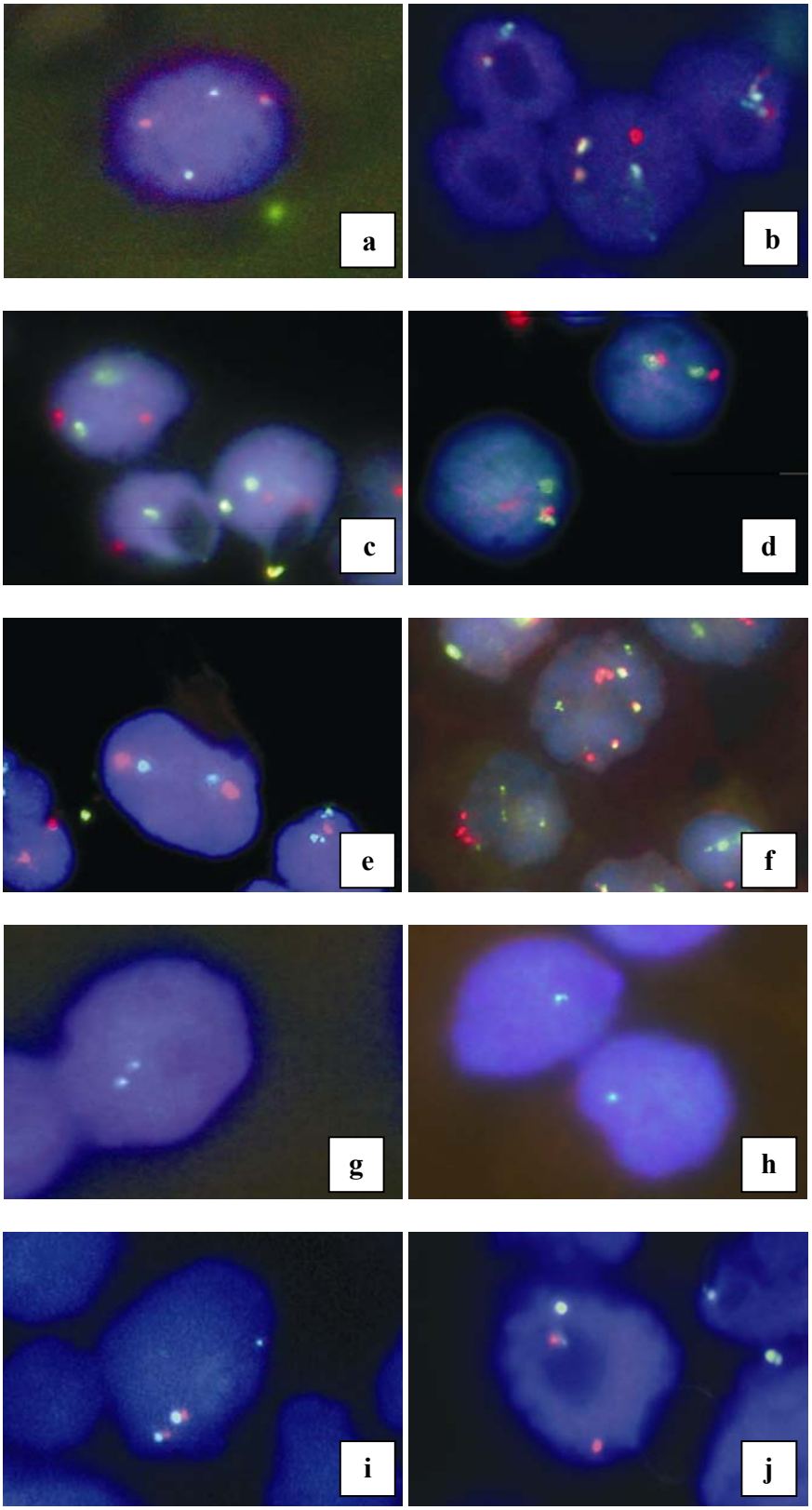
	Interfazni FISH signali				
	t(11;14)(q13;q32)	t(4;14)(p16;q32)	t(14;16)(q32;q23)	del 13(13q34)	*PAX5* (9p13)
n/∑ (%)	11/ 80 (14)	20 / 79(25)*	5 / 79 (6)*	7 / 42 (17)**	14 / 77 (18)

* Analiza nije bila moguća u dva slučaja zbog loše kvalitete preparata.

** Analiza nije bila moguća u 38/80 (48%) slučajeva zbog neadekvatne pohrane citoloških stakala, većim dijelom nesilaniziranih, posebice u razdoblju 2004. - 2006.

Nije nađena statistički značajna razlika usporedbom rezultata citogenetičkih promjena t(11;14)(q13;q32) (χ^2= 0,020; s.s.=1; P=0,999), t(4;14)(p16;q32) (χ^2= 0,242; s.s.=1; P=0,774), t(14;16)(q32;q23) (χ^2= 0,824; s.s.=1; P=0,923), delecije 13(13q34) (χ^2= 1,923; s.s.=1; P=0,322) i translokacije *PAX5*(9p13) (χ^2= 0,734; s.s.=1; P=0,513) u plazma stanicama uzoraka MGUS-a i MM-a.

Citogenetičke promjene analizirane FISH metodom u tumorskim plazma stanicama MM-a prikazane su na **slici 9**.



Slika 9. Interfazna fluorescentna *in situ* hibridizacija plazma stanica u koštanoj srži

Slika 9. Legenda:

a, LSI *IGH/CCND1*®	stanica bez translokacije (2O2G) (PHD#8116/05)
b, LSI *IGH/CCND1*®	translokacija (1O1G2F) (PHD#2399/05)
c, LSI *IGH/FGFR3*®	stanica bez translokacije (2O2G) (PHD#8116/05)
d, LSI *IGH/FGFR3*®	translokacija (1O1G2F) (104/07)
e, LSI *IGH/MAF*®	stanica bez translokacije (2O2G) (PHD#8116/05)
f, LSI *IGH/MAF*®	translokacija (1O1G2F) (PHD#4518/04)
g, LSI *13q34SpectrumGreenProbe*®	stanica bez delecije (2G) (PHD#8116/05)
h, LSI *13q34SpectrumGreenProbe*®	delecija (1G) (PHD#2399/08)
i, *PAX5 FISH DNA Probe, Split Signal*®	stanica bez translokacije (2F) (PHD#8116/05)
j, *PAX5 FISH DNA Probe, Split Signal*®	translokacija (1R1G1F) (PHD#2633/08)

4.4.1 Usporedba morfoloških obilježja tumorskih plazma stanica u koštanoj srži u podskupinama MM-a s citogenetičkim promjenama i bez citogenetičkih promjena

U **tablici 10** prikazano je 41/80 (51,3%) bolesnika koji pripadaju podskupini MM-a s barem jednom analiziranom citogenetičkom promjenom te 39/80 (48,7%) bolesnika koji pripadaju podskupini MM-a bez citogenetičkih promjena utvrđenih analizom FISH signala. Bolesnici su prikazani prema tipu infiltrata i morfološkom stupnju diferenciranosti tumorskih plazma stanica u koštanoj srži.

Tablica 10. Morfološke karakteristike tumorskih plazma stanica u podskupinama MM-a s obzirom na citogenetičke promjene.

	MM s citogenetičkim promjenama		**MM bez citogenetičkih promjena**				
	Distribucija	n/∑	Distribucija	n/∑	χ^2	s.s.	P
Tip infitracije KS*							
	Difuzni	19 / 41	Difuzni	12 / 39	2,042	1	0,115
	Nedifuzni	22 / 41	Nedifuzni	27 / 39			
Stupanj diferenciranosti PS*							
	III	11 / 41	III	3 / 39	5,070	1	**0,024**
	I, II	30 / 41	I, II	36 / 39			

*KS - koštana srž; PS - plazma stanica

Analizirani slučajevi podskupine MM-a s citogenetičkim promjenama i bez citogenetičkih promjena imaju statistički značajne razlike u morfološkom stupnju diferenciranosti tumorskih plazma stanica.

Analizom cilindra koštane srži u bolesnika podskupine MM-a s citogenetičkim promjenama tumorske plazma stanice češće su morfološki slabo diferencirane (stupanj diferenciranosti III) (χ^2= 5,070; s.s.=1; **P= 0,024**).

4.4.2 Usporedba izraženosti proteina NOTCH1, JAGGED1, CIKLIN D1, CD20 i PAX5 u podskupinama MM-a s citogenetičkim promjenama i bez citogenetičkih promjena

Nije utvrđena značajna razlika u izraženost proteina NOTCH1, JAGGED1, CIKLIN D1, CD20 i PAX5 u dvjema podskupinama MM-a s obzirom na prisutnost/odsutnost citogenetičkih promjena (**tablica 11**). Izraženost navedenih proteina nije povezana s citogenetičkim promjenama u tumorskim plazma stanicama MM-a.

Tablica 11. Izraženost proteina NOTCH1, JAGGED1, CIKLIN D1, CD20 i PAX5 u podskupinama MM-a s obzirom na citogenetičke promjene.

	MM s citogenetičkim promjenama		**MM bez citogenetičkih promjena**				
	n=41		n=39				
	+	-	+	-	χ^2	s.s.	P
NOTCH1 n=78	37	3	36	2	0,163	1	0,525
JAGGED1 n=77	36	5	35	1	2,366	1	0,133
CIKLIN D1 n=80	16	25	16	23	0,033	1	0,518
CD20 n=80	8	33	6	33	0,236	1	0,425
PAX5 n=80	2	39	3	36	0,270	1	0,476

+ pozitivna izraženost

- negativna izraženost

U **tablici 12** prikazana je učestalost intenziteta proteinske izraženosti NOTCH1 u dvjema podskupinama MM-a s obzirom na prisutnost/odsutnost citogenetičkih promjena. Značajno veća učestalost jakog intenziteta proteinske izraženosti NOTCH1 nađena je u podskupini MM-a s citogenetičkim promjenama, dok je slab intenzitet izraženosti proteina NOTCH1 nađen u podskupini MM-a bez citogenetičkih promjena (χ^2= 5,096; s.s.=1; **P= 0,021**) (**tablica 12**).

Tablica 12. Intenzitet izraženosti NOTCH1 proteina u podskupinama MM-a s obzirom na citogenetičke promjene.

χ^2= 5,096; s.s.= 1; P= **0,021**	**NOTCH1 INTENZITET**		
	JAKI	SLABI	∑
MM s citogenetičkim promjenama	28	12	40
MM bez citogenetičkih promjena	17	21	38
∑	45	33	78

4.4.3 Usporedba kliničkih, radioloških i laboratorijskih pokazatelja u podskupinama MM-a s citogenetičkim promjenama i bez citogenetičkih promjena

U **tablicama 13 i 14** prikazane su podskupine MM-a s citogenetičkim promjenama i bez citogenetičkih promjena u tumorskim stanicama MM-a prema kliničkim, radiološkim i laboratorijskim parametrima.

Tablica 13. Laboratorijski pokazatelji u podskupinama MM-a s obzirom na citogenetičke promjene.

		MM s citogenetičkim promjenama		MM bez citogenetičkih promjena				
			n/∑		n/∑	χ^2	s.s.	P
Dob	(godine)	≥65	27 / 41	≥65	18 / 39	3,152	1	0,060
		<65	14 / 41	<65	21 / 39			
Spol	m/ž	20/21		18/21		0,055	1	0,496
$s\beta_2m$*	(mg/L)	≥3,5	20 / 28	≥3,5	11 / 26	4,676	1	**0,029**
		<3,5	8 / 28	<3,5	15 / 26			
Albumin	(g/L)	≤35	6 / 41	≤35	13 / 39	3,859	1	**0,044**
		>35	35 / 41	>35	26 / 39			
Kalcij	(mmol/L)	≥2,49	11 / 41	≥2,49	4 / 39	3,604	1	0,052
		<2,49	30 / 41	<2,49	35 / 39			
Hemoglobin	(g/L)	≤100	19 / 41	≤100	15 / 39	0,508	1	0,314
		>100	22 / 41	>100	24 / 39			
Kreatinin	(μmol/L)	≥176,8	7 / 40	≥176,8	4 / 39	0,864	1	0,274
		<176,8	33 / 40	<176,8	35 / 39			
CRP*	(mg/L)	≥8	9 / 41	≥8	10 / 39	0,154	1	0,449
		<8	31 / 41	<8	32 / 39			
LDH*	(U/L)	≥461	6 / 40	≥461	2 / 39	2,114	1	0,140
		<461	34 / 40	<461	37 / 39			
IgG izotip			16 / 37		15 / 35		3	0,756
IgA izotip			8 / 37		8 / 35			
IgL izotip			12 / 37		10 / 35			
Nesekretorni			1 / 37		3 / 35			
Kappa			27 / 37		18 / 35		2	0,099
Lambda			9 / 37		16 / 35			

* $s\beta_2m$ - serumski β_2 mikroglobulin; CRP - C-reaktivni protein; LDH - laktat dehidrogenaza

Tablica 14. Radiološki i klinički pokazatelji u podskupinama MM-a s obzirom na citogenetičke promjene.

	MM s citogenetičkim promjenama		**MM bez citogenetičkih promjena**				
	Distribucija	n/∑	Distribucija	n/∑	χ^2	s.s.	P
Osteolitičke lezije					1,409	1	0,169
	≥3	19 / 41	≥3	13 / 39			
	<3/osteopenija	22 / 41	<3	26 / 39			
DS stadij*					3,948	1	**0,039**
	III A ili B	25 / 41	III A ili B	13 / 39			
	I, II A ili B	16 / 41	I, II A ili B	26 / 39			

*DS - Durie Salmon

Bolesnici su prikazani prema dobi, spolu, laboratorijskim vrijednostima: serumskog $ß_2$-mikroglobulina, serumskog albumina, ukupnog kalcija, hemoglobina, kreatinina, C-reaktivnog proteina (CRP), laktat dehidrogenaze (LDH); izotipu i subtipu imunoglobulina na osnovi elektroforeze proteina, imunoelektroforeze proteina s/u i radioimunodifuzije imunoglobulina (**tablica 13**), osteolitičkim lezijama i kliničkom Durie Salmon stadiju bolesti (**tablica 14**).

Značajno veća učestalost vrijednosti serumskog albumina manje od 35 g/L nađena je u podskupini MM-a bez citogenetičkih promjena, dok je vrijednost serumskog albumina jednaka ili viša od 35 g/L nađena u podskupini MM-a s citogenetičkim promjenama (χ^2= 3,859; s.s.=1; **P= 0,044**).

U analiziranim slučajevima podskupina MM-a s citogenetičkim promjenama i bez citogenetičkih promjena nađena je značajna razlika u vrijednosti serumskog β_2 mikroglobulina. Podskupina MM-a s citogenetičkim promjenama imala je značajno veću učestalost vrijednosti serumskog β_2 mikroglobulina ≥3,5 mg/L, dok su bolesnici u podskupini bez citogenetičkih promjena imali veću učestalost vrijednosti serumskog β_2 mikroglobulina <3,5 mg/L (χ^2= 4,676; s.s.=1; **P= 0,029**).

Analizirani slučajevi podskupine MM-a s citogenetičkim promjenama i bez citogenetičkih promjena imaju statistički značajne razlike u kliničkom Durie Salmon stadiju bolesti.

Bolesnici u podskupini MM-a s citogenetičkim promjenama češće su bili u kliničkom stadiju bolesti III A ili B (χ^2= 3,948; s.s.=1; **P= 0,039**). Bolesnici u podskupini MM-a bez citogenetičkih promjena češće su bili u kliničkom stadiju I, II A ili B, a koštana srž bila im je češće infiltrirana morfološki dobro diferenciranim tumorskim plazma stanicama (**tablica 10**).

4.5.1 Usporedba morfoloških, imunohistokemijskih i FISH rezultata s kliničkim i laboratorijskim pokazateljima u MGUS-u i MM-u

U **tablici 15** prikazane su klinička i laboratorijska obilježja ispitanih bolesnika, 80 MM-a i 20 MGUS-a.

Tablica 15. Klinička i laboratorijska obilježja bolesnika oboljelih od MM-a i MGUS-a.

		MM	**MGUS**
		n/∑ (%)	n/∑ (%)
Dob	(≥65 godine)	45 / 80 (56)	12 / 20 (60)
Spol	m/ž	42 / 38	11 / 9
$s\beta_2m$*	(≥3,5 mg/L)	31 / 54 (57)	0 / 10 (0)
Albumin	(≤35 g/L)	19 / 80 (24)	3 / 20 (15)
Kalcij	(≥2,49 mmol/L)	15 / 80 (19)	5 / 20 (25)
Hemoglobin	(≤100 g/L)	34 / 80 (43)	2 / 19 (11)
Kreatinin	(≥176,8 μmol/L)	11 / 79 (14)	1 / 20 (5)
CRP*	(≥8 mg/L)	19 / 78 (24)	4 / 20 (20)
LDH*	(≥461 U/L)	8 / 79 (10)	0 / 19 (0)
IgG izotip		31 / 72 (43)	12 / 15 (80)
IgA izotip		16 / 72 (22)	2 / 15(13)
IgL izotip		21 / 72 (29)	1 / 15 (7)
Nesekretorni		4 / 72 (6)	0 / 15 (0)
Kappa		45 / 73 (62)	9 / 16 (56)
Lambda		25 / 73 (38)	7 / 16 (44)

* $s\beta_2m$ - serumski β_2 mikroglobulin; CRP- C-reaktivni protein; LDH- laktat dehidrogenaza

U **tablici 16** prikazano je 80 bolesnika s MM-om prema opsežnosti osteolitičkih lezija, Durie Salmon kliničkom stadiju bolesti, tipu infiltrata i morfološkom stupnju diferenciranosti tumorskih plazma stanica u koštanoj srži.

Tablica 16. Radiološka, klinička i morfološka obilježja bolesnika oboljelih od MM-a.

	Multipli mijelom	
	Distribucija	n/∑ (%)
Osteolitičke lezije		
	≥3	32 / 80 (40)
	<3/osteopenija	48 / 80 (60)
Tip infitracije KS*		
	Difuzni	31 / 80 (39)
	Nedifuzni	49 / 80 (61)
Stupanj diferenciranosti PS*		
	III	14 / 80 (18)
	I, II	66 / 80 (82)
DS stadij*		
	III A or B	38 / 80 (48)
	I, II A or B	42 / 80 (52)

* KS - koštana srž; PS - plazma stanica; DS - Durie Salmon

U analiziranim slučajevima MGUS-a nisu nađene statistički značajne razlike usporedbom morfoloških, imunohistokemijskih i FISH rezultata s kliničkim i laboratorijskim pokazateljima.

U analiziranim slučajevima MM-a s jakim intenzitetom bojanja NOTCH1 proteina nađena je statistički značajna razlika usporedbom morfoloških karakteristika tumorskih plazma stanica. Veća učestalost jakog intenziteta bojanja NOTCH1 bila je u morfološki slabo diferenciranim plazma stanicama MM-a (χ^2= 4,087; s.s.=1; **P= 0,043**) i difuznim tipom infiltrata u biopsiji koštane srži (χ^2= 9,408; s.s.=1; **P= 0,002**) (**tablica 17**).

Tablica 17. Intenzitet imunohistokemijskog bojanja NOTCH1 i morfoloških karakteristika MM-a.

	NOTCH1				
	Intenzitet bojanja				
	Jaki	Slabi	χ^2	s.s.	P
Tip infiltrata KS*					
Difuzni	22	7	9,408	1	**0,002**
Nedifuzni	21	27			
Stupanj diferenciranosti PS*					
Stupanj diferenciranosti III	11	2	4,087	1	**0,043**
Stupanj diferenciranosti I/II	32	27			

* KS – koštana srž; PS - plazma stanica

U analiziranim slučajevima MM-a s t(11;14)(q13;q32) i t(14;16)(q32;q23) te izraženošću PAX5 proteina nađena je značajna razlika u odnosu na spol.

Značajna je učestalost t(11;14)(q13;q32) u žena oboljelih od MM-a (χ^2= 9,637; s.s.=1; **P= 0,002**) (**tablica 18**). Suprotno, značajna je učestalost t(14;16)(q32;q23) (χ^2= 4,947; s.s.=1; **P= 0,033**) i izraženosti PAX5 proteina (χ^2= 4,825; s.s.=1; **P= 0,035**) u muškaraca oboljelih od MM-a (**tablica 18**).

Tablica 18. Učestalost t(11;14)(q13;q32), t(14;16)(q32;q23) i PAX5 proteina u odnosu na spol u bolesnika s MM-om.

	Spol				
	Ž*	M*	χ^2	s.s.	P
t(11;14)(q13;q32)	10	1	9,637	1	**0,002**
t(14;16)(q32;q23)	0	5	4,947	1	**0,033**
PAX5*	0	5	4,825	1	**0,035**

*Ž - ženski spol; M - muški spol; PAX5 - izraženost PAX5 proteina imunohistokemijskim bojanjem

U analiziranim slučajevima bolesnika oboljelih od MM-a u različitim kliničkim Durie Salmon stadijima nađena je statistički značajna razlika u morfološkom stupnju diferenciranosti tumorskih plazma stanica, prisutnosti t(4;14)(p16;q32), *PAX5*(9p13) translokacije, te vrijednostima serumskog β_2 mikroglobulina.

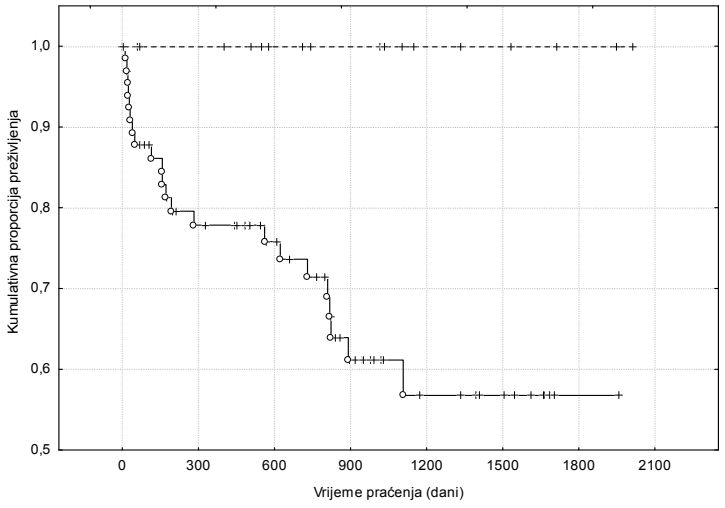
U bolesnika s kliničkim stadijem III (A ili B) nađena je značajna učestalost stupnja diferenciranosti III tumorskih plazma stanica (χ^2= 3,896; s.s.=1; **P= 0,046**); prisutnost t(4;14)(p16;q32) (χ^2= 5,144; s.s.=1; **P= 0,022**), *PAX5*(9p13) translokacije (χ^2= 10,027; s.s.=1; **P= 0,002**), te vrijednosti serumskog β_2 mikroglobulina ≥ 3,5 mg/L (χ^2= 5,687; s.s.=1; **P= 0,017**) (**tablica 19**).

Tablica 19. Stupanj diferenciranosti III tumorskih plazma stanica, t(4;14)(p16;q32) i *PAX5*(9p13) translokacija, serumski β_2 mikroglobulin ≥ 3,5 mg/L u bolesnika s MM-om u kliničkom stadiju III(A/B) i I/II(A/B) prema Durie Salmonu.

	Durie Salmon klinički stadij				
	III (A ili B)	I, II (A ili B)	χ^2	s.s.	P
Stupanj diferenciranosti III plazma stanica	10	4	3,896	1	**0,046**
t(4;14)(p16;q32)	14	6	5,144	1	**0,022**
translokacija *PAX5*(9p13)	12	2	10,027	1	**0,002**
serumski β_2 mikroglobulin ≥ 3,5 mg/L	13	10	5,687	1	**0,017**

4.5.2 Usporedba utjecaja morfoloških i fenotipskih obilježja te citogenetičkih abnormalnosti na preživljenje bolesnika s MGUS-om i MM-om

Analizom preživljenja skupine bolesnika s MGUS-om i MM-om nađena je statistički značajna razlika (Log-Rank test= 2,824; **P=0,005**) (**slika 10**).



Log-Rank Test = 2,824; **P = 0,005**

○ kompletno praćenje; + cenzorirano praćenje

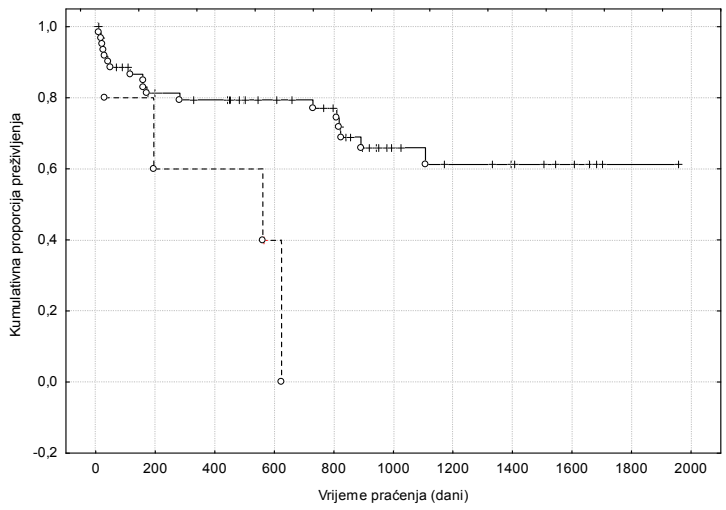
Slika 10. Kumulativna proporcija preživljenja (Kaplan-Meier) za bolesnike s MGUS-om i MM-om.

Analizom preživljenja podskupine bolesnika oboljelih od MM-a s prisutnom barem jednom citogenetičkom promjenom i podskupine bez citogenetičkih promjena nije nađena razlika (Log-Rank Test= 4,149; P = 0,073).

Analizom preživljenja skupina s i bez t(11;14)(q13;q32) dobivenih FISH analizom bolesnika oboljelih od MM-a nije nađena razlika (Log-Rank test= 1,142; P=0,253).

Analizom preživljenja skupina bolesnika s i bez t(4;14)(p16;q32) dobivenih FISH analizom oboljelih od MM-a nije nađena razlika (Log-Rank test= 1,196; P=0,231).

Međutim, u skupinama bolesnika oboljelih od MM-a s i bez t(14;16)(q32;q23) dobivenih FISH analizom nađena je statistički značajna razlika u preživljenju (Log-Rank test= 2,340; **P=0,019**) (**slika 11**).



—— bez t(14;16)(q32;q23)

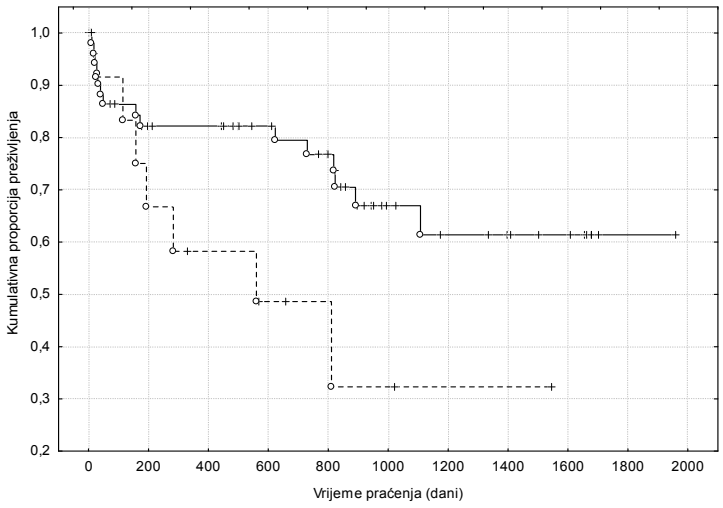
------- t(14;16)(q32;q23)

Log-Rank test= 2,340; **P=0,019**

○ kompletno praćenje; + cenzorirano praćenje

Slika 11. Kumulativna proporcija preživljenja (Kaplan-Meier) za skupine s i bez t(14;16)(q32;q23) dobivenih FISH analizom u bolesnika oboljelih od MM-a.

Također, za skupine bolesnika oboljelih od MM-a s i bez *PAX5*(9p13) translokacije dobivenih FISH analizom nađena je statistički značajna razlika u preživljenju (Log-Rank test= 1,982; **P=0,048**) (**slika 12**).



—— bez translokacije *PAX*(9p13)

------- translokacija *PAX*(9p13)

Log-Rank test= 1,982; **P=0,048**

○ kompletno praćenje; + cenzorirano praćenje

Slika 12. Kumulativna proporcija preživljenja (Kaplan-Meier) za skupine s i bez translokacije *PAX*(9p13) dobivenih FISH analizom u bolesnika oboljelih od MM-a.

Analizom preživljenja skupina bolesnika s i bez delecije 13(13q34) dobivenih FISH analizom oboljelih od MM-a nije nađena razlika (Log-Rank test= 0,547; P=0,584).
Analizom preživljenja skupina bolesnika s pozitivnom i negativnom izraženošću proteina NOTCH1 dobivenih imunohistokemijskim bojanjem u bolesnika s MM-om nije nađena razlika (Log-Rank test= 0,751; P=0,453), kao niti za skupine jakog i slabog intenziteta izraženosti NOTCH1 proteina (Log-Rank test=0,026; P=0,979).
Analizom preživljenja skupina bolesnika s pozitivnom i negativnom izraženošću proteina JAGGED1 dobivenih imunohistokemijskim bojanjem u bolesnika s MM-om nije nađena razlika (Log-Rank test= 0,359; P=0,720), kao niti za skupine jakog i slabog intenziteta izraženosti JAGGED1 proteina (Log-Rank test=0,006; P=0,999).

Analizom preživljenja skupina bolesnika oboljelih od MM-a s pozitivnom ili negativnom izraženošću CIKLIN D1 proteina u tumorskim plazma stanicama dobivenih imunohistokemijskim bojanjem nije nađena razlika (Log-Rank test=0,962; P=0,336).

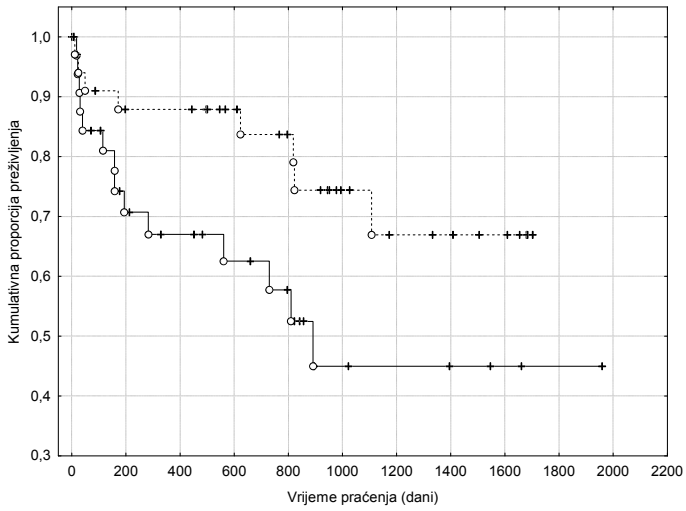
Analizom preživljenja skupina bolesnika oboljelih od MM-a s pozitivnom ili negativnom izraženošću CD20 proteina u tumorskim plazma stanicama dobivenih imunohistokemijskim bojanjem nije nađena razlika (Log-Rank test=1,757; P=0,079).

Analizom preživljenja skupina bolesnika oboljelih od MM-a s pozitivnom ili negativnom izraženošću PAX5 proteina u tumorskim plazma stanicama dobivenih imunohistokemijskim bojanjem nije nađena razlika (Log-Rank test=0,125; P=0,900).

Analizom preživljenja skupina bolesnika oboljelih od MM-a s difuznim i nedifuznim tipom infiltrata koštane srži nije nađena razlika (Log-Rank test=0,078; P=0,938).

Analizom preživljenja skupina bolesnika oboljelih od MM-a s morfološkim stupnjem diferenciranosti plazma stanica I/II nasuprot stupnju diferenciranosti III nije nađena razlika (Log-Rank test=0,098; P=0,329).

Analizom preživljenja bolesnika oboljelih od MM-a nađena je statistički značajna razlika u skupinama bolesnika u kliničkom Durie Salmon stadiju III(A/B) i I/II(A/B) (Long-Rank test=1,989; **P=0,046**) (**slika 13**).



—— MM Durie Salmon stadij III(A/B)

------- MM Durie Salmon stadij I/II(A/B)

Long-Rank test=1,989; **P=0,046**

○ kompletno praćenje; + cenzorirano praćenje

Slika 13. Kumulativna proporcija preživljenja (Kaplan-Meier) za skupine bolesnika oboljelih od MM-a u kliničkom Durie Salmon stadiju III(A/B) i I/II(A/B).

5. RASPRAVA

Zajedničko osnovno obilježje svih plazmastaničnih novotvorina je klonalna proliferacija plazma stanica s prekomjernim stvaranjem monoklonalnih imunoglobulina, paraproteina ili M-proteina (monoklonalna gamapatija) (**1**).

MGUS i MM u skupini plazmastaničnih novotvorina s obzirom na biološko ponašanje dvije su različite bolesti. No, dobna pojavnost tumora, spolna zastupljenost, visina proliferativnog indeksa, apoptoze, izraženost staničnih biljega i citogenetičke promjene u tumorskim plazma stanicama dodatna su zajednička obilježja MGUS-a i MM-a (**1**).

Dvadeset bolesnika s MGUS-om i osamdeset bolesnika s MM-om nije se razlikovalo prema dobnoj pojavnosti tumora te spolnoj zastupljenosti što je sukladno podacima iz literature (**1**).

Udio tumorskih plazma stanica jedan je od dijagnostičkih kriterija za razlikovanje i u razlikovanju MGUS-a od MM-a (**5**). U ovoj studiji morfološka diferenciranost plazma stanica nije se pokazala značajnim parametrom. Tip infiltracije koštanom srži tumorskim plazma stanicama, međutim, značajno je različit. Difuzni tip infiltracije tipičan je za MM. Suprotno našim rezultatima, morfološke promjene i diferenciranost tumorskih plazma stanica u MM-u značajno su povezani s višim kliničkim stadijem bolesnika, hipodiploidnim statusom tumorskih plazma stanica i lošijom prognozom (**127**). U MGUS-u morfološke promjene tumorskih plazma stanica nisu toliko učestale. Udio takvih stanica u ukupnoj tumorskoj masi je nizak (<5%) (**127,128**).

Složene numeričke i strukturne citogenetičke promjene pojavljuju se sa sličnom učestalošću u MGUS-u i MM-u (**49,55**).

Određene numeričke i strukturne citogenetičke promjene u MM-u i MGUS-u utječu na klinički tijek i prognozu bolesnika obiju skupina te liječenje bolesnika oboljelih od MM-a. Uvođenjem „mSMART“ dijagnostičkog i terapijskog algoritma kod bolesnika s MM-om citogenetičke promjene u tumorskim plazma stanicama predstavljaju dijagnostička i prognostička obilježja u MM-u (**48**).

„Hiperdiploidna skupina" MM-a te ekspresija *CCND1* u tumorskim plazma stanicama povezani su s boljom prognozom bolesti. Također, t(11;14)(q13;q32) pozitivni je prognostički čimbenik u bolesnika s MM-om liječenih agresivnim oblikom kemoterapije i autolognom transplantacijom perifernih matičnih stanica (**123,1429**). Suprotno, aktivacija *MAF, MAFB, FGFR3/MMSET* te delecija kromsoma 13 i 17 povezani su s lošom prognozom bolesti (**17,20,22,51,52,56-62**). Tek nedavno t(4;14)(p16;q32) postaje neovisan prognostički čimbenik te je vjerojatno najvažniji citogenetički prognostički čimbenik u bolesnika s MGUS-om i MM-om (**63**). Opisane aberacije kromosoma koreliraju s razvojem bolesti, imunološkim i kliničkim statusom te prognozom (**49,63-66**).

Skupine MGUS i MM nisu se statistički značajno razlikovale u učestalosti t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32), t(14;16)(q32;q23), deleciji 13(13q34) i translokaciji *PAX5*(9p13) u tumorskim plazma stanicama, iako je učestalost svih navedenih promjena bila veća u skupini MM-a, što je nađeno i u drugim studijama (**49,55**).

U skupini bolesnika s MM-om nađeno je 41/80 (51%) bolesnika s barem jednom citogenetičkom promjenom. Rezultati su sukladni pojavnosti citogenetičkih promjena u populaciji bolesnika s MGUS-om i MM-om (**49,50-54**).

U bolesnika s MGUS-om koji su razvili kliničku sliku MM-a učestalost citogenetičkih promjena nije se razlikovala u tumorskim plazma stanicama prve i druge biopsije što potvrđuje podjednaku pojavnost citogenetičkih promjena u tumorskim stanicama MGUS-a i MM-a te pokazuje da one nisu pokazatelj razvoja, progresije bolesti, već vjerojatno jednog od inicijalnih događaja u patogenezi bolesti (**49,50-54**).

U analiziranih bolesnika podskupine MM-a s citogenetičkim promjenama i bez citogenetičkih promjena statistički se ne razlikuju s obzirom na preživljenje, što je u suprotnosti s rezultatima drugih studija u kojima bolesnici oboljeli od MM-a unutar „nehiperdiploidne" skupine imaju kraće preživljenje u odnosu na bolesnike „hiperploidne" skupine MM-a (**49,59,65**). Razlog tome je najvjerojatnije u malom broju bolesnika u pojedinoj podskupini MM-a te u kraćem vremenskom praćenju bolesnika u ovoj studiji.

Izdvojivši svaku citogenetičku promjenu i usporedivši ih, slučajevi MM-a s t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32) i delecijom 13(13q34) nisu imali značajnu razliku u

preživljenju u odnosu na bolesnike bez navedenih citogenetičkih promjena. Podaci iz literature upućuju na razlike u prosječnom preživljenju MM-a s navedenim citogenetičkim promjenama i bez njih (**17,20,22,51,52,56-62**). Razlog što u našim rezultatima nije bilo statistički značajne razlike u preživljenju MM-a s i bez t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32) i delecije 13(13q34) može biti u malom broju bolesnika te njihovu kraćem praćenju.

Suprotno tome, bolesnici oboljeli od MM-a s t(14;16)(q32;q23) i *PAX5*(9p13) translokacijom u tumorskim plazma stanicama MM-a statistički se značajno razlikuju u odnosu na preživljenje bolesnika bez navedenih translokacija. Bolesnici s MM-om u kliničkom stadiju III (A/B) imali su statistički značajniju učestalost t(14;16)(q32;q23) i translokaciju *PAX5*(9p13) u tumorskim plazma stanicama. Prosječno preživljenje MM-a s t(14;16)(q32;q23) i *PAX5*(9p13) translokacijom značajno je kraće u odnosu na MM bez navedenih translokacija. Preživljenje bolesnika oboljelih od MM-a s t(14;16)(q32;q23) sukladno je s drugim studijama (**49,59,65**). Kraće preživljenje bolesnika oboljelih od MM-a s *PAX5*(9p13) translokacijom ne može se povezati s izraženošću drugih biljega, posebice s CD20 (**28,79,84,85**). U MM-u s CD20 pozitivnim tumorskim plazma stanicama veća je učestalost morfološki dobro diferenciranih tumorskih plazma stanica, t(11;14)(q13;q32) u tumorskim plazma stanicama te imaju bolju prognozu (**79**). Suprotno tome, CD20 povezan je s kraćim preživljenjem u bolesnika s plazmastaničnom leukemijom čije tumorske stanice izražavaju „nezreliji“ fenotip te prijevremenu i nepotpuniju diferencijaciju stanica (**80,81**). U ovoj studiji promjene *PAX5*(9p13) gena nisu povezane s izraženošću analiziranih proteina i prisutnošću ostalih citogenetičkih promjena u tumorskim plazma stanicama. Rezultati bi mogli upućivati na ulogu *PAX5*(9p13) gena u patogenezi MM-a, pri čemu je izraženost PAX5 proteina samo ostatni produkt ranije ekspresije *PAX5*(9p13) gena, što ne inhibira razvoj plazma stanica.

U ovom radu potvrđena je značajna povezanost stupnja morfološke diferenciranosti plazma stanica i citogenetičkih promjena u tumorskim plazma stanicama MM-a. Veća učestalost morfološki slabo diferenciranih plazma stanica, stupanj diferenciranosti III, nađena je u podskupini MM-a s citogenetičkim promjenama bez obzira na tip infiltrata tumorskim stanicama u koštanoj srži. Iako je u skupini MM-a morfološki stupanj diferenciranosti značajno povezan s citogenetičkim promjenama u tumorskim plazma

stanicama, nismo potvrdili razliku u preživljenju grupa MM-a morfološki različitog stupnja diferenciranosti tumorskih stanica kako je opisano u literaturi (**127**). U podskupini MM-a s citogenetičkim promjenama značajno je veća učestalost bolesnika u kliničkom DS stadiju III koji imaju statistički značajno kraće preživljenje u odnosu na bolesnike u kliničkom DS stadiju I i II. Time bi morfološki stupanj diferenciranosti tumorskih plazma stanica mogao biti jedan od pokazatelja koji upućuju na promjene u biologiji tumorskih plazma stanica, kao i na prognozu bolesti (**127,128**).

Analizirajući klinička i laboratorijska obilježja u podskupinama MM-a s citogenetičkim promjenama i bez citogenetičkih promjena nađena je statistički značajna razlika u vrijednostima serumskog β_2 mikroglobulina i albumina te kliničkom stadiju prema Durie Salmonu. U podskupini MM-a s citogenetičkim promjenama bila je statistički značajno veća učestalost vrijednosti serumskog β_2 mikroglobulina $\geq$3,5 mg/L i albumina $\leq$35 g/L te su bolesnici bili češće u kliničkom stadiju III (A/B) prema Durie Salmonu.

U svih bolesnika s MM-om koji su bili u kliničkom stadiju III (A/B) prema Durie Salmonu također je statistički značajno bila veća učestalost vrijednosti serumskog β_2 mikroglobulina $\geq$3,5 mg/L. Nije se našla statistički značajno veća učestalost vrijednosti serumskog albumina $\leq$35 g/L.

Serumski β_2 mikroglobulin je nezavisan prognostički pokazatelj preživljenja bolesnika s MM-om (**50,51,129**).

Serumski β_2 mikroglobulin nije odraz samo tumorske mase MM-a i bubrežne funkcije bolesnika, već najvjerojatnije i parametara koji utječu na imunološki sustav bolesnika (**52-54**). Niske vrijednosti serumskog albumina u bolesnika s MM-om mogu biti rezultat djelovanja interleukina-6, produkta tumorskih plazma stanica, stromalnih stanica koštane srži i osteoblasta, na sintezu albumina u jetri (**53,54**). Odnos vrijednosti serumskog β_2 mikroglobulina, serumskog albumina i preživljenja bolesnika s MM-a upućuje na moguću povezanost mehanizama u patogenezi multiplog mijeloma. Bolesnici oboljeli od MM-a s povećanom vrijednosti serumskog β_2 mikroglobulina i sniženom vrijednosti serumskog albumina imaju kraće preživljenje (**130-135**).

Bolesnici oboljeli od MM-a u kliničkom Durie Salmon stadiju III(A/B) imaju statistički značajno kraće preživljenje u odnosu na bolesnike u kliničkom stadiju I/II(A/B), sukladno podacima iz literature (**10,12,136**). U bolesnika oboljelih od MM-a u kliničkom

stadiju III(A/B) nađena je statistički značajna učestalost morfološki slabo diferenciranih tumorskih stanica, stupanj diferenciranosti III, citogenetičkih promjena t(4;14)(p16;q32) i *PAX5*(9p13) translokacije u tumorskim stanicama te serumskog β_2 mikroglobulina $\geq$3,5 mg/L, za razliku od bolesnika u kliničkom stadiju I/II(A/B).

U studiji P. Greippa i suradnika učestalost t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32) i delecije 13(13q34) u tumorskim plazma stanicama ne razlikuje se značajno u odnosu na vrijednosti serumskog β_2 mikroglobulina i albumina u bolesnika s MM-om prema ISS sistemu kliničkog stadija bolesti (**10**). U ovom radu također nismo našli razliku u pojavnosti gore navedenih citogenetičkih promjena u tumorskim plazma stanicama skupina MGUS-a i MM-a u odnosu na klinički stadij bolesti te vrijednosti laboratorijskih parametara.

Iako se skupine MGUS-a i MM-a statistički značajno razlikuju s obzirom na preživljenje, uspoređujući CIKLIN D1, CD20 i PAX5, NOTCH1 i JAGGED1 pozitivne i negativne slučajeve između skupina MGUS-a i MM-a statistički se nije našla razlika u preživljenju bolesnika.

Imunohistokemijskim bojanjem izraženost CIKLIN D1, CD20 i PAX5 proteina nije se statistički značajno razlikovala u u skupinama MGUS-a i MM-a.

U jednog bolesnika s dijagnozom MGUS-a koji je razvio kliničku sliku MM-a analizom druge biopsije koštane srži nađena je izraženost CIKLIN D1 u tumorskim plazma stanicama, u drugog bolesnika izraženost PAX5 proteina, a u trećeg bolesnika došlo je do gubitka CD20 u tumorskim plazma stanicama. Pojavnost CIKLIN D1 i PAX5 proteina u tumorskim plazma stanicama nije bila povezana s citogenetičkim promjenama t(11;14)(q13;q32) i *PAX5*(9p13) translokacijom u tumorskim stanicama.

Analizirajući izraženost CIKLIN D1, PAX5 i CD20 nije se našla značajna razlika u podskupinama MM-a s citogenetičkim promjenama i bez citogenetičkih promjena.

Rezultati učestalosti CIKLIN D1 proteinske izraženosti u tumorskim plazma stanicama MGUS-a i MM-a djelomično su u sukladnosti s rezultatima drugih studija (**60,76,78***)*. Imunohistokemijskim bojanjem izraženost CIKLIN D1 nije se statistički značajno razlikovala u skupinama MGUS-a i MM-a, iako je učestalost CIKLIN D1 bila veća u slučajevima MM-a nego MGUS-a. Također, izraženost CIKLIN D1 proteina nije

statistički značajno korelirala s t(11;14)(q13;q32) u tumorskim plazma stanicama MGUS-a i MM-a.

Pojačana izraženost CIKLIN D1 proteina u tumorskim plazma stanicama u 30% slučajeva MGUS-a i MM-a nije povezana s citogenetičkim promjenama kromosoma 11q13, što vjerojatno govori o drugim mehanizmima koji uzrokuju pojačanu izraženost proteina te se još istražuju (**60,76,78**).

No, suprotno tome, u studiji J. R. Cooka i suradnika analizom imunohistokemijskog bojanja CIKLIN D1 proteina u jezgrama tumorskih plazma stanica pri dijagnozi MM-a uočeni su različiti intenziteti proteinske izraženosti, pri čemu je jaki intenzitet bojanja CIKLIN D1 proteina bio značajno povezan s t(11;14)(q13;q32), povećanim postotkom tumorskih plazma stanica u koštanoj srži (median 72,9% plazma stanica u koštanoj srži), limfoplazmocitoidnom diferencijacijom i izraženosti CD20 u tumorskim stanicama (**123**). Slab intenzitet bojanja bio je značajno povezan s umnoženim kopijama i amplifikacijom *CCND1* gena te nalazom hiperdiploidije u tumorskim plazma stanicama MM-a dobivenih FISH i konvencionalnom citogenetičkom analizom. U ovom radu analizom imunohistokemijskog bojanja CIKLIN D1 proteina u tumorskim plazma stanicama MM-a, kao i MGUS-a, nismo našli razliku u intenzitetu proteinske izraženosti.

Izraženost CIKLIN D1 proteina u tumorskim plazma stanicama MM-a upućuje na promjene u biologiji tumorskih plazma stanica (**49,123**). Proteinska izraženost CIKLIN D1 u tumorskim plazma stanicama različito utječe na klinički tijek i liječenje MM-a, što nismo uspjeli potvrditi u bolesnika oboljelih od MM-a (**59,60**).

Imunohistokemijskim bojanjem izraženost CD20 i PAX5 nije se statistički značajno razlikovala u skupinama MGUS-a i MM-a, iako je učestalost CD20 bila manja, a PAX5 proteina bila veća u slučajevima MM-a.

U tumorskim plazma stanicama MM-a učestalost proteinske izraženosti CD20 (17,5%) bila je veća u odnosu na studije E. Torlakovic i suradnika (**83**), te P. Lin i suradnika (**85**), dok je učestalost izraženosti PAX5 bila relativno manja (6,3%). Nije se našla značajna međusobna povezanost u izraženosti navedenih proteina u tumorskim stanicama. Suprotno tome, učestalost CD20 bila je veća, a PAX5 proteina manja u tumorskim plazma stanicama MGUS-a (CD20 35%, PAX5 0%). Isto tako, izraženost PAX5 proteina

nije statistički značajno bila povezana s *PAX5*(9p13) translokacijom u tumorskim plazma stanicama MGUS-a i MM-a.

U studiji E. Torlakovic i suradnika te P. Lin i suradnika 8-9% MM-a izražavalo je slab intenzitet bojanja CD20 u manjem postotku tumorskih plazma stanica i korelaciju s izraženošću PAX5 proteina također u manjem postotku stanica (**83,85**). U istoj studiji E. Torlakovic i suradnika CD20 i PAX5 pozitivni MM klinički su se prezentirali kao homogena skupina niskog kliničkog stadija (klinički stadij I) te se pretpostavlja da predstavljaju slučajeve proliferacije B limfocita s preranom diferencijacijom u tumorske plazma stanice (**83**). Suprotno tome, u skupini MM-a, P. Lin i suradnici nalaze raspon morfološke atipije stanica, složene kromosomalne abnormalnosti te su bolesnici u različitim kliničkim stadijima bolesti (**85**). U našoj studiji nismo uspjeli utvrditi povezanost izraženosti CD20 i PAX5 proteina, no razlika u izraženosti proteina između skupine MGUS-a i MM-a mogla bi upućivati na pogreške u diferencijaciji i proliferaciji B limfocita u tumorske plazma stanice i progresiju bolesti (**40**).

Poremećena transkripcija *PAX5* gena kao posljedica t(9;14)(p13;q32) dio je patogeneze B-neHodgkinova limfoma s plazmastaničnom diferencijacijom (**137**). P. Lin i suradnici pokazali su da je niska ekspresija *PAX5* mRNA u suprotnosti s pozitivnom izraženošću PAX5 proteina u tumorskim plazma stanicama (**85**). Inverzna korelacija između *PAX5* i *PRDM1* mRNA u tumorskim i normalnim plazma stanicama uz aberantnu izraženost PAX5 i CD20 proteina u tumorskim plazma stanicama upućuje na poremećaj diferencijacije B limfocita, pri čemu je PAX5 protein samo ostatni produkt ranije ekspresije *PAX5* gena te ne inhibira razvoj plazma stanica. Uspoređujući biopsije u MM-u s prethodnom dijagnozom MGUS-a, gubitak CD20 i pojavnost PAX5 proteina bez korelacije s *PAX5*(9p13) translokacijom u tumorskim plazma stanicama mogli bi biti pokazatelji patogeneze MM-a.

Analizirajući izraženost NOTCH1 i JAGGED1 nađena je statistički značajno veća učestalost izraženosti obaju proteina u slučajevima MM-a od slučajeva MGUS-a te značajno veća učestalost jakog intenziteta imunohistokemijskog bojanja u tumorskim plazma stanicama MM-a. U slučajevima MGUS-a rijetke tumorske plazma stanice bile su NOTCH1 i JAGGED1 pozitivne, slabog intenziteta bojanja, s medijanom manjim od 4%, što se smatralo negativnim rezultatom s obzirom na prag pozitivnosti od 30%. U skupini

MGUS-a i u najvećem broju MM-a tumorske plazma stanice nisu pokazivale morfološku različitost. U nekoliko MM-a manji udio tumorskih stanica bio je nižeg ili višeg morfološkog stupnja diferenciranosti u odnosu na morfološki stupanj diferenciranosti glavnog udjela tumorskih stanica. U studiji H. Olteanua i suradnika MGUS i MM sadržavaju dvije populacije plazma stanica, poliklonalnu s normalnim fenotipom i monoklonalnu s aberantnim fenotipom. Udio poliklonalne populacije u MGUS-u je prosječno 27%, a u MM-u 4% (**39,40**). U našoj studiji nismo određivali udio poliklonalne i klonalne populacije stanica u MGUS-u i MM-u, a morfološki se te dvije populacije stanica ne mogu razlikovati.

Tumorske plazma stanice u skupini MM-a bile su NOTCH1 (93,6%) i JAGGED1 (92,1%) pozitivne u vrlo visokom postotku slučajeva. U vrlo malom broju slučajeva MM tumorske stanice bile su negativne, NOTCH1 (6%) i JAGGED1 (8%), u odnosu na prag pozitivnosti. Analizirajući intenzitet bojanja NOTCH1 i JAGGED1 nađena je statistički značajna razlika u morfološkom stupnju diferenciranosti tumorskih plazma stanica i tipu infiltrata u koštanoj srži. Znatno veća učestalost jakog intenziteta bojanja NOTCH1 i JAGGED1 proteina nađena je u morfološki slabo diferenciranim plazma stanicama gradus III i difuznom tipu infiltrata u slučajevima MM-a.

Rezultati su djelomično u suprotnosti s rezultatima studije F. Jundt i suradnika (**110**).

Do sada, samo u studiji F. Jundt i suradnika imunohistokemijskim bojanjem biopsija koštane srži nađena je jaka izraženost NOTCH1 i JAGGED1 proteina u CD138 pozitivnim tumorskim plazma stanicama u svih 16 bolesnika oboljelih od MM-a. Nije učinjena morfološka analiza bioptičkih uzoraka koštane srži MM-a. U analizi nije određen prag pozitivnosti te nije učinjena semikvantitativna analiza imunohistokemijskog bojanja u slučajevima MM-a. Suprotno, u izoliranim plazma stanicama CD38+++/CD19++ iz koštane srži zdravih davatelja nije se našla izraženost NOTCH1 i JAGGED1 proteina ili je ona bila vrlo niska (**110,115**). F. Jundt i suradnici nisu analizirali izraženost navedenih proteina u tumorskim plazma stanicama MGUS-a. Slično navedenoj studiji, u našem radu MM su u visokom postotku bili NOTCH1 i JAGGED1 pozitivni, no u nekoliko MM-a tumorske stanice bile su NOTCH1 i/ili JAGGED1 negativne. Unutar skupine MM-a pokazali smo različit intenzitet bojanja navedenih proteina u odnosu na prisutnost citogenetičkih promjena u tumorskim plazma stanicama,

što također nije učinjeno u studiji F. Jundt i suradnika, a moglo bi upućivati na biologiju tumorskih stanica u MM-u (**110**).

Analizirajući izraženost NOTCH1 i JAGGED1 u bolesnika oboljelih od MM-a nakon prethodne dijagnoze MGUS-a nađena je statistički značajno veća učestalost izraženosti obaju proteina u uzorcima druge biopsije s dijagnozom MM-a, ali ne i u intenzitetu bojanja.

U podskupinama MM-a s citogenetičkim promjenama i bez citogenetičkih promjena nije se našla značajna razlika u izraženosti NOTCH1 i JAGGED1. Suprotno tome, nađena je statistički značajna razlika u intenzitetu bojanja NOTCH1, veća učestalost jakog intenziteta bojanja proteina u tumorskim plazma stanicama podskupine MM-a s citogenetičkim promjenama, dok se u intenzitetu bojanja JAGGED1 nije našla razlika, što u dostupnoj literaturi do sada nije obrađeno.

Rezultati semikvantitativne analize imunohistokemijskog bojanja NOTCH1 i JAGGED1 proteina u tumorskim plazma stanicama MGUS-a, MM-a proizišlog iz MGUS-a i MM-a upućuju na ulogu navedenih proteina u patogenezi multiplog mijeloma. Ostaje otvoreno pitanje uloge prisutnog Notch signalnog puta u primarnom, *de novo* MM bez prethodne dijagnoze MGUS-a i sekundarnom MM-u proizišlom iz MGUS-a; sudjeluje li taj put u proliferaciji/inhibiciji i/ili apoptozi tumorskih stanica, ili u složenoj signalnoj mreži mikrookoliša koštane srži?

Notch signalni put i aberantna izraženost NOTCH1 i JAGGED1 proteina u tumorskim plazma stanicama MM-a nije u potpunosti razjašnjena (**107,109-114**). Većina studija analizirala je izraženost NOTCH proteina i JAGGED liganda u tumorskim plazma stanicama humanih staničnih kultura, upućujući na različitu učestalost izraženosti proteina, a rezultati studija koji ističu njihov utjecaj na proliferaciju i apoptozu tumorskih plazma stanica te na njihovu rezistenciju na kemoterapiju u suprotnosti su (**107,109-114**).

S obzirom da tumorske plazma stanice multiplog mijeloma mogu izražavati više od jednog NOTCH receptora i/ili liganda, priroda Notch signalnog puta ovisi o: ukupnom profilu svih Notch receptora/liganda; tipu stanice; specifičnim citokinima/čimbenicima rasta u mikrookolišu i količini Notch signala (**118**).

Nije se uspjela utvrditi povezanost izraženosti NOTCH1 i JAGGED1 proteina u tumorskim plazma stanicama s izraženošću CIKLIN D1, CD20 i PAX5 proteina ni u

MGUS-u ni u MM-u. Kako je poznato, izraženost CIKLIN D1 djelomično je rezultat citogenetičke promjene t(11;14)(q13;q32), a djelomično rezultat drugih mehanizama koji nisu u potpunosti razjašnjeni (**105**). Izraženost CD20 i PAX5 proteina u tumorskim plazma stanicama upućuje na pogreške u proliferaciji i diferencijaciji B limfocita u plazma stanice. Sve opisane promjene događaju se u germinativnom centru. Pojavnost promjena u izraženosti NOTCH1 i JAGGED1 proteina u tumorskim plazma stanicama MM-a mogla bi se dogoditi u samoj koštanoj srži nakon proliferacije i diferencijacije u germinativnom centru, ovisno o morfološkoj diferenciranosti tumorskih plazma stanica, njihovoj biologiji te njihovu složenom odnosu s mikrookolišem koštane srži (**138**).

.

6. ZAKLJUČCI

1. **a.** MGUS i MM klinički su definirana dva različita entiteta vrlo sličnih citogenetičkih karakteristika. Razlikuju se prema tipu infiltrata tumorskog tkiva u koštanoj srži, ali ne i prema morfološkom stupnju diferenciranosti tumorskih plazma stanica.

b. MGUS i MM dva su različita entiteta definirana prema izraženosti NOTCH1 i JAGGED1 proteina u tumorskim plazma stanicama.

c. *PAX5*(9p13) translokacija u MGUS-u i MM-u najvjerojatnije je rani događaj u patogenezi plazmastaničnih novotvorina.

d. U MGUS-u i MM-u imunofenotipske i citogenetičke karakteristike tumorskih plazma stanica nisu međusobno povezane.

2. **a.** t(14;16)(q32;q23) i *PAX5*(9p13) translokacija u MM-u prognostički su pokazatelji bolesti.

b. U MM-u kliničkog stadija bolesti III prema Durie Salmonu češća je pojavnost t(14;16)(q32;q23) i *PAX5*(9p13) translokacija.

3. **M**M s citogenetičkim promjenama morfološki je i klinički definiran entitet u odnosu na MM bez citogenetičkih promjena.

4. **a.** Češća pojavnost povišene vrijednosti serumskog β_2 mikroglobulina i sniženog serumskog albumina u bolesnika oboljelih od MM-a u kliničkom stadiju III prema Durie Salmonu upućuje na povezanost mehanizama koji sudjeluju u patogenezi i progresiji MM-a.

b. Klinički stadij bolesti prema Durie Salmonu u MM-u prognostički je pokazatelj bolesti.

5. **a.** Intenzitet izraženosti NOTCH1 definira dva entiteta u MM-u s obzirom na citogenetičke promjene u tumorskim plazma stanicama.

b. Tip infiltrata i morfološki stupanj diferenciranosti povezan je s intenzitetom izraženosti NOTCH1 proteina u tumorskim plazma stanicama u MM-u.

7. SAŽETAK

Multipli mijelom (MM) i monoklonalna gamapatija neodređenog značenja (MGUS) imaju zajedničke fenotipske i citogenetičke karakteristike u tumorskim plazma stanicama, no bolesnici s MGUS-om rijetko razviju kliničku sliku MM-a. Izraženost aktivnih Notch proteina NOTCH1 i JAGGED1 u tumorskim plazma stanicama multiplog mijeloma upućuje na Notch signalni put kao jedan od mogućih čimbenika u patogenezi bolesti.
Imunohistokemijski smo analizirali izraženost NOTCH1, JAGGED1, CIKLIN D1, CD20 i PAX5 proteina u tumorskim plazma stanicama u koštanoj srži 80 bolesnika s klinički potvrđenom dijagnozom MM-a i 20 bolesnika s klinički potvrđenom dijagnozom MGUS-a. Broj NOTCH1 i JAGGED1 imunohistokemijski pozitivno obilježenih tumorskih stanica određivan je na ukupnom broju od minimalno 1000 tumorskih plazma stanica te je semikvantitativno određivan intenzitet bojanja. Usporedili smo rezultate imunohistokemijskog bojanja s morfološkim stupnjem diferenciranosti i tipom infiltrata tumorskih plazma stanica u koštanoj srži, prisutnošću t(11;14)(q13,q32), t(14;16)(q32;q23), t(4;14)(p16;q23), del(13q34) i *PAX5*(9p13) translokacije, kliničkim i laboratorijskim parametrima te s ukupnim preživljenjem bolesnika s MGUS-om i oboljelih od MM-a. MGUS i MM nisu se razlikovali prema morfološkom stupnju diferenciranosti, imunohistokemijskom bojanju CIKLIN D1, CD20, PAX5 proteina, kao ni prema učestalosti citogenetičkih promjena u tumorskim plazma stanicama. Suprotno tome, MGUS i MM razlikovali su se prema tipu infiltrata tumorskog tkiva u koštanoj srži sa statistički značajnom pojavnošću difuznog tipa infiltrata u MM-u (P<0,001). Slična učestalost *PAX5*(9p13) translokacije u MGUS i MM plazma stanicama najvjerojatnije je rani događaj u patogenezi plazmastaničnih novotvorina. U MM-u NOTCH1 protein bio je pozitivan u 92,31%, a JAGGED1 u 92,21% slučajeva. Jaki intenzitet bojanja NOTCH1 proteina u tumorskim plazma stanicama nađen je u većini slučajeva (59,7%), dok je intenzitet bojanja JAGGED1 proteina bio slab (67,6%). U svih bolesnika s MGUS-om oba proteina bila su negativna u tumorskim plazma stanicama (P<0,001). Međutim, četiri bolesnika s MGUS-om razvila su kliničku sliku MM-a u razdoblju od 3,7 do 29,5 mjeseci (medijan 17,65 mjeseci). Analiza i usporedba prve i druge biopsije koštane srži pokazala

je razliku u izraženosti obaju proteina u tumorskim plazma stanicama. U drugoj biopsiji koštane srži tumorske plazma stanice bile su NOTCH1 i JAGGED1 pozitivne, slabog intenziteta bojanja. Značajna učestalost jakog intenziteta bojanja NOTCH1 proteina nađena je u MM-u s difuznim tipom infiltrata koštane srži (P=0,020), morfološkim stupnjem III diferenciranosti plazma stanica (P=0,043) te u podskupini MM-a s citogenetičkim promjenama u tumorskim plazma stanicama (P=0,021). U podskupini MM-a s citogenetičkim promjenama u tumorskim plazma stanicama nađena je značajna pojavnost morfološkog stupnja III diferenciranosti plazma stanica (P=0,024), serumskog β_2 mikroglobulin ($s\beta_2m$) >3,5 mg/L (P=0,029) i serumskog albumina ≤35 g/L (P=0,044). U ovoj podskupini MM-a bolesnici su bili značajno češće u kliničkom stadiju III (A/B) prema Durie Salmonu (DS) (P=0,012).

Bolesnici oboljeli od multiplog mijeloma u DS kliničkom stadiju III (A/B) imali su značajno kraće preživljenje (P=0,046). Rezultati potvrđuju vrijednost DS sustava kao standarda u prognostičkoj podjeli kliničkih stadija u bolesnika oboljelih od MM-a. U bolesnika oboljelih od MM-a u DS kliničkom stadiju III (A/B) nađena je značajna pojavnost $s\beta_2m$ >3,5 mg/L i serumskog albumina ≤35 g/L, što upućuje na povezanost mehanizama koji sudjeluju u patogenezi i progresiji MM-a. t(14;16)(q32;q23) (P=0,019) i *PAX5*(9p13) translokacija (P=0,048) prognostički su pokazatelji bolesti sa statistički značajnim kraćim srednjim vremenom preživljenja u bolesnika oboljelih od MM-a. U bolesnika oboljelih od MM-a nije se našla statistički značajna razlika u preživljenju između NOTCH1 i JAGGED1 pozitivnih i negativnih rezultata bojanja u tumorskim plazma stanicama.

Naši rezultati upućuju na važnost citogenetičkih promjena u patogenezi plazmastaničnih novotvorina, njihovu ulogu u dijagnostičkim i terapijskim protokolima te na njihovu prognostičku vrijednost u MM-u i MGUS-u. Različita izraženost NOTCH1 i JAGGED1 proteina u MGUS-u i MM-u upućuje na moguću ulogu navedenih proteina u patogenezi plazmastaničnih novotvorina te na moguću dijagnostičku vrijednost analize NOTCH1 i JAGGED1 imunohistokemijskog bojanja infiltrata koštane srži u multiplom mijelomu.

8. SUMMARY

Multiple myeloma (MM) and monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) share phenotypic profile and similar genomic aberrations but rarely MGUS progresses into overt MM. Notch signalling is implicated in the pathogenesis of multiple myeloma expressing high level of active Notch proteins NOTCH1 and JAGGED1 in tumor plasma cells.

We investigated expression of NOTCH1, JAGGED1, CYCLIN D1, CD20 and PAX5 in bone marrow trephine biopsies of 80 newly diagnosed multiple myeloma and 20 monoclonal gammopathy of undetermined significance patients using immunohistochemical methods. The number of NOTCH1 and JAGGED1 positive tumor cells was counted per 1000 tumor cells and the intensity of staining was assessed semi quantitatively. Immunohistochemical results were compared with the morphological characteristics of tumorous plasma cells in bone marrow, the presence of t(11;14)(q13,q32), t(14;16)(q32;q23), t(4;14)(p16;q23), del13q34 and *PAX5*(9p13) translocation, the clinical and laboratory data, as well as overall survival in multiple myeloma patients. MGUS and MM showed no significant difference in the pattern of bone marrow infiltration, plasma cell differentiation, immunohistochemical staining of CYCLIN D1, CD20, PAX5 as well as analyzed chromosomal changes in tumorous plasma cells. In contrast, MGUS and MM differ according to type of infiltration of tumorous plasma cells in bone marrow with significant occurrence of diffuse pattern in MM ($P<0.001$). A similar occurrence of *PAX5*(9p13) translocation in MGUS and MM plasma cells may indicate its early occurrence in the pathogenesis of plasma cell neoplasia. Multiple myelomas expressed NOTCH1 in 92.31% and JAGGED1 in 92.21% cases with strong staining of NOTCH1 in the majority of cases (59.7%), whereas JAGGED1 was predominately weak (67.6% of cases). In contrast, both markers were negative in all MGUS cases ($P<0.001$). However, upon progression of disease from MGUS to MM (seen in 4 patients) analysis of the subsequent bone marrow biopsies showed weak expression of both markers in tumorous plasma cells. A significant correlation was found in strong NOTCH1 staining with diffuse type of bone marrow

infiltration (P=0.020), an immature morphologic type of plasma cells (P=0.043) and MM subgroup with cytogenetic aberrations in plasma cells (P=0.021). In MM subgroup with cytogenetic aberrations in tumorous plasma cells a statistically significant occurrence of immature morphological type of plasma cells (P=0.024), serum β_2 microglobulin ($s\beta_2m$) >3,5 mg/L (P=0.029) and serum albumin ≤35 g/L (P=0.044) was found. In this MM subgroup the patients were significantly more frequent in Durie/Salmon (DS) stage III (A or B) (P=0.012).

After a median follow-up of 20.3 months, multiple myeloma patients with DS stage III (A or B) had statistically shorter overall survival which confirms DS system as the standard for prognostication in MM (P=0.046). Frequent occurrence of $s\beta_2m$ >3,5 mg/L and serum albumin ≤35 g/L in MM patients with DS stage III (A or B) was found to be statistically significant. Correlations between serum level $s\beta_2m$, albumin and patients survival imply connections to underlying mechanisms. t(14;16)(q32;q23) (P=0.019) and *PAX5*(9p13) translocation (P=0.048) present prognostic factors with statistically shorter survival in MM patients. In multiple myeloma patients no difference in overall survival between JAGGED1 positive and negative cases were found.

In conclusion, our results indicate an importance of chromosomal aberrations in pathogenesis of plasma cell neoplams, their role in the diagnostic and therapeutic algorithms, as well as prognostic value in MM and MGUS. A difference in NOTCH1 and JAGGED1 expression in MGUS and MM may imply possible role of both proteins in pathogenesis of plasma cell neoplasms, and a possible diagnostic value of NOTCH1 and JAGGED1 immunohistochemical evaluation of bone marrow infiltrates for multiple myeloma.

9. LITERATURA

1. Grogan TM CB, Kyle RA, Muller-Hermelink HK, Harris NL. Plasma cell neoplasms. In: Jaffe ES HN, Stein H, Vardiman JW (ed). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2001.
2. González D, van der Burg M, García-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, González M, van Dongen JJ, San Miguel JF, Morgan GJ. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. Blood 2007;110(9):3112-21.
3. Malpas J, Bergsagel D, Kyle R, Anderson K (eds.).Myeloma: Biology and Management. 3rd. Edition. Saunders: Philadelphia. 2004.
4. Devesa SS, Silverman DT, Young JL Jr, Pollack ES, Brown CC, Horm JW, Percy CL, Myers MH, McKay FW, Fraumeni JF Jr. Cancer incidence and mortality trends among whites in the United States 1947-84. J Natl Cancer Inst. 1987;79(4):701-70.
5. Anon. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. Br J Haemathol. 2003,121(5):749-57.
6. Kyle RA, Gertz MA. Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features in 474 cases. Semin Hematol. 1995;32(1):45-59.
7. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. Mayo Clin Proc. 2003;78(1):21-33.
8. Serpell LC, Sunde M, Blake CC. The molecular basis of amyloidosis. Cell Mol Life Sci. 1997;53(11-12):871-87.
9. Greer JP, Foerster J, Lukens JN (ed). Wintrobe's Clinical Hematology. Lippincott Williams & Wilkins; Eleventh edition, 2004.
10. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. International staging system for multiple myeloma. J Clin Oncol. 2005;23(15):3412-20.
11. Durie BG. Staging and kinetics of multiple myeloma. Semin Oncol. 1986;13(3):300-9.
12. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. Cancer. 1975;36(3):842-54.
13. San Miguel JF, García-Sanz R. Prognostic features of multiple myeloma. Best Pract Res Clin Haematol. 2005;18(4):569-83.

14. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, Leyvraz S, Michallet M, Yakoub-Agha I, Garderet L, Marit G, Michaux L, Voillat L, Renaud M, Grosbois B, Guillerm G, Benboubker L, Monconduit M, Thieblemont C, Casassus P, Caillot D, Stoppa AM, Sotto JJ, Wetterwald M, Dumontet C, Fuzibet JG, Azais I, Dorvaux V, Zandecki M, Bataille R, Minvielle S, Harousseau JL, Facon T, Mathiot C. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. Blood. 2007;109(8):3489-95.
15. Chiecchio L, Protheroe RK, Ibrahim AH, Cheung KL, Rudduck C, Dagrada GP, Cabanas ED, Parker T, Nightingale M, Wechalekar A, Orchard KH, Harrison CJ, Cross NC, Morgan GJ, Ross FM. Deletion of chromosome 13 detected by conventional cytogenetics is a critical prognostic factor in myeloma. Leukemia. 2006;20(9):1610-7.
16. Chng WJ, Santana-Dávila R, Van Wier SA, Ahmann GJ, Jalal SM, Bergsagel PL, Chesi M, Trendle MC, Jacobus S, Blood E, Oken MM, Henderson K, Kyle RA, Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Fonseca R. Prognostic factors for hyperdiploid-myeloma: effects of chromosome 13 deletions and IgH translocations. Leukemia. 2006;20(5):807-13.
17. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Litzow MR, Henderson KJ, Van Wier SA, Ahmann GJ, Fonseca R. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. Blood. 2005;106(8):2837-40.
18. Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, Zhan F, Santra M, Sawyer JR, Hollmig K, Zangarri M, Pineda-Roman M, van Rhee F, Cavallo F, Burington B, Crowley J, Tricot G, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. Blood. 2006;108(5):1724-32.
19. Hayman SR, Bailey RJ, Jalal SM, Ahmann GJ, Dispenzieri A, Gertz MA, Greipp PR, Kyle RA, Lacy MQ, Rajkumar SV, Witzig TE, Lust JA, Fonseca R. Translocations involving the immunoglobulin heavy-chain locus are possible early genetic events in patients with primary systemic amyloidosis. Blood. 2001;98(7):2266-8.
20. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, Taylor BJ, Larratt LM, Mant MJ, Belch AR, Pilarski LM. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. Blood. 2003;101(4):1520-9.
21. Königsberg R, Zojer N, Ackermann J, Krömer E, Kittler H, Fritz E, Kaufmann H, Nösslinger T, Riedl L, Gisslinger H, Jäger U, Simonitsch I, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J. Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma. J Clin Oncol. 2000;18(4):804-12.
22. Shaughnessy J, Jacobson J, Sawyer J, McCoy J, Fassas A, Zhan F, Bumm K, Epstein J, Anaissie E, Jagannath S, Vesole D, Siegel D, Desikan R, Munshi N, Badros A, Tian E, Zangari M, Tricot G, Crowley J, Barlogie B. Continuous absence of metaphase-defined cytogenetic abnormalities,

especially of chromosome 13 and hypodiploidy, ensures long-term survival in multiple myeloma treated with Total Therapy I: interpretation in the context of global gene expression. Blood. 2003;101(10):3849-56.

23. Stewart AK, Bergsagel PL, Greipp PR, Dispenzieri A, Gertz MA, Hayman SR, Kumar S, Lacy MQ, Lust JA, Russell SJ, Witzig TE, Zeldenrust SR, Dingli D, Reeder CB, Roy V, Kyle RA, Rajkumar SV, Fonseca R. A practical guide to defining high-risk myeloma for clinical trials, patient counseling and choice of therapy. Leukemia. 2007;21(3):529-34.
24. Bartl R, Frisch B, Fateh-Moghadam A, Kettner G, Jaeger K, Sommerfeld W. Histologic classification and staging of multiple myeloma. A retrospective and prospective study of 674 cases. Am J Clin Pathol. 1987;87(3):342-55.
25. Brunning RD, McKenna RW. Plasma cell dyscrasias and related disorders. In Atlas of Tumor Pathology. Armed Forces Institute of Pathology. Ed. Washington, D.C., pp 323-267, 2004.
26. Bartl R, Frisch B. Clinical significance of bone marrow biopsy and plasma cell morphology in MM and MGUS. Pathol Biol. 1999;47(2):158-68.
27. Greipp PR, Leong T, Bennett JM, Gaillard JP, Klein B, Stewart JA, Oken MM, Kay NE, Van Ness B, Kyle RA. Plasmablastic morphology--an independent prognostic factor with clinical and laboratory correlates: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) myeloma trial E9486 report by the ECOG Myeloma Laboratory Group. Blood. 1998;91(7):2501-7.
28. Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. Am J Clin Pathol. 2004;121(4):482-8.
29. Pellat-Deceunynck C, Barillé S, Jego G, Puthier D, Robillard N, Pineau D, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R. The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma. Leukemia. 1998;12(12):1977-82.
30. Sahara N, Takeshita A, Shigeno K, Fujisawa S, Takeshita K, Naito K, Ihara M, Ono T, Tamashima S, Nara K, Ohnishi K, Ohno R. Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma. Br J Haematol. 2002;117(4):882-5.
31. Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M, Mateo G, Corral M, Caballero MD, Blade J, Moro MJ, Hernandez J, San Miguel JF. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma.
    Br J Haematol. 1999;107(1):121-31.
32. Grogan TM, Durie BG, Spier CM, Richter L, Vela E. Myelomonocytic antigen positive multiple myeloma. Blood. 1989;73(3):763-9.
33. Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undertermined significance. Natural history in 241 cases. Am J Med. 1978;64(5):814-26.
34. Kyle RA. “Benign” monoclonal gammopathy- after 20 to 35 years of follow-up. Mayo Clin Proc. 1993;68(1):26-36.

35. Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undertermined significance. Br J Hematol. 2006;134(6):573-89.
36. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ 3rd. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. N Engl J Med. 2002;346(8):564-9.
37. Pasqualetti P, Festuccia V, Collacciani A, Casale R. The natural history of monoclonal gammopathy of undetermined significance. A 5- to 20-year follow-up of 263 cases. Acta Haematol. 1997;97(3):174-9.
38. Katzmann JA, Clark JA, Rajkumar VS, Kyle RS. Monoclonal free light chains in sera from healthy individuals: FLC MGUS. Clin Chem. 2003;49:pA24.
39. Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, Galende J, Martín-Nuñez G, Alonso JM, de Las Heras N, Hernández JM, Martín A, López-Berges C, Orfao A, San Miguel JF. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. Blood. 2007;110(7):2586-92.
40. Olteanu H, Wang HY, Chen W, McKenna RW, Karandikar NJ. Imunophenotypic studies of monoclonal gammopathy of undetermined significance. BMC Clin Pathol. 2008;8:13.
41. Bladé J, Samson D, Reece D, Apperley J, Björkstrand B, Gahrton G, Gertz M, Giralt S, Jagannath S, Vesole D. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. Br J Haematol. 1998;102(5):1115-23.
42. Harousseau JL. Hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma. J Natl Compr Canc Netw. 2009;7(9):961-70.
43. Harousseau JL. Optimising patient outcomes in myeloma. Cancer Treat Rev. 2010;36 Suppl 2:S33-5.
44. Kumar S. Multiple myeloma - current issues and controversies. Cancer Treat Rev. 2010;36 Suppl 2:S3-11.
45. Palumbo A, Gay F. How to treat elderly patients with multiple myeloma: combination of therapy or sequencing. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009:566-77.
46. Berenson JR. Therapeutic options in the management of myeloma bone disease. Semin Oncol. 2010;37 Suppl 1:S20-9.
47. Smith A, Wisloff F, Samson D; UK Myeloma Forum; Nordic Myeloma Study Group; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. Br J Hematol 2006;132(4):410-51.
48. EHA,2010; Mayo Clin Proc. 2007;82(3):323-341; Mayo Clin Proc 2009;84:1095-110; (regular update on www.msmart.org)

49. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. Cyclin D dysregulation: An early and unifying pathogenid event in multiple myeloma. Blood. 2005;106(1):296-303.
50. Higgins MJ, Fonseca R. Genetics of multiple myeloma. Best Pract Res Clin Haematol. 2005;18(4):525–36.
51. Smadja NV, Fruchart C, Isnard F, Louvet C, Dutel JL, Cheron N, Grange MJ, Monconduit M, Bastard C. Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. Leukemia 1998;12(6):960–9.
52. Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. Blood 2001;98(7):2229–38.
53. Debes-Marun CS, Dewald GW, Bryant S, Picken E, Santana-Dávila R, González-Paz N, Winkler JM, Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Dispenzieri A, Lacy MQ, Rajkumar SV, Lust JA, Greipp PR, Fonseca R. Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. Leukemia 2003;17(2):427–36.
54. Smadja NV, Bastard C, Brgaudeau C. Primary plasma cell leukemia and multiple myeloma: one or two diseases according to the methodology. Blood 1999;94:3607–9.
55. Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, Dewald GW, Bryant SC, Winkler JM, Blood E, Oken MM, Santana-Dávila R, González-Paz N, Kyle RA, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Greipp PR. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. Blood. 2003;102(7):2562-7.
56. Wuilleme S, Robillard N, Lodé L, Magrangeas F, Beris H, Harousseau JL, Proffitt J, Minvielle S, Avet-Loiseau H; Intergroupe Francophone de Myélome. Ploidy, as detected by fluorescence in situ hybridization, defines different subgroups in multiple myeloma. Leukemia. 2005;19(2):275-8.
57. Cremer FW, Bila J, Buck I, Kartal M, Hose D, Ittrich C, Benner A, Raab MS, Theil AC, Moos M, Goldschmidt H, Bartram CR, Jauch A. Delineation of distinct subgroups of multiple myeloma and a model for clonal evolution based on interphase cytogenetics. Genes Chromosomes Cancer. 2005;44(2):194-203.
58. Smadja NV, Leroux D, Soulier J, Dumont S, Arnould C, Taviaux S, Taillemite JL, Bastard C. Further cytogenetic characterization of multiple myeloma confirms that 14q32 translocations are a very rare event in hyperdiploid cases. Genes Chromosomes Cancer. 2003;38(3):234-9.
59. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Van Ness B, Van Wier SA, Henderson KJ, Bailey RJ, Greipp PR. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. Blood. 2003;101(11):4569-75.
60. Soverini S, Cavo M, Cellini C, Terragna C, Zamagni E, Ruggeri D, Testoni N, Tosi P, De Vivo A, Amabile M, Grafone T, Ottaviani E, Giannini B, Cangini D, Bonifazi F, Neri A, Fabris S, Tura S, Baccarani M, Martinelli G. Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variablev for

newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation. Blood.2003;102(5):1588-94.

61. Zojer N, Königsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Krömer E, Kaufmann H, Riedl L, Gisslinger H, Schreiber S, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. Blood. 2000;95(6):1925-30.
62. Fonseca R, Harrington D, Oken MM, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Blood EA, Rajkumar SV, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR. Biological and prognostic significance of interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (delta13) in multiple myeloma: an eastern cooperative oncology group study. Cancer Res. 2002;62(3):715-20.
63. Gutiérrez NC, Castellanos MV, Martín ML, Mateos MV, Hernández JM, Fernández M, Carrera D, Rosiñol L, Ribera JM, Ojanguren JM, Palomera L, Gardella S, Escoda L, Hernández-Boluda JC, Bello JL, de la Rubia J, Lahuerta JJ, San Miguel JF; GEM/PETHEMA Spanish Group. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4:14) is the most relevant averse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. Leukemia. 2007;21(1):143-50.
64. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. Blood. 2004;104(3):607-18.
65. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, Minvielle S, Bataille R; Intergroupe Francophone du Myélome. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. Blood. 2002;99(6):2185-91.
66. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, Epstein J, Yaccoby S, Sawyer J, Burington B, Anaissie E, Hollmig K, Pineda-Roman M, Tricot G, van Rhee F, Walker R, Zangari M, Crowley J, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. The molecular classification of multiple myeloma. Blood. 2006;108(6):2020-8.
67. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. J Clin Oncol. 2005;23(26):6333-48.
68. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, Lenz G, Hanamura I, Wright G, Xiao W, Dave S, Hurt EM, Tan B, Zhao H, Stephens O, Santra M, Williams DR, Dang L, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr, Kuehl WM, Staudt LM. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. Cancer Cell. 2007;12(2):115-30.
69. Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, Jacobsen SE.

Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. Cell. 2005;121(2):295-306.

70. Dib A, Peterson TR, Raducha-Grace L, Zingone A, Zhan F, Hanamura I, Barlogie B, Shaughnessy J Jr, Kuehl WM. Paradoxical expression of INK4c in proliferative multiple myeloma tumors: bi-allelic deletion vs increased expression. Cell Div. 2006;1:23.
71. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ, Van Wier S, Tiedemann R, Shi CX, Sebag M, Braggio E, Henry T, Zhu YX, Fogle H, Price-Troska T, Ahmann G, Mancini C, Brents LA, Kumar S, Greipp P, Dispenzieri A, Bryant B, Mulligan G, Bruhn L, Barrett M, Valdez R, Trent J, Stewart AK, Carpten J, Bergsagel PL. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. Cancer Cell. 2007;12(2):131-44.
72. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. Nat Rev Cancer. 2002;2(3):175-87.
73. Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, Qi Y, Brents LA, Roschke A, Dewald G, Kirsch IR, Bergsagel PL, Kuehl WM. Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. Proc Natl Acad Sci U S A. 20004;97(1):228-33.
74. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. (eds.) Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition: Expert Consult - Online and Print (Robbins Pathology) Saunders; 8th edition, 2009.
75. Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. Semin Hematol. 1999;36(2):115–27.
76. Krieger S, Grunau C, Sabbah M, Sola B. Cyclin D1 gene activation in human myeloma cells is independent of DNA hypomethylation or histone hyperacetylation. Exp Hematol. 2005;33(6):652-9.
77. Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. Oncogene. 2001;20(40):5611–22.
78. Sola B, Troussard X. Relevance of cyclin D1 level in the pathogenesis of multiple myeloma. Blood. 2003;102(12):4245–6.
79. Robillard N, Avet-Loiseau H, Garand R, Moreau P, Pineau D, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R. CD20 is associated with a small mature plasma cell morphology and t(11;14) in multiple myeloma. Blood. 2003;102(3):1070-1.
80. San Miguel JF, González M, Gascón A, Moro MJ, Hernández JM, Ortega F, Jiménez R, Guerras L, Romero M, Casanova F, Sanz MA, Sánchez J, Portero JA, Orfão A: Immunophenotype heterogeneity of multiple myeloma: Influence on the biology and clinical course of the disease. Br J Haematol. 1991;77(2):185-90.
81. García-Sanz R, Orfão A, González M, Tabernero MD, Bladé J, Moro MJ, Fernández-Calvo J, Sanz MA, Pérez-Simón JA, Rasillo A, Miguel JF. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. Blood. 1999;93(3):1032-7.

82. Souabni A, Cobaleda C, Schebesta M, Busslinger M. Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. Immunity. 2002;17(6):781-93.
83. Torlakovic E, Torlakovic G, Nguyen PL, Brunning RD, Delabie J. The value of anti-Pax-5 immunostaining in routinely fixed and paraffin-embedded sections. Am J Surg Path. 2002;26(10):1343-50.
84. Angelin-Duclos C, Cattoretti G, Lin KI, Calame K. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. J Immunol 2000;165(10):5462–71.
85. Lin P, Mahdavy M, Zhan F, Zhang HZ, Katz RL, Shaughnessy JD. Expression of PAX5 in CD20-positive MM assessed by immunohistochemistry and oligonucleotide microarray. Mod Path. 2004;17(10):1217-22.
86. Milner LA, Bigas A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. Blood. 1999;93(8):2431-48.
87. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal intergration in development. Science. 1999;284(5415):770-6.
88. Larsson C, Lardelli M, White I, Lendahl U. The human NOTCH1, 2, and 3 genes are located at chromosome positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in regions of neoplasia-associated translocation. Genomics. 1994;24(2):253-8.
89. Nefedova Y, Gabrilovich D. Mechanisms and clinical prospects of Notch inhibitors in the therapy of hematological malignancies. Drug Resist Updat. 2008;11(6):210-8.
90. Baldi A, De Falco M, De Luca L, Cottone G, Paggi MG, Nickoloff BJ, Miele L, De Luca A. Characterization of tissue specific expression of Notch-1 in human tissues. Biol Cell. 2004;96(4):303-11.
91. Dallman MJ, Smith E, Benson RA, Lamb JR. Notch: control of lymphocyte differentiation in the periphery. Curr Opin Immunol. 2005;17(3):259-66.
92. Muskavitch MAT: Delta-Notch signaling and Drosophila cell fate choice. Dev Biol. 1994;166(2):415-30.
93. Sun X, Artavanis-Tsakonas S: The intracellular deletions of Delta and Serrate define dominant negative forms of the Drosophila Notch ligands. Development. 1996;122(8):2465-74.
94. Kojika S, Griffin JD. Notch receptors and hematopoiesis. Exp Hematol. 2001;29(9):1041-52.
95. Shimizu K, Chiba S, Saito T, Kumano K, Hirai H. Physical interaction of Delta1, Jagged1, and Jagged2 with Notch1 and Notch3 receptors. Biochem Biophys Res Commun. 2000;276(1):385-9.
96. Kopan R, Weintraub H. Mouse notch: expression in hair follicles correlates with cell fate determination. J Cell Biol. 1993;121(3):631-41.
97. Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U. The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. Mech Dev. 1994;46(2):123-36.

98. Bianchi S, Dotti MT, Federico A. Physiology and pathology of notch signalling system. J Cell Physiol. 2006;207(2):300-8.
99. Carlesso N, Aster JC, Sklar J, Scadden DT. Notch1-induced delay of human hematopoietic progenitor cell differentiation is associated with altered cell cycle kinetics. Blood. 1999;93(3):838-48.
100. Nye JS, Kopan R, Axel R. An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. Development. 1994;120(9):2421-30.
101. Milner LA, Bigas A, Kopan R, Brashem-Stein C, Bernstein ID, Martin DI: Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch 1. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93(3):13014-9.
102. Micchelli CA, Rulifson EJ, Blair SS. The function and regulation of *cut* expression on the wing margin of Drosophila: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. Development. 1997;124(8):1485-95.
103. Li L, Milner LA, Deng Y, Iwata M, Banta A, Graf L, Marcovina S, Friedman C, Trask B, Hood L, Torok-Storb B. The human homolog of rat *Jagged*, *hJagged1*, is expressed by marrow stroma and inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1. Immunity. 1998;8(1):43-5.
104. Karanu FN, Murdoch B, Gallacher L, Wu DM, Koremoto M, Sakano S, Bhatia M. The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. J Exp Med. 2000;192(9):1365-72.
105. Ronchini C, Capobianco AJ. Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). Mol Cell Biol. 2001;21(17):5925-34.
106. Wu L, Sun T, Kobayashi K, Gao P, Griffin JD. Identification of a gamily of mastermind-like transcriptional coactivators for mammalian notch receptors. Mol Cell Biol. 2002;22(21):7688-700.
107. Nefedova Y, Cheng P, Alsina M, Dalton WS, Gabrilovich DI. Involvement of Notch-1 singaling in bone marrow stroma. Mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. Blood. 2004;103(9):3503-10.
108. Ferrando AA. The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009;:353-61.
109. Houde C, Li Y, Song L, Barton K, Zhang Q, Godwin J, Nand S, Toor A, Alkan S, Smadja NV, Avet-Loiseau H, Lima CS, Miele L, Coignet LJ. Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma ells from multiple myeloma patients and cell lines. Blood. 2004;104:3697-3704.
110. Jundt F, Pröbsting KS, Anagnostopoulos I, Muehlinghaus G, Chatterjee M, Mathas S, Bargou RC, Manz R, Stein H, Dörken B. Jagged1-induced notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. Blood. 2004;103(9):3511-5.
111. Morimura T, Goitsuka R, Zhang Y, Saito I, Reth M, Kitamura D. Cell cycle arrest and apoptosis induced by Notch1 in B cells. J Biol Chem. 2000;275(47):36523-31.

112. Romer S, Saunders U, Jäck HM, Jehn BM. Notch1 enhances B-cell receptor-induced apoptosis in mature activated B cells without affecting cell cycle progression and surface IgM expression. Cell Ceath Differ. 2003;10(7):833-44.
113. Jundt F, Schwarzer R, Dörken B. Notch signaling in leukemias and lymphomas. Curr Mol Med. 2008;8(1):51-9.
114. Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, Rodriguez CG, Karnell FG, Carpenter AC, Aster JC, Allman D, Pear WS. Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B cell malignancies. Blood. 2005;106(12): 3898-906.
115. Jundt F, Anagnostopoulos I, Förster R, Mathas S, Stein H, Dörken B. Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. Blood. 2002;99(9):3398-403.
116. Nefedova Y, Landowski TH, Dalton WS. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. Leukemia. 2003;17(6):1175-82.
117. Mudry RE, Fortney JE, York T, Hall BM, Gibson LF. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. Blood. 2000;96(5):1926-32.
118. Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. Blood. 2006;107(6):2223-33.
119. http://www.protocol-online.org/prot/Histology/Staining/index.html
120. Wilson CS, Butch AW, Lai R, Medeiros LJ, Sawyer JR, Barlogie B, McCourty A, Kelly K, Brynes RK. Cyclin D1 and E2F-1 immunoreactivity in bone marrow biopsy specimens of multiple myeloma: relationship to proliferative activity, cytogenetic abnormalities and DNA ploidy. Br J Haematol. 2001;112(3):776-82.
121. Pruneri G, Fabris S, Baldini L, Carboni N, Zagano S, Colombi MA, Ciceri G, Lombardi L, Rocchi M, Buffa R, Maiolo AT, Neri A. Immunohistochemical analysis of cyclin D1 shows deregulated expression in multiple myeloma with the t(11;14). Am J Pathol. 2000;156(5):1505-13.
122. Athanasiou E, Kaloutsi V, Kotoula V, Hytiroglou P, Kostopoulos I, Zervas C, Kalogiannidis P, Fassas A, Christakis JI, Papadimitriou CS. Cyclin D1 overexpression in multiple myeloma. A morphologic, immunohistochemical, and in situ hybridization study of 71 paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. Am J Clin Pathol. 2001;116(4):535-42.
123. Cook JR, Hsi ED, Worley S, Tubbs RR, Hussein M. Immunohistochemical analysis identifies two cyclin D1+ subsets of plasma cell myeloma, each associated with favorable survival. Am J Clin Pathol. 2006;125(4):615-24.
124. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl WM, Hernandez JM, Minvielle S, Pilarski LM, Shaughnessy JD Jr, Stewart AK, Avet-Loiseau H. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. Cancer Res. 2004;64(4):1546-58.

125. Ivanković D, ur. Osnove statističke analize za medicinare. Samobor: A.G. Matoš; 1998, str.370.
126. Petz B, ur. Statističke metode za nematematičare. Jastrebarsko: Naklada Slap; 2004, str.384.
127. Leleu X, Genevieve F, Guieze R, Duhamel A, Andrieux J, Berthon C, Godon A, Prat-Lesaffre S, Depil S, Lai JL, Facon T, Zandecki M; Intergroupe Francophone du Myelome (IFM). Irregular nuclear shape of bone marrow plasma cells defines a multiple myeloma subgroup related to hypodiploidy and to short survival. Leuk Res. 2005;29(6):665-71.
128. Milla F, Oriol A, Aguilar JL, Aventin A, Ayats R, Alonso E, Domingo A, Feliu E, Florensa L, Lopez A, Perez- Vila E, Rozman M, Sanchez C, Wallespi T, Woessner S. Usefulness and reproducibility of cytomorphologic evaluations to differentiate myeloma from monoclonal gammopathy of unknown significance. Am J Clin Pathol. 2001;115(1):127–35.
129. Moreau P, Facon T, Leleu X, Morineau N, Huyghe P, Harousseau JL, Bataille R, Avet-Loiseau H; Intergroupe Francophone du Myélome. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. Blood. 2002;100(5):1579-83.
130. Johnson DR, Pober JS: Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy-and light-chain genes in vascular endothelium. Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87(13):5183-7.
131. Beersma MFC, Bijlmakers MJE, Ploegh HL. Human cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains. J Immunol. 1993;151(9):4455-64.
132. Perosa F, Luccarelli G, Prete M, Ferrone S, Dammacco F. Increased serum levels of beta2m-free HLA class I heavy chain in multiple myeloma. Br J Haematol. 1999;106(4):987-94.
133. Christianson GJ, Brooks W, Vekasi S, Manolfi EA, Niles J, Roopenian SL, Roths JB, Rothlein R, Roopenian DC. Beta2-microglobulin-deficient mice are protected from hypergammaglobulinemia and have defective antibody responses because of increased IgG catabolism. J Immunol. 1997;159(10):4781-92.
134. Bologa RM, Levine DM, Parker TS, Cheigh JS, Serur D, Stenzl KH, Rubin AL. Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients. Am J Kidney Dis. 1998;32(1):107-14.
135. Maire P, Wuarin J, Schibler U. The role of cis-acting promoter elements in tissue-specific albumin gene expression. Science. 1989;244(4902):343-6.
136. Rajkumar SV, Greipp PR. Prognostic factors in multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am. 1999;13(6):1295-314.
137. Amakawa R, Ohno H, Fukuhara S. t(9;14)(p13;q32) involving th PAX-5 gene: a unique subtype of 14q32 translocation in B cell non-Hodgkin's lymphoma. Int J Hematol. 1999;69(2):65-9.
138. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. Nat Rev Immunol. 2002;2(12):920-32.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 18. studenoga 1971. godine u Zagrebu, gdje sam završila osnovnu i srednju školu.

Diplomirala sam 1996. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu s prosječnom ocjenom 3,94. Tijekom studija bila sam demonstrator u dodiplomskoj nastavi u Katedri za biokemiju. Pripravnički staž u trajanju od godine dana obavila sam u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. Državni ispit položila sam 1997. godine. Od 1999. do 2003. godine radila sam na Odjelu za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Marije Dominis, dr. med., u sklopu specijalizacije iz Patološke anatomije te sam položila specijalistički ispit s ocjenom odličan.

Od 1998. do 2000. te od 2005. do 2006. godine pohađala sam i završila znanstveni poslijediplomski studij biomedicine na Medicinskom fakultetu u Zagrebu s ocjenom odličan. U akademskoj godini 2000./2001. završila sam stručni poslijediplomski studij iz patologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Nakon položenog specijalističkog ispita iz Patološke anatomije zaposlila sam se u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu.

Od 2002. godine aktivno sudjelujem u dodiplomskoj nastavi treće godine studija u nastavnom programu predmeta Patologija. 2004. godine izabrana sam u suradničko zvanje naslovnog asistenta u Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za znanstveno područje Biomedicina i zdravstvo, polje Kliničke medicinske znanosti, grana Patologija.

Član sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva patologa i sudskih medicinara, Hrvatskog društva perinatalne medicine, hematopatološke sekcije pri Hrvatskom liječničkom zboru.

Pohađala sam tečajeve *European School of Pathology* iz područja hematopatologije (2001., Torino, Italija), patologije glave i vrata (2007., Zagreb, Hrvatska) i patologije probavnog sustava (2010., Zagreb, Hrvatska).

Aktivno sam sudjelovala na sedam međunarodnih znanstvenih skupova i dva domaća znanstvena skupa na kojima sam izlagala kao prvi autor šest i suautor deset kongresnih priopćenja. Objavila sam sedam znanstvenih radova citiranih u CC-u.