

**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET**

Sanja Štifter

**ULOGA NUKLEARNOG FAKTORA KAPPA B U REGULACIJI
ANGIOGENEZE U MULTIPLOM MIJELOMU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Rijeka, 2008.

Mentor : prof. Dr. sc. N. Jonjić

Doktorska je disertacija obranjena dana _____ u _____
_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1._____

2._____

3._____

4._____

Rad ima _____ listova

Tablica_____

Slika

UDK klasifikacija

Predgovor

Doktorska disertacija je ostvarena u sklopu projekta „Regulacijski čimbenici angiogeneze u prognozi tumora“ (062-0620095-0082), u potpori Ministarstva znanosti, tehnologije i športa Republike Hrvatske, glavnog istraživača prof. dr. sc. N. Jonjić, na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Ovom prilikom zahvaljujem svima koji su na bilo koji način doprinjeli realizaciji ovog rada.

Iz doktorske disertacije je publiciran rad:

Stifter S. The role of nuclear factor kappaB on angiogenesis regulation through monocyte chemotactic protein-1 in myeloma. Med Hypotheses 2006 66(2):284-6.

Umjesto pogovora...

Kako je prof. Batistić znao reći;

„Čudesni su putevi Gospodnji“

***Ovaj rad posvećujem onima čiji su trud, vrijeme i entuzijazam utkani u
ovo djelo, kojeg uostalom bez toga ne bi niti bilo...***

SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Multipli mijelom (MM) je B-stanična neoplazma obilježena multifokalnom infiltracijom koštane srži s malignim plazma stanicama. Molekularna je osnova bolesti nejasna. Angiogeneza, kao biološki fenomen stvaranja novih krvnih žila, prisutna je u koštanoj srži kod raznih plazma staničnih poremećaja i posebno je značajna karakteristika aktivnog MM. Zbog toga se inhibicija tumorske angiogeneze pokazala kao obećavajući pristup liječenju mijeloma. Ciljevi istraživanja su bili ispitati angiogenezu i ekspresiju vaskularnog endoteljnog faktora rasta (VEGF), monocitnog kemotaktičnog proteina (MCP-1) u odnosu prema nuklearnom faktoru – kappa B (NF- κ B) na molekularnoj razini, razini proteina u stanici i u plazmi bolesnika s MM.

Ispitanici i metode: U istraživanje je uključeno 79 bolesnika s dijagnozom MM i s kliničkim podatcima uključujući klinički stadij bolesti, odgovor na terapiju i preživljjenje. Biopsički uzorci koštane srži korišteni su za dvostruku imunohistokemijsku analizu u cilju utvrđivanja gustoće krvnih žila (MVD), Ki67 proliferacijskog indeksa te izražaja VEGF, MCP-1 i subcelularne lokalizacije NF- κ B. Krv 19 bolesnika korištena je za određivanje plazmatske koncentracije VEGF i MCP-1 ELISA metodom, dok su stanice koštane srži korištene za izolaciju plazma stanica metodom magnetske separacije ili protočnom citometrijom u cilju utvrđivanja mRNA VEGF i MCP-1 RT-PCR metodom.

Rezultati: Rezultati su pokazali pozitivnu udruženost između MVD, % tumorskog infiltrata ($p<0,001$), pojave atipičnih plazma stanica ($p=0,001$) i kliničkog stadija bolesti ($p=0,001$). Nadalje, uočena je značajna povezanost većeg MVD sa slabijim odgovorom na terapiju ($p=0,029$) i kraćim preživljjenjem ($p=0,04$). Izražaj VEGF u tumorskim stanicama je bio značajno niži kod većeg MVD ($p=0,002$). Slabija ekspresija oba citokina, VEGF ($p =0,006$) i MCP-1 ($p = 0,03$) bila je udružena s većim

izražajem NF- κ B. U bolesnika je utvrđena veća plazmatska koncentracija VEGF u odnosu na kontrolnu skupinu ($p=0,008$). Koncentracije oba citokina, VEGF ($p=0,05$) i MCP-1 ($p=0,05$) bile su udružene s većim % tumorskih infiltrata, a samo VEGF s većim kliničkim stadijem bolesti ($p=0,001$). Vrijednosti mRNA VEGF i MCP-1 nisu pokazale udruženost s ispitivanim parametrima.

Zaključci: Povrđena je pozitivna korelacija između angiogeneze i nepovoljnih prognostičkih čimbenika te kraćeg preživljjenja u MM. Koncentracije secerniranih citokina u krvi, VEGF i MCP-1, proporcionalne su tumorskoj masi i dugoročno mogu biti važan klinički pokazatelj bolesti što se dalnjim studijama mora potvrditi. Opažena obrnuta ekspresija između NF- κ B i citokina ne isključuje mogućnost njihove međusobne povezanosti u regulaciji sinteze i sekrecije ovih proteina.

Ključne riječi: angiogeneza, NF- B, VEGF, MCP-1, plazma stanice, multipli mijelom

The expression of nuclear factor kappa B in the regulation of angiogenesis in multiple myeloma

SUMMARY

The aim: Multiple myeloma (MM) is B-cell neoplasm characterized with multifocal malignant plasma cell bone infiltration, while the molecular basis of disease remains unclear. Angiogenesis, biological phenomenon of new blood vessel formation is present in different plasma cellular disorders and is of importance in active MM. Because of that the inhibition of tumour angiogenesis has shown to be promising target in myeloma therapy. The aim of this study was to determine angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), monocyte chemotactic protein (MCP-1) in relation to nuclear factor kappa B (NF- κ B) on molecular level, cellular level as well as in plasma of MM patients.

Patients and Methods: The study was conducted on 79 patients with diagnosed MM including clinical parameters of stage, therapy response and overall survival. The bone marrow biopsy specimens were used for double immunostaining method for detection of mean vascular density (MVD), Ki67 proliferation index (PI), VEGF, MCP-1 and subcellular localization of NF- κ B. Plasma samples obtained from 19 patients were used for detection of VEGF and MCP-1 using ELISA method, while the bone aspirates were used for magnetic cell labeling or flow cytometry separation in order to separate myeloma cells and determine mRNA VEGF and MCP-1 by RT-PCR.

Results: The results have shown positive correlation of MVD, % of bone marrow tumour infiltrate ($p<0,001$), atypical plasma cell morphology ($p=0,001$) and clinical stage ($p=0,001$) the patients were in. Further, there was significant correlation of

MVD and poor therapy response ($p=0,029$) as well as shorter survival ($p=0,04$) when high MVD values were observed. The VEGF expression was significantly lower when MVD was higher ($p=0,002$). The lower expression of both cytokines VEGF ($p =0,006$) and MCP-1 ($p =0,03$) was related to higher NF- κ B expression. The higher plasma concentrations of VEGF compared to the control group were observed ($p=0.008$). Concentration of both cytokines VEGF ($p=0.05$) and MCP-1($p=0.05$) correlated with % of tumour cell infiltrate ($p=0.05$), while VEGF correlated with the clinical stage ($p=0,001$), respectively. Values of mRNA VEGF and MCP-1 showed lack of significance when compared with any of parameters in the study.

Conclusions: The results of this study confirmed correlation of angiogenesis and poor prognostic parameters in myeloma as well as shorter survival observed. The concentrations of cytokines in blood, VEGF and MCP-1 are in proportion with tumour mass and could be important clinical parameters which remain to be confirmed in further studies. Observed inverse correlation of NF- κ B in myeloma cells and angiogenic cytokines does not rule out the possibility of their mutual connection in regulation of synthesis and secretion of these proteins.

Key words: angiogenesis, NF- B, VEGF, MCP-1, plasma cell, multiple myeloma

S A D R Ž A J

	Stranica
1. UVOD	9
1.1. Plazma stanice i plazmastanične diskrazije	9
1.2. Multipli mijelom	14
1.3. Angiogeneza i njezina uloga u multiplom mijelomu	28
1.4. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i njegova uloga u multiplom mijelomu	31
1.5. Monocitni kemotaktični protein (MCP-1) i njegova uloga u multiplom mijelomu	34
1.6. Nuklearni faktor kappa B (NF-κB) i njegova uloga u multiplom mijelomu	36
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	41
3. BOLESNICI, MATERIJAL I METODE	42
3.1. Bolesnici	42
3.2. Patohistološka obrada uzorka i imunohistokemijska metoda	43
3.2.1. Određivanje gustoće malih krvnih žila	44
3.2.2. Određivanje proliferacijskog indeksa na tumorskim stanicama	46
3.2.3. Određivanje izražaja VEGF na tumorskim stanicama	47
3.2.4. Određivanje izražaja NF- B/p65 na tumorskim stanicama	48
3.2.5. Određivanje izražaja MCP-1 na tumorskim stanicama	48
3.3. Utvrđivanje vrijednosti citokina u plazmi	50
3.3.1. ELISA za određivanje plazmatske koncentracije VEGF	51
3.3.2. ELISA za određivanje plazmatske koncentracije MCP-1	52
3.4. Izolacija CD138⁺ mijelomskih stanica iz aspirata koštane srži	53
3.4.1. Izolacija mononukleara	54
3.4.2. Izolacija CD138⁺ mijelomskih stanica iz aspirata koštane srži upotrebom MS kolona i MiniMACS magnetskog separatora	55
3.4.3. Izolacija CD138⁺ mijelomskih stanica iz aspirata koštane srži upotrebom protočnog citometra	59

3.5. Metoda lančane reakcije polimerazom	61
3.5.1. Izolacija RNA	63
3.5.2. Reverzna transkripcija RNA	64
3.5.3. RealTime PCR za određivanje MCP-1	65
3.5.4. RealTime PCR za određivanje VEGF	66
3.5. Statistička obrada	68
4. REZULTATI	69
4.1. Kliničko-patološki podatci o bolesnicima s multiplim mijelomom	69
4.1.1. Klinička obilježja u ispitivanoj skupini bolesnika	69
4.1.2. Patohistološka obilježja ispitivanih uzoraka	71
4.2. Rezultati imunohistokemijske analize	75
4.2.1. Vrijednosti srednje gustoće malih krvnih žila, proliferacijskog indeksa, VEGF, MCP-1 i NF- B/p65	78
4.2.2. Usporedba imunohistokemijski utvrđenih parametara	80
4.2.3. Rezultati odnosa ispitivanih patohistoloških parametara i kliničkog stadija bolesti	83
4.2.4. Odnos ispitivanih patohistoloških parametara, kliničkih pokazatelja bolesti, odgovora na terapiju i preživljenja bolesnika	86
4.3. Vrijednosti VEGF i MCP-1 analizirane u plazmi	91
4.3.1. Vrijednosti VEGF i MCP-1 u plazmi analizirane skupine određene ELISA metodom	91
4.3.2. Plazmatske koncentracije VEGF i MCP-1 u plazmi bolesnika s multiplim mijelomom u odnosu na imunohistokemijske i patohistološke parametre te klinička obilježja	92
4.4. Vrijednosti mRNA VEGF i mRNA MCP-1 iz aspirata koštane srži bolesnika određene Real Time PCR	94
5. RASPRAVA	98

6. ZAKLJUČCI.....	115
7. LITERATURA.....	116
PRILOZI/POPIS SKRAĆENICA/ POPIS KEMIKALIJA	133
ŽIVOTOPIS.....	136

1. UVOD

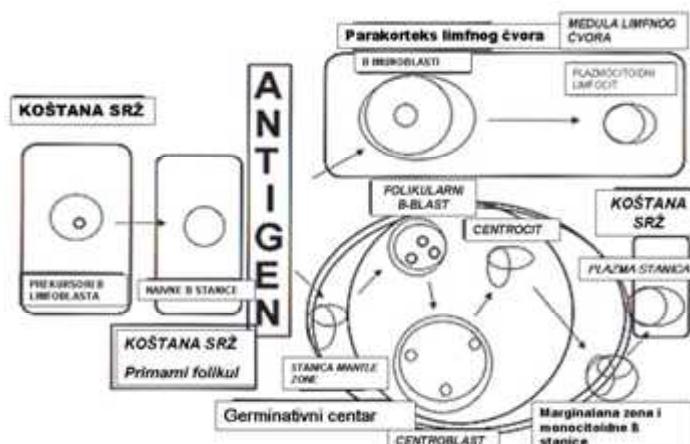
1.1. Plazma stanice i plazmastanične diskrazije

Plazma stanice su terminalno diferencirani limfociti B koji su sposobni proizvoditi i lučiti imunoglobuline. Nastaju od prekursora B limfoblasta u koštanoj srži (1). Morfološka obilježja plazma stanica uključuju periferno smještenu jezgru u kojoj je kondenzirani kromatin, te obilnu bazofilnu citoplazmu koja sadrži predominantno IgG ili IgA lance imunoglobulina. Imunofenotipski plazma stanicama nedostaju površinski imunoglobulini i pan-B stanični antigeni, no one izražavaju CD79a i CD138 biljege. Memorijski limfociti B kao i plazma stanice sadrže mutirane gene varijabilne regije teškog lanca imunoglobulina (engl. *immnoglobulin variabile region*, IgV) koji međutim ne nastavljaju s mutacijama (2).

Svaka molekula imunoglobulina sastoji se od dva teška i dva laka lanca povezanih disulfidnim vezama. Klasifikacija imunoglobulina počiva na tri skupine strukturnih varijacija među molekulama antigenskih determinanti (3). Izotipovi su determinante koje razlikuju glavne klase protutijela pojedine vrste, te su iste u svih zdravih jedinki neke vrste. To znači da po definiciji protutijela različite vrste prepoznaju izotipske determinante (heterologni serum), a protutijela iste vrste ne (homologni serum). Postoji pet izotipova teških lanaca (M, G, A, D, E) i dva izotipa lako, kapa (geni na drugom kromosomu) i lambda (geni na kromosomu 22), a svaki sadrži dvije domene. Alotipovi su determinante koje među jedinkama iste vrste označavaju normalne male razlike u slijedu aminokiselina inače sličnih imunoglobulina. Idiotipovi su treća skupina antigenskih determinanti, specifičnih za određeni klon stanica koje proizvode

protutijela. Pojedini idiotip postoji samo u imunoglobulinima pojedinog klena, a tvori ga specifična struktura mesta vezanja antiga. Većina plazma stanica sintetizira nešto više lakih lanaca koji se kao slobodni laci lanci izlučuju urinom, no ukupna dnevna ekskrecija ne prelazi 10 mg (3).

Za razumijevanje patogeneze multiplog mijeloma i ostalih bolesti iz skupine plazmastaničnih diskrazija potrebno je poznавање diferencijacijskog puta kretanja i sazrijevanja limfocita B, као што то shematski prikazuje slika 1. Iz nje se vidi da plazma stanica nastaje iz limfocita B nakon izlaska iz germinativnog centra (4).



Preuzeto iz knjige SZO Klasifikacija limfoidnih neoplazmi, 2000.(4)

Slika 1. Anatomska podjela pojedinih razvojnih oblika limfocita B tijekom sazrijevanja i diferencijacije.

Neoplazme zrelih B stanica obuhvaćaju skupinu bolesti koje klonalno proliferiraju, a građene su od B stanica u različitim stadijima diferencijacije, u rasponu od naivne B stanice do zrele plazma stanice. Obzirom na temu ove disertacije, koja obrađuje multiple mijelome (MM), u tablici 1 navedena je skupina bolesti pod nazivom

plazmastanične diskrazije, koje u osnovi imaju zajedničko obilježje, a to je poremećaj funkcije plazma stanica.

Tablica 1. Podjela plazmastaničnih diskrazija.

<i>Multipli mijelom</i>
<i>Varijante multiplog mijeloma</i>
- nesekretorni mijelom
- indolentni mijelom
- šuljajući mijelom
- plazmastanična leukemija
<i>Plazmacitom</i>
- solitarni plazmacitom kostiju
- ekstramedularni plazmacitom
<i>Bolesti imunoglobulinskih depozita</i>
- primarna amiloidoza
- sistemska bolest odlaganja lakih i teških lanaca
<i>Osteosklerotični mijelom (POEMS sindrom)</i>
<i>Bolest teških lanaca (BTL)</i>
<i>Gamma BTL, Mu BTL, Alfa BTL</i>

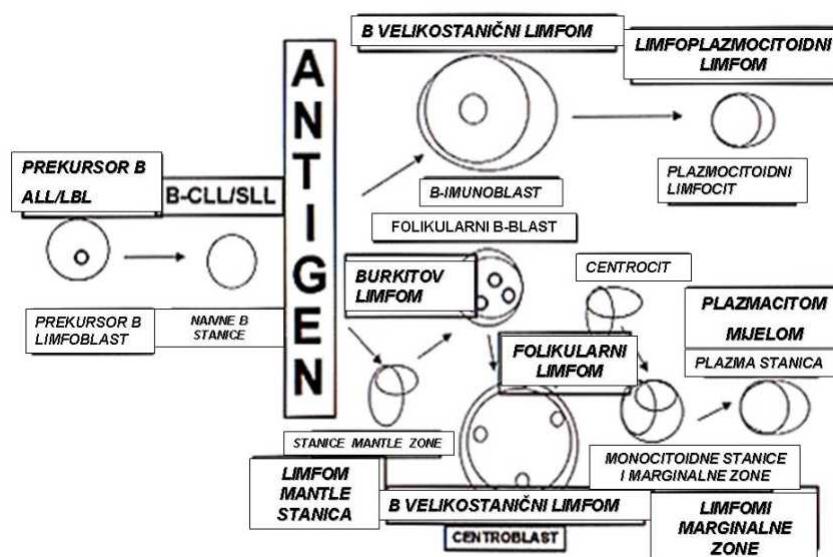
Preuzeto iz knjige SZO Klasifikacija limfoidnih neoplazmi, 2000.

Potrebno je ukratko definirati uz neke od navedenih i neke druge poremećaje koji pripadaju ovoj skupini. Solitarni plazmacitom kostiju je izolirana osteolitička lezija koja nastaje zbog nakupljanja monoklonalnih plazma stanica. Ekstramedularni plazmacitom je tumor plazma stanica ekstramedularne lokalizacije.

Monoklonalana gamapatija neutvrđenog značenja (engl. *monoclonal gammopathy of undetermined significance*, MGUS) je stanje sa stabilnim monoklonalnim proteinom u serumu, rjeđe u urinu i odsutstvom kliničkopatoloških nalaza za MM, ili drugi od

navedenih poremećaja. Primarna amiloidoza je klonalni plazma stanični poremećaj u kojem sistemska bolest ima za posljedicu disfunkciju organa zbog ekstracelularnih depozita fibrilarnih proteina. Bolest teših lanaca je limfoplazmocitoidni proliferativni poremećaj obilježen proizvodnjom teških imunoglobulinskih lanaca. Osteosklerotični mijelom je udružen s POEMS sindromom (POEMS – Polineuropatija, Organomegalija, Endokrine abnormalnosti, M-komponenta, engl. **Skin changes** /promjene na koži) (5).

Brojne su podjele prethodile navedenoj klasifikaciji hematopoetskih neoplazmi Svjetske Zdravstvene Organizacije (SZO). Na slici 2. mogu se uočiti mesta iz kojih se razvijaju pojedini tipovi ne-Hodgkinovih limfoma (NHL) porijeklom iz B stanica.



Preuzeto iz knjige SZO Klasifikacija limfoidnih neoplazmi, 2000.

Slika 2. Pojedinim tipovima ne-Hodgkinovih limfoma ishodište su B limfociti u određenoj fazi razvitka.

Promotrimo li epidemiologiju B staničnih neoplazmi u svjetu one zauzimaju oko 4% novootkrivenih malignih novotvorina godišnje. Češće su u razvijenim zemljama osobito Sjedinjenim Američkim Državama, Australiji, Novom Zelandu i Europi. Najčešći su folikularni limfom i difuzni velikostanični limfom, na koje skupa otpada 50% svih NHL (4).

1.2. Multipli mijelom

Multipli mijelom definiramo kao multifokalnu monoklonalnu proliferaciju plazma stanica u koštanoj srži odnosno kao neoplazmu građenu od malignih plazma stanica (mijelomskih) koje proizvode i luče fragmente monoklonalnih imunoglobulina tj. M-komponente (Ig) (2). Koštana je srž mjesto ishodišta i u većini slučajeva i mjesto širenja tumora. Međutim, i drugi organi mogu biti zahvaćeni ovo neoplazijom (ekstramedularna lokalizacija). Početna transformacija se odvija u B stanicama postgerminativnog centra koje su prošle antigensku stimulaciju „VDJ“ rearanžman, somatsku mutaciju varijabilne regije i izotipsko prekapčanje gena za teški lanac imunoglobulina (Ig) (slika 3) (3). Ove plazmablastične prekursorske stanice koloniziraju koštanu srž, klonalno propagiraju i diferenciraju u polako proliferirajuću populaciju mijelomskih stanica, koje su pod utjecajem raznih citokina (6).

Multipli mijelom je drugi najčešći oblik krvne maligne bolesti. Čini oko 1% svih malignih oboljenja, 10% hematoloških novotvorina i na njega otpada 2% svih smrti zbog malignih oboljenja. Godišnja incidencija MM u svijetu varira od 15 novootkrivenih slučajeva na 100 000 stanovnika u nekim regijama SAD do svega 1,2/100 000 u Kini. Incidencija mijeloma u Europi je 3,9 novootkrivenih slučajeva godišnje na 100 000 stanovnika (6).

Prema podatcima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo učestalost mijeloma u Hrvatskoj iznosi 4,2 na 100 000 stanovnika godišnje. Učestalost je slična i u ostalim europskim zemljama, uz opažanje da statistike u posljednje vrijeme govore o porastu ukupne incidencije (7).

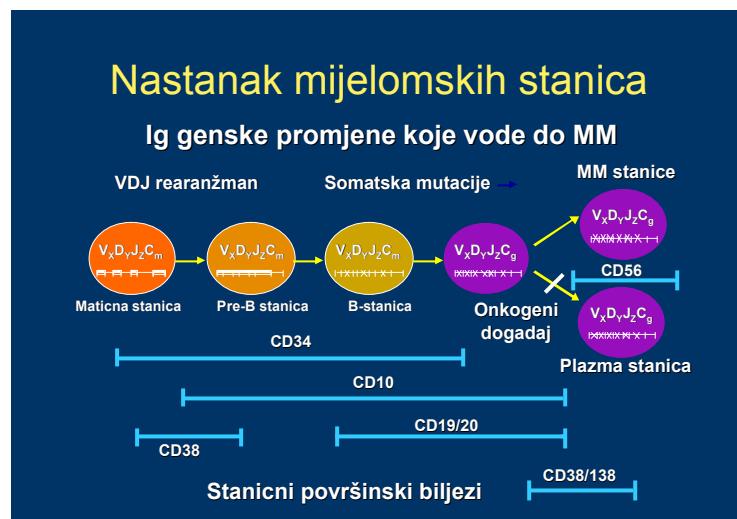
Predilekcija po spolu je po nekim autorima 3:2 M:Ž, dok drugi autori ne opažaju razlike u omjeru koji iznosi 1:1 M:Ž (4,6). U afroameričkoj je populaciji u SAD dvaput

češća pojavnost mijeloma u odnosu na bijelce. MM se gotovo ne pojavljuje u djece i rijetko se pojavljuje u mlađih od 35 godina.

Prosječna dob pojavljivanja je 68 godina, te se u 99% slučajeva dijagnosticira u ljudi iznad 40 godina, a u više od 50% slučajeva su bolesnici stariji od 71 godine života.

Bilježi se porast incidencije s porastom dobi. Sukladno tome najviša je incidencija u devetoj dekadi.

Usprkos značajnom napretku u razumijevanju biologije MM molekularna osnova bolesti je nejasna (8). Znamo da brojne promjene u samim plazma stanicama prethode malignoj transformaciji. Prije svega promjene, koje se nakupljaju u plazma stanicama tijekom vremena, uključuju gensko preuređenje imunoglobulinskih lanaca kao što to prikazuje slika 3.



Preuzeto po uzoru na Kuehl & Bergsagel. Nature Rev Cancer 2002; 2:175-87 i Hideshima T, Anderson K. Nat Rev Cancer. 2002;2:927(9,10).

Slika 3. Gensko preuređenje imunoglobulinskog lanca koje prethodi nastanku multiplog mijeloma.

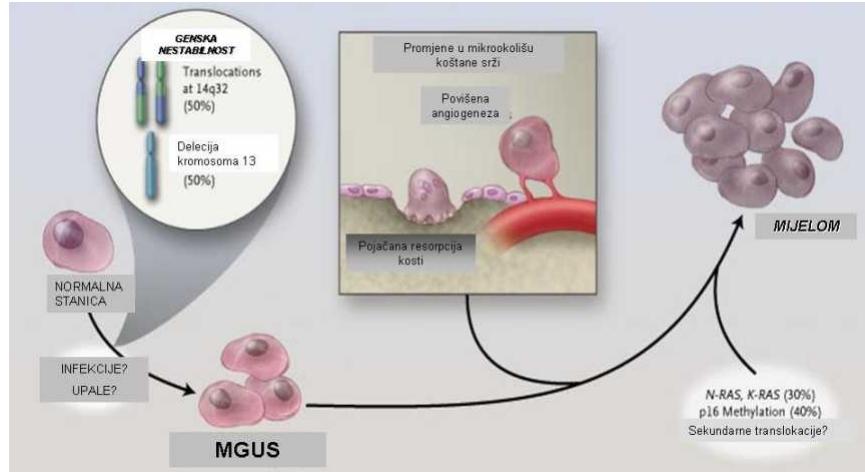
Kromosomske promjene uočavaju se u gotovo 50% multiplih mijeloma i visokom postotku monolonalnih gamapatija, stoga se brojni autori pitaju nije li MGUS preteča multiplog mijeloma.

Citogenetske promjene uključuju razne abnormalnosti kariotipa koje se uočavaju u 30-50% MM. Metodom fluorescentne *in situ* hibridizacije (engl. *fluorescent in situ hybridization*, FISH) prikazana je aneuploidija u gotovo svih oboljelih od MM. Nalaze se različite monosomije (8,13,14,16,22); abnormalnosti koje uključuju 14q32 (lokus teškog lanaca Ig) u 60-70%; translokacije t(11;14), t(4;14), t(14;16). Nadalje, hiperdiploidija u 50-60% (trisomije 3,5,7,9,11,15,19). U gotovo 50% MM prisutna je delecija 13, a nalazi se i del(17p;13.1) i gubitak P53 tumor supresor gena. Utvrđena translokacija teškog lanca imunoglobulina (IgH) kromosoma 14 t(11;14) prognostički je povoljan nalaz, dok delecija na kromosому 13 ima loš prognostički značaj kao i t(4;14), t(14;16), del(17p), del(13) te hiperdiploidija (5).

Interakcija mijelomskih stanica s mikrookolišem koštane srži bitna je u patogenezi multiplog mijeloma. Koštani mikrookoliš sastoji se od vanstaničnih bjelančevina, stromalnih stanica, vaskularnih endotelnih stanica, osteoblasta, osteoklasta koji sudjeluju u procesima angiogeneze putem brojnih citokina.

Može se vidjeti da usporedno s nakupljanjem genskih promjena koje imaju za posljedicu gensku nestabilnost dolazi i do promjena u mikrookolišu lučenjem brojnih citokina i kemokina te aktivacijom procesa angiogeneze (slika 4).

Stanice mijeloma stječu sposobnost rasta i širenja kroz genetske alteracije i klonalnu selekciju (11).



Kyle RA and Rajkumar SV. N Engl J Med 2004;351:1860-73.(12).

Slika 4. Interakcija citogenetski promjenih plazma stanica i mikrookoliša u nastanku mijeloma.

Primjerice, interleukin 6 (IL-6) proizvode pretežno koštane stromalne stanice, a on djeluje kao faktor rasta i na mijelomske stanice i na osteoklaste, stimulirajući pritom njihovu proliferaciju i sprječavajući apoptozu. Nadalje, adhezija mijelomskih stanica na fibronektin ima antiapoptotičko djelovanje, dok vezanje na stromalne stanice dovodi do sekrecije prethodno spomenutih citokina. Time stromalne stanice pružaju neposredno stanicama mijeloma poticaj na proliferaciju. Sličan učinak ima i faktor tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*, TNF).

Koštane promjene su glavno obilježje MM. Mijelomom inducirana destrukcija kosti posljedica je narušene ravnoteže u koštanom mikrookolišu, što ima za posljedicu pojačanu aktivnost osteoklasta, koja nije praćena adekvatnim povećanjem osteoblastne aktivnosti. Rezultat je u konačnici pojačana razgradnja kosti. Danas se zna da interakcija mijelomskih stanica s koštanim mikrookolišem vodi do pojačane osteoklastične aktivnosti i njihove proliferacije putem pojačane proizvodnje citokina koji aktiviraju osteoklaste. Nekoliko je studija pokazalo da citokini poput IL-6, interleukina 1 (IL-1) i TNF stimuliraju osteoklastičnu aktivnost.

Enzimi poput matriksnih metaloproteinaza također imaju bitnu ulogu u aktivaciji osteoklastične aktivnosti u mijelomu. Razne histomorfometrijske studije su pokazale da se ne radi samo o pojačanoj aktivnosti osteoklasta već i o narušenoj osteoblastičnoj funkciji jer je u bolesnika s litičkim lezijama značajno manje osteoblasta snižene aktivnosti (13). U ranim stadijima mijeloma, formiranje kosti je pojačano kao odgovor na resorpciju, no napredovanje bolesti prati smanjenje formiranja kosti i rapidni gubitak koštanog matriksa (13,14). Ova opažanja sugeriraju da bi stanice mijeloma mogle prvo stimulirati osteoblastičnu funkciju tijekom ranih stadija bolesti, a potom inhibirati ili čak toksično djelovati tijekom ekspanzije tumora. Shaughenessy i sur. (15) su pokazali rezultate koji podupiru prethodno izneseni koncept.

Dosadašnja istraživanja ukazuju da pronalaženje novih molekula poput nuklearnog faktora kappa B (engl. *nuclear factor-kappa B*, NF- B), njegovog receptora (engl. *receptor activator of nuclear factor-kappa B*, RANK) te njegovog liganda (engl. *receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand*, RANKL), doprinose boljem razumijevanju patogeneze MM i iznalaženju novih pristupa u terapiji bolesti.

Rast i preživljenje MM u mnogočemu je ovisan o koštanom mikrookolišu, a njegova je ekspanzija neposredno udružena s pojačanom angiogenezom u blizini tumorskih stanica o čemu će još biti riječi (16).

Vodeći klinički simptomi uključuju bol u kostima (leđima, rebrima ili udovima) zbog osteolitičkih lezija ili generalizirane osteoporoze. U uznapredovalom stadiju bolesti urušavanje kralježaka može dovesti do gubitka visine, a česte su i patološke frakture. Simptomi poput umora i slabosti izazvani anemijom učestali su pri inicijalnoj

prezentaciji bolesti. Nasuprot navedenom, u nekih bolesnika infekcije, krvarenje, ili simptomi bubrežne insuficijencije i hiperkalcemije su prve manifestacije oboljenja.

U rjeđe simptome pri prvoj prezentaciji spadaju neurološki ispadi zbog kompresije kralježnične moždine, a u vrlo rijetke organomegalija zbog ekstramedularne tumorske mase ili amiloidoza. U tablici 2. navedeni su simptomi koji su posljedica povećanog broja plazma stanica u koštanoj srži, odnosno njihovog učinka na druge organe i organske sustave.

Fizikalni pregled nije od veće važnosti pri postavljanju dijagnoze.

Tablica 2. Posljedice povišenog broja plazma stanica i simptomi koji se pritom pojavljuju.

UČINAK POVEĆANOG BROJA MIJELOMSKIH STANICA U KOŠTANOJ SRŽI	UZROK	SIMPTOM
anemija	smanjeno stvaranje i aktivnost crvenih krvnih stanica	umor, slabost
visoka koncentracija proteina (u serumu ili urinu)	abnormalni monoklonski protein se pojačano stvara od strane mijelomske stanice i otpušta u krvotok te prelazi u urin	otežana cirkulacija moguće oštećenje bubrega
oštećenje kostiju slabljenje koštane strukture / osteoporoza	mijelomske stanice aktiviraju stanice u kostima (osteoklaste), koji razaraju kost i blokiraju drugu vrstu stanica (osteoblaste) čija je uloga popraviti oštećenja kosti	koštana bol prijetili kostiju smetenost, manjak tekućine (dehidratacija), zatvor stolice, umor, slabost
litice lezije (razjadi kosti), prijetili ili slegnuće kralješaka,		
visoka razina kalcija u krvi	kalcij se iz oštećenih kostiju otpušta u krvotok	
smanjena funkcija imunog sustava u borbi protiv infekcija	mijelomske stanice sprečavaju stvaranje normalnih protutijela protiv mikroorganizama, uzročnika infekcija	podložnost razvoju infekcija/produženo vrijeme oporavka nakon infekcije

Preuzeto po uzoru na http://www.mijelom.hr/o_bolesti/?p=simptom. 2007(17)

Uz obrzanu sedimentaciju eritrocita nalaz krvne slike kod većine bolesnika pokazuje normocinu, normokromnu anemiju (18).

U razmazu periferne krvi najuočljiviji su slijepjeni eritrociti koji stvaraju tzv. „roleaux“ formacije. Njihova izraženost izravno korelira s količinom i tipom monoklonalnih Ig i u pravilu se opaža paralelno s povišenjem sedimentacije. Cirkulirajuće se plazma stanice mogu naći u malom broju u oko 15% bolesnika, češće u terminalnim stadijima bolesti.

Obično se bolest dijagnosticira po otkriću šiljka u području imunoglobulina na elfelogramu proteina seruma. Tip monoklonalnih Imunoglobulina tj. M-komponenta se definitivno utvrđuje imunofiksacijom proteina seruma. Monoklonalni laki lanci proteina (Bence-Jones) može se naći u urinu u oko 2/3 bolesnika ponekad bez prisutnosti monoklonalnog proteina u serumu.

Standardna dijagnostika multiplog mijeloma uključuje još radiološke snimke skeleta, te citološku i patohistološku analizu koštane srži. Testovi koji se koriste pri probiru, dijagnozi i procjeni veličine tumorske mase prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Testovi koji se koriste tijekom dijagnostike, terapije i u prognozi mijeloma.

<i>Testovi probiranja</i>	<i>Testovi za postavljanje prognoze</i>	<i>Testovi za procjenu veličine tumora i prognoze</i>	<i>Testovi za otkrivanje oštećenja organa</i>	<i>Testovi za posebne situacije</i>
SE, KKS, viskozitet plazme	Aspirat koštane srži (KS) +/- biopsija	citogenetika KS i FISH	KKS (anemija)	imunohistologija KS, protočna citometrija (imunofenotipizacija)
urea, kreatinin, elektroliti, Ca, albumin, urati, elektroforeza proteina seruma i urina, kvantifikacija ne-izotopskih imunoglobulina	Imunofiksacija proteina u serumu i urinu	kvantifikacija monoklonskog proteina u serumu i urinu, kalcij, albumin, β_2 mikroglobulin	urea, kreatinin, klirens kreatinina, kalcij, albumin, LDH i CRP Kvantifikacija ne-izotopskih imunoglobulina	vitamin B12, folati
Rtg simptomatskih područja	Rtg cijelog skeleta	Rtg cijelog skeleta	Rtg cijelog skeleta	MRI, CT

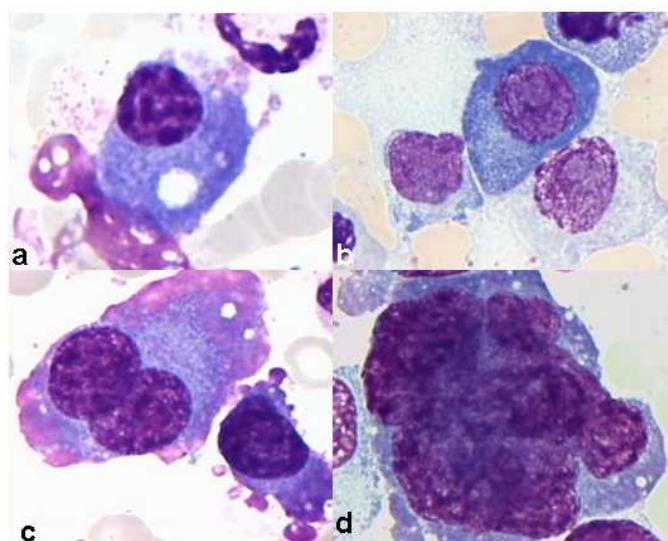
Preuzeto po uzoru na http://www.mijelom.hr/o_bolesti/?p=simptom. 2007(17)

Monoklonalni M-komponente mogu biti Imunoglobulini klase G, A, D, E, M, biklonalni ili samo laki lanci. Po učestalosti na prvom su mjestu IgG 55 %, IgA u 22 %, samo laki lanci u 18% te IgD i biklonalni u 2% (6).

Analiza koštane srži je važan element u dijagnostici MM i indicirana je bez obzira na indikativne imunološke ili radiološke nalaze. Nadalje, analiza koštane srži je osim pri postavljanju dijagnoze značajna i u praćenju terapijskog odgovora u bolesnika te pri dijagnozi recidiva.

Aspirat koštane srži i koštani cilindri su neophodni za adekvatnu evaluaciju. Oni su u većini slučajeva od neovisnog dijagnostičkog značaja no ponekad je potrebna

kombinacija obje metode za postavljanje dijagnoze. U prosjeku se u literaturi navodi da se u bolesnika s MM u aspiratima koštane srži nalazi 20-36% plazma stanica (19). Morfološka obilježja atipičnih plazma stanica se uočavaju na jezgri i citoplazmi (slika 5). Stanice su obično veće od normalnih plazma stanica, no mogu biti normalne veličine ili čak i manje; obilne do srednje obilne, bazofilne citoplazme. U citoplazmi se mogu vidjeti prosvijetljenja, vakuole, granule, hijaline inkluzije, te male ili veće kristalične inkluzije (u bolesnika sa mijelomom koji boluju od Fanconijevog sindroma). Inkluzije po tipu Russelovog tjelešca bilo intracitoplazmatske bilo intranuklearne su relativno česte, nasuprot Dutcherovim tjelešcima bliјedim, pojedinačnim intranuklearnim inkluzijama koje su rijetke. Jezgra je obično veća od normalne, u većini slučajeva slabije kondenziranog kromatina te varijabilno istaknutih nukleola.



Slika 5. Morfološka obilježja atipičnih plazma stanica u razmazu koštane srži bojano May-Grimwald-Giemsa bojanjem. a) Zrela plazma stanica na povećanju x1000; b) Atipična plazma stanica istaknute jezgrice na povećanju x1000; c) binuklearna plazma stanica s eozinofilnim protruzijama citoplazme na povećanju x1000; d) multinuklearna atipična plazma stanica bizarnog oblika na povećanju x1000.

Citološka klasifikacija dijeli mijelome u *zrele*, *intermedijarne*, *nezrele* i *plazmablastične* (6). Ta je podjela u neposrednoj vezi s preživljnjem jer bolesnici s plazmablastičnim mijelomom imaju medijan preživljjenja 10 mjeseci u usporedbi s 35 mjeseci za sve ostale tipove, među kojima se ne opažaju značajne razlike u preživljjenju. Postoje i druge klasifikacije koje uključuju tri ili šest citoloških tipova (20,21).

Pokušaji da se utvrdi povezanost morfoloških obilježja i tipa Ig su se pokazali neuspješnim izuzev kod malog broja IgA mijeloma čije su plazma stanice izrazito pleomorfne s krupnim multinuklearnim stanicama, „plamtećim“ plazma stanicama te blijedim stanicama fragmentirane citoplazme (6). U istom su tipu mijeloma značajno češće intranuklearne inkluzije (6). Neke studije su prikazale da je 20% IgD mijeloma “limfoplazmacitoidno” (6).

U histološkim preparatima koštane srži infiltrat stanica može biti *intersticijski*, *nodularni* ili *difuzni* (20,22). Stupanj zahvaćenosti koštanog uzorka varira od malih nakupina plazma stanica u normocelularnoj koštanoj srži do hipercelularne koštane srži u potpunosti infiltrirane plazma stanicama. Opisani su načini infiltrata u koštanoj srži proporcionalni s proširenošću bolesti. Tako su intersticijski i nodularni oblik infiltrata povezani s očuvanom normalnom hematopoezom i značajnom poštedom koštane srži, za razliku od difuzno prožete koštane srži u kojoj dolazi do supresije hematopoeze. Opaža se progresija od intersticijskog i nodularnog infiltrata u ranim stadijima bolesti prema difuznom u uznapredovalom (20).

Predloženo histološko određivanje stadija uključuje (20):

- histološki stadij I - u kojem je u manje od 20% uzorka infiltrat plazma stanica;
- histološki stadij II - 20-50% uzorka su plazma stanice i

- histološki stadij III - u kojem su plazma stanice u više od 50% uzorka.

Nalazi se dobra korelacija između opisanog histološkog stadija i kliničkog stadija bolesti i prognoze (20).

Na koštanom cilindru je teško uočiti morfologiju atipične plazma stanice, poput onih plazmablastičnog i limfoidnog oblika, lobuliranih jezgara kao i izrazito pleomorfnih plazma stanica. U tim je slučajevima citološka analiza superiornija.

U koštanoj se biopsiji oboljelih od MM opaža u gotovo 9% slučajeva umnažanje retikulinskih vlakana te fibroza. Izražena fibroza snažno je povezana s agresivnom bolešću i opsežnim koštanim infiltratima.

Multipli se mijelom javlja u nekoliko oblika: nesekretorni mijelom, indolentni mijelom, šuljajući (engl. *smoldering*) mijelom te plazmastanična leukemija. Tablica 4. i 5. prikazuje dijagnostičke kriterije potrebne za klasificiranje pojedinog tipa multiplog mijeloma te monoklonalne gamapatije nepoznatog značenja.

Tablica 4. Kriteriji za postavljanje dijagnoze multiplog mijeloma.

A. Dijagnoza multiplog mijeloma zahtijeva minimalno jedan glavni i jedan sporedni kriterij ili tri sporedna kriterija koji moraju uključivati (1) i (2). Ovi kriteriji se moraju manifestirati u simptomatskih bolesnika s progresivnom bolešću.
B. Glavni kriteriji: - plazmocitoza u srži (>30%) - plazmocitom u biopsiji - M komponenta: Serum: IgG >3,5g/L, IgA>2g/L Urin: >1g/24h Bence Jones proteina
C. Sporedni kriteriji 1. plazmocitoza u srži (10-30%) 2. M- komponenta: prisutna, ali manje od gore navedenog - litičke lezije kostiju - reducirani normalni imunoglobulini (<50% od normalnog): IgG <600 mg/L, IgA <100 mg/L, IgM <50 mg/L

Preuzeto iz knjige SZO Klasifikacija limfoidnih neoplazmi, 2000.

Tablica 5. Kriteriji za dijagnozu MGUS, šuljajućeg i indolentnog mijeloma.

A. MGUS:
- serumska M- komponenta prisutna <30g/L
- plazmocitoza u srži < 10%
- nema litičkih koštanih lezija
- nema mijelomu-pridruženih simptoma
B. Šuljajući mijelom; isto kao MGUS osim:
- plazmocitoza u srži (10-30%)
- serumska M- komponenta kao kod $\geq 30\text{g/L}$
C. Indolentni mijelom; isto kao mijelom osim:
- M- komponenta : IgG<70g/L, IgA <50g/L
- rijetke litičke lezije kostiju (< 3 litičke lezije) bez kompresivnih frakturna
- normalni hemoglobin, serumski kalcij i kreatinin
- bez infekcija

Preuzeto iz knjige SZO Klasifikacija limfoidnih neoplazmi, 2000.

U tablici 6. navedeni dijagnostički kriteriji važni za razlikovanje MGUS, asimptomatskog i simptomatskog oblika MM.

Tablica 6. Usporedno prikazani dijagnostički kriteriji za MGUS te asimptomatski (šuljajući ili indolentni) i simptomatski multipli mijelom.

MGUS	Asimptomatski MM / stadij IA MM po Durie/Salmon stupnjevanju	Simptomatski MM
Serumska M-komponenta <30g/L	Serumska M-komponenta u =30g/L	M-protein u serumu ili u urinu
Plazma stanice u koštanoj srži <10% i niska razina infiltracije u bioptatu KS	Plazma stanice u koštanoj srži i/ili biopsiji tkiva =10%	Plazma stanice (klonalne) u koštanoj srži ili MM potvrđen biopsijom

Nepostojanje oštećenja organa uzrokovano mijelomom (uključivo koštane lezije) ili simptoma	Nepostojanje oštećenja organa uzrokovano mijelomom (uključivo koštane lezije) ili simptoma	Bilo koje oštećenja organa uzrokovano mijelomom (uključivo koštane lezije) ili simptoma.
Nepostojanje dokaza o drugoj B staničnoj proliferativnoj bolesti ili amiloidozi lakin lanaca, ili oštećenja tkiva lakin lancima, teškim lancima ili imunoglobulinima		

Preuzeto po uzoru na http://www.mijelom.hr/o_bolesti/?p=simptom. 2007

Plazmastanična leukemija je oblik u kojem je broj plazma stanica u krvi viši od 20% ukupnog broja leukocita ili apsolutni broj plazma stanica prelazi $2 \times 10^9 /L$. Može se pojaviti kao primarni oblik bolesti (u 2% svih mijeloma) ili kasnije tijekom bolesti. Većina neobičnih i rijetkih bilo kliničkih bilo laboratorijskih abnormalnosti je povezana upravo s plazmastaničnom leukemijom. Oboljeli su obično mlađi u odnosu na MM, imaju loš odgovor na terapiju te kraće ukupno preživljenje (oko 6 mjeseci).

Za dijagnozu multiplog mijeloma neophodan je povišeni postotak plazma stanica u koštanoj srži, u većini slučajeva barem 10% plazma stanica; monoklonalna gamapatija u serumu ili urinu, 30 g/L monoklonalnih proteina u serumu ili više od gram/dnevno kappa ili lambda laktih lanaca u urinu (23,24).

Nakon postavljanja dijagnoze potrebno je odrediti stadij bolesti što ima i značajnu prognostičku važnost. Za određivanje stadija bolesti primjenjuje se Durie-Salmon klasifikacija, koja se koristi još od 1975. godine, tablica 7 (25).

Tablica 7. Durie-Salmon klasifikacija multiplog mijeloma.

Stadij I
- niska M komponenta; IgG <50g/L, IgA <30g/L; Bence Jones (BJ) protein u urinu < 4g/24h
- odsutne ili solitarne koštane lezije
- normalna koncentracija hemoglobina, serumskog kalcija i imunoglobulina (bez M-komponente)
Stadij III, bilo koji ili više od navedenog:
- visoka M komponenta; IgG >70g/L, IgA >50g/L BJ protein u urinu 12g/24h
- brojne koštane lezije
- hemoglobin <85 g/L, serumski kalcij >2,99 mmol/L
Stadij II : - ukupne vrijednosti između I i III
Subklasifikacija prema bubrežnoj funkciji
A = serumski kreatinin <177 µmol/L
B = serumski kreatinin >177 µmol/L
Primjeri:
Stadij IA = mala mijelomska masa (< $0,6 \times 10^{12} /m^2$) s normalnom bubrežnom funkcijom
Stadij IIIB= velika mijelomska masa (< $1,2 \times 10^{12} /m^2$) s abnormalnom bubrežnom funkcijom

Preuzeto iz knjige SZO Klasifikacija limfoidnih neoplazmi, 2000.

Multipli mijelom je još uvijek neizlječiva bolest, medjan preživljenja je 3 godine, a 10% oboljelih preživi 10 godina (26,27). Bolesnici u stadiju I imaju medjan preživljenja > 60 mjeseci, stadij II 41 mjesec, te stadij III 23 mjeseca (25,28). Bolesnici s bubrežnom insuficijencijom imaju srednje preživljenje svega 8 mjeseci u odnosu na bolesnike s normalnom bubrežnom funkcijom kod kojih je srednje preživljenje 37 mjeseci.

Poznati prognostički čimbenici uključuju vrijednosti hemoglobina, serumske vrijednosti kalcija, laktat dehidrogenaza (LDH), broj litičkih lezija kostiju, vrijednost M-komponente, koncentracija β 2-mikroglobulina (β 2-M), C reaktivnog proteina i albumina u serumu (29). Povoljni prognostički klinički parametri su mlađa dob bolesnika i dobro opće stanje bolesnika.

Međunarodna skupina za multipli mijelom (engl. *international myeloma working group*) predložila je novi Internacionalni Prognostički Indeks (IPI) za mijelom koja se zasniva na određivanju vrijednosti β 2-M i albumina, a dijeli se u tri stadija :

Stadij I β 2-M <3,5 mg/L i albumin =35 g/l

Stadij II β 2-M <3,5 mg/L; albumin =35 g/l ili β 2-M 3,5-5,5 mg/L

Stadij III β 2-M >5,5 mg/L.

Terapija osnovne bolesti u MM uključuje primjenu antitumorske terapije sa ciljem postizanja kompletne remisije koju definiramo odsutnošću M-komponente u serumu i urinu metodom imunofiksacije u trajanju od najmanje 6 tjedana, manje od 5% plazma stanica u koštanoj srži i odsutnost novih osteolitičkih lezija te nepostojanje plazmacitoma mekih tkiva (18).

U terapiji se koriste glukokortikoidi sami ili u kombinaciji citostatika poput melfalana, vinkristina, deksametazona (shema VAD). Primjenjuju se imunomodulatorni lijekovi (talidomid, lendalidomid) te proteosomni inhibitor (bortezomib) kao predstavnik nove generacije „pametnih“ lijekova u refraktornoj bolesti (30).

Osim antitumorske, suportivna terapija ima veliki značaj u liječenju multiplog mijeloma. Anemija se primjerice osim simptomatski transfuzijama eritrocita liječi i primjenom eritropoetina, dok koštana bolest zahtijeva primjenu bisfosfanata (18).

1.3. Angiogeneza i njezina uloga u multiplom mijelomu

Folkman i (31) su još 1971. godine pretpostavili da je rast novotvorine ovisan o angiogenezi. Utvrdili su povezanost tumorskih stanica i krvnih žila u novotvorini te ih obilježili kao visoko integrirani ekosistem u kojem endotelne stanice prelaze iz "mirnog" stanja u fazu brze proliferacije pod djelovanjem brojnih signala iz tumorskog parenhima ili strome. Danas znamo da tumorski parenhim i stroma mogu biti mjesta terapijskog djelovanja. Radovi drugih autora poput Blooda i (32) koji su utvrdili da tumor *in vitro* može narasti svega 4 mm, a *in vivo* 2 mm ukoliko ne razvije vlastitu mrežu krvnih žila išli su u prilog Folkmanovoj teoriji. Brojna istraživanja, primjerice na tumorima središnjeg živčanog sustava (33), tumorima glave i vrata (34), karcinomu ždrijela i grkljana (35), pluća (36), štitnjače (37), probavnog sustava (38), jednjaka (39), testisa (40), dojke (41), stidnice (42), maternice (43), jajnika (44) te karcinomu prijelaznog epitela mokraćnog mjeđura (45), su potvrđila povezanost povećanog broja malih krvnih žila u novotvorini i različitim čimbenika tumorske agresivnosti,

odnosno lošije prognoze poput većeg tumorskog stadija bolesti, veće učestalosti metastaza i kraćeg ukupnog preživljenje bolesnika.

Angiogeneza se u navedenim primjerima pokazala neovisnim prognostičkim čimbenikom u usporedbi s tradicionalnim prognostičkim čimbenicima u multivarijatnoj analizi.

Izravna potvrda i dokazi da angiogeneza utječe na rast i progresiju novotvorine pokazana je kroz znanstvene studije i istraživanja zaustavljenog rasta novotvorine nakon specifične inhibicije angiogeneze (46). Inhibicija angiogenih čimbenika je zaustavljanje otpuštanja angiogenih čimbenika iz tumorskih ili stromalnih stanica i/ili njihova neutralizacija nakon što ih navedene stanice otpuste, a prije nego se vežu za endotelne stanice. Angiogeni čimbenici mogu se blokirati neutralizirajućim protutijelima, topivim receptorskim molekulama te različitim sintetskim spojevima (47). Na životinjskim su se modelima protutijela protiv vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. Vascular endothelial growth factor, VEGF), bazičnog fibroblastnog faktora rasta (engl. Basic fibroblast growth factor, bFGF) te antagonisti angiogenina pokazali efikasni u blokiranju angiogeneze (47,48).

Inhibicija proliferacije i migracije endotelnih stanica može se ostvariti pomoću više spojeva koji dovode do specifične inhibicije proliferacije i/ili migracije endotelnih stanica. Primjer spoja koji ima takvo djelovanje je prirodni antibiotik Fumagillin iz gljivice *Aspergillus fumigatus*. Navedeni učinci su dokazani u staničnoj kulturi, no njegova se primjena kod eksperimentalnih životinja pokazala toksičnom (49). TNP-470 je njegov sintetski analog, snažan inhibitor angiogeneze s manjom toksičnošću (50). Angiostatski učinak dokazan je na glioblastomu i kolorektalnom karcinomu (51,52).

Inhibicija sinteze i remodeliranja bazalne membrane i vanstaničnog matriksa sljedeći je način moguće inhibicije angiogeneze. Kao što je već rečeno angiogeneza uključuje proliferaciju i migraciju endotelnih stanica, degradaciju bazalne membrane i organizaciju novog lumena. Unutar ovakvog mikrookoliša mreža uravnoteženih pro- i anti-angiogenih regulatora koje produciraju aktivirane endotelne stanice, monociti, trombociti pa i same tumorske stanice determiniraju angiogeni odgovor. Svi proteolitički enzimi koje stvaraju endotelne stanice olakšavaju probijanje tumorskih stanica kroz stromu novotvorine, stijenu krvne žile ili limfne žile čime u biti započinje proces metastaziranja. Primjećeno je da je veliki postotak tumora u ljudi prisutan mjesecima ili čak godinama bez stvaranja metastaza do trenutka kada jedan klon zločudnih stanica ne stekne *angiogeni fenotip*, što u osnovi znači narušavanje ravnoteže između angiogenih čimbenika (pozitivni regulatori) i inhibitora angiogeneze (negativni regulatori) (53). Angiogene čimbenike proizvode same tumorske stanice, stanice tumorske strome ili se mobiliziraju iz vanstaničnog matriksa (54). Glavni čimbenici rasta u angiogenezi su VEGF, bFGF te hepatinski faktor rasta (engl. *hepatal growth factor*, HGF). Ostali pozitivni regulatori su angiotropin, angiogenin, epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF), granulocitni kolonija stimulirajući faktor (engl. *granulocyte colony stimulating factor*, G-CSF), IL-1, IL-6, IL-8, monocitni kemotaktični protein (engl. Monocyte chemotactic protein, MCP-1), faktor rasta podrijetlom iz trombocita (engl. *platelet derived growth factor*, PDGF), faktor tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*, TNF- α) i matriksne metaloproteinaze (55,56). Među najvažnije inhibitore angiogeneze se ubrajaju: angiostatin, trombospondin-1, endostatin, interferon-alfa (IFN- α) i drugi.

Postavlja se pitanje kojim mehanizmima angiogeneza potiče rast i rasap tumora?

Mehanizama je nekoliko, no čini se najbitnijim da novostvorene krvne žile doprinose učinkovitijoj prehrani tumora dovođenjem kisika i hranjivih tvari i istovremenim bržim uklanjanjem tumorskih metabolita (57). Nadalje, novostvorene endotelne stanice produciraju najrazličitije kemokine, citokine, (čimbenike rasta) i proteolitičke enzime koji autokrino i parakrino potiču rast i napredovanje tumora (58).

Angiogeneza kao biološki fenomen stvaranja novih krvnih žila, prisutna je u koštanoj srži kod raznih plazma staničnih poremećaja i posebna je značajka aktivnog MM. Stoga se inhibicija tumorske angiogeneze pokazala kao obećavajući pristup u liječenju malignih bolesti pa tako i multiplog mijeloma (13,59,60).

Mehanizam indukcije angiogeneze u MM primarno ide preko produkcije VEGF o čemu će biti riječi u slijedećem poglavlju. VEGF pokreće Flt-1 fosforilaciju (VEGFR1) i aktivaciju MEK/ERK i PI-3K/PKC α signalne kaskade, promovirajući tako blagu proliferaciju i naglašenu migraciju stanica mijeloma. Stanice mijeloma manjim dijelom i same proizvode VEGF (autokrino djelovanje), dok je značajnija produkcija posredovana stromalnim stanicama (parakrina stimulacija). Poznato je da osim VEGF stromalne stanice i osteoblasti proizvode i brojne druge citokine poput IL-6, MCP-1 i TNF α koji su esencijalni za rast stanica mijeloma (61).

1.4. . Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i njegova uloga u multiplom mijelomu

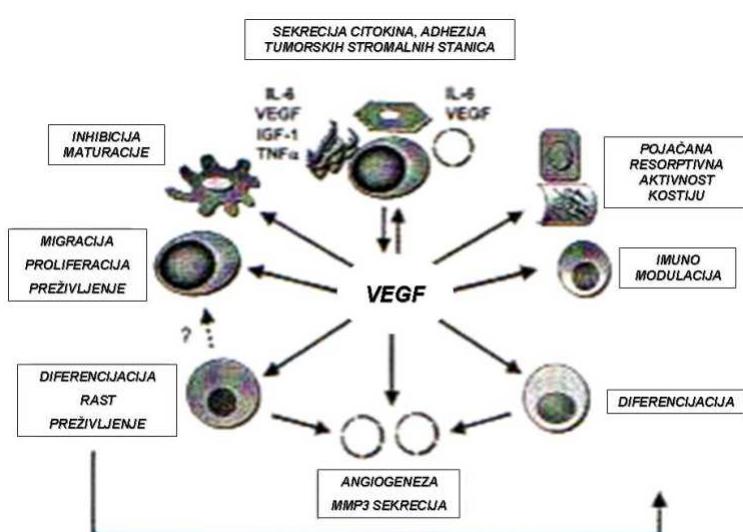
Vaskularni endotelni faktor rasta je protein prvi put opisan kao vaskularni permeabilni faktor (engl. *vascular permeability factor*, VPF) davne 1980 (62), potom je imenovan kao VEGF i danas se smatra prototipom cijele skupine angiogenih proteina. VEGF

obitelj skupina je strukturno povezanih dimerskih glikoproteina koji su članovi superfamilije PDGF faktora rasta. VEGF obitelj uključuje VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E i placentalni faktor rasta (engl. *placental derived growth factor*, PIGF). Aktivna je forma sintetizirana u vidu homodimera (40-45 kDa) ili kao heterodimer s drugim članovima obitelji. Gen za VEGF-A se nalazi na kromosomu 6p21.3 i kodira ga 8 eksona i 7 introna. Alternativnim cijepanjem proteinske strukture nastaju četiri glavne izoforme koje se međusobno razlikuju primarno po svojoj bioviabilnosti, ovisnoj o heparin i heparin sulfat vežućim domenama. VEGF je povišen u raznim tumorima u ljudi, uključujući karcinom dojke, pluća, mozga, gušerače, jajnika, mokraćnog mjehura i bubrega (62). Iskazuju ga i stanice multiplog mijeloma (63). VEGF -A, -B, -C, -D te PIGF pokazuju afinitet različitog intenziteta prema tri tirozin kinazna receptora VEGFR-1, VEGFR-2 i VEGFR-3. VEGFR-1 i VEGFR-2 su iskazani u svim adultnim endotelnim stanicama, izuzev vaskularnih endotelnih stanica mozga (64). VEGFR-1 i stanice multiplog mijeloma (65).

Uloga VEGF je ključna u poticanju nastanka endotela tumorskih krvnih žila (vaskulogeneza) nakon koje slijedi angiogeneza i to ekspanzijom od primitivne mreže preko pupanja, premoštavanja i grananja novonastalih krvnih žila. Osim neposrednog učinka VEGF stimulira i privlači visoko proliferativne cirkulirajuće endotelne prekursore (angioblaste) iz koštane srži, hematopoetske matične stanice, usmjerne matične stanice, monocite i makrofage (66,67). Osim što je esencijalan regulator fiziološkog endotelnog rasta, permeabilnosti i migracije in vivo i in vitro (68-71), VEGF je značajan čimbenik u hematopoezi gdje utječe na diferencijaciju raznih staničnih linija. Osim njih, VEGF inhibira sazrijevanje dendritičkih stanica inhibirajući NF- B/p65 (72).

Promatran u kontekstu tumorske patologije VEGF je značajan čimbenik za rast, migraciju i preživljjenje tumorskih stanica u multiplom mijelomu, leukemiji, Kaposijevom sarkomu (73-75). Brojni se učinci VEGF očituju u djelovanju na različite tipove stanica poput endotelnih, dendritičkih stanica, osteoblasta, osteoklasta, fibroblasta, cirkulirajućih endotelnih prekursora i hematopoetskih matičnih stanica (62). U solidnim je tumorima utvrđena značajna uloga VEGF u induciranju neovaskularizacije, a 1993. godine prepoznat je njegov značaj i u leukemijama te drugim hematološkim bolestima (76,77).

VEGF je uključen ne samo u proces angiogeneze već i u brojne procese proliferacije, migracije, diferencijacije, preživljjenja, inhibicije maturacije i imunomodulacije, kao što je prikazano na primjeru plazma stanica na slici 6.



Preuzeto iz Podar i sur. 2005.(62)

Slika 6. Pleiotropni učinci VEGF u različitim procesima u plazma stanici.

VEGF direktno stimulira stanice mijeloma da proliferiraju, migriraju preko autokrinog i parakrinog učinka. No čini se osobito važnim istaknuti da osim mijelomske stanice u

koštanoj srži oboljelih on stimulira brojne druge stanice hematopoeze kao i stanice strome, potičući na taj način proliferaciju B limfocita i stanica mijelopoeze (72,78). U skladu sa svime do sada navedenim vidljivo je da su velika očekivanja od terapijskih pristupa koji su za ciljnu molekulu imali VEGF i njegove receptore bila opravdana.

1.5. Monocitni kemotaktični protein (MCP-1) i njegova uloga u multiplom mijelomu

Zna se da tumorske stanice luče kemokine kao i da posjeduju različite receptore za kemokine (79). Nekoliko je mehanizama opisano kojima kemokini utiču na patogenezu tumora. Prije svega njihov se učinak ostvaruje neposrednim djelovanjem receptora za kemokine na tumorskim stanicama. Zna se da se njihovom aktivacijom pokreću signalni putevi procesa proliferacije i preživljjenja tumorskih stanica (80). Kemokini kao tvari kemotaktičnih osobina pojačavaju migratornu sposobnost tumorskih stanica i izravni su čimbenici rasta (81). Naposljetku, poznato je da stanice brojnih tumora stvaraju kemokine i na taj način ostvaruju interakcije sa stanicama mikrookoliša u kojem se nalaze dodatno pojačavajući svoju migratornu sposobnost (82).

Sekrecija proangiogenih kemokina dokazana je u Hodgkinovom limfomu, karcinomu dojke i staničnim linijama karcinoma jajnika (83). Za tumorski rast je neophodno formiranje novih krvnih žila kao što je već izneseno. Dokazano je da kemokini mogu imati proangiogeni i antiangiogeni učinak (84).

MCP-1 je član obitelji kemokina čiji je značaj prepoznat u injicijaci i progresiji upale. Njegovim vezivanjem za specifične receptore (CC-kemokin receptora R2, CCR2) inducira se lučenje brojnih proinflamatornih signala te kemotaksija monocita (85).

Rast gotovo svakog tumora je u nekoj mjeri povezan s pojavom upalne reakcije koja može djelovati protumorski, indukcijom tumorske angiogeneze i na druge načine (86).

Opisano je da MCP-1 kojeg proizvode hipoksijom inducirani astrociti djeluje na migratornu sposobnost neuralnih progenitorskih stanica (87). Njegovo kemotaktično djelovanje je potvrđeno i u folikularnom limfomu (88). Brojni kemokini poput CXCL4, CXCL9, CXCL10 pokazuju antiangiogeno djelovanje (82), nasuprot CXCL12 i MCP-1 koji stimuliraju angiogenezu (84). MCP-1 je prepoznat kao snažan proangiogeni kemokin (89,90).

Posljednjih godina uočava se značaj MCP-1 i njegovih receptora u patogenezi tumorskog rasta u koštanoj srži i koštanoj destrukciji u mijelomu (91). Pellegrino i sur. (92) pokazali su na eksperimentalnom modelu da endotelne stanice u multiplom mijelomu imaju više razine CXC-kemokina kao i da ih izloženost kemokinima poput MCP-1 stimulira na proliferaciju i kemotaktičnu aktivnost. Stanice MM su, kao što je više puta do sada naglašeno, smještene u srži gdje primaju odgovarajuće poticajne signale za proliferaciju i preživljjenje. Da bi se mogle širiti koštanom srži stanice MM migriraju iz vaskularnog u ekstravaskularni koštani odjeljak, što je poznato kao proces udomljenja (engl. *homeing*) (93).

Studija Menu i sur. (93) te drugih autora je pokazala da je MCP-1 odgovoran prije svega za migraciju stanica MM kroz koštanu srž, da bi kad su premostile endotel, tumorske stanice invadirale ekstracelularni matriks ponajviše uz pojačanu produkciju matriksnih metaloproteinaza-9. U trenutku kada su kolonizirale srž, stanice MM su podložne djelovanju IGF-1 koji ih stimulira na proliferaciju i lučenje VEGF.

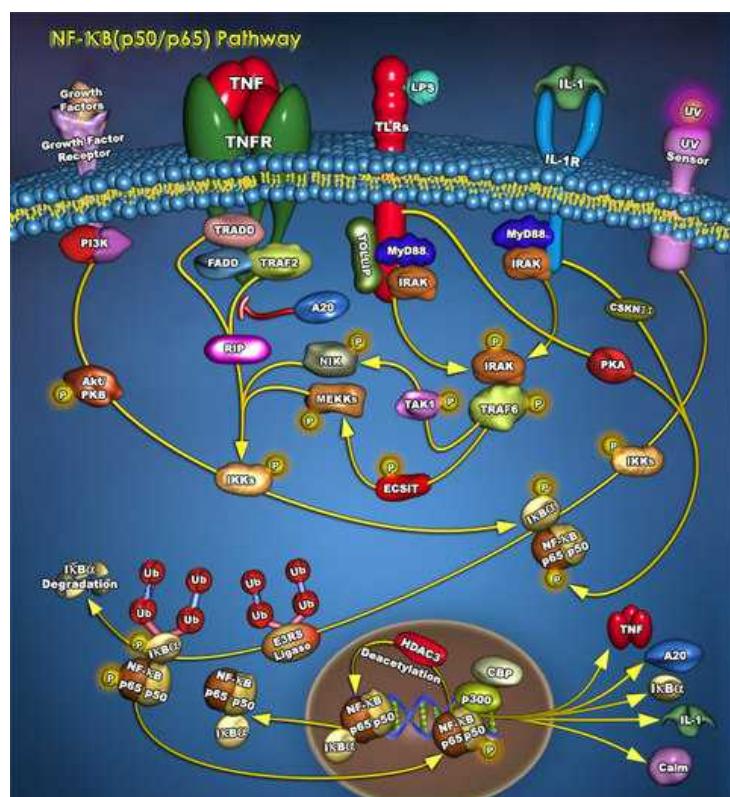
Silvestris i sur. (94) proučavali su narušen mehanizam remodeliranja kosti u MM, što ima za posljedicu metastaziranje, odnosno širenje malignih stanica multiplog mijeloma skeletom. Zanimalo ih je da li je ovaj proces ovisan o pojačanoj apoptozi osteoblasta ili je reguliran prije svega procesima u koštanom mikrookolišu. Utvrđeno je da su razine cirkulirajućih proteina poput TNF- α , interferona- γ , IL-1 i IL-6 više u bolesnika s izraženom koštanom destukcijom. Njihovi osteoblasti konstitutivno eksprimiraju Fas, DR4/DR5 kompleks kao i receptore TNF posredovanog puta apoptoze, intracelularne adhezijske molekule-1 (ICAM-1) i naravno MCP-1. Ti su osteoblasti vrlo brzo ulazili u apoptozu, za razliku od kontrolne skupine osteoblasta bolesnika s normalnom srži (95). Miješane kulture (tzv. ko-kulture) osteoblasta i MMC-2 stanične linije su pokazale uzlaznu regulaciju ICAM-1 i MCP-1, na isti način kao i kontrolna skupina osteoblasta pokazavši time da u mikrookolišu multiplog mijeloma visoka razina citokina (za nas važnog MCP-1) i fizička interakcija malignih plazma stanica i osteoblasta dovode do ubrzane apoptoze i neadekvatnog stvaranja nove kosti. Pokazana je uzlazna regulacija mRNA MCP-1 u osteoblastima bolesnika s opsežno zahvaćenom koštanom srži uz istovremeno opažanje pojačane ekspresije CCR2, liganda MCP-1 u stanicama multiplog mijeloma (96,97).

MCP-1 se do sada pokazao značajan kao kemotaktični faktor za stanice mijeloma, dok je njegov značaj u procesu angiogeneze u mijelomu potrebno ispitati.

1.6. Nuklearni faktor kappa B (NF- κ B) i njegova uloga u multiplom mijelomu

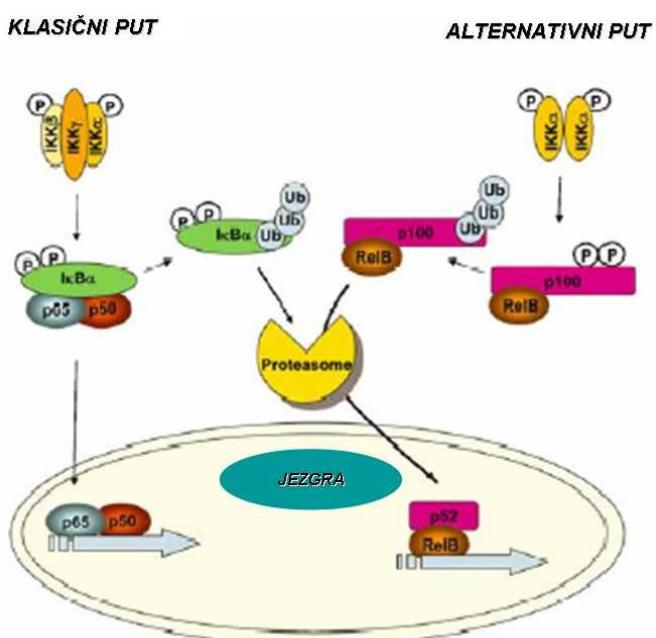
NF- B je skupni naziv za obitelj transkripcijskih faktora uključenih u regulaciju brojnih bioloških procesa. Obitelj sadrži pet gena: NF- B1 (p50/105), NF- B2 (p52/100), RelA (p65), c-Rel i RelB (98). Ovih pet gena ishodište je sedam proteina koji dijele

Rel Homolognu Domenu (RHD) u svojoj sekvenci. RHD posreduje u njihovoj dimerizaciji i interakciji sa specifičnim inhibitorima i DNA veznim mjestima. U većini su stanica NF- B dimeri lokalizirani predominantno citoplazmatski i transkripcijski su inaktivni zbog interakcije s inhibitorima. Različiti okidači poput citokina, čimbenika rasta ili tirozin kinaza mogu potaknuti aktivaciju NF- B (slika 7). Pojačana ekspresija različitih receptora rasta poput receptora epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) i receptora faktora rasta inzulina (engl. *inzulin growth factor receptor*, IGFR) može biti odgovorna za aktivaciju NF- B (95). Predloženi su različiti mehanizmi NF- B aktivacije (98,99).



Slika 7. Shematizirani prikaz puteva aktivacije NF- B u citoplazmi te translociranja u jezgru. Na membrani stanice su prisutni različiti receptori čijom se aktivacijom pokreće transkripcija u jezgri.

Poznata su tri aktivacijska puta NF- B; klasični, alternativni i atipični. Klasični put aktivacije NF- B posljedica je odgovora na infekcije mikroorganizmima ili izlaganju proinflamatornim kemokinima koji aktiviraju I κ kompleks, s posljedičnom fosforilacijom koja inducira degradaciju I B. Alternativni put aktivacije dovodi do selektivne aktivacije p50:RelB dimera indukcijom p100 prekursorskog proteina, a njegova je aktivacija potaknuta nekim članovima TNF obitelji. Alternativni put aktivacije je bitan za razvitak limfoidnih organa i stečenog imunološkog odgovora (100) (slika 8).



*Preuzeto iz Dolcet X et al. NF- κ B in development and progression of human cancer.
Virchows Arch 2005.(101)*

Slika 8. Shematisirani prikaz klasičnog i alternativnog puta aktivacije NF- B/p65.

Fosforilirane podjedinice p105/p65 i p50/p65/ I B α postaju substrati za ubikvitaciju proteosomskom degradacijom koja slijedi na podjedinicama p105 i p50 I B α (102).

Pri tom se kompleks p50/p65 premješta u jezgru aktivirajući transkripciju gena koji sadrže B mjesto, uključujući I B α . Fosforilirani I B α protein može stvoriti kompleks p50/p65 koji se zadržava u citoplazmi do pojave novog aktivacijskog signala. Novosintetizirani I B α protein može ući i u jezgru. Ne postoje čvrsti dokazi koji bi isključili da novonastali p50/p65 kompleks ne ide direktno u jezgru bez da se prethodno veže s I B, no smatra se da je kinetika cijelog procesa u tom slučaju sporija od aktivacije NF- B. Taj je put aktivacije nazvan atipičnim jer je neovisan o I K, a aktivira se nakon izlaganja stanica UV zrakama, ili doksorubicinu koji oboje dovode do DNA oštećenja (103). NF- B/p65 regulira ekspresiju gena uključenih u brojne procese poput proliferacije, migracije i apoptoze. Brojni heterodimeri NF- B vežu se na specifične promotore i pokreću transkripciju brojnih gena (104). Pri tom su ciljne molekule na staničnoj razini brojni citokini (IL1, IL2, IL6, TNF α), kemokini (MCP-1, MIP-1 α , eotaksin), adhezijske molekule (ICAM-1, VCAM-1, E-selektini), inducirajući enzimi (iNOS, COX-2) i naposljetku regulatori apoptoze i stanične proliferacije (BCL-XL, Fas ligand, c-MYC, ciklin D1) (slika 8) (105,106). Utvrđena je uloga NF- B u regulaciji imunološkog odgovora i u upali, a sve su brojniji dokazi o značajnoj ulozi u onkogenezi (107).

Aberantna ili konstitutivna aktivacija NF- B/p65 uočena je u brojnim solidnim i hematološkim tumorima u ljudi, poput leukemija i limfoma (105,108-110). Uloga NF- B u tumorima može se promatrati u sklopu regulacije apoptoze, procesa angiogeneze, stjecanja osobina invazivnosti tumorskih stanica, u regulaciji staničnog ciklusa i u indukciji kemo- i radio-rezistencije tumora.

Treba istaknuti utjecaj NF- B na proces tumorske angiogeneze gdje je do danas utvrđeno da NF- B regulira aktivnost matriksnih metaloproteinaza (MMP2, MMP9) te serin proteinaza, urokinaza tipa plazminogen aktivatora (uPA) (111-113). No u posljednje vrijeme ističe se njegova uloga u posredovanju aktivacije i regulacije VEGF o čemu će još biti govora.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja ove disertacije bili su slijedeći:

1. Ispitati izražaj NF-kB u mijelomskim stanicama.
2. Ispitati angiogena svojstva mijelomskih stanica kroz utvrđivanje izražaja VEGF u tumorskim stanicama i plazmatske koncentracije VEGF u bolesnika s MM.
3. Ispitati izražaj MCP-1 na tumorskim stanicama i njegovu koncentraciju u plazmi bolesnika s MM.
4. Utvrditi postoji li povezanost između ekspresije i vrijednosti određenih u plazmi VEGF i MCP-1 u mijelomskim stanicama.
5. Izražaj NF-kB usporediti s angiogenim svojstvima mijelomskih stanica kroz ekspresiju VEGF.
6. Procijeniti angiogenezu kroz utvrđivanje broja krvnih žila i ekspresije VEGF i u koštanim biopsijama.
7. Utvrditi postoji li povezanost između statusa NF-kB na mijelomskim stanicama i angiogenih obilježja (broja krvnih žila, VEGF) u koštanim uzorcima.
8. Utvrditi postoji li povezanost između statusa NF-kB i angiogenih obilježja tumora s kliničko-patološkim osobinama bolesnika (kliničkim stadijem, odgovorom na terapiju) u MM.
9. Ispitati značaj koncentracija VEGF i MCP-1 proteina u plazmi, u funkciji potencijalnih biomarkera mijelomske bolesti.

3. BOLESNICI, MATERIJAL I METODE

3.1. Bolesnici

U studiju je uključeno 79 bolesnika kojima je postavljena dijagnoza MM na Klinici za unutarnje bolesti Odjel Hematologije Kliničkog bolničkog centra-Rijeka (KBC-Rijeka), u vremenu od 30. studenog 2001. do 01. 03. 2008. godine. Pri tom su korišteni kriteriji za dijagnozu mijeloma prema Huang i sur. (114).

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta „Regulacijski čimbenici angiogeneze u prognozi tumora“ (062-0620095-0082), u potpori Ministarstva znanosti tehnologije i športa Republike Hrvatske, koje je odobreno od strane etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Rijeci i Povjerenstva za etička pitanja KBC-Rijeka. Klinički podaci uključivali su: spol, dob, klinički stadij bolesti i terapijski odgovor procijenjivan po uzoru na Blade i sur. (115), prikazano u tablici 8.

Tablica 8. Obilježja ispitivane skupine prema spolu i dobi, zastupljenosti pojedinog kliničkog stadija i prema odgovoru na terapiju bolesnika s multiplim mijelomom (MM).

Obilježja		Bolesnici s MM
	Muškarci	35 (44%)
Spol	Žene	44 (56%)
	M:Ž	1:1,3
Dob	Raspon	42-90
	Medijan	75
Klinički stadij		
	Stadij I	9 (12,3%)
	Stadij IIA	24 (32,9%)
	Stadij IIB	2 (2,7%)
	Stadij IIIA	27 (37,0%)
	Stadij IIIB	11 (15,1%)
	Ukupno	73 (100%)
Odgovor na terapiju		
	Odgovorio/la	25 (67,6%)
	Bez odgovora	12 (32,4%)
	Ukupno	37 (100%)

Bolesnici su svrstani temeljem kliničkog stadija bolesti, te s obzirom na terapijski odgovor u skupine: kompletne remisije, parcijalne remisije, minimalni terapijski odgovor, bez odgovora na terapiju i progresiju bolesti. Preživljenje bolesnika praćeno je od trenutka kada je dijagnosticirana bolest i trajalo je minimalno 24 mjeseca.

U trenutku postavljanja dijagnoze MM najveći broj bolesnika bio je u kliničkom stadiju IIIA (tablica 8). Za potrebe dalnjih analiza bolesnici su obzirom na klinički stadij grupirani u dvije skupine: prvu s kliničkim stadijem I, IIA i IIB i drugu sa stadijem IIIA i IIIB.

Temeljem odgovora na terapiju bolesnici su podijeljeni u kategorije kompletne remisije, parcijalne remisije, minimalnog terapijskog odgovora, bez odgovora i progresije bolesti. Obzirom na broj ispitanika i kriterije odgovora na terapiju bolesnici su za potrebe analize po uzoru na Blade i sur. (115) svrstani u dvije skupine: odgovorio/la na terapiju i bez odgovora na terapiju. Pri tom su kategoriju odgovorio/la na terapiju činili bolesnici s kompletnom i parcijalnom remisijom te minimalnim odgovorom na terapiju, dok je kategorija bez odgovora na terapiju uključivala skupinu bolesnika bez odgovora na terapiju ili s progresijom bolesti (tablica 8).

Bolesnici na kojima je provedeno ovo istraživanje pripadali su ili retrospektivnoj ili prospektivnoj skupini. U retrospektivnu je skupinu bilo uključeno 60 bolesnika. Korišteni su parafinski blokovi bioptata koštane srži na kojima je vršena imunohistokemijska analiza sa svrhom utvrđivanja svih biljega koji su postavljeni u ciljevima istraživanja ove disertacije i koji su potom korelirani s kliničkim parametrima (odgovor na terapiju i preživljenje bolesnika). Prospektivna skupina uključivala je 39 bolesnika kojima je temeljem kliničkih nalaza postavljena sumnja na mijelom i od kojih je u konačnici u 19 slučajeva postavljena dijagnoza MM, a u 20 dijagnoza monoklonalne gamapatijske bolesti. Uz bioptat koštane srži, koji je potom imunohistokemijski obrađen, uziman je i uzorak krvi za enzimimunokemijsku metodu, te aspirat stanica koštane srži za molekularnu analizu. Svi bolesnici uključeni u istraživanje dali su informirani pristanak.

3.2. Patohistološka obrada i imunohistokemijska metoda

Bioptički uzorci koštane srži su fiksirani u Schafferovom fiksativu 24 sata i dekalcinirani u osteodecu 4-5 sati. Potom su standardno bojani na hemalaun-eozin (HE), Giemsu, PAS, Gomory i Berlinsko modrilo. Deparafinirani uzorci su također rutinski obojeni imunohistokemijski s anti-CD138 (klon MI15, m7228, DAKO, Glostrup), Ig Kappa (No.40191, DAKO, Glostrup) i Ig Lambda (No.40193, DAKO, Glostrup) protutijelima. Patohistološka obrada uključivala je procjenu infiltrata (difuzni, nodularni, intersticijski), postotka zastupljenosti tumorskih plazma stanica ($CD138^+$) u koštanim uzorcima i restrikciju lakih lanaca imunoglobulina. Morfološka svojstva tumorskih stanica korelirana su sa citološkim razmazima aspirata koštane srži.

Dekalcinirani, fiksirani, u parafin uklopljeni uzorci tkiva su rezani na debljinu od 3-5 µm. Tijekom noći su uzorci čuvani u termostatu na 37°C , te potom deparafinirani standardnim potupkom primjenom substituta za ksilen (Xylene substytute, Shandon,UK) (3x10'), rehidraciju u 100%-tnom alkoholu (2 x 5'), 96%-tnom alkoholu (5'), 70%-tnom alkoholu (5') sve do ispiranja u destiliranoj vodi.

Rezovi su tretirani s vizualizacijskim sistemom temeljenim na EnVision metodi. Vizualizacijski sistem (DAKO Real EnVision detection System peroxidase/DAB +, rabbit/mouse K 5007) korišten je u automatskom imunobojaču (DAKO Autostainer plus). Diaminobenzidine (DAB) korišten je kao kromogen. Uzorci su u citratnom puferu (DAKO No. S2031) u razrjeđenju 1:10 pretretirani u mikrovalnoj pećnici. Korištена su slijedeća primarna protutijela: za utvrđivanje gustoće malih krvnih žila (angiogeneza) monoklonsko protutijelo anti CD34 Class II (DAKO, Glostrup, m7165 klon QBEnd10) u razrjeđenju 1:10; za proliferaciju mijelomske stanice monoklonsko

mišje antihumano protutijelo Ki67 (DAKO, Glostrup, m7240, klon MIB-1) koje reagira s nuklearnim antigenima prisutnim u humanim stanicama u proliferaciji, u razrijeđenju 1:50; za utvrđivanje ekspresije VEGF, anti VEGF mišje monoklonalno IgG 2a protutijelo VEGF (C-1) (Santa Cruz Biotechnology Inc. USA, SC-7269) u razrijeđenju 1:500; za određivanje ekspresije NF- B monoklonsko IgG₁ protutijelo za pojedinicu p65 anti NF- B/p65 (Santa Cruz Biotechnology Inc. USA, SC-8008) u razrjeđenju 1:200; za određivanje ekspresijai MCP-1 pomoću mišjeg monoklonskog IgG_{2B} protutijela u razrijeđenju 20µg/ml, pretretirani u TRIS EDTA puferu i mikrovalnoj pećnici. Primarna protutijela razrjeđivala su se *Dako Antibody Diluent*-om (DAKO A/S, Glostrup, DK, S0809).

Nakon primjene vizualizacijskog sistema uslijedilo je kontrastiranje hematoksilinom kroz 1 minutu, ispiranje u mlakoj vodi i pokrivanje *Shandon histomount* medijem. Za sva ispiranja između pojedinih faza korišten je DAKO Wash Buffer 10x, S3006.

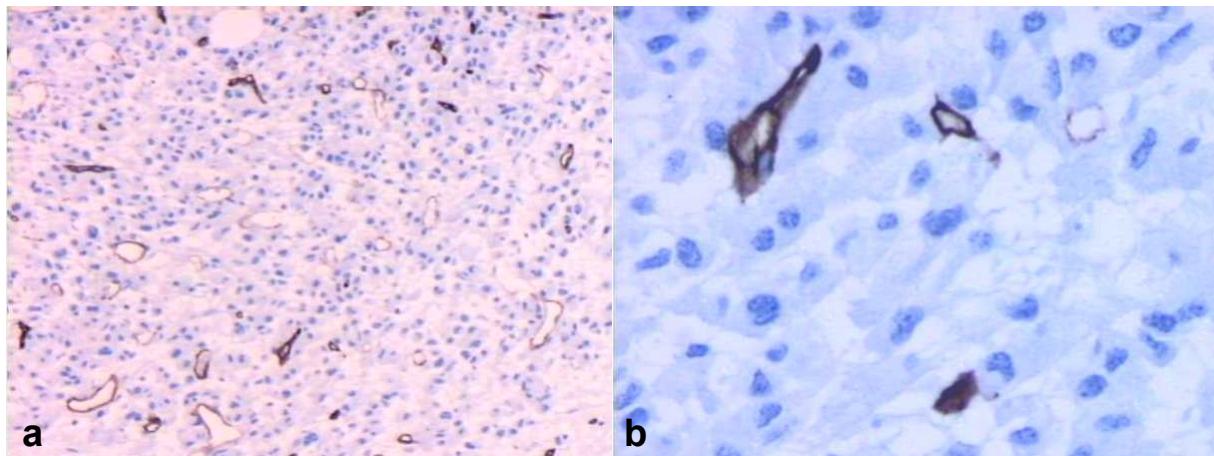
Kao negativne kontrole u svim imunohistokemijskim bojanjima su korišteni histološki rezovi na koje je umjesto primarnih protutijela nanesena puferska otopina.

3.2.1. Određivanje srednje gustoće malih krvnih žila

Uzorci tumorskog tkiva obojeni s anti CD34 korišteni su za određivanje srednje gustoće malih krvnih žila (engl. *mean vascular density*, MVD) prema metodi Wiednera i sur. (116). Histološki preparat se pregledao na malom povećanju (x10) u cilju utvrđivanja mjesta s najvećim brojem malih krvnih žila (engl. *hot spot*, "vruće točke"). U svakom preparatu su se odabrala tri takva područja u kojima su se brojale sve obojene krvne žile u vidu nakupina ili pojedinačnih endotelnih stanica na

povećanju x200, odnosno x400 (slika 9.). Brojanje su obavila dva nezavisna ispitivača.

Aritmetičkom je sredinom dobivena srednja vrijednost (broj krvnih žila u tri vruće točke) i u vidu apsolutnog broja korištena u daljnjoj obradi podataka. Modifikacija metode sastojala se u tome da dobivene vrijednosti nisu prevođene u mm^2 , s obzirom da su objavljeni rezultati ranijih istraživanja utvrdili da nema razlike preračunavaju li se vrijednosti u mm^2 ili se koriste apsolutne vrijednosti (117).



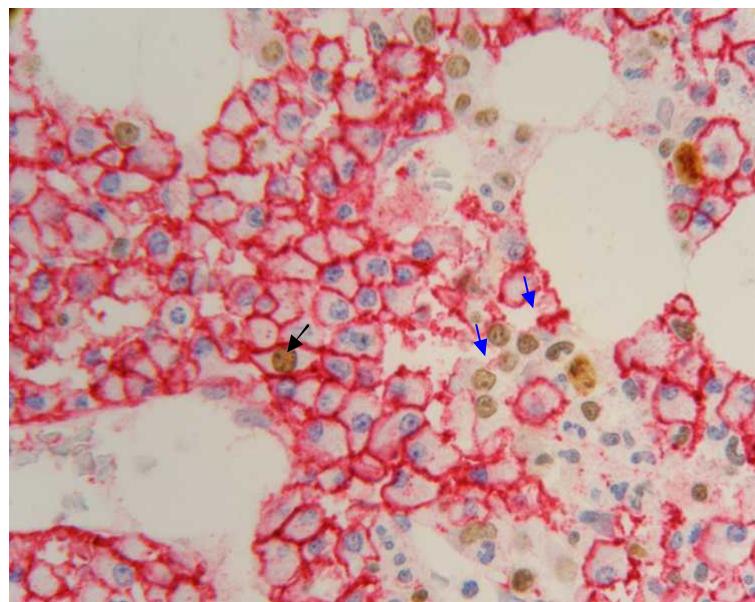
Slika 9. Imunohistokemijski prikazani vaskularni prostori u koštanoj biopsiji bolesnika s multiplim mijelomom. Endotelne stanice obojane s anti CD34 na povećanju a) x100 i b) x400.

3.2.2. Određivanje proliferacijskog indeksa na tumorskim stanicama

U cilju utvrđivanja proliferacijskog indeksa (PI) na tumorskim stanicama primjenjena je dvostruka imunohistokemijska metoda, *DAKO EnVision™ Doublestain System* (K5361). Bojanje se temelji na horseradish peroxidase (HRP) i alkalnoj fosfatazi (AP) označenim polimerima koji su konjugirani sekundarnim protutijelima protiv mišjih i zečjih imunoglobulina (118). Polimeri ne sadrže avidin ili biotin. Nespecifična obojenost koja se može javiti kao posljedica endogene avidin-biotin aktivnosti u jetri, bubregu, limfatičnim tkivima ili smrznutim rezovima, na ovaj je način izbjegнута.

Posebnost ovog bojanja se sastoji u istovremenoj primjeni dva primarna protutijela u jednom uzorku. Dva antiga u istom uzorku označavaju se kontrastnim bojama; u ovom slučaju nuklearni pozitivitet na Ki67 s DAB kao smeđim kromogenom i membranski pozitivitet na CD138, za detekciju plazma stanica, s Fast Red kromogenom crveno (slika 10).

Kvantificiranje se odredilo brojanjem pozitivno obojenih jezgara na 1000 stanica koje je iskazano u vidu postotka (%) odnosno PI. Stanice su izbrojane pomoću „*image analyser*“-a na velikom povećanju (x400). Primjenjena je metodologija po uzoru na druge autore (119).

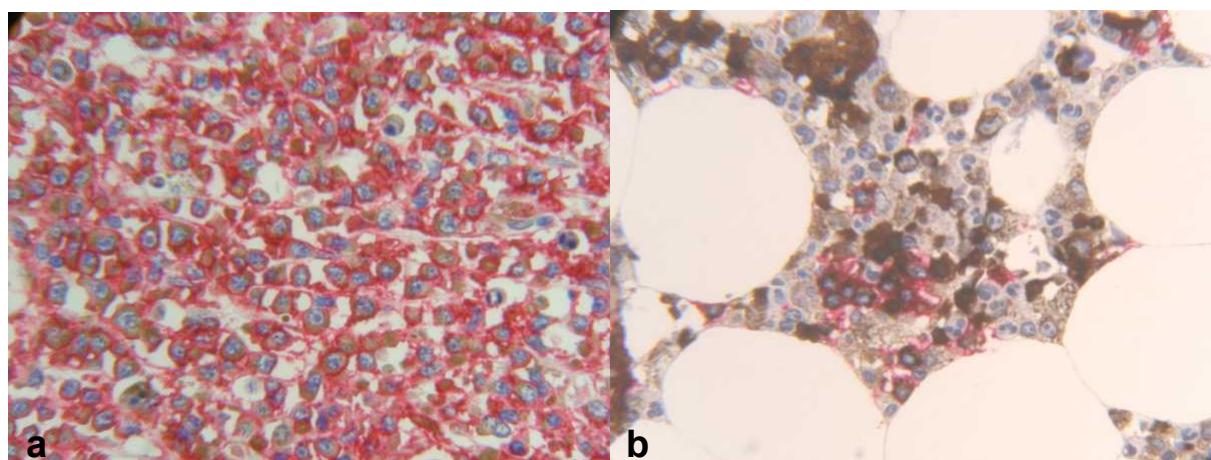


Slika 10. Dvojno imunohistokemijsko bojanje na Ki67 proliferacijski antigen (smeđe obojena jezgra) i na CD138 antigen plazma stanice (crvena membrana) u koštanoj srži bolesnika s multiplim mijelomom. Vidi se i nakupina stanica hematopoeze u proliferaciji (plava strelica), povećanje x 400.

3.2.3. Određivanje izražaja VEGF na tumorskim stanicama

Izražaj VEGF na tumorskim stanicama također je utvrđivan dvostrukom imunohistokemijskom metodom, primjenom *DAKO EnVision™ Doublestain System* (K5361). U ovom su slučaju u automatskom imunobojaču preparati obojani s VEGF, gdje je citoplazmatski pozitivitet vizualiziran DAB, smeđi kromogen, a membrane plazma stanica s protutijelom CD138, gdje je pozitivitet vizualiziran Fast Red kromogenom (crveno) (slika 11).

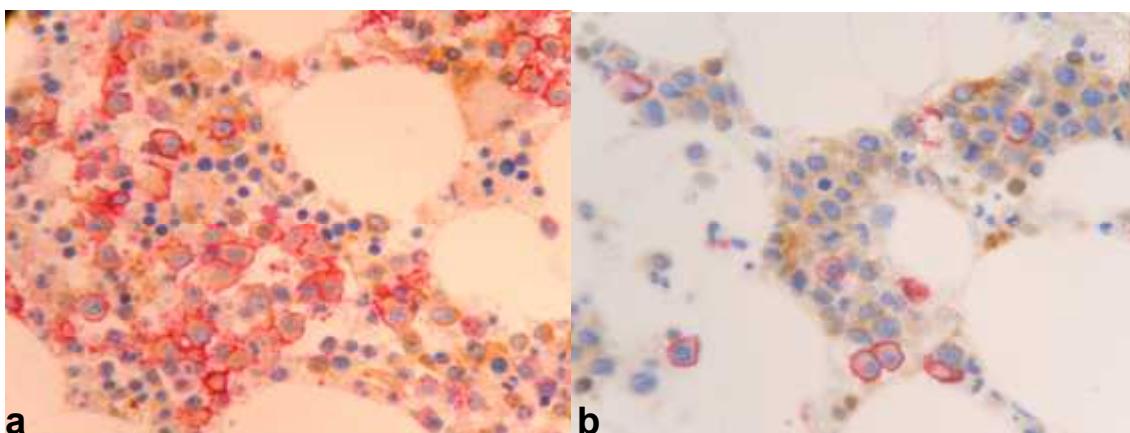
Intenzitet VEGF obojenih citoplazmi analiziran je na 100 stanica i iskazan je semikvantitativno kao: bez bojenja (0), slabo (1), umjereno (2) i snažno obojenje (3). Imunoreaktivnost je konačno prikazana u vidu Histo-skora koji je dobiven umnoškom intenziteta s postotkom pozitivnih stanica ($\text{VEGF H-skor} = (\% \times 1) + (\% \times 2) + (\% \times 3)$). Metoda je primjenjena po uzoru na druge autore (120). Za potrebe statističke analize vrijednosti VEGF H-skora bile su podijeljene prema medijanu u dvije grupe (niskih vrijednosti ispod medijana i visokih vrijednosti iznad medijana).



Slika 11. Dvojno imunohistokemijsko bojanje na VEGF u koštanoj biopsiji bolesnika s multiplim mijelomom. a) Snažni citoplazmatski VEGF pozitivitet (smeđe) u CD138^+ stanicama mijeloma (crvene membrane), povećanje x200; b) Smeđe obojene citoplazme u ne mijelomskim stanicama koštane srži koje eksprimiraju VEGF, povećanje x200.

3.2.4. Određivanje izražaja NF- B/p65 na tumorskim stanicama

Za određivanje izražaja NF- B/p65 na tumorskim stanicama primjenjena je metoda *DAKO EnVision™ Doublestain System (K5361)*. U automatskom imunobojaju membrane stanica MM označene su protutijelom CD138, a obojenje je vizualizirano Fast Red kromogenom (crveno) dok se izražaj NF- B/p65 prikazivao kao citoplazmatski i/ili nuklearni pozitivitet vizualiziran smeđim kromogenom DAB (slika 12). Intezitet NF- B/p65 obojenih citoplazmi i jezgara analiziran je na 100 stanica i iskazan je semikvantitativno kao: bez bojenja (0), slabo (1), umjereno (2) i snažno obojenje (3). Imunoreaktivnost je konačno prikazana u vidu Histo-skora koji je dobiven umnoškom intenziteta s postotkom pozitivnih stanica (NF- B/p65 H-skor =(% x 1)+(% x 2)+(% x 3)). Za potrebe statističke analize vrijednosti NF- B/p65 H-skora bile su podijeljene prema medijanu u dvije grupe (niskih vrijednosti ispod medijana i visokih vrijednosti iznad medijana).



Slika 12. Dvojno imunohistokemijsko bojanje na NF- B/p65 i CD138 u koštanoj biopsiji bolesnika s multiplim mijelomom. a) Citoplazme i jezgre smeđe obojene na NF- B/p65 u mijelomskim stanicama (crvene membrane), povećanje x 200; b) stanice mijeloma ne eksprimiraju NF- B/p65 dok se pozitivitet opaža u citoplazmama ostalih stanica hematopoeze, povećanje x 200.

Ekspresija pojedinih čimbenika određivala se pomoću sustava za analizu slika ISSA 3.1 (engl. *image analysis software*) (VAMS, Zagreb, Hrvatska).

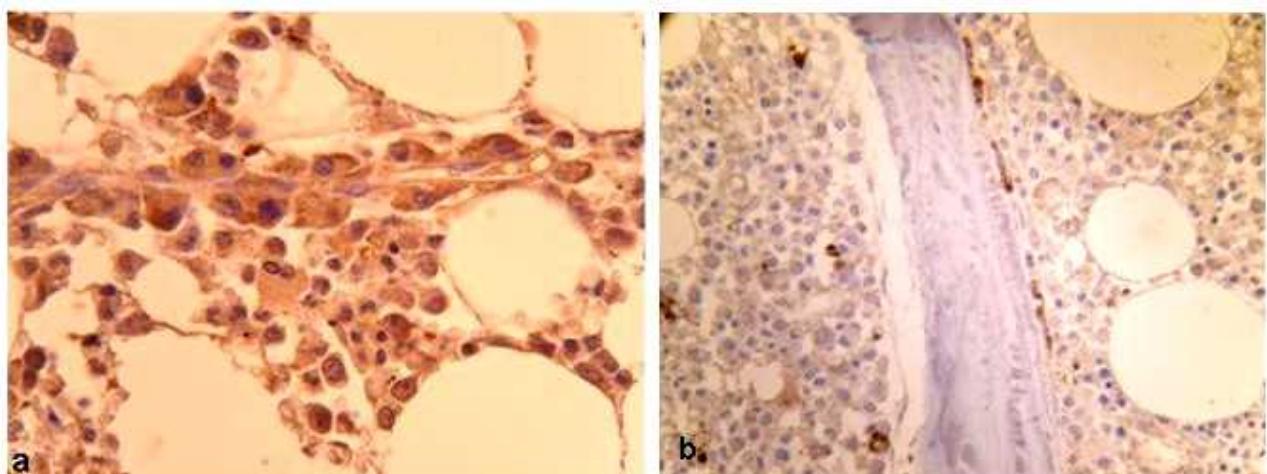
3.2.5. Određivanje izražaja MCP-1 na tumorskim stanicama

Izražaj MCP-1 na tumorskim stanicama također je utvrđivan imunohistokemijskom metodom, primjenom *DAKO EnVision™ System*. U ovom su slučaju u automatskom imunobojaču preparati obojani s MCP-1, gdje je citoplazmatski pozitivitet vizualiziran DAB, smeđi kromogenom (slika 13).

Intezitet MCP-1 obojenih citoplazmi analiziran je na 100 stanica i iskazan je semikvantitativno kao: bez bojenja (0), slabo (1), umjereno (2) i snažno obojenje (3).

Imunoreaktivnost je konačno prikazana u vidu Histo-skora koji je dobiven umnoškom intenziteta s postotkom pozitivnih stanica ($MCP-1\text{ H-skor} = (\% \times 1) + (\% \times 2) + (\% \times 3)$).

Za potrebe statističke analize vrijednosti MCP-1 H-skora bile su podijeljene prema medijanu u dvije grupe (niskih vrijednosti ispod medijana i visokih vrijednosti iznad medijana).



Slika 13. Imunohistokemijsko bojanje na MCP-1 u koštanoj biopsiji bolesnika s multiplim mijelomom. a) Citoplazme mijelomske stanice su obojane smeđim kromogenom, opaža se smeđi pozitivitet u citoplazmama stanica mijeloma kao i endotelnim stanicama krvne žile na povećanju x200; b), tumor u kojem nije uočen izražaj MCP-1čiji se pozitivitet opaža u osteoblastima, na povećanju x100.

3.3. Određivanje koncentracije citokina u plazmi

U cilju određivanja koncentracija MCP-1 i VEGF u plazmi bolesnika kojima je klinički postavljena sumnja na MM korištena je enzimimunokemijska metoda ELISA, (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) prema dolje opisanom protokolu.

3.3.1 Određivanje plazmatske koncentracije VEGF

Za kvantitativno određivanje VEGF iz heparinizirane plazme korišten je KIT Quantikine, Human VEGF Immunoassay, Catalog Number DVE00, R&D Systems, USA. Kit je sadržavao: polistirensku mikroploču (Part 890218) s 96 jažica (12 x 8 jažica) presvučenih mišjim monoklonalnim anti VEGF protutijelom; VEGF Conjugate (Part 890219) - 21 mL poliklonalnog protutijela na VEGF konjugiranog peroksidazom u prisutstvu konzervansa; VEGF Standard (Part 890220) - 3 boćice (2000 pg/po bočici), rekombinantnog liofiliziranog humanog VEGF₁₆₅ u puferiranoj proteinskoj bazi uz dodatak konzervansa; Assay Diluent RD1W (Part 895117) - 11 mL puferirane proteinske baze s konzervansima; Calibrator Diluent RD5K (Part 895119) - 21 mL puferirane proteinske baze s konzervansima (koji se rabi za uzorke supernatanta staničnih kultura); Calibrator Diluent RD6U (Part 895148) - 21 mL životinjskog seruma s konzervansima za uzorke seruma/plazme koji smo mi koristili; Wash Buffer concentrate (Part 895003) - 21 mL, 25x koncentrirane otopine za ispiranje puferiranog surfaktanta s konzervansima; Color Reagent A (Part 895000) - 12.5 mL stabiliziranog hidrogen peroksida; Color Reagent B (Part 895001) - 12.5 mL stabiliziranog kromogena (tetrametilbenzidine); Stop Solution (Part 895032) - 6 mL 2 N sulfurična kiselina i Plate Covers - 4 prijanjajuća pokrivača za mikrotitarsku ploču. Princip testa sastoji se u primjeni kvantitativnog „sandwich“ enzimimunokemijskog testa. Monoklonalnim anti VEGF protutijelom presvučene jažice su na mikroploči.

Standardi i uzorci se odpipetiraju u jažice i bilo koja količina VEGF prisutna u uzorku veže se na imobilizirano protutijelo u jažici. Potom se ispiranjem ukloni sav nevezani materijal, pa se u jažice doda konjugat koji sadrži poliklonalno anti VEGF protutijelo vezano peroksidazom. Sav nevezani konjugat se ispere i u jažice se doda otopina supstrata potrebnog za razvijanje boje čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji VEGF u uzorku. Dodatkom Stop otopine zaustavi se razvijanje boje, a intenzitet nastalog obojenja u jažicama očita se na fotometru tj. čitaču mikrotitarskih pločica (Metertech 960, Biomedica grupe, Njemačka) koji mjeri apsorbanciju uzo rka na 450 nm (s korekcijom postavljenom na valnu duljinu 540 nm ili 570 nm).

Metoda je provedena prema navedenom protokolu:

1. Priprema reagensa i standarda.
2. U jažice se odpipetira 100 µl Assay Diluent RD1W te 100 µl uzorka plazme, standarda i kontrole. Inkubira se 2 sata na sobnoj temperaturi.
3. Aspirira se i ispere 3x s razrijeđenim puferom za ispiranje.
4. Doda se 200 µl Conjugata u svaku jažicu, inkubira se 2 sata na sobnoj temperaturi.
5. Aspirira se i ispere 3x s razrijeđenim puferom za ispiranje.
6. Doda se 200 µl otopine Substrata u svaku jažicu, zaštiti od svjetla i inkubira 25 minuta na sobnoj temperaturi.
7. Doda se 50 µl Stop otopine u svaku jažicu, apsorbancija uzorka očita se na 450 nm unutar 30 minuta.

3.3.2. Određivanje plazmatske koncentracije MCP-1

Za kvantitativno određivanje MCP-1 iz heparinizirane plazme korišten je KIT Quantikine, Human MCP-1/CCL2 Immunoassay, Catalog Number DCP00, R&D, USA. Kit za MCP-1 je sadržavao: MCP-1 Microplate (Part 890223) - 96 jažica na polistirenskoj mikroploči (12 x 8) presvučenih mišjim monoklonalnim anti MCP-1 protutijelom; MCP-1 Conjugate (Part 890224) - 21 mL poliklonalnog protutijela na MCP-1 konjugiranog s peroksidazom uz dodatak konzervansa; MCP-1 Standard (Part 890225) - 3 bočice (2000 pg/po bočici) rekombinantnog, liofiliziranog humanog MCP-1 u puferiranoj proteinskoj bazi uz dodatak konzervansa; Assay Diluent RD11-83 (Part 895875) - 11 mL puferirane proteinske baze uz dodatak konzervansa; Calibrator Diluent RD5L (Part 895028) - 21 mL puferirane proteinske baze s konzervansima (za supernatante staničnih kultura); Calibrator Diluent RD6Q (Part 895128) - 21 mL životinjskog seruma s konzervansima (za serum/plazmu); Wash Buffer Concentrate (Part 895003) - 21 mL 25 x koncentrirane otopine za ispiranje puferiranog surfaktanta s konzervansima; Color Reagent A (Part 895000) - 12.5 mL stabiliziranog hidrogen peroksida Color Reagent B (Part 895001) - 12.5 mL stabiliziranog kromogena (tetrametilbenzidine); Stop Solution (Part 895032) - 6 mL 2 N sulfurična kiselina; Plate Covers - 4 prijanjajuća pokrivača za mikrotitarske ploče.

Metoda je provedena prema navedenom protokolu:

1. Priprema reagensa i standarda, razrijeđivanje uzorka s Calibrator Diluentom RD 6Q (1:1).
2. U jažice se odpipetira 50µl Assay Diluent RD1-83, te 200 µl razrijeđene plazme, standarda i kontrole. Inkubira se 2 sata na sobnoj temperaturi.
3. Aspirira se i ispere 3x s razrijeđenim puferom za ispiranje.

4. Doda se 200 µl Conjugata u svaku jažicu, inkubira se 2 sata na sobnoj temperaturi.
5. Aspirira se i ispere 3x s razrijeđenim puferom za ispiranje.
6. Doda se 200 µl otopine Substrata u svaku jažicu, zaštiti od svjetla i inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi.
7. Doda se 50 µl Stop otopine u svaku jažicu, apsorbancija uzorka očita se na 450 nm unutar 30 minuta.

3.4. Izolacija CD138⁺ mijelomskih stanica iz aspirata koštane srži

Uzorci koštane srži bolesnika koji su se podvrgli rutinskoj dijagnostičkoj aspiraciji koštane srži uzimani su u količini približno 3ml i pohranjeni uz dodatak antikoagulansa (EDTA). Prije izdvajanja CD138⁺ stanica prethodio je postupak izolacije mononukleara.

3.4.1. Izolacija mononukleara

Mononukleari su izolirani odvajanjem s Ficollom centrifugiranjem po gradientu gustoće prema navedenom protokolu :

1. Aspirat se prelije u tubu zapremnine 50 ml. Dodaje se približno 35 ml (2/3) RMPI 1640, a do 50 ml (1/3) Ficoll paque TMPlus.
2. Centrifugira se na 1800 okr/20 minuta, na sobnoj temperaturi.
3. U novu tubu se izdvoji bijelkasti prsten stanica na granici između Ficolla i RMPI 1640.
4. Stanice se isperu dodavanjem 2x do 50 ml RMPI 1640 i potom se centrifugiraju na 1200 okr/10 minuta. Odlije se supernatant.

5. Doda se do 25 ml RMPI 1640 i potom se u jažicu odvoji 20µl tripanskog plavila i 20µl uzorka, pomiješa se i 10µl se odpipetira na Neubauerovo stakalce s mrežicom za brojanje stanica.
6. Pod mikroskopom se broje žive stanice (svijetle), dok mrtve primaju boju i oboje se plavo s tripanskim plavilom.
7. Dobiveni se broj stanica podijeli s četiri (broj odjeljaka mrežice na stakalcu), pomnoži s dva (zbog razrijedenja 1:1), pomnoži s 10^4 i dobije se broj stanica u mililitru uzorka. Formula glasi: $x \text{ (broj stanica)} / 4 \times 2 \times 10^4 / \text{ml}$.
Kada smo utvrdili ukupan broj stanica u uzorku odvoji se 50-100 000 stanica za kontrolu protočnim citometrom (kontrola 1).

3.4.2. Izolacija CD138⁺ mijelomskih stanica iz mononukleara aspirata koštane srži upotrebom MS kolona i Mini MACS magnetskog separatora

U ovisnosti o broju mononuklearnih stanica u uzorku (manje ili više od 5×10^6 stanica) slijedio je postupak separacije magnetskim separatorom ili sortiranje stanica na protočnom citometru (engl. Flow cytometer, BD FACSaria, FACS = fluorescent activated cell sorting).

Postupak separacije CD138⁺ mijelomskih stanica je rađen po uzoru na druge autore (120) upotrebom Kita za izolaciju Miltenyi Biotec, No 130-051-301 koji uključuje MS separacijske kolone (MACS® No. 130-042-201) te tubice (MS kolone plus tube No. 130-041-301) (očekivana čistoća CD138⁺ stanica je bila >95%, a dobivena je >98%).

Opći princip MACS® separacije se sastoji u tome da se plazma stanice obilježe sa CD138 MicroBeads (magnetskim kuglicama). Potom se suspenzijom stanica ispunii MACS® kolona koja se stavi u magnetsko polje MACS separatora. Vršili smo pozitivnu selekciju. Stanice obilježene magnetskim kuglicama zadržale su se u koloni, a neobilježene su propuštene kroz kolonu. Nakon uklanjanja kolone iz magnetskog polja zadržane CD138⁺ stanice su se odvojile kao pozitivna frakcija.

Postupak pripreme uzorka za magnetsku separaciju:

1. Centrifugira se uzorak na 300xg (1200 okr)/10minuta, odpipetira se supernatant u cijelosti.
2. Resuspendiraju se stanice taloga u 90µl puferske otopine na 5×10^6 stanica. Koristi se MACS puferska otopina (u 250ml PBS-EDTA 2 mM otopi se 1,5ml FCS).
3. Doda se 10µl CD138 MicroBeadsa na 5×10^6 stanica, promiješa i inkubira 15 minuta na 4-8°C (produži se inkubacija ako se radi na ledu).
4. Odvoji se 50-100 000 stanica za kontrolu (kontrola 2)
5. Doda se 10µl CD138-APC (kat. br. 130-091-250) (u preporučenom razrijeđenju 1:11), inkubira se 5 minuta na 4-8°C.
6. Stanice se isperu s 1-2 ml pufera na 10^7 stanica i centrifugiraju na 300xg, 10 minuta. Odpipetira se supernatant u cijelosti.
7. Resuspendiraju se stanice u 500µl pufera.
8. Uslijedi magnetska separacija.

Magnetska separacija:

1. MS kolona se stavi u magnetsko polje MiniMACS separatora.
2. Kolona se pripremi ispiranjem/tj.propuštanjem kroz kolonu 500µl pufera (za MS kolone).

3. Uzorak se filtrira prije propoštanja kroz kolonu.
4. Neoznačene se stanice skupljaju prolaskom kroz kolonu zajedno s puferom. Inspire se $3 \times 500\mu\text{l}$ MACS pufera. Prikupljeni dio uzorka odgovara nevezanoj frakciji.
5. Ukloni se kolona od separatora i smjesti na odgovarajuću tubu za skupljanje.
6. Odpipetira se 1ml MACS pufera u kolonu, odmah se ispere frakcija magnetski označenih stanica ($\text{CD}138^+$ stanice) čvrstim, energičnim pritiskom na klip koji je isporučen u dodatku sa svakom kolonom.
7. Uzima se kontrolni uzorak (kontrola 3, nakon kolumnе; $10\mu\text{l}$).
8. Da bi se dobila najveća čistoća stanica izvode se dva uzastopna propuštanja (korak 1. do 6, bez filtriranja).
9. Kontrola postupka se vrši protočnim citometrom.

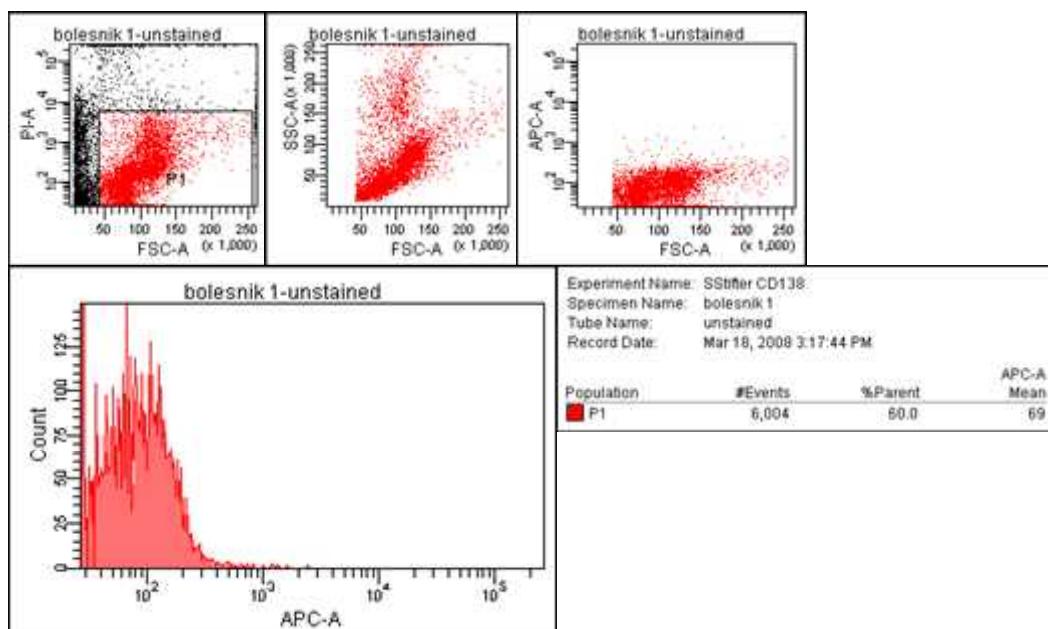
Prikazan je primjer separacije u bolesnika s više od 5×10^6 stanica (slika 14, 15 i 16).

Bolesnik 1: Opći podaci - 47 godina, žena

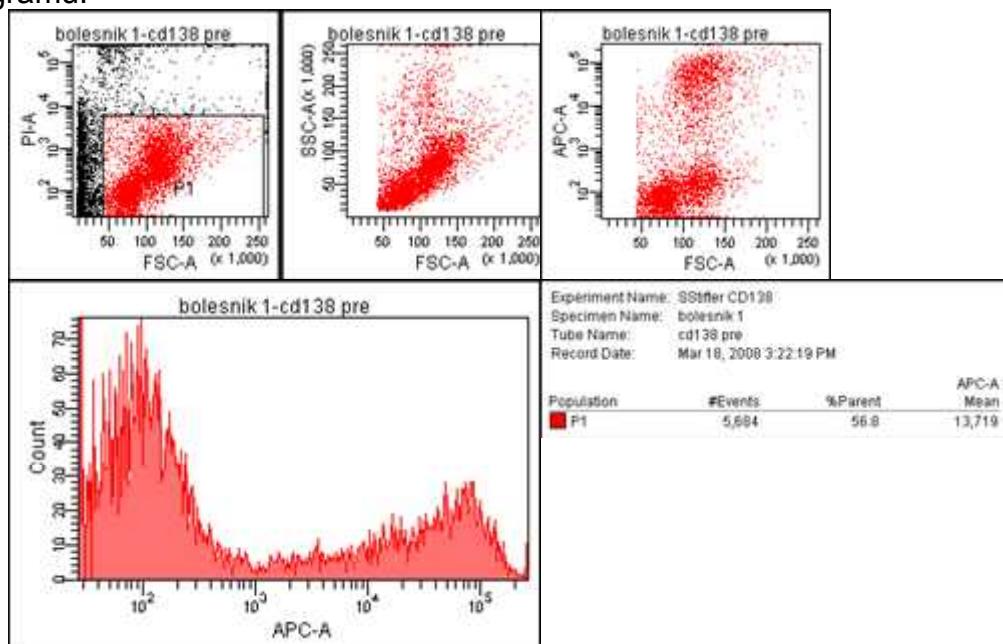
Nalaz citološkog razmaza - 60% plazma stanica

Patohistološki nalaz – 70% plazma stanica u uzorku koštane srži

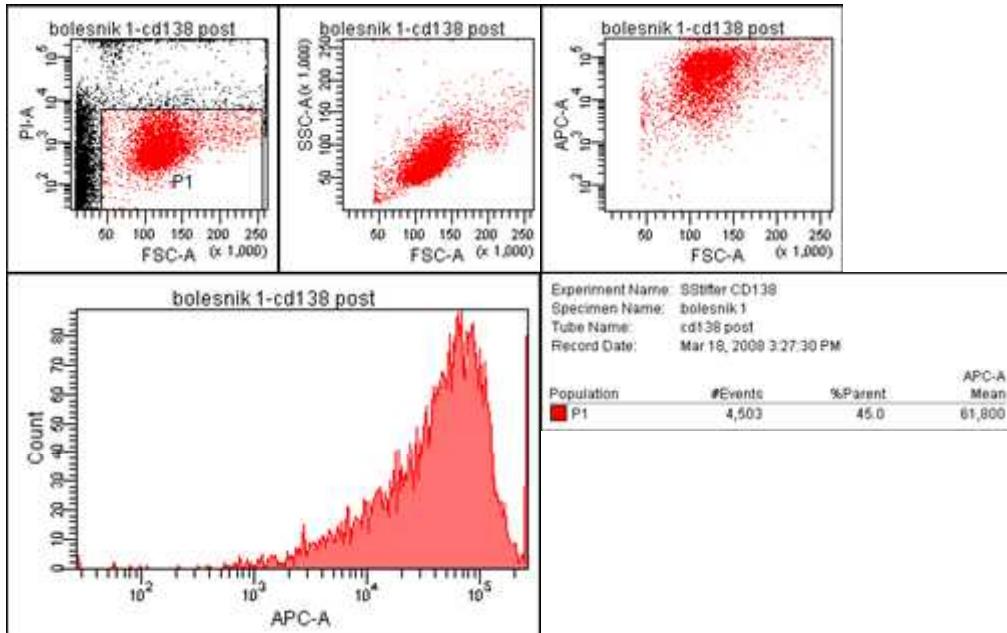
Dobiven uzorak $3,5\text{ml}$ aspirata koštane srži; ukupan broj stanica u uzorku nakon fikoliziranja $6,885 \times 10^6$ stanica /ml. Izolacijom je odvojeno 500 000 plazma stanica.



Slika 14. Prva kontrola na protočnom citometru: bojenjem s propidijevim jodidom (PI) diferenciraju se žive (PI negativne, “vrata“(engl.gate) P1) od mrtvih stanica (PI pozitivne). Prvi dijagram pokazuje populaciju živih stanica u uzorku (crveno), u odnosu na mrtve stanice označene PI. Drugi dijagram prikazuje veličinu i granuliranost populacije živih stanica (mononukleari). Treći dijagram prikazuje populaciju stanica obojanu APC konjugiranim-CD138 protutijelom, koja se prikazuje i na histogramu.



Slika 15. Druga kontrola na protočnom citometru: prvi dijagram pokazuje populaciju živih stanica u uzorku (crveno) obilježenu s magnetskim kuglicama prije separacije u odnosu na mrtve stanice označene propidijevim jodidom (PI). Treći dijagram i histogram prikazuju populaciju stanica obojanu APC-CD138⁺ protutijelom, gdje se uočava CD138 populacija prije separacije.



Slika 16. Treća kontrola nakon magnetske separacije na protočnom citometru. Prvi dijagram pokazuje populaciju živih stanica u uzorku (crveno) u odnosu na mrtve stanice označene propidijevim jodidom (PI). Drugi dijagram prikazuje veličinu izolirane populacije živih stanica (plazma stanice). Treći dijagram prikazuje populaciju stanica obojanu APC-CD138⁺ protutijelom, gdje se uočava jedna populacija (dokaz uspješne separacije), prikazano i na histogramu.

3.4.3. Izolacija CD138⁺ mijelomskeih stanica iz aspirata koštane srži upotreboom protočnog citometra

Protočni citometar je korišten za potvrdu izolacije CD138⁺ stanica te kontrolu postupka (kontrolne točke 1-3). Uzorak aspirata koštane srži je pohranjen uz dodatak antikoagulansa (EDTA) približno 3ml. Monoukleari su izolirani odvajanjem s Ficollom centrifugiranjem po gradientu gustoće po prethodno navedenom protokolu.

Za uzorak u kojem je ukupni broj stanica bio $2,6 \times 10^6$ /ml primjenjena je metoda sortiranja protočnim citometrom primjerena kada se radi o manjem uzorku obzirom na vrijeme potrebno za sortiranje. Stanice su pripremljene u mediju za FACS (FACS pufer=otopina PBS+0,5%FCS), na način da se centrifugiraju na 1200okr/10'.

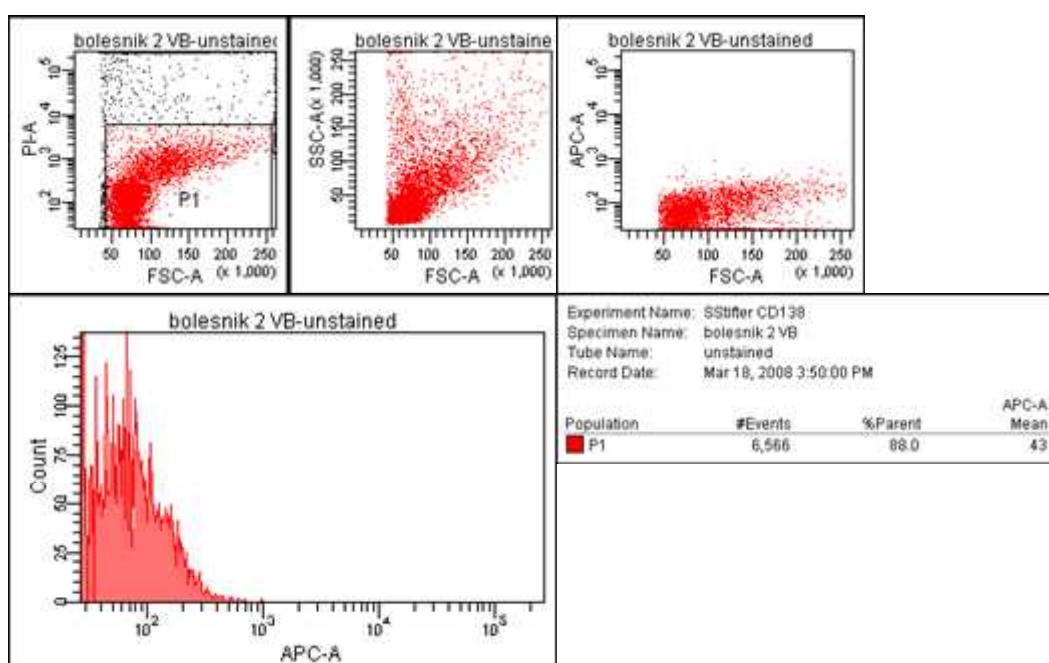
Sortiranje je izvedeno na Cytometru FACS Aria (Becton Dickinson, P07800160), obrada podataka je obavljena u softveru FACSDiva Version 6.0.

Na slikama 17, 18. i 19. prikazan je primjer separacije protočnim citometrom kod jednog bolesnika.

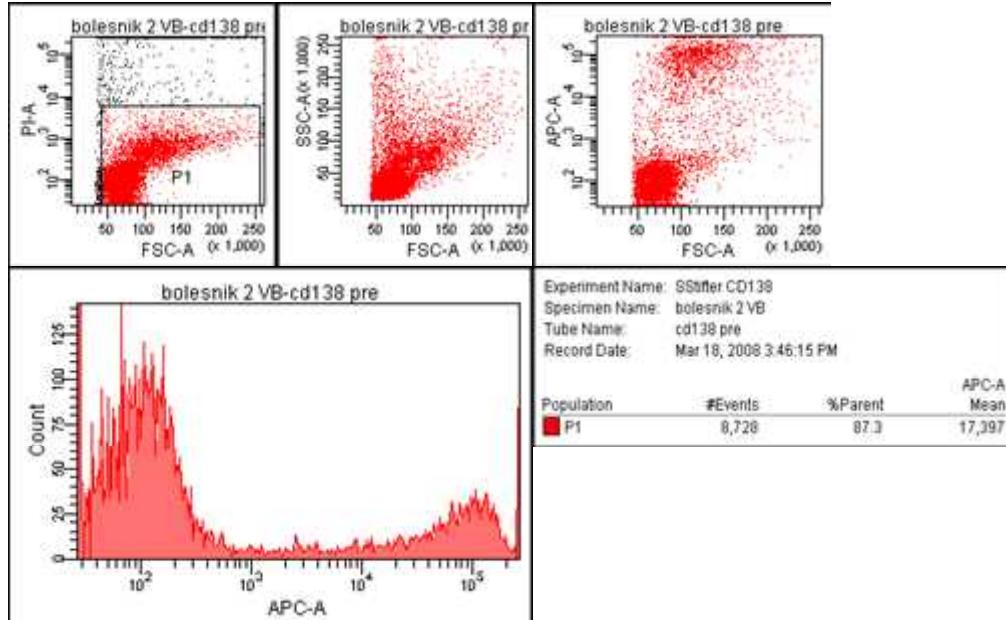
Bolesnik 2: Opći podaci - 70 godina, muškarac

Dobiven uzorak 3,5ml aspirata koštane srži; određen ukupan broj stanica u uzorku nakon fikoliziranja $2,6 \times 10^6$ stanica /ml.

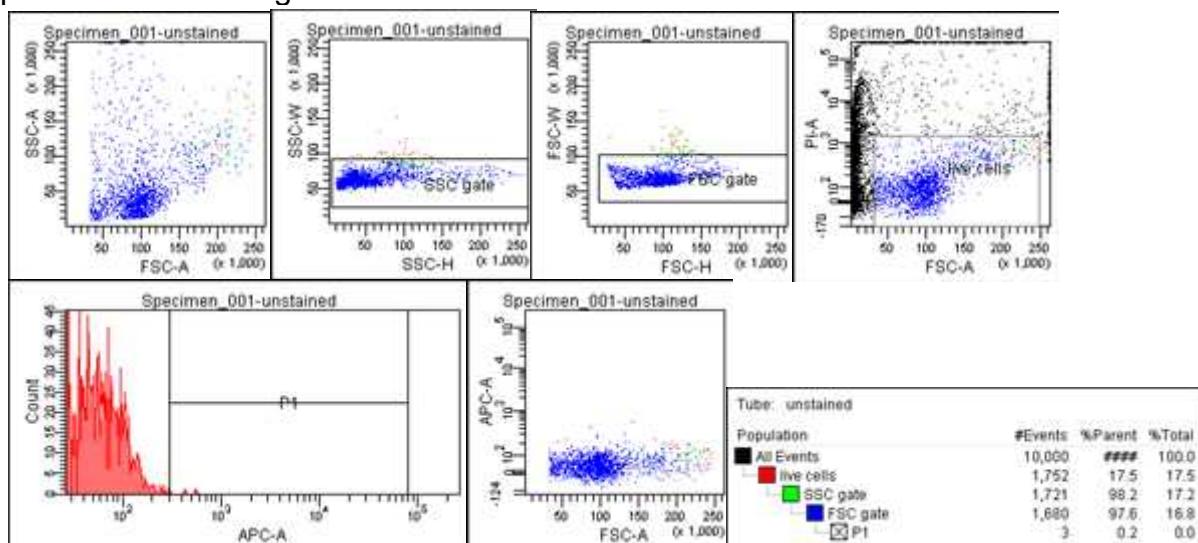
Izolirani broj plazma stanica 100 000 stanica.



Slika 17. Prva kontrola na protočnom citometru. Prvi dot dijagram pokazuje populaciju živih stanica u uzorku (crveno), u odnosu na mrtve stanice označene propidijevim jodidom (PI). Drugi dijagram prikazuje veličinu populacije živih stanica (mononukleari). Treći dijagram prikazuje populaciju stanica obojanu APC-protutijelom, koja se prikazuje i na histogramu.



Slika 18. Druga kontrola na protočnom citometru. Prvi dijagram pokazuje populaciju živih stanica u uzorku (crveno) obilježenom s magnetskim kuglicama prije separacije u odnosu na mrtve stanice označene propidijevim jodidom (PI). Drugi dijagram prikazuje veličinu populacije živih stanica s pojavom dviju populacija mononukleara. Treći dijagram prikazuje dvije populacije stanica obojane APC-CD138⁺ protutijelom, prikazane i na histogramu.



Slika 19. Sortiranje stanica na protočnom citometru: Na prvom dijagramu vidi se veličina uzorka željene populacije stanica obilježenih sa CD138-APC. Na drugom i trećem dijagramu označena su područja „vrata“ (engl. gate) kojim određujemo željnu populaciju stanica prema opsegu (SSC-H; SS-W) i veličini (FSC-H; FSC-W). Na četvrtom dijagramu vide se žive stanice u uzorku (plavo) u odnosu na mrtve stanice označene propidij jodidom (PI). Histogram i šesti dijagram prikazuju sortiranu populaciju stanica obojanu APC-CD138⁺ protutijelom.

3.5. Metoda lančane reakcije polimerazom

Metoda lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda umnažanja određenog odsječka DNA u *in vitro* uvjetima uz pomoć DNA enzima polimeraze. PCR je brza, osjetljiva i specifična metoda (122). Od jedne kopije DNA u PCR reakciji dobije se nekoliko bilijuna kopija (odnosno 2^n kopija, gdje je „n“ broj ciklusa reakcije). Ovaj je proces strogo kontroliran i ovisi o nizu čimbenika. Ne postoji jedinstveni protokol reakcije PCR koji bi bio prikladan za svako umnažanje odsječka DNA. Stoga je potrebno prethodno optimiziranje reakcije. Da bi se određeni odsječak DNA umnožio metodom PCR neophodno je poznavati slijed nukleotida odsječka koji se umnaža. Ovaj slijed nukleotida služi za odabir početnica (engl. *primers*) tj. kraja kraćih nukleotida koji predstavljaju granice (lijevo i desno) odsječka DNA koji se umnaža. Jedna početnica je komplementarna na 3' kraju odsječka jednog DNA lanca, a druga je početnica komplementarna na 5' kraju drugog DNA lanca. Odabir početnica je ključan za uspješnost metode PCR. PCR se izvodi u prosječno 30 do 40 ciklusa koji se sastoje iz tri faze: prvu fazu čini denaturacija dvostrukе uzvojnice DNA na 95°C; drugu fazu čini sparivanje početnica (engl. *annealing temperature*, Ta) na temp. 50-65°C i treću fazu čini produljivanje DNA lanca (engl. *extension*) na 72°C uz pomoć polimeraze. Reakcija se na kraju ohladi na 4°C.

Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (engl. *reverse transcription PCR*, RT PCR) metoda je kojom se na kalupu RNA sintetizira jednolančana molekula DNA, cDNA (komplementarna DNA), koja se zatim umnožava u PCR reakciji. Ova se metoda često rabi u analizi ekspresije gena (120).

U ovom slučaju se RNA obrnuto prepiše u cDNA koja će biti upotrijebljena kao uzorak za PCR. Na ovaj se način dokazuje ekspresija pojedinog gena u određenom tkivu ili stanici.

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-time PCR*) ili kvantitativni RT-PCR je pouzdana i precizna metoda za umnožavanje i kvantifikaciju specifičnih molekula mRNA. U ovoj su reakciji produkti obilježeni fluorescentnom bojom i mjeri se porast fluorescencije kao indikator količine umnoženog PCR produkta, na način da se u svakom ciklusu vrši očitavanje nastalog produkta. Ova se metoda koristi za apsolutnu i relativnu kvantifikaciju DNA/RNA (120). U ovom radu korištena je relativna kvantifikacija za detekciju količine VEGF i MCP-1 transkripta u odnosu na kontrolni transkript (engl. *house-keeping gene*) GPDH.

3.5.1. Izolacija RNA

Na CD138⁺ obilježenim stanicama izdvojenim upotrebom MS kolona i magnetskog separatora, izolirana je RNA u cilju kvantificiranja ekspresije transkripta VEGF i MCP-1 u koštanoj srži.

RNA je izolirana iz smrznutih uzoraka aspirata koštane srži novodijagnosticiranih bolesnika sa mijelomom (prospektivna skupina) i kontrolne skupine bolesnika s monoklonalnom gamapatijom, pohranjenih u mediju za očuvanje i izolaciju RNA: 4M gvanidin izotiocianat u DEPC-H₂O, 0,75M Na citrat-pH 7,0, 10% N-lauril-sakozil + β merkaptoetanol (50ml:0,36ml).

Protokol ekstrakcije RNA iz uzorka po protokolu za izolaciju RNA (Easy prep, Takara, Japan) je slijedeći:

1. U 200 µl homogenizata koštane srži doda se 1ml RNAwiz.
2. Inkubira se na sobnoj temperaturi 5'.
3. Dodaje se 200 µl kloroforma, protrese 20 sekundi, inkubira na sobnoj temperaturi 10'.
4. Centrifugira se na 10 000 okr/min, 15'.
5. Odvoji se gornja (vodena) faza u novu epruvetu i dodaje 500 µl DEPC (dietilpirokarbonat) tretirane vode.
6. Dodaje se 1 ml izopropanola, inkubira na sobnoj temperaturi 10'.
7. Centrifugira se na 10 000 okr/min, 15'.
8. Odstrani se supernatant i talog ispere s 1ml 75% etanola, centrifugira se 5' na 10000 okr/min, ukloni supernatant, osuši talog 30-tak minuta.
9. Resuspendira se talog u DEPC tretiranoj vodi; za otapanje zagrijati na 60⁰C /5'.

Nakon izolacije RNA je pohranjena na –30°C. Stupanj čistoće i kvaliteta RNA se provjerila na agaroznom gelu tretiranom 1% DEPC (slika 20). Potom se iz izolirane RNA je napravljena reverzna transkripcija (prijepis RNA u cDNA).



Slika 20. Uzorci RNA prikazani elektroforezom u agaroznom gelu (1% DEPC tretirani gel, 5 µl RNA na gelu (od 60 µl eluata). Na slici su prikazani različiti primjeri izolata RNA iz koštane srži, koji se razlikuju po konzistenciji i koncentraciji RNA.

3.5.2. Reverzna transkripcija RNA

Reverzna transkripcija je rađena sa komercijalnim kitom RT-PCR, AMV, ver.3,0 (Takara, Japan). Reakcijska shema za PCR za reverznu transkripciju je rađena prema preporuci proizvođača:

Reakcijska shema reverzne transkripcije za 1 uzorak je:

MgCl ₂	6	µl
10 X RT buffer	3	µl
d NTP	3	µl
RNAse inhibitor	0.75	µl
Reverse transcriptase	0.75	µl
Random 9 mers primer	1.5	µl
	Σ 14	µl
RNA	5-10 (8)µl	
H ₂ O	ad	30 µl

Ukupan volumen reakcijske smjese je 30 µl.

Pripremljena reakcijska mješavina s dodanim uzorcima RNA je pipetirana u 0,2 ml PCR mikro tubice, te stavljena u klasični PCR uređaj (PTC-100™ Programmable Thermal Controller - MJ Research Inc.).

Reverzna transkripcija je rađena po sljedećem programu:

RT-PCR

- 1) 30°C 10'
- 2) 45°C 25'
- 3) 99°C 5'
- 4) 4°C 5'
- 5) END

Nakon završene reverzne transkripcije dobivena cDNA je pohranjena na – 30°C.

3.5.3. RealTime PCR za određivanje MCP-1

Real-Time PCR je rađen na Real Time PCR uređaju Light Cycler 1.5 (proizvođač ROCHE – Njemačka), s reagensima SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) - proizvođača (TAKARA BIO INC. – Japan). Za MCP-1 korišten je komercijalni Kit LightCycler®- Primer Set (Search LC, GmbH, Heidelberg, Njemačka, kat. br. 488109).

Reakcijska smjesa za Real-Time PCR je bila sljedeća:

Sybergreen	10	µl
dH ₂ O	3.0	µl
Početnica G-6-PDH Primer mix	2	µl
cDNA	5	µl
	Σ	20

Pripremljena reakcijska mješavina s dodanom cDNA je odpipetirana u kapilarice, centrifugirana, stavljeni u okrugli rotirajući nosač (engl. *carousal*) te smještena u PCR uređaj.

3.6.4. RealTime PCR za određivanje VEGF

Real-Time PCR smo radili na Real Time PCR uređaju Light Cycler 1.5 (proizvođač ROCHE – Njemačka), s reagensima SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) - proizvođača (TAKARA BIO INC. – Japan). Za GPDH koristili smo početnice:

GAPDH-5F (engl.*forward primer*) CCACCCAGAAGACTGTGGAT, GAPDH-3R (reverse primer) TTCAGCTCAGGGATGACCTT, a produkt je bio ~150pb; VEGF-F (forward primer) AACCATGAACCTTCTGCTGTCTTG, VEGF-R (engl.*reverse primer*) TTCACCACCTCGTGATGATTCTG, a produkt je bio ~150pb.

Reakcijska smjesa za Real-Time PCR je bila sljedeća:

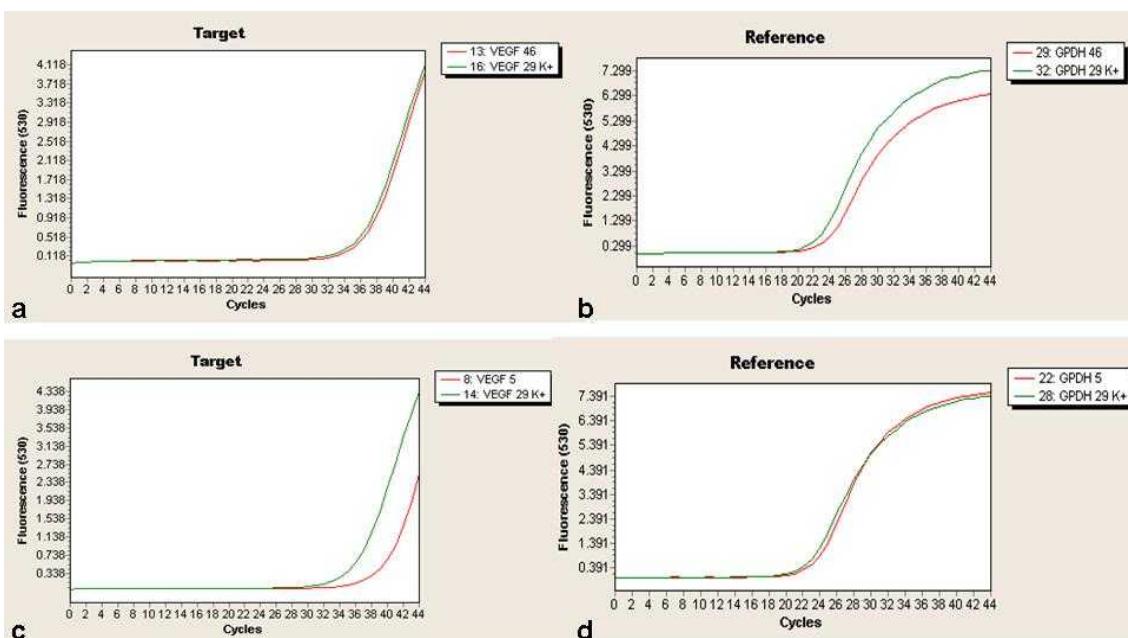
Sybergreen	10	µl
dH ₂ O	3.0	µl
GAPDH-5F početnica (<i>forward primer</i>)	0.4	µl
GAPDH-3R početnica (<i>reverse primer</i>)	0.4	µl
cDNA	5	µl
	Σ	20 µl

Odnosno,

Sybergreen	10	µl
dH ₂ O	3.0	µl
VEGF-F početnica (<i>forward primer</i>)	0.4	µl
VEGF-R početnica (<i>reverse primer</i>)	0.4	µl
cDNA	5	µl
	Σ	20 µl

Pripremljena reakcijska mješavina s dodanom cDNA je odpipetirana u kapilarice, centrifugirana, stavljeni u okrugli rotirajući nosač (engl. *carousal*) te uložena u Light-Cycler.

Na slici 21. je primjer Real-time PCR krivulja umnažanja za VEGF i GPDH transkripte iz RNA izolirane iz ukupnog aspirata koštane srži i izolata plazma stanica.



Slika 21. Primjer Real-time PCR krivulja umnažanja za VEGF i GPDH transkripte iz RNA izolirane iz aspirata koštane srži (slika a, b) i izolata plazma stanica u istog bolesnika (slika c, d).

3.6. Statistička obrada

Statistička obrada je obavljena spomoću računalnog programa SPSS 15.0 za Windows. Za usporedbu razlika između grupa, a obzirom na veličinu uzorka korišteni su parametrijski (t-test) i neparametrijski statistički postupci (Mann-Whitneyev U test). Razlike na varijablama izraženim u obliku frekvencija izračunate su χ^2 -testom. Prilikom obrade rezultata VEGF H-skora, MCP-1 H-skora i NF- κ B H-skora formirane su grupe prema medijanu.

Odnosi među kontinuiranim varijablama ispitani su korelacijom. Izračunat je Pearsonov koeficijent korelacijske.

Za analizu preživljjenja korišten je Kaplan-Meierov postupak.

Preživljjenje bolesnika je praćeno od trenutka kada je dijagnosticirana bolest i minimalno 24 mjeseca. Bolesnici su praćeni u rasponu od 5 do 140 mjeseci prosječno 46 mjeseci. Bolesnici su temeljem kliničkog stadija bolesti svrstani u četiri kategorije, a obzirom na odgovor na terapiju u skupine kompletne remisije, parcijalne remisije, bez odgovora na terapiju, umrlih.

Razina statističke značajnosti zaključivanja je bila $p<0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Kliničko-patološki podatci o bolesnicima s multiplim mijelomom

4.1.1. Klinička obilježja u ispitivanoj skupini bolesnika

U istraživanje je uključeno 79 bolesnika. Dob ispitanika kretala se u rasponu od 42 do 90 godina, srednje vrijednosti $71,2 \pm 10,0$. U naših je ispitanika bio zastupljeniji ženski spol 1,3:1 u odnosu na muški (tablica 8).

Tablica 8. Obilježja ispitivane skupine prema spolu i dobi, zastupljenosti pojedinog kliničkog stadija i prema odgovoru na terapiju bolesnika s multiplim mijelomom (MM).

Obilježja		Bolesnici s MM
	Muškarci	35 (44%)
Spol	Žene	44 (56%)
	M:Ž	1:1,3
Dob	Raspon	42-90
	Medijan	75
Klinički stadij		
	Stadij I	9 (12,3%)
	Stadij IIA	24 (32,9%)
	Stadij IIB	2 (2,7%)
	Stadij IIIA	27 (37,0%)
	Stadij IIIB	11 (15,1%)
	Ukupno	73 (100%)
Odgovor na terapiju		
	Odgovorio/la	25 (67,6%)
	Bez odgovora	12 (32,4%)
	Ukupno	37 (100%)

U trenutku postavljanja dijagnoze MM najveći broj bolesnika bio je u kliničkom stadiju IIIA (tablica 8).

Bolesnici su praćeni u retrospektivnoj skupini u vremenu najmanje 24 mjeseca, od trenutka postavljanja dijagnoze (N=60). Vrijeme preživljjenja se kretalo u rasponu od 5 do 140 mjeseci, srednja vrijednost je bila $46 \pm 33,2$ mjeseci, medijan 36 mjeseci. Utvrdilo se da je 30 živih (51%) i 29 umrlih (49%) (za jednog bolesnika se nije dobio podatak o preživljjenju).

4.1.2. Patohistološka i citološka obilježja ispitivanih uzoraka

U bioptičkom uzorku je analiziran tip i postotak infiltrata plazma stanica u koštanoj srži koji je podijeljen u četiri kategorije. U koštanoj srži naših bolesnika (N=72) načešće je bio zastupljen difuzni tip infiltrata u 31 uzorku (43,1%) u odnosu na ostale tipove (nodularni N=10, 13,9%; intersticijski N=17, 23,6%; nodularni/intersticijski N=14, 19,4%).

Procjenom zastupljenosti postotka infiltracije plazma stanica u koštanim biopsijama, utvrđeno je da je u najvećem broju slučajeva koštana srž bila ispunjena s 25-49% mijelomske stanice (31 bolesnik ili 42,5%) dok su ostali postoci bili zastupljeni u manjem broju bolesnika (<25% u 13 bolesnika; 50-74% u 16 bolesnika i $\geq 75\%$ u 13 bolesnika; N=73).

Rezultati citološke analize aspirata koštane srži, koji obuhvaćaju postotak zastupljenosti i zrelost plazma stanica, prikazani su u tablici 9. Vidi se gotovo podjednaka raspodjela bolesnika u skupini s <30% ili >30% infiltrata plazma stanica, kao i nešto veći postotok zrelih oblika plazma stanica.

Tablica 9. Citološki nalaz zastupljenosti i zrelosti plazma stanica, te odnosa postotka tumorskih stanica u koštanoj srži i postotak srednje vrijednosti mijelomskih stanica u koštanoj srži bolesnika s obzirom na izgled plazma stanica u bolesnika s multiplim mijelomom.

Plazma stanice u aspiratu			Ukupno (N/%)
Zastupljenost	> 30 %	24 (57,1%)	42 (100%)
	= 30 %	18 (42,9%)	
Citološka obilježja	Zrele	37 (61,7%)	60 (100%)
	Atypične	23 (38,3%)	
Plazma stanice	X (%)	±SD	t; p
Zrele	36,9	21,6	$t = 2,930$ p = 0,005
Atypične	55,4	26,6	
Plazma stanice u biopsiji koštane srži			
% Infiltrata	Zrele	Atypične	
0-24	8 (22,2%)	2 (8,7%)	
25-49	18 (50,0%)	7 (30,4%)	$\chi^2 = 8,3;$ s.s. = 3
50-74	7 (19,4%)	6 (26,1%)	p = 0,040
75-100	3 (8,3%)	8 (34,8%)	
Ukupno	36 (100%)	23 (100%)	

X-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija; t-t-test; p-vjerojatnost
 χ^2 – hi-kvadrat; s.s. – stupnjevi slobode; p – vjerojatnost

Međusobnom usporedbom, odnosno statističkom analizom, citoloških obilježja iz aspirata koštane srži i nalaza infiltrata plazma stanica u koštanoj biopsiji nađen je značajno veći postotak tumorskog infiltrata (<50%) u slučajevima kad je mijelom sadržavao atypične plazma stanice, kao što to prikazuje tablica 9 (t-test=2,93; p=0,005).

Isto tako je uočena i povezanost izgleda plazma stanica i postotka tumorskih infiltrata, prikazano u tablici 9.

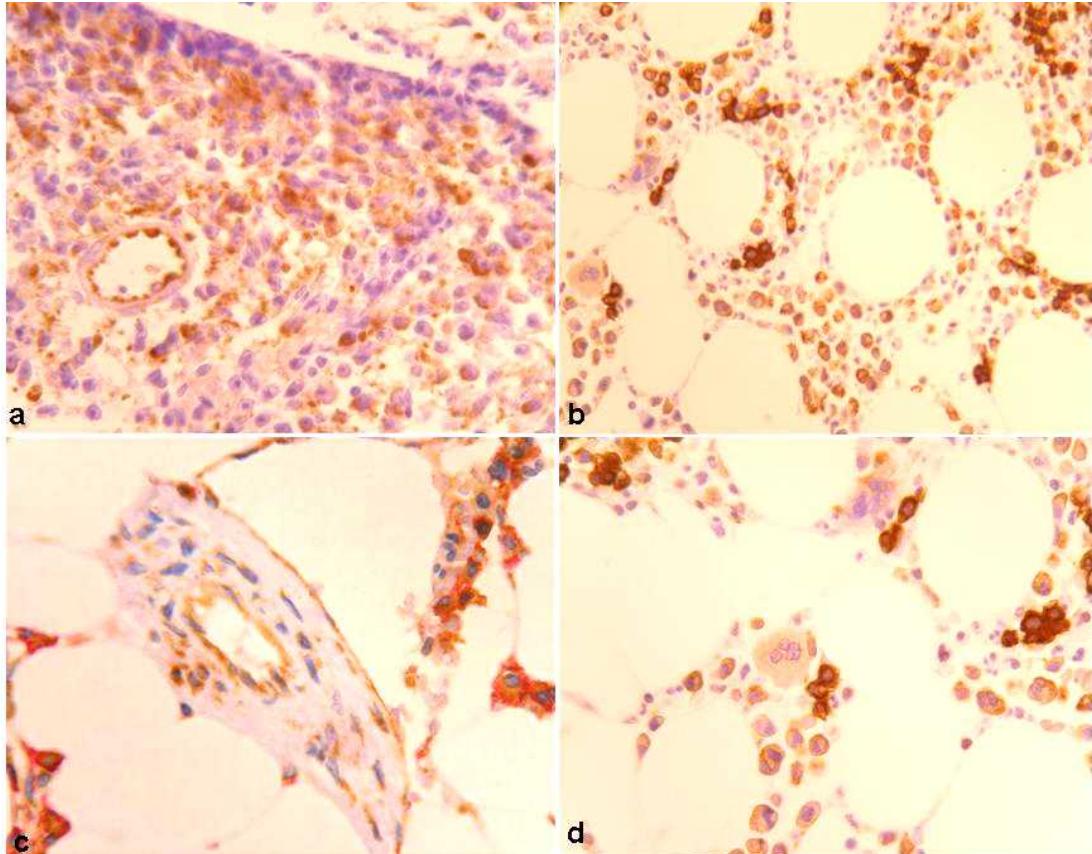
Testiranjem podudarnosti postotka tumorskih plazma stanica u uzorku aspirata i biopsiji koštane srži uočena je statistički značajna korelacija ($r= 0,4$, $p<0,05$).

4.2. Rezultati imunohistokemijske analize

Imunohistokemijski je utvrđena srednja gustoća malih krvnih žila (MVD) u stromi te PI (proliferacijski indeks), izražaj VEGF, MCP-1 i NF- B /p65 u tumorskim stanicama MM.

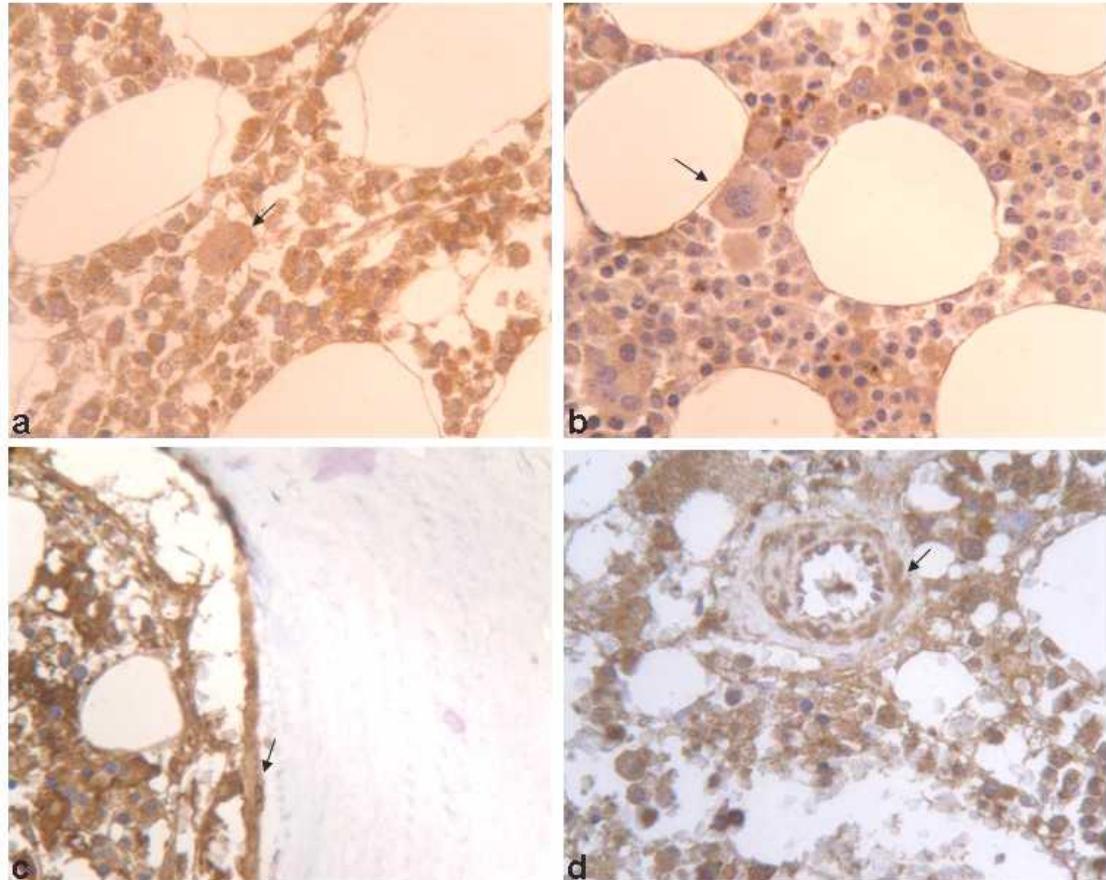
Međutim, pregledom obojenih preparata primjećeno je da se osim na plazma stanicama analizirani proteini eksprimiraju u različitom intezitetu i na drugim elementima koštane srži, kao npr. na stanicama hematopoeze, stanicama strome i mikrookoliša srži.

Izražaj VEGF uočen je u citoplazmama: endotelnih stanica, glatkih mišićnih stanica krvnih žila, osteoklasta, prekursora granulocita, eritrocita, megakariocita kao i u vidu zrnaca slobodno u ekstracelularnom matriksu (slika 23).



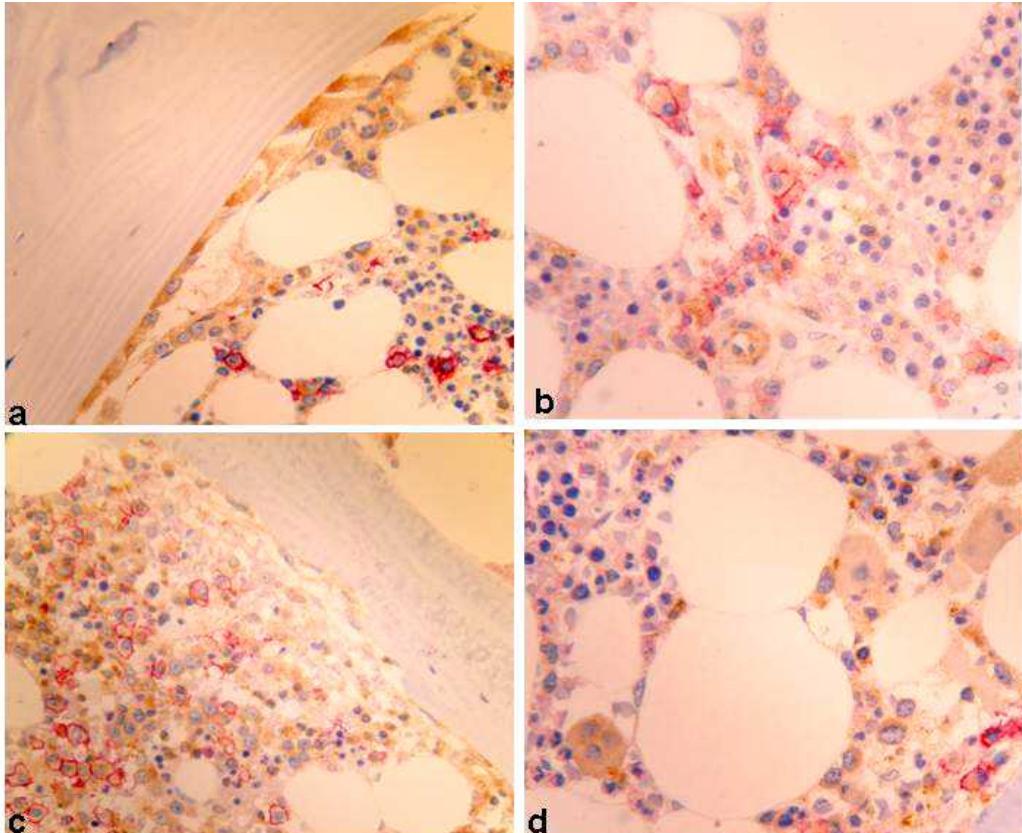
Slika 23. Detalji bojenja VEGF u koštanoj biopsiji bolesnika s multiplim mijelomom. a) Prisutnost citoplazmatskog obojenja u endotelu krvnih žila na povećanju x200. b) Ekspresija VEGF u citoplazmama ostalih stanica hematopoeze, eritronima i megakariocitu, x200. c) Ekspresija VEGF u mišićnici krvne žile u preparatu dvojnog bojanja, uz vidljive označene plazma stanica (crvene membrane) na povećanju x600. d) Ekspresija VEGF u citoplazmama ostalih stanica hematopoeze, eritronima i megakariocitu, na povećanju x600.

MCP-1 protein u koštanim biopsijama uočavao se u citoplazmama stanica i slobodan u ekstracelularnoj stromi koštane srži. Bojenje je većinom bilo fino zrnato (granulirano). U pojedinim stanicama koštane srži kao npr. u makrofagima granula su većinom bila vrlo intenzivno obojena dok su druge stanice hematopoeze, npr. megakariociti, stanice mijelopoeze, osteoblasti, općenito pokazivale slabiji intezitet i veću varijabilnost u obojenju između pojedinih uzoraka koštanih biopsija (slika 24).



Slika 24. Detalji bojenja MCP-1 u koštanoj biopsiji bolesnika s multiplim mijelomom.
a) Prisutnost citoplazmatskog obojenja u makrofagu (strelica), x600. b) Ekspresija MCP-1 u citoplazmama ostalih stanica hematopoeze, eritronima i megakariocitu (strelica), x600. c) Ekspresija MCP-1 u, eritronima i osteoblastima uz koštanu gredicu, x600. d) Ekspresija MCP-1 u stromi koštane srži kao i u mišićnici i endotelu krvne žile (strelica), na povećanju x600.

Bojenje NF- B/p65 podjedinice je procjenjivano kao nuklearni (u nastavku označenog nNF- B/p65) i citoplazmatski (u nastavku označenog cNF- B/p65) izražaj. Citoplazmatsko obojenje, u različitom intezitetu, se opažalo u plazma stanicama kao i u ostalim stanicama hematopoeze (eritroni, mijelopoeza, megakariociti) te stanicama mikrookoliša srži (osteoblasti, endotelne stanice, glatke mišićne stanice) (slika 25).



Slika 25. Detalji bojenja NF- *B*/p65 u koštanoj biopsiji bolesnika s multiplim mijelomom. a) Prisutnost citoplazmatskog obojenja u osteoblastima uz gredicu, x600. b) Ekspresija NF- *B*/p65 u citoplazmi endotelnih stanica i mišićnici krvne žile, x600. c) Ekspresija NF- *B*/p65 u citoplazmama ostalih stanica hematopoeze, eritronima, x400. d) Ekspresija NF- *B*/p65 u citoplazmi megakariocita, na povećanju x600.

4.2.1. Vrijednosti srednje gustoće malih krvnih žila, proliferacijskog indeksa, VEGF, MCP-1 i NF- *B* /p65

Pregledom biopsija obojenih s CD34 općenito je uočeno da uzorci s većim nodularnim ili difuznim infiltratima mijelomske stanice sadrže u pravilu veći broj krvnih žila koje su smještene unutar same tumorske mase. Međutim, u uzorcima s intersticijskim ili manjim nodularnim tipom infiltracije broj krvnih žila je bio manji i pretežno lokaliziran na tumorskim rubovima. Broj krvnih žila određen kao MVD na 78 uzoraka MM (uz povećanje x400) iznosio je $18,8 \pm 1,4$. Proliferacijska aktivnost određena je ekspresijom biljega Ki67 i iskazana kao PI na 79 uzoraka MM prosječno

je iznosila $2,0 \pm 0,4$. Primjetilo se da opsežnije tumorske infiltrate prati viši PI, koji se može uočiti češće pri pojavi atipičnih plazma stanica u uzorku. Značajno je veća proliferacijska aktivnost uočena u ostalim stanicama hematopoeze prisutnim u srži, što je očekivana značajka koštane srži.

Kao što je opisano u metodama procjena imunohistokemijski obojanih preparata na VEGF, MCP-1 i NF- B/p65 vršila se određivanjem histo-skora (H-skor). Srednja vrijednost H-skora VEGF je iznosila $121,6 \pm 11,4$ (N=77), a MCP-1 $200,5 \pm 9,2$ (N=78). Vrijednost H-skora cNF- B/p65 je iznosila $161 \pm 9,2$, a nNF- B/p65 prosječno $22,1 \pm 2,0$. Statistički je utvrđena značajna povezanost nuklearne i citoplazmatske ekspresije NF- B/p65 ($r=0,64$, $p<0,01$). Sve vrijednosti analiziranih parametara imunohistokemijskom metodom navedene su u tablici 10.

Tablica 10. Deskriptivni statistički parametri za ispitivane imunohistokemijske varijable.

Statistički parametri	MVD	Ki67	MCP-1	VEGF	nNF-κB	cNF-κB
Aritmetička sredina	18,81	2,01	200,46	121,58	22,15	161,92
Standardna pogreška aritmetičke sredine	1,37	0,35	9,25	11,40	2,72	9,23
Medijan	16,75	1,00	206	94,00	14,00	179,00
Mod	11,30	0,00	300	4	0	58
Standardna devijacija	12,10	3,15	81,69	100,07	23,99	81,55
Raspon	60,15	16,00	288	300	124	286
Minimum	2,00	0,00	12	0	0	10
Maksimum	62,15	16,00	300	300	124	296

4.2.2. Usporedba imunohistokemijski utvrđenih parametara

Rezultati korelacije između ispitivanih imunohistokemijskih parametara prikazani su u tablici 11. Tako se vidi negativna korelacija između MVD i VEGF ($r=-0,35$, N=76),

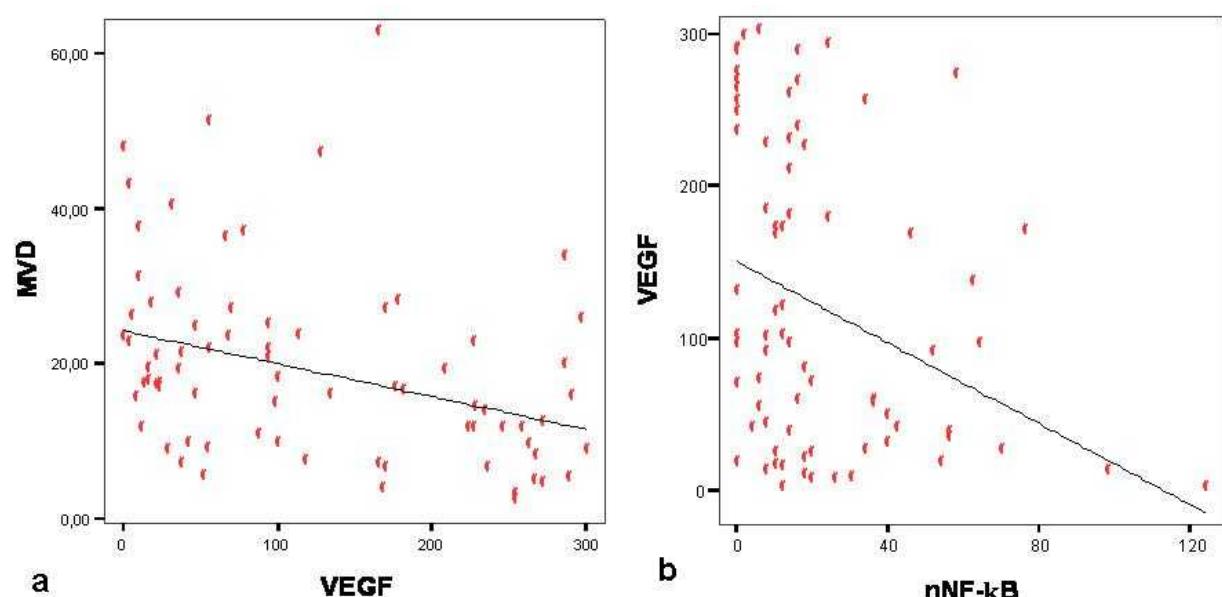
odnosno veći broj krvnih žila u tumoru je pratio niži H-skor VEGF u tumorskim stanicama (slika 26). Negativna korelacija je također utvrđena između nNF- κ B/p65 i VEGF ($r = -0.32$, $N=76$), naime niža nuklearna ekspresija nNF- κ B/p65 je uočena pri jačoj VEGF ekspresiji (slika 26).

Jača citoplazmatska ekspresija cNF- κ B/p65 udružena je s jačom nuklearnom ekspresijom nNF- κ B/p65 te one značajno koreliraju ($r=0,6$, $N=76$).

Tablica 11. Korelacije između ispitivanih imunohistokemijskih varijabli.

Imunohistokemijske varijable	Ki67	MCP-1	VEGF	nNF- κ B	cNF- κ B
<i>MVD</i>	-0,07	0,11	-0,35**	0,12	0,11
<i>Ki67</i>		0,12	-0,20	0,17	-0,08
<i>MCP-1</i>			-0,01	0,06	-0,08
<i>VEGF</i>				-0,32**	-0,19
<i>nNF-κB</i>					0,64**

Pearson ** $p < 0.01$



Slika 26. Prikaz negativne korelacije između: a) H-skora VEGF i srednje gustoće malih krvnih žila (MVD), ($r=-0,352$, $p=0,002$, $N=76$) i b) H-skora VEGF i nuklearnog H-skora NF- κ B/p65 (nNF- κ B/p65, ($r=-0,32$, $p=0,002$, $N=76$)).

Kad su uzorci pregrupirani u dvije skupine, s visokim i niskim vrijednostima prema medijanu (skupina s visokim (iznad medijana) odnosno niskim vrijednostima (ispod medijana)) primjenom χ^2 –hi-kvadrat testa dobivene značajnosti su potvrđene; za MVD i VEGF prikazano u tablici 12. te za VEGF i nNF- κ B/p65 u tablici 13.

Tablica 12. Odnos između visokog i niskog VEGF i srednje gustoće malih krvnih žila (MVD).

VEGF	MVD		$\chi^2 = 7,7$; s.s. = 1 p = 0,006
	Niski	Visoki	
Niski	11 (29,7%)	25 (64,1%)	
Visoki	26 (70,3%)	14 (35,9%)	
Ukupno	37 (100%)	39 (100%)	

χ^2 – hi-kvadrat; s.s. – stupnjevi slobode; p – vjerojatnost

Tablica 13. Odnos između skupine s niskim i visokim VEGF i u odnosu na skupinu s visokim i niskim nNF- κ B.

nNF- κ B	VEGF		$\chi^2 = 7,5$; s.s. = 1 p = 0,006
	Niski	Visoki	
Niski	13 (35,1%)	27 (69,2%)	
Visoki	24 (64,9%)	12 (30,8%)	
Ukupno	37 (100%)	39 (100%)	

χ^2 – hi-kvadrat; s.s. – stupnjevi slobode; p – vjerojatnost

Promatra li se odnos MVD prema ostalim imunohistokemijski određivanim biljezima uočava se udruženost s ekspresijom nNF- B/p65 ($p<0,001$), cNF- κ B ($p<0,005$), kao i udruženost s PI ($p=0,05$). Ekspresija n/cNF- B/p65 je značajno viša u zrelim plazma stanicama u odnosu na atipične za razliku od proliferacijske aktivnosti koja je značajno viša s pojavom atipičnih plazma stanica, u odnosu na zrele plazma stanice.

Pri tom je uočena i značajna obrnuta udruženost VEGF i cNF- B/p65 na način da više vrijednosti VEGF prate niže vrijednosti cNF- B/p65 ($\chi^2=4,3$, $p<0,038$) tablica 14.

Tablica 14. Odnos između skupine s niskim i visokim VEGF i u odnosu na skupinu s visokim i niskim cNF- κ B.

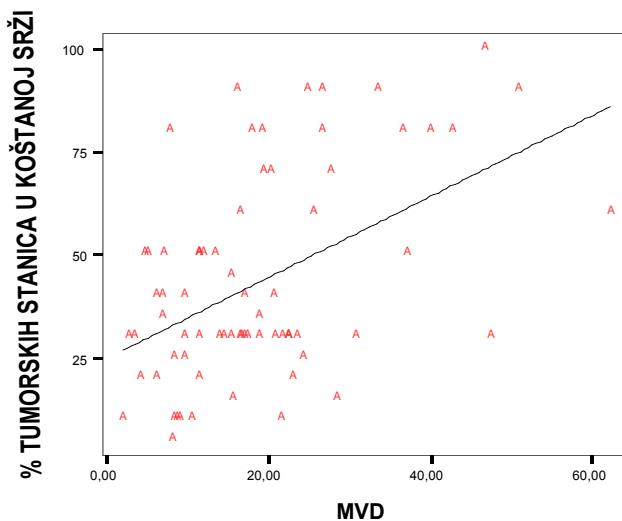
cNF- κ B	VEGF		$\chi^2 = 4,3$; s.s. = 1 p = 0,038
	Niski	Visoki	
Niski	13 (35,1%)	24 (61,5%)	
Visoki	24 (64,9%)	15 (38,5%)	
Ukupno	37 (100%)	39 (100%)	

χ^2 – hi-kvadrat; s.s. – stupnjevi slobode; p – vjerojatnost

4.2.3. Rezultati odnosa ispitivanih patohistoloških parametara i kliničkog stadija bolesti

Analiziran je odnos između svih parametara koji su uključeni u studiji, a to su patološki: gustoća tumorskih infiltrata i zrelost plazma stanica; imunohistokemijski: MVD, VEGF, MCP-1, NF- κ B i Ki67, PI te klinički: stadij bolesti i odgovor na terapiju.

Uočila se značajna povezanost MVD s postotkom zahvaćenosti koštane srži tumorskim stanicama tj. veći broj krvnih žila opaža se u uzorcima s većim postotkom infiltracije koštane srži ($r=0,49$, $p<0,001$) slika 27.



Slika 27. Povezanost između srednje gustoće malih krvnih žila (MVD) i postotka tumorskih stanica u koštanoj srži ($r=0,5$; $p<0,001$).

Također je ekspresija n/cNF- B/p65 bila značajno viša u zrelim plazma stanicama u odnosu na atipične za razliku od proliferativne aktivnosti koja je značajno viša s pojavom atypičnih plazma stanica, u odnosu na zrele plazma stanice (tablica 15).

Tablica 15. Srednje vrijednosti imunohistokemijskih parametara s obzirom na citološki nalaz plazma stanica.

IMUNOHISTOKEMIJSKE VARIJABLE	PLAZMA STANICE				t ; p	
	Zrele		Atipične			
	X	SD	X	SD		
MVD	18,0	10,7	20,7	15,1	$t=0,8$; $p=0,5$	
Ki67	1,6	2,9	3,1	3,5	$t=1,9$; $p=0,053$	
MCP-1	195,5	84,1	212,3	76,2	$t=0,8$; $p=0,4$	
VEGF	115,7	97,8	136,4	106,5	$t=0,8$; $p=0,4$	
nNF- κ B	26,5	26,2	11,2	11,4	$t=3,6$; $p=0,001$	
cNF- κ B	178,1	76,9	120,8	80,3	$t=2,9$; $p=0,005$	

X-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija; t-t-test; p-vjerojatnost

Odgovor na terapiju je značajno povezan s MVD, na način da bolesnici skupine bez odgovora na terapiju imaju više vrijednosti MVD ($\chi^2=3,8$, $p=0,05$) tablica 16.

Tablica 16. Odnos između odgovora na terapiju u bolesnika s multiplim mijelomom i srednje gustoće malih krvnih žila (MVD).

MVD	Odgovor na terapiju		χ^2 ; p
	Bez odgovora	Odgovorili	
Niski MVD	5 (41,7%)	20 (80,0%)	$\chi^2 = 3,8$; s.s. =1 p =0,05
Visoki MVD	7 (58,3%)	5 (20,0%)	
Ukupno	12 (100%)	25 (100%)	

χ^2 – hi-kvadrat; s.s. – stupnjevi slobode; p – vjerojatnost

Nadalje, usporedbom kliničkog stadija bolesti i ekspresije imunohistokemijski određivanih biljega u bolesnika u kliničkom stadiju III (koji je uključivao IIIA i IIIB) dobine su se značajno više vrijednosti MVD ($22,2 \pm 14,1$, $p < 0,01$), a u istoj su skupini opažene i više vrijednosti proliferacijskog indeksa koje su blizu statističke značajnosti ($2,4 \pm 3,6$, $p = 0,06$) (tablica 17).

Tablica 17. Prosječne vrijednosti imunohistokemijskih varijabli i postotka tumorskih stanica u koštanoj srži s obzirom na klinički stadij.

Imunohistokemijske varijable i % tumorskih stanica u koštanoj srži	Klinički stadij				t; p	
	I i II		III			
	X	SD	X	SD		
MVD	14,5	7,1	22,2	14,1	t=2,9;p=0,005	
Ki67	1,9	2,9	2,4	3,6	t=0,6;p=0,6	
MCP-1	202,4	70,8	198,5	89,2	t=0,2;p=0,8	
VEGF	136,9	97,7	111,6	102,7	t=1,1;p=0,3	
nNF-κB	18,6	19,4	25,6	28,6	t=1,2;p=0,2	
cNF-κB	160,5	82,6	163,7	81,3	t=0,2;p=0,8	
% tumorskih stanica u koštanoj srži	40,6	23,4	47,9	25,5	t=1,2;p=0,2	
Imunohistokemijske varijable i % tumorskih stanica u koštanoj srži	Klinički stadij				z; p	
	I		II i III			
	X	SD	X	SD		
MVD	15,7	7,7	18,8	12,3	z=0,4;p=0,7	
Ki67	0,7	1,4	2,4	3,4	z=2,5;p=0,012	
MCP-1	194,0	64,5	201,2	82,9	z=0,4;p=0,7	
VEGF	131,1	107,5	122,7	100,3	z=0,2;p=0,8	
nNF-κB	21,6	19,6	22,3	25,4	z=1,2;p=0,9	
cNF-κB	188,9	714	158,3	82,5	z=1,1;p=0,3	
% tumorskih stanica u koštanoj srži	28,9	15,6	46,4	24,9	z=1,9;p=0,051	

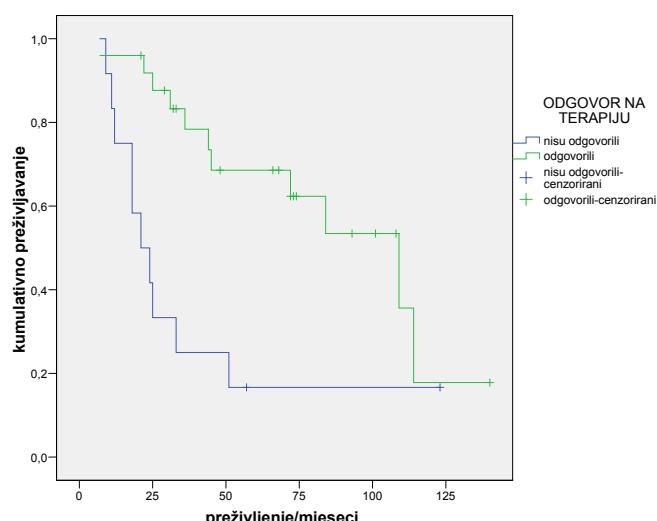
X-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija; t-test; z -z-vrijednost za Mann-Whitneyev test; p-vjerojatnost.

Preraspodjelom bolesnika i promatranjem udruženog kliničkog stadija II i III primjećeno je da se u uzorcima tumora bolesnika u kliničkom stadiju II i III nalazi

značajno viša proliferativna aktivnost ($p=0,012$), kao i da isti bolesnici imaju značajno veći postotak tumorskog infiltrata u koštanoj srži ($p<0,051$) tablica 17.

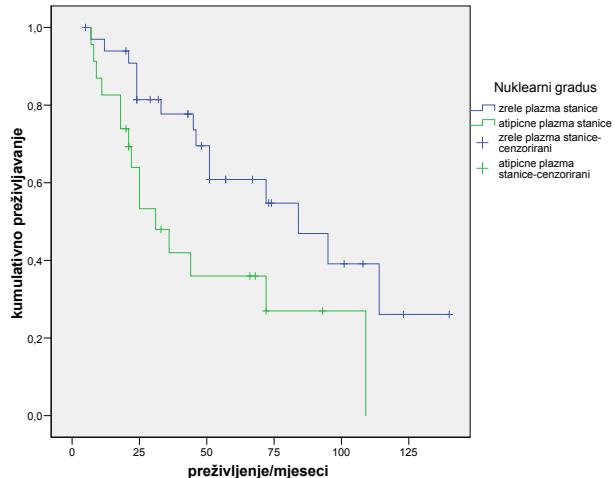
4.2.4. Odnos ispitivanih patohistoloških parametara, kliničkih pokazatelja bolesti, odgovora na terapiju i preživljjenja bolesnika

Analizom preživljjenja bolesnika, koji su uključeni u ovu studiju, utvrdila se njegova značajna povezanost s očekivanim parametrom kao što je to odgovor na terapiju ($p<0.05$) (slika 28).



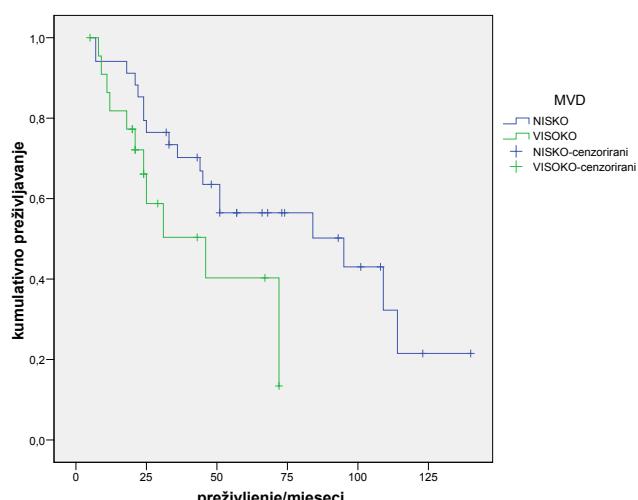
Slika 28. Preživljenje bolesnika obzirom na odgovor na terapiju. Bolesnici iz skupine koja je odgovorila na terapiju ulaskom u kompletnu, parcijalnu remisiju ili minimalnim terapijskim odgovorom imaju značajno dulje preživljenje u odnosu na bolesnike bez odgovora na terapiju ($p<0.05$).

Nadalje, pokazalo se značajno kraće preživljenje bolesnika s infiltratima atipičnih plazma stanica ($p<0,05$) (slika 29).



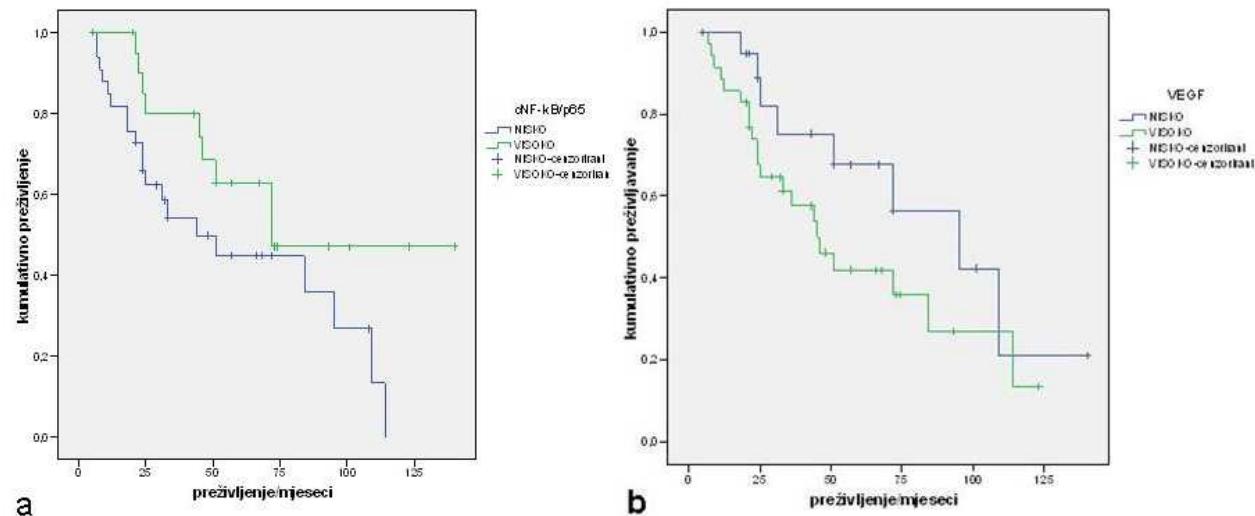
Slika 29. Preživljenje bolesnika obzirom na zrelost plazma stanica. Opaža se značajno duže preživljenje bolesnika s infiltratima zrelih u odnosu na zastupljenost atipičnih plazma stanica ($p<0,05$).

Međutim, poseban interes bilo je utvrditi moguću povezanost između preživljjenja i imunohistokemijskih parametara analiziranih u ovoj studiji. Tako je statistički dobiveno značajno duže, odnosno značajno veća vjerojatnost preživljavanja ($X=79,3$ mjeseci) u bolesnika s nižim vrijednostima MVD, u odnosu na one bolesnike koji imaju manju vjerojatnost preživljavanja ($x = 43,3$ mjeseci) kod većih vrijednosti MVD ($p=0,04$) (slika 30).



Slika 30. Preživljenje bolesnika obzirom na nisku (ispod medijana) odnosno visoku (iznad medijana) vrijednost srednje gustoće malih krvnih žila (MVD), (Log Rank Mantel-Cox) $\chi^2 = 4,2$; $s=1$; $p=0,04$.

Posebno je uočeno neočekivana povezanost izražaja NF- B/p65 i preživljenja. Bolesnici s višim vrijednostima cNF- B/p65 u prosjeku su preživjeli 80,8 mjeseci, dok oni s niskim vrijednostima cNF- B/p65 48,2 mjeseca. Dulje preživljenje bolesnika s visokim vrijednostima cNF- B/p65 bilo je na granici statističke značajnosti (slika 31) ($p=0,056$).



Slika 31. Ukupno preživljenje bolesnika obzirom na cNF- B/p65 i VEGF. a) Ukupno preživljenje obzirom na visoke i niske vrijednosti cNF- B/p65. b) Ukupno preživljenje obzirom na visoke i niske vrijednosti VEGF ($p = 0,07$).

Međutim, nije se uočila značajna povezanost PI tumorskih stanica i preživljenja. Nije nađena ni značajna razlike u duljini preživljenja s obzirom na visoku i nisku razinu VEGF, iako postoji tendencija dužeg preživljavanja kod niskog VEGF (Breslow hi-kvadrat=3,1; ss=1; $p=0,07$) (slika 33).

Da bi ispitali kako se na osnovi imunohistokemijskih varijabli, postotka tumorskih stanica u koštanoj srži te dobi i spola ispitanika može predvidjeti odgovor na terapiju korištena je binarna logistička regresijska analiza. Rezultati su prikazani u tablici 18. Značajne prediktorske varijable su cNF- κ B i dob ispitanika. Temeljem toga može se zaključiti da je značajno veća vjerojatnost da će starije osobe kao i bolesnici sa

značajno visokim cNF- κ B (skupina sa vrijednostima iznad medijana) odgovoriti na terapiju (neovisno o načinu odgovora tj. kompletnom, parcijalnom remisijom ili minimalnim terapijskim odgovorom).

Tablica 18. Rezultati binarne logističke regresijske analize za predviđanje odgovora na terapiju.

PREDIKTORI	B	S.E.	Wald	s.s.	p
MVD	0,04	0,07	0,3	1	0,6
Ki67	0,4	0,3	2,8	1	0,1
MCP-1	0,005	0,008	0,4	1	0,5
VEGF	0,007	0,008	0,6	1	0,4
nNF-κB	-0,1	0,08	2,6	1	0,1
cNF-κB % tumorskih stanica u koštanoj srži	0,02	0,01	4,0	1	0,045
SPOL	-0,02	0,02	0,5	1	0,5
DOB	2,3	1,2	3,6	1	0,1
	0,2	0,1	4,4	1	0,035

Na osnovi korištenog skupa prediktorskih varijabli za 85,7% ispitanika može se točno klasificirati odnosno reći odgovaraju li na terapiju ili ne. To je za 35,7 % bolje u odnosu na slučajno pogađanje (koje za 2 grupe iznosi 50%). Točnija je klasifikacija ispitanika koji odgovaraju na terapiju (95,7% točnih klasifikacija), nego onih koji ne odgovaraju na terapiju (66,7% točnih klasifikacija).

4.3. Vrijednosti VEGF i MCP-1 analizirane u plazmi

4.3.1. Vrijednosti VEGF i MCP-1 analizirane u plazmi

Vrijednosti VEGF i MCP-1 određivane su u plazmi 39 bolesnika ELISA metodom.

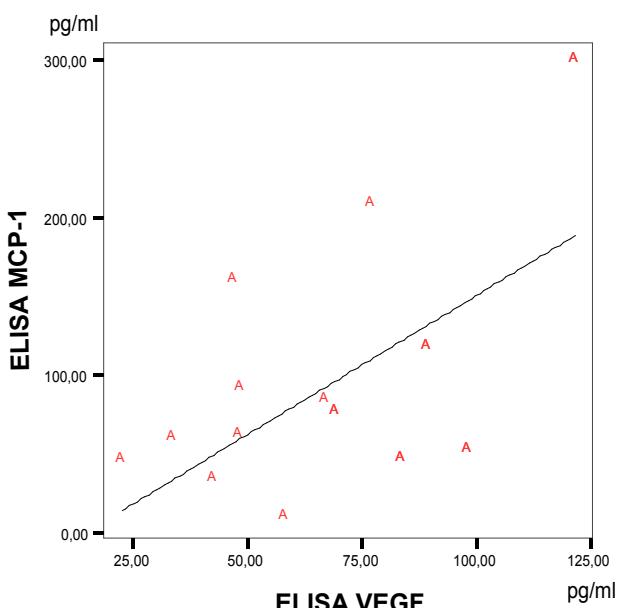
Temeljem kliničkih nalaza u bolesnika je postavljena sumnja na multipli mijelom u trenutku pohrane plazme, a u konačnici je u 19 slučajeva postavljena dijagnoza MM. U preostalih 20 bolesnika dijagnosticirana je monoklonalna gamapatija (N=11) ili dijagnoza van skupine plazmastaničnih bolesti (N=9). Kao kontrolna skupina za potrebe daljnjih analiza korištena je skupina bolesnika s kliničkim obilježjima monoklonalne gamapatije (N=8), jer je bila najadekvatnija za usporedbu, tablica 19.

Uočena je značajna razlika u koncentracijama VEGF u skupini bolesnika s mijelomom u odnosu na kontrolnu skupinu, odnosno u novodijagnosticiranih bolesnika s mijelomom značajno su više vrijednosti VEGF u plazmi u odnosu na skupinu bolesnika s monoklonalnom gamapatijom.

Tablica 19. Usporedba aritmetičke sredine koncentracija u ispitivanoj skupini za VEGF i MCP-1.

	VEGF	MCP-1
Mijelomi, N=19	71,9 pg/ml	101,2 pg/ml
Kontrolna skupina, N=8	38,5 pg/ml	74,4 pg/ml
Ukupno, N=27	p>0,05	p<0,05

Srednja vrijednost VEGF u plazmi bolesnika s MM iznosila je $71,9 \pm 27,7$ pg/ml, a za MCP-1 srednja vrijednost je bila $101,2 \pm 83,9$ pg/ml. Uočena je njihova međusobna statistički značajna povezanost ($r=0,59$; $p=0,009$), (slika 32).

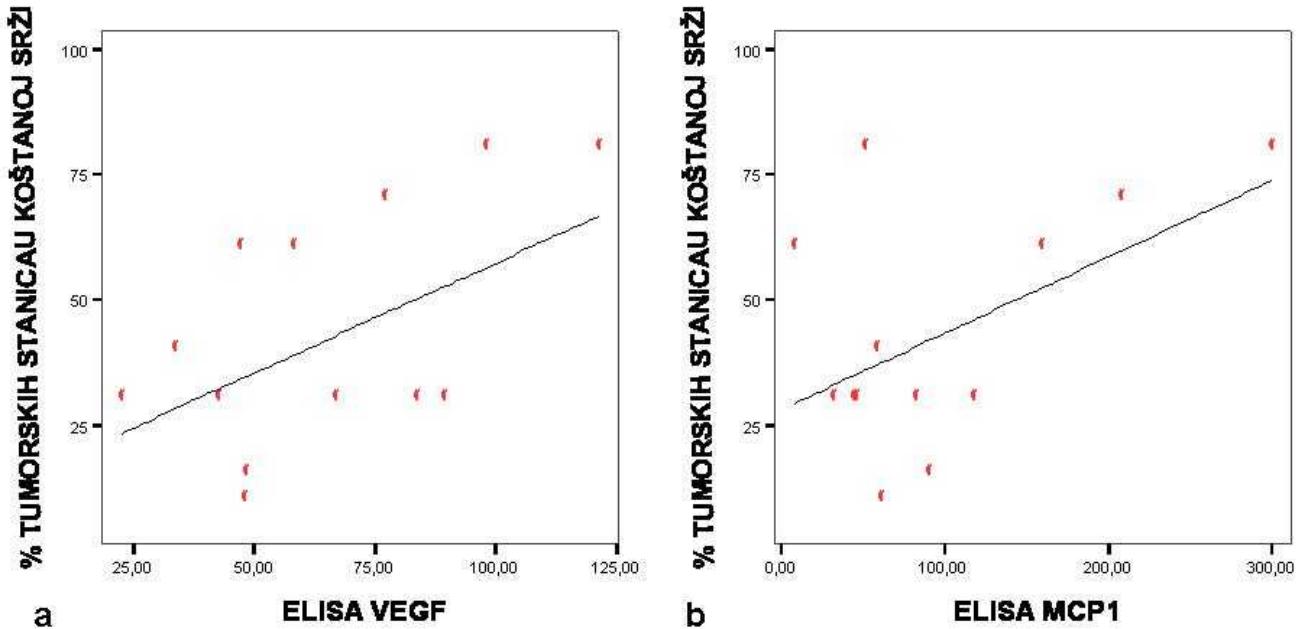


Slika 32. Povezanost između koncentracije VEGF i MCP-1 u plazmi ($r=0,6$; $p=0,009$).

4.3.2. Plazmatske koncentracije VEGF i MCP-1 u plazmi bolesnika s multiplim mijelomom u odnosu na imunohistokemijske i patohistološke parametre te klinička obilježja

Korelacijom vrijednosti iz plazme dobivenih ELISA metodom za VEGF i MCP-1, u odnosu na imunohistokemijski određivane varijable VEGF, MCP-1, Ki67, c/nNF- κ B nije uočena značajnost na razini $p<0,05$.

Postotak tumorskih stanica značajno je bio povezan s vrijednostima VEGF u plazmi na način da su bolesnici s višim vrijednostima VEGF u plazmi imali veći postotak infiltrata u srži (slika 34). Ista povezanost se uočila između vrijednosti MCP-1 i postotka infiltrata u srži slika (slika 33). Više vrijednosti MCP-1 u plazmi su pratile veći postotak tumorom infiltrirane srži.



Slika 33. Korelacija zahvaćenosti koštane srži s VEGF i MCP-1 u plazmi bolesnika određene ELISA metodom. a) Veće vrijednosti VEGF u plazmi (pg/ml) prate veći postotak tumorskih stanica u koštanoj srži ($r=0,52$; $p=0,05$). b) Pozitivna udruženost MCP-1 (pg/ml) i postotka tumorskih stanica u koštanoj srži ($r=0,53$; $p=0,05$).

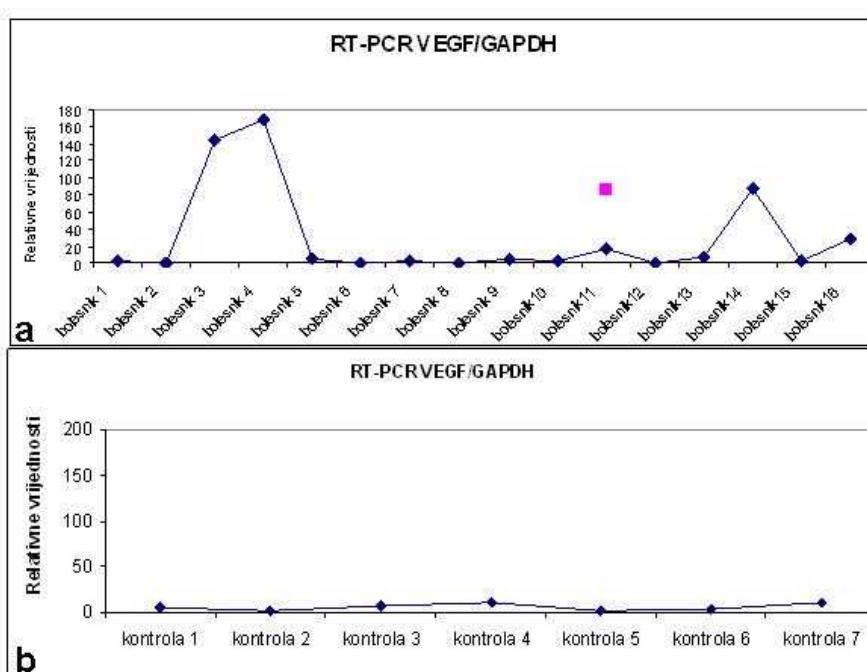
Također je utvrđeno da bolesnici s kliničkim stadijem I i II, u odnosu na one u kliničkom stadiju III imaju značajno više koncentracije VEGF u plazmi dok za MCP-1 takva udruženost nije nađena (tablica 20).

Tablica 20. Plazmatske vrijednosti VEGF i ELISA MCP-1 u odnosu na klinički stadij.

	Klinički stadij I, II		Klinički stadij III		
VEGF (pg/ml)	Medijan 33,7	22-48	Median 58,6	44-90	p=0,001
MCP-1 (pg/ml)	Medijan 77	42-121	Median 75,4	8-299	NS

4.4. Relativne vrijednosti mRNA VEGF i mRNA MCP-1 iz aspirata koštane srži bolesnika određene Real Time PCR

mRNA VEGF je relativno kvantificirana u odnosu na kontrolni gen kućepazitelj (engl. *house keeping gen*) GAPDH (GAPDH - gliceraldehid aldehid 3 fosfat dehidrogenaza) u ukupno 24 uzorka. U svim analiziranim uzorcima dokazana je ekspresija mRNA VEGF. Real Time PCR su određene relativne vrijednosti mRNA VEGF u 16 uzoraka aspirata koštane srži bolesnika s MM, u 1 uzorku separacijom izdvojenih plazma stanica i u 7 uzoraka kontrolne skupine. Dobiveni rezultati relativne kvantifikacije prikazani su na slici 34 gdje se može uočiti da su se relativne vrijednosti omjera mRNA VEGF/GPDH za bolesnike s MM kretale u rasponu od 0-169 dok su u kontrolnoj skupini vrijednosti bile u rasponu 1 -11,5.



Slika 34. Grafički prikaz relativnih vrijednosti mRNA VEGF u novodijagnosticiranih bolesnika s multiplim mijelomom (MM) i u kontrolnoj skupini. a) Vrijednost omjera mRNA VEGF/ GAPDH za bolesnike s MM. Kockicom je označena () relativna vrijednost omjera mRNA VEGF/GPDH populacije čistih stanica bolesnika 11. b) Relativne vrijednosti omjera mRNA VEGF u kontrolnoj skupini.

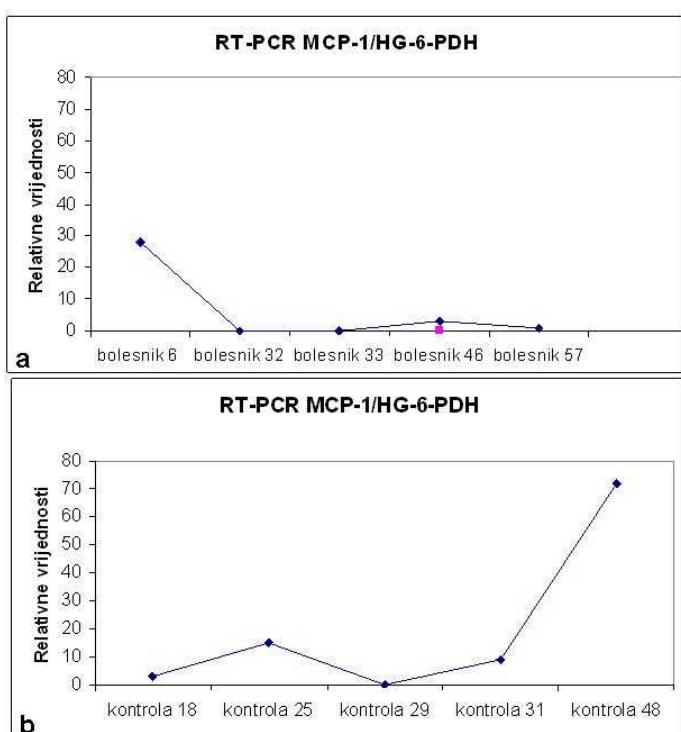
Relativne vrijednosti mRNA VEGF podijeljene prema medijanu i raspon određivanih vrijednosti su prikazane u tablici 21. Premda se može uočiti da su vrijednosti mRNA VEGF više u bolesnika s MM u odnosu na kontrolnu skupinu rezultati nisu statistički značajni. Srednja vrijednost omjera mRNA VEGF/GAPDH je za skupinu novodijagnosticiranih mijeloma iznosila $29,6 \pm 54,36$ dok je u kontrolnoj skupini iznosila $5,95 \pm 4,25$ testiranjem razlika srednjih vrijednosti nije uočena značajnost ($p=0,09$).

Tablica 21. Vrijednosti mRNA VEGF u ispitivanoj skupini.

MRNA VEGF	MEDIJAN	RASPON	P	UKUPNO (N)
Multipli mijelom,	3,71	0 -169	NS	17
Kontrolna skupina	5,5	1- 11,5	NS	7
Ukupno (N)				24

Nadalje, kada smo usporedili dobivene vrijednosti mRNA VEGF u oboljelih od MM s ostalim kliničkopatološkim parametrima nije se utvrdila značajna povezanost mRNA VEGF s ispitivanim imunohistokemijski određivanim parametrima (Ki67, VEGF, MVD, MCP-1, c/nNF- κ B /p65), VEGF i MCP-1 u plazmi, te kliničkopatološkim karakteristikama.

Real Time PCR određene su relativne vrijednosti mRNA MCP-1 u odnosu na gen kućepazitelj HG-6-PDH (HG-6-PDH; humani glukoza -6- fosfat dehidrogenaza). RT-PCR transkripcija kontrolnog HG-6-PDH gena dokazana je u 21 uzorku od toga je mRNA MCP-1 dobivena u 5 uzoraka od 13 bolesnika s MM, te u 5 uzoraka od 8 uzoraka kontrolne skupine, prikazano na slici 35.



Slika 35. Grafički prikaz relativnih vrijednosti omjera mRNA MCP-1/HG-6-PDH. a) Vrijednosti omjera mRNA MCP-1/HG-6-PDH u novodijagnosticiranih bolesnika s mijelomom. Može se uočiti da u izolatu stanica bolesnika pod rednim brojem 46 nije detektiran MCP-1 dok je detektiran u aspiratu koštane srži istog bolesnika. b) Vrijednosti omjera mRNA MCP-1/HG-6-PDH u kontrolnoj skupini.

U tablici 22 prikazane su vrijednosti omjera mRNA MCP-1/HG-6-PDH.

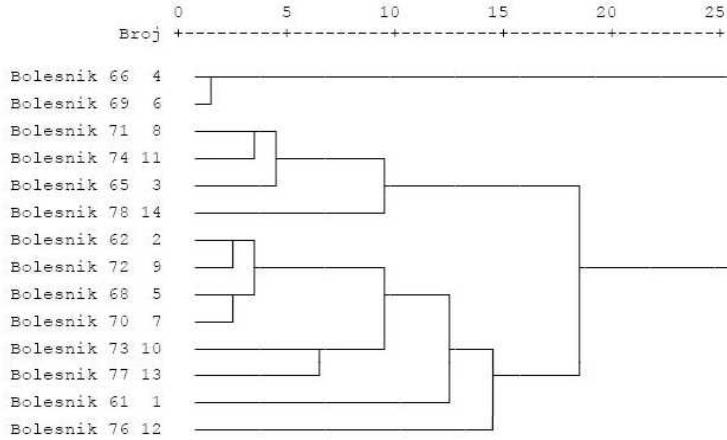
Vidi se da su vrijednosti u skupini oboljelih od MM niže sa srednjom vrijednosti $10,7 \pm 15,0$ u odnosu na kontrolnu skupinu gdje je srednja vrijednost iznosila $24,8 \pm 31,9$. Obzirom na mali broj uzoraka, provedena je samo bazična statistička analiza rezultata, dok je usporedba s ostalim prametrima bila ograničena brojem dobivenih podataka.

Tablica 22. Vrijednosti omjera mRNA MCP-1/HG-6-PDH u ispitivanoj skupini.

MCP1/HG-6-PDH	
bolesnik 6	28
bolesnik 32	<1
bolesnik 33	<1
bolesnik 46	3
bolesnik 57	1
kontrola 18	19,9
kontrola 25	8,6
kontrola 29	5,7
kontrola 31	1,3
kontrola 48	54,1

Kao zaključnu statističku analizu primjenili smo analizu grupiranja u koju smo uključili imunohistokemijski analizirane parametre te vrijednosti parametara određivanih u plazmi i vrijednosti mRNA za VEGF.

Primjenjenom analizom se utvrdio trend grupiranja bolesnika u dvije skupine. Obilježja prve skupine bolesnika uključuju: visoke vrijednosti mRNA VEGF, visoke vrijednosti n/cNF-κB te niske vrijednosti MVD i VEGF u koštanoj srži, niske vrijednosti VEGF i MCP-1 u plazmi, a druge skupine: niske vrijednosti mRNA VEGF, niske vrijednosti n/cNF-κB te visoke vrijednosti VEGF i MCP-1 u plazmi, visoki MVD i VEGF u koštanoj srži, prikazano na slici 36.



Slika 36. Slika prikaza analize grupiranja prema ispitivanim parametrima mRNA VEGF, n/cNF- κ B, ELISA VEGF, ELISA MCP-1, VEGF H-skor i MVD, u 14 oboljelih.

Analiza grupiranja (engl. *cluster analysis*) je potvrdila uočene odnose između ispitivanih parametara.

RASPRAVA

Istraživanja novijeg datuma u području MM usmjereni su na signalne puteve i proteine čija je aktivacija i u ovom malignom oboljenju prepoznata. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi značaj izražaja NF-κB u patogenezi MM. Preciznije rečeno, cilj je bio utvrditi ekspresiju p65 (RelA), podjedinice obitelji NF-κB, kao što je uvodno spomenuto, u sklopu angiogeneze kroz ekspresiju VEGF i MCP-1 u MM. Dosadašnja istraživanja, koja se prvenstveno odnose na utvrđivanje mutacije NF-κB u ovoj bolesti, utvrdila su visoku ekspresiju aktiviranog oblika ovog signalnog proteina kao i abnormalnosti ovog gena u stanicama multiplog mijeloma (122). Međutim, mehanizam djelovanja i prognostički značaj NF-κB, koji je u brojnim studijama na različitim tumorima prepoznat, u MM nije u cijelosti razjašnjen.

Rezultati ovog istraživanja su potvrdili varijabilnu ekspresiju NF-κB/p65, kako na nivou citoplazme tako i same jezgre mijelomske stanice. Potrebno je prokomentirati značaj subcelularne lokalizacije ovog signalnog faktora. Pri tome je bitno ponoviti da se mehanizam signalne transdukcije zasniva na činjenici da se NF-κB dimeri vežu i translociraju u jezgru gdje reguliraju transkripciju gena. Značaj detekcije različite subcelularne lokalizacija ovog proteina, u citoplazmi ili jezgri tumorske stanice, ostaje još nejasan. U literaturi postoje brojni radovi (79,96,105), na različitim tumorskim modelima u kojima se pokušalo imunohistokemijski detektirati NF-κB u tumorskim stanicama i utvrditi njegov značaj. Pri tome se navodi tzv. konstitutivna NF-κB aktivacija koja je udružena s nuklearnom ekspresijom, a moguće je uvjetovana alteracijama gena za NF-κB ili IκB. Takve kromosomske aberacije su uočene u brojnim hematopoetskim i solidnim tumorima (123). Odnosno konstitutivno visoke razine nuklearne aktivnosti NF-κB su opisane u različitim tipovima tumorskih stanica

kao posljedica uzlazne konstitutivne aktivacije kinaza ili mutacije inaktiviranog IKB. Detekcija aktiviranog NF- κ B u adenokarcinomu gušterače je među prvim radovima o konstitutivnoj aktivaciji NF- κ B u humanim karcinomima (124). Aberantna nuklearna lokalizacija NF- κ B je opažena u karcinomu dojke i karcinomu prostate (125-126). Ovakve su promjene uočene i u Hodgkinovom limfomu te akutnoj limfoblastičnoj leukemiji u djece gdje je pojačana ekspresija NF- κ B prognostički nepovoljna (127). U ovom istraživanju nije se mogla potvrditi udruženost nuklearne ekspresije NF- κ B/p65 s lošijom prognozom bolesnika s MM, međutim utvrđena je statistički značajna povezanost citoplazmatske ekspresije NF- κ B/p65 i bolje prognoze. Bolesnici u kojih je uočena veća citoplazmatska ekspresija NF- κ B/p65 na mijelomskim stanicama pokazali su bolji odgovor na terapiju, odnosno imali su dulje preživljjenje. Moguće objašnjenje je da je kumuliranje citoplazmatskog NF- κ B/p65 posljedica manje aktivacije NF- κ B pa time i povoljnije prognoze oboljelih. In vivo modeli na karcinomu gušterače, jajnika i debelog crijeva su pokazali da inhibicija NF- κ B povećava efikasnost antitumorskih lijekova (124,128,129). Smatra se da NF- κ B inhibicija prevenira kemorezistenciju tumora. Stoga bi razvoj NF- κ B inhibitora mogao povećati efikasnost brojnih antitumorskih lijekova.

Aktivacija NF- κ B može biti inducirana djelovanjem citokina, kemokina, faktora rasta, adhezijskim molekulama, antigenim receptorima, ili drugim molekularnim putevima. Za uzvrat NF- κ B također regulira gensku ekspresiju brojnih od navedenih faktora, uključujući i molekule koje ga mogu aktivirati (npr. *TNF α*) ili inhibirati (npr. *IkB α*). Na taj se način formira pozitivna i negativna povratna sprega. Primjerice, tumor-supresorski gen CYLD je identificiran kao negativni regulator NF- κ B (130). CYLD se

veže na IKK γ i pritom inhibira fosforilaciju i degradaciju I κ B. Na taj način NF- κ B ostaje u citoplazmi. Nasuprot tome inhibicija CYLD pojačava aktivaciju NF- κ B i time potiče napredovanje raka u obiteljima oboljelih od cilindromatoza (130). NF- κ B/p65 udružen je i s proteinom ING4, koji nastaje transkripcijom tumor-supresor gena. U glijalnim tumorima je ovaj protein potisnut. Odnosno što je veći gubitak njegove proteinske ekspresije to je glijalni tumor agresivniji. Obrnuto, pojačana ekspresija ING4 inhibira angiogenezu moguće inaktivacijom NF- κ B gena (130).

Osim udruženosti s boljom prognozom rezultati ove studije pokazuju da postoji i korelacija citoplazmatske ekspresije NF- κ B i stupnja zrelosti plazma stanica. Naime, u zrelijih je plazma stanica veća, a u plazmablastičnoj transformaciji manja i citoplazmatska i nuklearna NF- κ B ekspresija. Iz dosada rečenog moglo bi se zaključiti da bi slabije diferencirani mijelomi, obzirom na manju citoplazmatsku ekspresiju NF- κ B, mogli imati bolju prognozu. Međutim, naši rezultati pokazuju da to nije pravilo obzirom da su bolesnici sa slabije diferenciranim mijelomima većinom imali jače zahvaćenu koštanu srž tumorom i lošiju prognozu kao što se to opisuje i u literaturi (131). Rezultati navode na zaključke da procijena ekspresije NF- κ B u tumorskim stanicama imunohistokemijskom analizom zasigurno nije jednostavna ni dosta na za procijenu aktivacije ovog signalnog proteina koji se vrlo brzo sintetizira i razgrađuje unutar stanice.

U ovom radu nije vršena usporedba ekspresije NF- κ B u različitim plazma staničnim diskrazijama, od rektivnih do neoplastičnih lezija. Međutim, treba ukratko spomenuti značaj NF- κ B u upalnom i imunološkom odgovoru koji mogu prethoditi malignoj transformaciji. Tako je na nekoliko eksperimentalnih modela u miševa opisana udruženost NF- κ B aktivnosti u upali, karcinogenezi i progresiji karcinoma (99).

Studije na Mdr2-nock out miševima su pokazale spontani nastanak kolestatskog hepatitisa i posljedično hepatocelularni karcinom s potvrđenim značajem NF- κ B u progresiji hepatocitne lezije (124). Rezultati dobiveni na ovom modelu i njemu sličnima ukazuju da se aktivnost NF- κ B može uočiti u upalnim bolestima koje su povezane s povećanim rizikom progresije u malignu leziju. Osim toga utvrđena je njegova uloga u transformaciji preneoplastičnih lezija do karcinoma pluća i u karcinomu prostate u kojoj se prema njemu može predvidjeti ishod tumora, odnosno prognoza (132,133).

Osnovno pitanje koje se postavlja je koji su to molekularni mehanizmi djelovanja NF- κ B? Uloga NF- B u tumorima je prepoznata na nekoliko razina. Kao što je uvodno rečeno uključuje regulaciju apoptoze, povezanost s procesom angiogeneze u tumorima, regulaciju staničnog ciklusa kao i induciranja kemo- odnosno radio-rezistencije. U ovom istraživanju cilj je bio povezati NF- κ B s angiogenim čimbenicima, međutim kratko treba navesti i neke od prethodno spomenutih mehanizama.

Brojne su studije pokazale antiapoptotičnu ulogu NF- B u normalnim i malignim stanicama. Zna se da NF- κ B inhibira apoptozu indukcijom antiapoptotičnih proteina i supresijom proapoptotičnih gena (134). Uočena konstitutivna aktivacija NF- κ B u brojnim malignim tumorima štiti tumorsku stanicu od apoptotičnih podražaja, uključujući antitumorsku terapiju. To je svojstvo uočeno ex juvantibus, jer nekolicina antitumorskih lijekova koji stimuliraju NF- κ B aktivaciju potencijalno dovode do kemorezistencije. NF- B suprimira apoptozu indukcijom ekspresije brojnih proteina s izraženom antiapoptotičkom aktivnošću uz istovremeno djelovanje na ekspresiju ili aktivnost proapoptotičnih proteina. Prvi dokazi inhibitornog efekta NF- B na apoptozu

uočeni su analizom RelA -/- knockout miševa koji su umirali u vrijeme 15-16 dana gestacije zbog masivne hepatalne apoptoze (135). Analiza ekspresije NF- B u multiplom mijelomu pokazala je do sada da silazna regulacija ekspresije inducira apoptozu (134).

Treba spomenuti značaj NF- κ B i u regulaciji staničnog ciklusa. U ovom istraživanju utvrđen je niski proliferacijski indeks mijelomske stanice, kao što je literaturno poznato (136), koji nije bio udružen s ekspresijom NF- κ B. Međutim, treba navesti da NF- B promovira stanični rast uzlaznom regulacijom transkripcije ciklina D koja je povezana s hiperfosforilacijom Retinoblastom gena te tranzicijom kroz G1 do S faze staničnog ciklusa i inhibicijom apoptoze (137). NF- B regulira transkripciju katalitičkih telomeraznih podjedinica u miša (138). NF- B je konstitutivno aktiviran u Hodgkinovim tumorskim stanicama, gdje njegovom inhibicijom blokiramo njihov rast (139). Postoje studije (132,133) koje potvrđuju značaj aktiviranog NF- B u regulaciji proliferacije normalne i neoplastične stanice. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da ključni mehanizam djelovanja transkripcijskog faktora u mijelomske stanicama zasigurno ne predstavlja poticanje staničnog ciklusa.

Do sada je prvenstveno bilo govora o posljedicama aktivacije NF- B u mijelomske stanicama, međutim kratko treba spomenuti i ulogu stromalnih elementa u navedenim mehanizmima. U našim istraživanjima utvrđena je ekspresija NF- B na različitim elementima srži, od stanica hematopoeze, do stromalnih kao npr. osteoblasta, osteoklasta, makrofaga, endotelnih stanica i glatko mišićnih stanica. Ekspresija je bila varijabilno zastupljena u citoplazmi i jezgri ovih stanica ukazujući na aktivnost NF- B kroz mogući autokrini i parakrini učinak. Tako je pokazano da

adhezija mijelomskih stanica sa stromalnim elementima srži potiče NF- B ovisnu uzlaznu regulaciju i transkripciju IL-6, faktora rasta i antiapototičko djelovanje u samom tumoru (140). Nadalje, NF- κ B regulira ekspresiju intracelularne adhezijske molekule 1 i vaskularne adhezijske molekule 1; koje su značajne za tumorsko metastaziranje i lošu prognozu. Čini se da u multiplom mijelomu tumorske stanice djeluju na rezidualni okoliš srži eksprimirajući signale koji povratno utječu na stanice mijeloma. Direktan kontakt dovodi do aktivacije NF- κ B u stanica mijeloma i stromalnim stanicama, a NF- κ B aktivacija u samom MM doprinosi progresiji tumorskog rasta, adhezije, preživljjenja tumorskih stanica, tumorske angiogeneze i eventualno sposobnosti metastaziranja.

Kao što je spomenuto prepoznata je uloga NF- B u regulaciji tumorske angiogeneze koju smo u ovom istraživanju pokušali utvrditi kroz sekretornu aktivnost VEGF i MCP- 1 u mijelomima imunohistokemijskom analizom i određivanjem koncentracije proteina u plazmi. Rezultati istraživanja koji se baziraju na imunohistokemijskoj analizi su pokazali značajno veću ekspresiju NF- B u citoplazmi i jezgri u tumorima s nižim VEGF, te značajno nižu ekspresiju MCP-1 u mijelomima s većom citoplazmatskom ekspresijom NF- κ B. Moguće objašnjenje ovakvih rezultata je tzv. mehanizam negativne povratne sprege. Naime, stanice s većom produkcijom, stvorenog i jednog i drugog citokina, koja se može interpretirati jačom citoplazmatskom ekspresijom proteina u tumorskim stanicama, obilježene su slabijim izražajem transkripcijskog faktora i obrnuto. Potvrdu ovakve pretpostavke trebalo bi tražiti u utvrđivanju genske ekspresije NF- κ B, odnosno sveukupne sinteze određenog proteina u mijelomu. Rezultati grupiranja bolesnika podupiru ovaku pretpostavku

obzirom na činjenicu da se u skupini bolesnika s visokim vrijednostima nuklearne i citoplazmatske NF- κ B nalaze i oni s visokim vrijednostima mRNA VEGF.

Uočena povezanost na imunohistokemijskoj razini nije se potvrdila usporedbom vrijednosti citokina određenih u plazmi bolesnika s ekspresijom NF- B u mijelomskim stanicama. Mogući razlog dobivenih rezultata je činjenica da u sekreciji navedenih citokina doprinose velikim dijelom stromalni elementi i druge stanice prisutne u koštanoj srži. A promatramo li izolirano tumorske stanice bitan je i doprinos ukupne tumorske mase, što je i potvrđeno u dobivenim rezultatima.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s literaturnim podacima (141-144) u kojima je na modelu kulture mišjih embrionskih fibroblasta i na staničnim linijama opisana NF- B regulirana sekrecija nekih citokina poput VEGF, MCP-1 i IL-6. Nadalje, utvrđeno je da blokiranjem NF- B sekrecija MCP-1 opada za gotovo 60% (145) i da se smanjuje produkcija IL-6 (146).

Aktivacija NF- B potiče rast, preživljjenje i rezistenciju mijelomskih stanica na kemoterapeutike i u mikro okolišu srži te predstavljaju okvir za kliničke studije novih terapeutika koji bi ciljano djelovali na NF- B u MM (147). Pristupi koji koriste višestruke terapijske ciljeve i u konačnici blokiraju i kemokine bi u budućnosti trebali pružiti bolji terapijski odgovor u bolesnika s mijelomom jer djeluju istovremeno protektivnim efektom na koštani mikro okoliš i na MM stanice, uz aktivaciju osteoklastične aktivnosti (91).

Nakon dokaza o značaju angiogeneze u solidnim tumorima potvrđena je njezina važnost i u hematološkim novotvorinama pa tako i u mijelomu (29). Uloga

angiogeneze u patogenezi mijeloma do sada je ne samo prepoznata već i implementirana u terapiji ovih bolesnika (74,121). Sukladno navedenom brojne su studije testirale hipotezu o udruženosti pojačane angiogeneze u koštanoj srži s nepovoljnim ishodom u bolesnika s MM.

Po uzoru na brojne druge autore (54-55,59-60) procijenjivali smo stupanj angiogeneze u mijelomu određivanjem MVD. U literaturi se on pokazao značajnim prognostičkim parametrom za preživljenje bolesnika s mijelomom (148-150). Tako su Rajkumar i sur. (29) među prvima utvrdili da bolesnici s povećanim brojem krvnih žila u koštanoj srži imaju kraće preživljenje u odnosu na bolesnike s manjim MVD. Dobiveni rezultati u ovom istraživanju također su pokazali značajnu povezanost između većeg MVD i kraćeg preživljenja bolesnika s MM. Osim toga uočena je i povezanost između MVD i odgovora na terapiju, što je također opisano u literaturi (29). Naime, bolesnici koji su postigli remisiju (kompletну ili parcijalnu), a u našoj skupini i bilo kakav odgovor na terapiju imali su značajno manje krvnih žila u koštanoj srži odnosno niže vrijednosti MVD.

Neke studije su pokazale da stupanj angiogeneze progresivno raste u spektru plazmastaničnih poremećaja od MGUS, SMM do MM (59-61). Istraživanje u ovoj disertaciji, kao što je prethodno rečeno, nije imalo za cilj pratiti stupanj angiogeneze kroz progresiju plazma staničnih diskrazija. Međutim, svrha je bila, između ostalih ciljeva istraživanja, utvrditi povezanost MVD i samog stadija bolesti u MM. Rezultati su potvrdili prisutnost većeg broja krvnih žila u koštanim uzorcima bolesnika s višim kliničkim stadijem. Ovakvi rezultati ukazuju na značaj angiogeneze u patogenezi multiplog mijeloma.

Međutim, mehanizam kojim je regulirana angiogeneza u mijelomu nije u potpunosti jasan. Zna se da stanice mijeloma luče angiogene citokine i različite faktore rasta. Brojne studije (62-65) su istraživale odnos MVD i citokina poput VEGF i utvrđile su korelaciju koja je sukladna njihovoj značajnoj ulozi u procesu angiogeneze u mijelomu.

U ovom je radu uočen inverzan odnos MVD i protienske ekspresije VEGF, odnosno u bolje vaskulariziranim tumorima dobivena je manja ekspresija VEGF na tumorskim stanicama. Rezultati su u suprotnosti sa studijama na animalnim modelima različitih tipova tumorskih stanica koje su pokazale da prekomjerna ekspresija VEGF rezultira ubrzanim tumorskim rastom i pojačanom vaskularizacijom (151). Ta kođer je dokazano smanjenje angiogeneze i pojava nekroze tumora nakon blokiranja VEGF kao i nekih drugih citokina i time je potvrđena njihova centralna uloga u angiogenezi (121). VEGF je po brojnim autorima ključna molekula procesa angiogeneze (152,153).

Kumar i sur. (121) pokazali da ekspresija VEGF, bFGF i njihovih receptora nije značajno različita između MGUS, SMM, te MM što su i pokazali na razini mRNA. U ovom istraživanju, iako na malom uzorku, utvrđene su razlike u srednjim vrijednostima VEGF mRNA između bolesnika s MM u odnosu na kontrolnu skupinu. Veća srednja vrijednost ekspresije mRNA VEGF dobivena je u bolesnika s MM, međutim bez statističke značajnosti. Odsutstvo statističke značajnosti se može tumačiti velikim rasponom rezultata, te sličnim medijanima dobivenih vrijednosti. Međutim, svakako treba spomenuti da pojačana regulacija mRNA VEGF u tumorskim stanicama pojedinih mijeloma zasigurno ima značaj u patogenezi ove bolesti što se mora daljnjim istraživanjem utvrditi.

U sklopu utvrđivanja uloge VEGF značajne su dobivene plazmatske vrijednosti ovog citokina. VEGF u plazmi ispitanika značajno je viši u odnosu na kontrolnu skupinu.

Rezultati Kumar i sur. (121) sugeriraju da uzlazna regulacija VEGF i bFGF u pojedinačnoj plazma stanici nije presudna u indukciji angiogeneze u plazma staničnim poremećajima. Nadalje, u svojem radu pokazuju da uočeni stupnjeviti porast MVD s progresijom bolesti može biti povezan barem dijelom ako ne u cijelosti s kumulativnim angiogenim efektom ostvarenim povećanjem broja plazma stanica, tj. povećanjem tumorske mase, prije nego pojačanom ekspresijom VEGF/bFGF u pojedinačnoj plazma stanici. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju idu u prilog ovim tvrdnjama obzirom da je u naših ispitanika uočena statistički značajna povezanost postotka zahvaćenosti koštane srži tumorom.

Isti autori (121) su došli do zaključka da pozitivna sprega povećane tumorske mase rezultira pojačanim lučenjem VEGF, bFGF i vice versa, što u osnovi amplificira proces angiogeneze, no nije naravno jedini pokretač tog procesa. Isto se može uočiti kroz rezultate dobivene u ovom istraživanju; pokazalo se da su vrijednosti VEGF u plazmi značajno povezane s postotkom infiltrata u koštanoj srži. Obrnuto proporcionalan odnos imunohistokemijski određivanih vrijednosti MVD i VEGF (prethodno spomenut) govori da u tumorima poput mijeloma, gdje se ne može govoriti o solidnoj tumorskoj masi kao niti o izloženosti tumorskih stanica značajnoj hipoksiji, ne dolazi do induciranja angiogeneze preko VEGF - HIF (engl. *hypoxia inducible factor*) sprege. Na taj se način može objasniti inverzan odnos VEGF i MVD, odnosno iz dobivenih je rezultata vidljivo da kada je prisutan veći broj krvnih žila niža je ekspresija VEGF u tumorskim stanicama.

Naravno da ovi mehanizmi nisu jedinstveni i opisani isključivo u mijelomu, već se opažaju i u drugim tumorima poput leukemija ili karcinoma mokraćnog mjeđura (154-155). Ria i sur. (156) su zaključili da autokrino posredovani putevi aktivacije VEGF u MM ne djeluju neovisno od parakrinih stimulacija, drugim riječima plazma stanice su podložne i ovisne o stromi, tumorskom mikrookolišu s kojim ostvaruju sinergistički učinak. Aktivirana stroma stimulira plazma stanice. Na eksperimentalnim je modelima pokazano da inhibicija VEGFR-2 efikasnije djeluje od inhibicije ekstracelularnog VEGF, te da ima učinak gotovo jednak ablaciji VEGF genske ekspresije prikazanom u murinom modelu matičnih stanica (157). VEGFR-2 se u radovima nekih autora pokazao kao ključno mjesto za kontrolu proliferacije, mitogenog potencijala kao i migratorne sposobnosti u vanstaničnom matriksu (158,159). Stoga se izvode zaključci da u MM plazma stanice zajedno sa stanicama ekstracelularnog matriksa (misli se pritom na stanice strome) utvrđuju specifične gradijente VEGF u mikro okruženju koštane srži koji posreduju autokrino i parakrino reguliranoj stimulaciji stanica mijeloma. U prikazanim rezultatima ekspresija mRNA VEGF je višestruko pojačana kada imamo izdvojenu populaciju tumorskih stanica, bez ostalih elemenata srži, što mijenja kontekst prethodno izrečenog (podudarno s našim rezultatima), jer implicira da je proizvodnja VEGF dominantno uvjetovana plazma staničnom ekspresijom.

Kumar i sur. (121) su prikazali rezultate heterogene ekspresije VEGF u stanicama mijeloma istog bolesnika, sa samo pojedinačnim grupama tumorskih stanica koje eksprimiraju dotični citokin. Ta je opservacija u skladu s našim opažanjima gdje pojedinačne tumorske stanice unutar istog tumora eksprimiraju različite razine intenziteta obojenja pa je stoga u procjeni korišten sistem skoriranja. Time se

potvrđuju teorije u kojima se postulira nastanak angiogenog fenotipa kao ishodišta aktivacije procesa angiogeneze u tumorima općenito pa tako i u MM. U rezultatima ovog istraživanja može se uočiti da postoji značajna razlika u vrijednostima VEGF dobivenim iz plazme bolesnika (premda detektiranih unutar raspona vrijednosti koji se detektiraju i u zdravih osoba) u odnosu na kontrolnu skupinu. To je potencijalno iskoristivo u kliničkom praćenju bolesnika obzirom da vrijednosti VEGF detektirane u plazmi koreliraju s postotkom tumorom zahvaćene koštane srži.

Bilo bi zanimljivo utvrditi koji dio krvnih žila je nastao procesom angiogeneze od preegzistirajućih krvnih žila procesom remodeliranja, a koji vaskulogenezom unutar istog tumora da se uoči mijenja li se udio pojedinog načina vaskularizacije ovisno o morfologiji maligne plazma stanice.

Iz literature je poznato da je plazmablastična morfologija nepovoljan prognostički biljeg (160). Analizom rezultata ovog istraživanja utvrdilo se da je prisutnost atipičnih plazma stanica značajno udružena s većim brojem krvnih žila. No, prisutnost atipičnih plazma stanica je udružena i sa slabijim odgovorom na terapiju te većim postotkom tumorskog infiltrata u koštanoj srži kao i s kraćim preživljenjem, što je u skladu s prethodno izrečenim.

U radu Vacce i sur. (161) promatran je i evaluiran angiogeni potencijal plazma stanica izdvojenih iz srži koristeći test korioalantoične membrane (engl. *chorioallantoic membrane CAM assay*), kojim su pokazali veću angiogenu aktivnost stanica srži izoliranih u bolesnika s aktivnim MM za razliku od stanica izoliranih u bolesnika s inaktivnom bolešću ili MGUS. Istovremeno je pokazano da je prisutan veći broj endotelnih prekursora u srži aktivnih mijeloma za razliku od onih koji su tretirani ili u srži bolesnika s MGUS, te normalnom koštanom srži. Inhibitori VEGFR-2

bi se prema prethodno izrečenom mogli pokazati efikasnima u biološkom vođenju MM ciljajući istovremeno na plazma stanice i novonastale krvne žile (156,162). No, ukupni značaj angiogeneze mišljenja sam da je uzročno povezan s progresijom plazmastaničnih diskrazija koje polako evoluiraju tijekom vremena od diskretnih plazmocitoza preko MGUS, SMM, te MM. Činjenica je da je „angiogeni switch“ o kojem se tako puno govori neosporan te da ima vrlo vjerojatno presudnu ulogu u progresiji mijeloma. To podupiru radovi (54-56) koji su argumentirali da rizik od progresije solitarnog plazmacitoma u mijelom značajno raste s porastom angiogeneze (156). Trenutak u kojem maligne plazma stanice mijenjaju svoja angiogena svojstva i gubitak normalnih angiogenih inhibitora je vjerojatno onaj u kojem se narušava ravnoteža između pro- i anti-angiogenih čimbenika.

Naravno, nije sve tako jednostavno jer pitanje tumorske mase, diferenciranosti tumora preko morfoloških obilježja tumorskih stanica dodatno mijenja perspektivu kako smo pokazali. Možemo zaključiti da je angiogenezu u multiplom mijelomu, utvrđena kao srednja gustoća krvnih žila, značajno veća u mijelomima koji pokazuju veći postotak plazma stanica u koštanoj srži i koji sadrže atipične plazma stanice. Jača angiogenezu nalazi se u bolesnika s višim kliničkim stadijem bolesti, onima koji slabije odgovoraju na terapiju i koji imaju kraće preživljjenje. Ekspresija VEGF, MCP-1 i NF-κB u mijelomskim stanicama, kao i plazmatska koncentracija citokina VEGF i MCP-1 nisu povezane sa srednjom gustoćom krvnih žila.

Zna se da su brojne molekule, citokini, faktori rasta i adhezijske molekule uključene u autokrine i parakrine interakcije između malignih plazma stanica i drugih elemenata koštanog mikrookoliša, osobito stromalnih stanica, endotelnih stanica, osteoblasta i osteoklasta (163). Tako angiogeni faktor VEGF proizvode i same plazma stanice, u

kojima je aktivnost produkcije VEGF modulirana brojnim drugim faktorima poput IL-6 ili MCP-1, što je pokazano u ovom i u radovima drugih autora (136,140). Ovi čimbenici potiču autokrinu stimulaciju VEGF/VEGFR-1 puta (164). No, značajan je i parakrini učinak koji je posredovan stimulacijom rasta i proliferacije plazma stanica kao i njihove migratorne sposobnosti (MCP-1), a ostvaren je preko produkcije VEGF u stanicama strome (8,136,165).

Opće je prihvaćeno da leukociti migriraju kao odgovor na gradient određenog kemokina kao i da njihova konačna pozicija ovisi o izvoru kemokina (166). Ovakva uloga MCP-1 je potvrđena u istraživanjima pomoću testova mikrokemotaksije (167,168). Rupert i sur. (169) su pokazali da je u bolesnica s ovarijalnim tumorima koncentracija MCP-1 u plazmi značajno niža nego u ascitesu. Objasnjavaju to efektom hipoksije na ekspresiju MCP-1 i migraciju monocita.

Ukoliko je ekspresija MCP-1 modulirana stupnjem oksigenacije tkiva očekuje se da se MCP-1 i VEGF ponašaju na sličan način što je uočeno u ovom istraživanju. Neki su autori (169) pokazali da MCP-1 uzlazno regulira ekspresija HIF gena koji potom inducira ekspresiju VEGF. To je u suglasju s našim rezultatima kojima se utvrdila povezanost MCP-1 i VEGF u plazmi bolesnika. Naime, vrijednosti MCP-1 i VEGF u plazmi značajno su povezane što se može objasniti ovisnošću aktivacije oba biljega o hipoksiji. Međutim odsutstvo transkripcije mRNA MCP-1 u mijelomskim stanicama, koje je potvrđeno u ovom istraživanju, isključuje značajnu ulogu samih tumorskih stanica u produkciji ovog kemokina. Odnosno može se utvrditi da MCP-1 u mijelomima nije vodeći faktor onkogeneze.

Činjenica da aktivirana B stanica može migrirati zasluga je proinflamatornih citokina poput TNF α (170,171). Nadalje, to je ishodište pretpostavke da su citokini značajni za transmigratorne procese u mijelomu. Zna se da brojne tumorske stanice posjeduju sposobnost lučenja kemokina (172,173) kao i da eksprimiraju receptore kemokina. U kulturama humanih staničnih linija dokazano je da mijelomske stanice mogu biti privučene brojnim kemokinima koje izlučuju endotelne stanice koštane srži (174). Nadalje pokazano je da stanice mijeloma mogu proizvesti CCL1 (175). U svojem radu Johrer i sur. su *microarray* analizom pokazali da TNF α inducira uzlaznu regulaciju MCP-1 u stanicama mijeloma, što nadalje korelira s njihovom migratornom sposobnošću (176). Druge studije (177-179) su pokazale da i ostale stanice koštane srži kao npr. endotelne, stromalne stanice, monociti i limfociti T proizvode MCP-1, MCP-2 i MCP-3. To se potvrdilo i ovim radom jer je imunohistokemijski ekspresija MCP-1 detektirana u svim navedenim elementima. Endotelne stanice i stromalne stanice srži promoviraju neposrednu migraciju mijelomskih stanica kao odgovor na povišeni kemotaktični gradient što bi moglo biti objašnjenje lokalizacije tumora u koštanoj srži.

MCP-1 je prepoznat kao proangiogeni kemokin s doprinosom u neovaskularizaciji nekih malignih bolesti (180,181), koja je vjerovatno regulirana VEGF (182). Direktnu povezanost između ekspresije MCP-1 u mijelomskim stanicama i MVD u koštanoj srži nismo dokazali. Ovakav rezultat nije u suprotnosti s mogućim proangiogenim djelovanjem ovog kemokina, koja je vjerojatno povezana s angiogenim učinkom i drugih stanica srži osim tumorskih. Ovoj pretpostavci ide u prilog i nalaz veće koncentracije ovog kemokina u plazmi bolesnika s većim tumorskim infiltratom, koji su pak pokazivali veće vrijednosti MVD.

U nekim je tumorima pokazano da visoke razine MCP-1 koreliraju s uznapredovalim stadijem bolesti (183). Takvu povezanost u mijelomu mi nismo uočili, ali kao što je prethodno navedeno MCP-1 u plazmi je korelirao s većim postotkom tumorskih stanica u srži.

Značaj MCP-1 uočen je i u progresiji mijeloma s litičkim lezijama kostiju na mjestima deponiranja tumorskih stanica. Utvrđeno je da bolesnici s brojnim koštanim lezijama imaju značajno više vrijednosti kemokina (184). Naime, poput mijelomskih stanica i osteoklasti su privučeni kemokinima. Nadalje kemokini stimuliraju osteoklastičnu aktivnost posredstvom pojačane ekspresije RANKL u stromalnim stanicama (185), a potom se RANKL veže za osteoklasni RANK stimulirajući koštanu resorpciju (186). U rezultatima imunohistokemijske ekspresije MCP-1 u ovom radu uočili smo ekspresija ovog kemokina u osteoklastima koja je vrlo često bila izraženija u odnosu na tumorske stanice. Ovakva opažanja sugeriraju autokrinu stimulaciju osteoklasta što bi u patogenezi mijeloma moglo biti od značaja.

Zaključno možemo navesti da je ovim istraživanjem potvrđena značajna uloga angiogeneze u patogenezi mijeloma i da je ista udružena s lošjom prognozom. Udružanost aktiviranog NF- κ B s ekspresijom VEGF najvjerojatnije ukazuje na njegovo poticanje proangiogenih svojstava mijelomskih stanica. Povećane koncentracije oba citokina, a posebno VEGF predstavljaju potencijalni novi biljeg u praćenju bolesnika.

Rezultati statističke analize grupiranja izdvojili su skupinu bolesnika s tumorima različitih molekularnih svojstava i moguće prognoze.

U sklopu razvijanja novih terapijskih pristupa kod MM i straživanja ovog tipa su ishodište za razvijanje novih terapijskih strategija u molekularnoj biologiji MM.

ZAKLJUČCI

1. Potvrđena je varijabilna citoplazmatska ekspresija oba ispitana citokina - VEGF i MCP-1, kao i varijabilna citoplazmatska te nuklearna ekspresija NF- κ B u stanicama mijeloma.
2. Ekspresija c/nNF- κ B veća je u zrelim plazma stanicama, nego li u slabije diferenciranim stanicama.
3. Postoji udruženost između ekspresije oba citokina i ekspresije NF- κ B: niža ekspresija VEGF udružena je s većom i citoplazmatskom, i nuklearnom NF- κ B ekspresijom, dok niža ekspresija MCP-1 korelira samo s višom citoplazmatskom ekspresijom NF- κ B.
4. U uzorcima stanica koštane srži utvrđene su varijabilne vrijednosti mRNA VEGF i MCP-1 koje nisu značajno povezane s ispitivanim parametrima angiogeneze.
5. Plazmatske vrijednosti citokina, VEGF i MCP-1 značajno su više u bolesnika s multiplim mijelomom u odnosu na kontrolnu skupinu. Nadalje, plazmatske vrijednosti navedenih citokina su više u bolesnika s jačim infiltratom tumorskih stаница u koštanoj srži, odnosno u bolesnika s višim stadijem bolesti.
6. Angiogeneza u multiplom mijelomu, utvrđena kao srednja gustoća krvnih žila, značajno je veća u mijelomima koji pokazuju veći postotak plazma stanic u koštanoj srži i koji sadrže atipične plazma stanice. Jača angiogeneza nalazi se u bolesnika s višim kliničkim stadijem bolesti, onima koji slabije odgovoraju na terapiju i koji imaju kraće preživljjenje.
7. Ekspresija VEGF, MCP-1 i NF- κ B u mijelomskim stanicama, kao i plazmatska koncentracija citokina VEGF i MCP-1 nisu povezane sa srednjom gustoćom krvnih žila.

LITERATURA:

1. Cotran R S, Kumar V, Collins T. Robbins and Cotran: Pathologic basis of disease. Philadelphia: 7th ed. W.B.Saunders company; 2005.
2. Damjanov I, Jukić S, Nola M. Patologija. Izdavač: Medicinska naklada Zagreb; 2008.
3. Harrison i sur. Principi interne medicine. Izdavač Placebo Split d.o.o, Split.; 1997.
4. Jaffe ES, Harris NL, Stein H i sur. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, WHO Classification of Tumours. IARC Press: Lyon; 2001.
5. Provan D, Singer CRJ, Baglin T i Lilleyman J. Oxford handbook of clinical haematology. Second Edition, Oxford University Press; 2006.
6. Brunning R, McKenna R.W. Atlas of tumor pathology, Tumors of the bone marrow. Armed Forces Institute of Pathology, Washington,D.C. American Registry of Pathology,1994.
7. Hrvatski zavod za javno zdravstvo; <http://www.hzjz.hr/index.htm>
8. Chesi M, Bergsagel PL, Kuehl WM. The enigma of ectopic expression of FGFR3 in multiple myeloma: a critical initiating event or just a target for mutational activation during tumor progression. Curr Opin Hematol 2002; 9:288-293.
9. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. Nat Rev Cancer 2002; 2:175-187.
10. Hideshima T, Anderson KC. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. Nat Rev Cancer 2002;2(12):927-937.
11. Abe M, Hiura K, Wilde J i sur. Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion. Blood 2004;104(8):2484-2491.
12. Kyle RA i Rajkumar SV. Multiple myeloma. N Engl J Med 2004;351:1860-1873.
13. Giuliani N, Colla S, Morandi F i sur. Angiopoietin-1 and myeloma-induced angiogenesis. Leuk Lymphoma 2005;46(1):29-33.
14. Bataille R, Jégo G, Robillard N i sur. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas"

- and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006;91(9):1234-1240.
15. Shaughnessy JD Jr, Barlogie B. Integrating cytogenetics and gene expression profiling in the molecular analysis of multiple myeloma. *Int J Hematol* 2002;76(2):59-64.
 16. Tanaka Y, Abe M, Hiasa M i sur. Myeloma cell-osteoclast interaction enhances angiogenesis together with bone resorption: a role for vascular endothelial cell growth factor and osteopontin. *Clin Cancer Res* 2007;13(3):816-823.
 17. http://www.mijelom.hr/o_bolesti/?p=simptom
 18. Labar B, Haumptman E i sur. *Hematologija*. Izdavač: Školska knjiga 2007.
 19. Kyle RA. Multiple myeloma: review of 869 cases. *Mayo Clin Proc* 1975;50:29-40.
 20. Bartl R, Frisch B, Fateh-Moghadam A i sur. Histologic classification and staging of multiple myeloma. A retrospective and prospective study of 674 cases. *Am J Clin Pathol* 1987;87:342-355.
 21. Carter A, Hocherman I, Linn S i sur. Prognostic significance of plasma cell morphology in multiple myeloma. *Cancer* 1987;60:1060-1065.
 22. Reed M, McKenna RW, Bridges R i sur. Morphological manifestations of monoclonal gammopathies. *Am J Clin Pathol* 1981;76:8-23.
 23. Kyle RA. Diagnostic criteria of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992;6:347-358.
 24. Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). A review. *Clin Haematol* 1982;11:123-150.
 25. 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;36:842-854.
 26. Salmon SE, Cassady JR. Plasma cell neoplasms. In: *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, DeVita VT, Hellman S, Rosenberg S, Eds. J.B. Lippincott: Philadelphia, 1854.
 27. Barlogie B, Epstein J, Selvanayagam P i sur. Plasma cell myeloma –new biological insights and advances in therapy. *Blood* 1989;73:865-879.
 28. Durie BG. Staging and kinetics of multiple myeloma. *Sem Oncol* 1986;13:300-309.

29. Rajkumar SV, Greipp PR. Prognostic factors in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999;13:1295-1314, xi.
30. Cavo M. Proteasome inhibitor bortezomib for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:13.
31. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-1186.
32. Blood Ch, Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochem Biophys Acta* 1990;1032:89-118.
33. Leon SP, Folkerth RD, Black PM. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer* 1996;77:362-72.
34. Mikami Y, Tsukuda M, Mochimatsu I i sur. Angiogenesis in head and neck tumors. *Nip Jib Gak Kai* 1991;96:645-650.
35. Beatrice F, Valente G, Cammarota R i sur. Laryngeal cancer and angiogenesis. *Acta Otorinolaryngol Ital* 1996;16:355-362.
36. Yamazaki K, Abe S, Takekawa H i sur. Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. *Cancer* 1994;74:2245-2249.
37. Fontanini G, Vignati S, Pacini F i sur. Microvessel count: an indicator of poor outcome in medullary thyroid carcinoma but not in other types of thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 1996;9:636-641.
38. Takebayashi Y, Akiyama SI, Yamada K i sur. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer* 1996;78:226-231.
39. Tanigawa N, Matsumura M, Amaya H i sur. Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997;9:220-225.
40. Olivarez D, Ulbright T, DeRiese W i sur. Neovascularization in clinical stage testicular germ cell tumor: prediction of metastatic disease. *Cancer Res* 1994;54:2800-2802.
41. Weidner N, Semple JP, Welch WR i sur. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.
42. Obermair A, Kohlebrger P, Bancher-Todesca D i sur. Influence of microvessel density and vascular permeability factor/vascular endothelial

growth factor expression on prognosis in vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 1996;63:204-209.

43. Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM i sur. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995;56:353-356.
44. Hollingworth HC, Kohn EC, Steinberg SM i sur. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1995;147:33-41.
45. Jaeger TM, Weidner N, Chew K i sur. Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer. *J Urol* 1995;154:59-71.
46. Kim KJ, Li B, Winer J i sur. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 1993;362:841-844.
47. Hori A, Sasada R, Matsutani E i sur. Supression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res* 1991;51:6180-6184.
48. Olson KA, Fett JW, French TC i sur. Angiogenin antagonists prevent tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;92:442-446.
49. Antioine N, Greimers R, De-Roanne C i sur. AGM-1470, a potent angiogenesis inhibitor, prevents the entry of normal but not transformed endothelial cells into G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* 1994;54:2073-2076.
50. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S i sur. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* 1990;348:555-557.
51. Takamiya Y, Brem H, Ojeifo J i sur. AGM-1470 inhibits the growth of human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Neurosurgery* 1994;34:869-875.
52. Konno H, Tanaka T, Kanai T i sur. Efficacy of an angiogenesis inhibitor, TNP-470, in xenotransplanted human colorectal cancer with high metastatic potential. *Cancer* 1996;77:1736-1740.
53. Dameron KM, Volpert OV, Taisnky MA i sur. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994;265:1582-1584.
54. Folkman J. Clinical application of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995;333:1757-1763.
55. Harousseau JL, Shaughnessy J Jr, Richardson P. Multiple myeloma. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2004;237-256.

56. Verheul HMW, Voest EE, Schlingemann RO. Are tumors angiogenesis-dependent? *J Pathol* 2004;202:5-13.
57. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE i sur. Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Angiogenic Activity during the Proliferative Phase of Wound Healing. *A J P* 1998;152(6):1445-1452.
58. Nicosia RF, Tchao R, Leighton J. Interaction between newly formed endothelial channels and carcinoma cells in plasma clot culture. *Clin Exp Metastasis* 1986;4:91-104.
59. Andersen NF, Standal T, Nielsen JL i sur. Syndecan-1 and angiogenic cytokines in multiple myeloma: correlation with bone marrow angiogenesis and survival. *Br J Haematol* 2005;128(2):210-217.
60. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM i sur. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004;104(3):607-618.
61. Rajkumar SV, Mesa RA, Fonseca R i sur. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res* 2002;8:2210-2216.
62. Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: the therapeutic implications. *Blood* 2005;105:1383-1395.
63. Podar K, Tai YT, Davies FE i sur. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood* 2001;98:428-435.
64. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H i sur. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835-846.
65. Bellamy WT. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma and other hematopoietic malignancies. *Sem Oncol* 2001;28:551-559.
66. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D i sur. Vessel co-option, regression, and growth in tumors mediated by angiopoetins and VEGF. *Science* 1999;284:1994-1998.
67. Raffi S, Lyden D, Ben Ezra R i sur. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2002;2:826-835.

68. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM i sur. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid Science 1983;219:983-985.
69. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G i sur. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. Science 1989;246:1309-1312.
70. Breier G, Albrecht U, Sterrer S i sur. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. Development 1992;114:521-532.
71. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL i sur. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. J Clin Invest 1992;89:244-253.
72. Gabrilovich DI, Chen HL, Grgis KR i sur. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. Nat Med 1996;2:1096-1103.
73. Plate KH, Breier G, Millauer B i sur. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. Cancer Res. 1993;53(23):5822-5827.
74. Ria R, Roccaro AM, Merchionne F i sur. Vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma. Leukemia 2003;17:1961-1966.
75. Arora N, Masood R, Zheng T i sur. Vascular endothelial growth factor chimeric toxin is highly active against endothelial cells. Cancer Res 1999;59:183-188.
76. Brunner G, Nguyen H, Gabrilove J i sur. Basic fibroblast growth factor expression in human bone marrow and peripheral blood cells. Blood 1993;81:631-638.
77. Vacca A, Ribatti D, Roncali L i sur. Angiogenesis in B cell lymphoproliferative diseases: biological and clinical studies. Leuk Lymphoma 1995;20:27-38.
78. Hattori K, Dias S, Heissig B i sur. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. J Exp Med 2001;193:1005-1014.
79. Waterfield M, Zhang M, Norman LN i sur. NF- κ B1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability of the Tpl2 kinase. Molecular Cell 2003;11:685-694.

80. Hoshino Y, Hatake K, Kasahara T i sur. Monocyte chemoattractant protein-1 stimulates tumor necrosis and recruitment of macrophages into tumors in tumor-bearing nude mice: increased granulocyte and macrophage progenitors in murine bone marrow. *Exp Hematol* 1995;23(9):1035-1039.
81. Strieter RM. Masters of angiogenesis. *Nat Med* 2005;11(9):925-927.
82. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD i sur. XCR2/CXCR2 ligand biology during lung transplant ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 2005;175(10):6931-6939.
83. Luciani MG, Stoppacciaro A, Peri G i sur. The monocyte chemotactic protein a (MCP-1) and interleukin 8 (IL-8) in Hodgkin's disease and in solid tumours. *Mol Pathol* 1998;51(5):273-276.
84. Strieter RM, Belperio JA, Burdick MD i sur. CXC chemokines: angiogenesis, immunoangiostasis, and metastases in lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1028:351-360.
85. Sousa AR, Lane SJ, Nakhossean JA i sur. Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;10(2):142-147.
86. Goede V, Brogelli L, Ziche M i sur. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int J Cancer* 1999;82(5):765-770.
87. Xu Q, Wang S, Jiang X i sur. Hypoxia-induced astrocytes promote the migration of neural progenitor cells via vascular endothelial factor, stem cell factor, stromal-derived factor-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1 up regulation in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34(7):624-631.
88. Husson H, Carideo EG, Cardoso AA i sur. MCP-1 modulates chemotaxis by follicular lymphoma cells. *Br J Haematol.* 2001;115(3):554-562.
89. Vande Broek I, Asosingh K, Vanderkerken K i sur. Chemokine receptor CCR2 is expressed by human multiple myeloma cells and mediates migration to bone marrow stromal cell-produced monocyte chemotactic proteins MCP-1, -2 and -3. *Br J Cancer* 2003;88(6):855-862.
90. Hee Hong K, Ryu J, Hoon Han K. Monocytochemoattractant protein -1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood* 2005;105(4):1405-1407.
91. Aggarwal R, Ghobrial IM, Roodman GD. Chemokines in multiple myeloma. *Exp Hematol.* 2006;34(10):1289-1295.

92. Pellegrino A, Ria R, Di Pietro G i sur. Bone marrow endothelial cells in multiple myeloma secrete CXC-chemokines that mediate interactions with plasma cells. *Br J Haematol* 2005;129(2):248-256.
93. Menu E, Asosingh K, Van Riet i sur. Myeloma cells (5TMM) and their interactions with the marrow microenvironment. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33(2):111-119.
94. Silvestris F, Cafforio P, Tucci M i sur. Upregulation of osteoblast apoptosis by malignant plasma cells: a role in myeloma bone disease. *Br J Haematol* 2003;122(1):39-52.
95. Silvestris F, Cafforio P, Calvani N i sur. Impaired osteoblastogenesis in myeloma bone disease: role of upregulated apoptosis by cytokines and malignant plasma cells. *Br J Haematol* 2004;126(4):475-486.
96. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004;25:280-288.
97. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004;18:2195-2224.
98. Senftleben U, Cao Y, Xiao G i sur. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* 2001;293:1495-1499.
99. Dolcet X, Llobet D, Pallares J i sur. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005;446(5):475-482.
100. Kim HJ, Hawke N, Baldwin AS. NF- κ B and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell death and Differentiation* 2006;13:738-747.
101. Verma IM, Stevenson JK, Schwartz EM i sur. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes&Dev* 1995;9:2723-2735.
102. Muller CW, Rey FA, Sodeoka M i sur. Structure of the NF- κ B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 1995;373:311-317.
103. Gosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B Puzzle. *Cell* 2002;109:81-96.
104. Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y i sur. To be, or not to be: NF-kappa B is the answer-role of Rel/NF kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 2003;22:8961-8982.
105. McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 1999;20:435-459.

106. Houldsworth J, Mathew S, Rao PH i sur. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood* 1996;87:25-29.
107. Joos S, Otano-Joos MI, Ziegler S i sur. Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. *Blood* 1996;87:1571-1578.
108. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K i sur. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998;92:234-240.
109. Bond M, Fabunmi RP, Baker AH i sur. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF- κ B. *FEBS Lett* 1998;435:29-34.
110. Novak U, Cocks BG, Hamilton JA. A labile repressor acts through the NF κ B-like binding sites of the human urokinase gene. *Nucleic Acids Res* 1991;19:3389-3393.
111. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Nuclear factor -inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/I κ Balpha kinase-dependent nuclear factor kappa B -mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J Biol Chem* 2004;279:38921-38935.
112. Huang YW, Hamilton A, Arnuk OJ i sur. Current drug therapy for multiple myeloma. *Drugs* 1999;57(4):485-506.
113. Bladé J, Rosiñol L. Complications of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21(6):1231-1246,xi.
114. Weidner N. Angiogenesis as a predictor of clinical outcome in cancer patients. *Hum Pathol* 2000;31(4):403-405.
115. Orre M, Susil B, Rogers PA. Microvessel density and vascular basement membrane immunostaining in tumours of the breast. *Angiogenesis* 1999;3(2):175-180.
116. Hasui K, Takatsuka T, Sakamoto R i sur. Double autoimmunostaining with glycine treatment. *J Histochem Cytochem* 2000;51(9):1169-1176.
117. Schmitt CA, Lowe SW. Bcl-2 Mediates Chemoresistance in Matched Pairs of Primary E-myc Lymphomas in Vivo. *Blood, Cells, Molecules and Diseases* 2001;27(1):206-216.
118. Demir R, Kayisli UA, Seval Y i sur. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences

between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 2004;25:560-572.

119. Zahn F, Tian E, Bumm K i sur. Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development. *Blood* 2003;101:1128-1140.
120. Ambriović Ristov A. i sur. Metode u molekularnoj biologiji. Izdavač: Institut Ruđer Bošković, Zagreb 2007;361-387.
121. Kumar S, Witzig TE, Timm M, i sur. Bone marrow angiogenic ability and expression of angiogenic cytokines in myeloma:evidence favoring loss of marrow angiogenesis inhibitory activity with disease progression. *Blood* 2004;104(4):1159-1165.
122. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y i sur. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007;12:115–130.
123. Novak U, Cocks BG, Hamilton JA. A labile repressor acts through the NFkB-like binding sites of the human urokinase gene. *Nucleic Acids Res* 1991;9:3389-3393.
124. Holcomb B, Yip-Schneider M, Schmidt CM. The role of nuclear factor kappaB in pancreatic cancer and the clinical applications of targeted therapy. *Pancreas* 2008;36(3):225-235.
125. Neil JR, Schiemann WP. Altered TAB1:I kappaB kinase interaction promotes transforming growth factor beta-mediated nuclear factor-kappaB activation during breast cancer progression. *Cancer Res* 2008;68(5):1462-1470.
126. Lee SY, Yuk DY, Song HS i sur. Growth inhibitory effects of obovatol through induction of apoptotic cell death in prostate and colon cancer by blocking of NF-kappaB. *Eur J Pharmacol* 2008;582(1-3):17-25.
127. Watanabe M, Dewan MZ, Taira M i sur. IkappaBalphα independent induction of NF-kappaB and its inhibition by DHMEQ in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Lab Invest* 2007;87(4):372-382.
128. Rhode J, Fogoros S, Zick S i sur. Ginger inhibits cell growth and modulates angiogenic factors in ovarian cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 2007;20(7):44.
129. Riganti C, Doublier S, Costamagna C i sur. Activation of NF-κB pathway by simvastatin and RhoA silencing increases doxorubicin cytotoxicity in human colon cancer HT29 cells. *Mol Pharmacol* 2008;doi:10.1124/mol.108.045286.

130. Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2005;5(4):297-309.
131. Xu JL, Lai R, Kinoshita T i sur. Proliferation, apoptosis, and intratumoral vascularity in multiple myeloma: correlation with the clinical stage and cytological grade. *J Clin Pathol* 2002;55(7):530-534.
132. Tang X, Liu D, Shishodia S i sur. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions. *Cancer* 2006;107(11):2637-2646.
133. Lessard L, Mes-Masson AM, Saad F. NFkappaB: a new marker kappable of predicting prostate cancer outcome. *Bull Cancer* 2006;93(9):891-899.
134. Watanabe M, Dewan MZ, Okamura T i sur. A novel NF-kB inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF-kB activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2005;114:32-38.
135. Aprigliano I, Dudas J, Ramadori G i sur. Atorvastatin induces apoptosis by a caspase-9-dependent pathway: an in vitro study on activated rat hepatic stellate cells. *Liver Int* 2008;28(4):546-557.
136. Mileshkin L, Honemann D, Gambell P i sur. Patients with multiple myeloma treated with thalidomide: evaluation of clinical parameters, cytokines,angiogenic markers, mast cells and marrow CD57+ cytotoxic T cells as predictors of outcome. *Haematologica* 2007;92(8):1075-1082.
137. Dai Y, Pei X-Y, Rahmani M i sur. Interruption of the NF-kB pathway by Bay 11-7082 promotes UCN-01-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human multple myeloma cells. *Blood* 2004;103(7):2761-2770.
138. Mancuso P, Calleri A, Cassi C i sur. Circulating endothelial cells as a novel marker of angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2003;522:83-97.
139. Ni H, Ergin M, Huang Q i sur. Analysis of expression of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) in multiple myeloma:downregulation of NF-kappa B induces apoptosis. *Br J Haematol* 2001;115(2):279-86.
140. Breitkreutz I, Raab MS, Vallet S i sur. Targeting MEK1/2 blocks osteoclast differentiation, function and cytokine secretion in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007;139(1):55-63.
141. Chauhan D, Singh A, Brahmandam M i sur. Combination of proteasome inhibitors bortezomib and NPI-0052 trigger in vivo synergistic cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 2008;111(3):1654-1664.

142. Okawa Y, Hidemitsu T, Ikeda H i sur. Fatty acid synthase is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2008;141(5):659-671.
143. Dias S, Hattori K, Zhu Z i sur. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Invest* 2000;106:511-521.
144. Mancuso P, Calleri A, Cassi C i sur. Circulating endothelial cells as a novel marker of angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2003;522:83-97.
145. Lee SA, Park SH, Kim BC. Raloxifene, a Selective Estrogen Receptor Modulator, Inhibits Lipopolysaccharide-induced Nitric Oxide Production by inhibiting the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Nuclear Factor-kappa B Pathway in RAW264.7 Macrophage Cells. *Mol Cells* 2008;27:26(1).
146. Richardson P, Mitsiades C, Schlossman R i sur. The treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;317-323.
147. Ghobrial J, Ghobrial IM, Mitsiades C i sur. Novel therapeutic avenues in myeloma: changing the treatment paradigm. *Oncology* 2007;21(7):785-792.
148. Sezer O, Niemoller K, Eucker J i sur. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol* 2000;79:574-577.
149. Rajkumar SV, Leong T, Roche PC i sur. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2000;6:3111-3116.
150. Vacca A, Ribatti D, Roncali L i sur. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1994;87:503-508.
151. Giavazzi R, Sennino B, Coltrini D i sur. Distinct role of fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor on tumor growth and angiogenesis. *Am J Pathol* 2003;162:1913-1926.
152. Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y i sur. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 1999;59:728-733.
153. Kumar S, Fonseca R, Dispenzieri A i sur. Prognostic value of angiogenesis in solitary bone plasmacytoma. *Blood* 2003;101:1715-1717.
154. Dias S, Choy M, Alitalo K i sur. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood* 2002;99:2179-2184.

155. Wu W, Shu X, Hovsepyan H i sur. VEGF receptor expression and signaling in human bladder tumors. *Oncogene* 2003;22:3361-3370.
156. Ria R, Ropccaro AM, Merchionne F i sur. Vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma. *Leukemia* 2003;17:1961-1966.
157. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A i sur. Different signal transduction properties of KDR and Flt1 , two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269:26988-26995.
158. Koldehoff M, Beelen DW, Elmaagacli AH. Small-molecule inhibition of proteasome and silencing by vascular endothelial cell growth factor-specific siRNA induce additive antitumor activity in multiple myeloma. *J Leukoc Biol.* 2008;DOI:10.1189/jlb.0907632.
159. Marković O, Marisavljević D, Cemerikić V i sur. Expression of VEGF and microvessel density in patients with multiple myeloma: clinical and prognostic significance. *Med Oncol* 2008 DOI 10.1007/s12032-008-9066-y.
160. Ria R, Piccoli C, Cirulli T i sur. Endothelial differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells from patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2008;15 14(6):1678-1685.
161. Vacca A, Ribatti D, Presta M i sur. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase- 2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* 1999;93:3064-3073.
162. Breitkreutz I, Raab MS, Vallet S i sur.Targeting MEK1/2 blocks osteoclast differentiation, function and cytokine secretion in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007;139(1):55-63.
163. Matsushima K, Larsen CG, DuBois GC i sur. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med* 1989;169(4):1485-1490.
164. Vacca A, Ria R, Ribatti D i sur. A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. *Haematologica* 2003;88:176-185.
165. Dankbar B, Padro T, Leo R i sur. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 2000;95:2630-2636.
166. Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT i sur. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for bridging KDRand FLT-1

- receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1996;271:5638-5646.
167. Dias S, Hattori K, Zhu Z i sur. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Invest* 2000;106:511-521.
 168. Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT i sur. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for bridging KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1996;271:5638-5646.
 169. Rupert KL, Moulds JM, Yang Y i sur. The molecular basis of complete complement C4A and C4B deficiencies in a systemic lupus erythematosus patient with homozygous C4A and C4B mutant genes. *J Immunol* 2002;169(3):1570-1578.
 170. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A i sur. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269:26988-26995.
 171. Drost EM, MacNee W. Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF- α in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *Eur J Immunol* 2002;32:393-403.
 172. Hefler L, Tempfer C, Heinze G i sur. Monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in ovarian cancer patients. *Br J Cancer* 1999;81:855-859.
 173. Pellegrino A, Vacca A, Scavelli C i sur. Chemokines and tumors. *Recenti Prog Med* 2002;93(11):642-654.
 174. Lentzsch S, Gries M, Janz M i sur. Macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1 alpha) triggers migration and signaling cascades mediating survival and proliferation in multiple myeloma (MM) cells. *Blood* 2003;101(9):3568-3573.
 175. Abe M, Oda N, Sato Y i sur. Augmented binding and activation of latent transforming growth factor-beta by a tryptic fragment of latency associated peptide. *Endothelium* 2002;9(1):25-36.
 176. Jöhrer K, Janke K, Krugmann J i sur. Transendothelial migration of myeloma cells is increased by tumor necrosis factor (TNF)-alpha via TNF receptor 2 and autocrine up-regulation of MCP-1. *Clin Cancer Res* 2004;10(6):1901-1910.
 177. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR i sur. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced

- by osteoprotegerin ligand. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96(7):3540-3545.
178. Ebert EC. Tumour necrosis factor – α enhances intraepithelial lymphocyte proliferation and migration. Gut 1998;42:650-655.
179. Broek IV, Asosingh K, Vanderkerken K i sur. Chemokine receptor CCR2 is expressed by human multiple myeloma cells and mediates migration to bone marrow stromal cell-produced monocyte chemotactic proteins MCP-1, -2 and -3. Br J Cancer 2003;88(6):855-862.
180. Vanderkerken K, Vande Broek I, Eizirik DL i sur. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), secreted by bone marrow endothelial cells, induces chemoattraction of 5T multiple myeloma cells. Clin Exp Metastasis 2002;19(1):87-90.
181. Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S i sur. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human esophageal squamous cell carcinomas. Int J Cancer 2002;102:220-224.
182. Goldberg-Bittman L, Sagi-Assif O, Meshel T i sur. Cellular characteristics of neuroblastoma cells: regulation by the ELR--CXC chemokine CXCL10 and expression of a CXCR3-like receptor. Cytokine 2005;29(3):105-117.
183. Oyajobi BO, Franchin G, Williams PJ i sur. Dual effects of macrophage inflammatory protein-1alpha on osteolysis and tumor burden in the murine 5TGM1 model of myeloma bone disease. Blood 2003;102(1):311-319.
184. Tang X, Liu D, Shishodia S i sur. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions. Cancer 2006;107(11):2637-2646.
185. He H, McCartney DJ, Wei Q i sur. Characterization of a murine alpha 2 macroglobulin gene expressed in reproductive and cardiovascular tissue. Biol Reprod 2005;72(2):266-275.
186. Hideshima T, Anderson KC. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. Nat Rev Cancer 2002;2(12):927-937.

PRILOG I

Popis skraćenica

MM- multipli mijelom

SMM – Smoldering multiple myeloma (šuljajući multipli mijelom)

IMM – indolentni multipli mijelom

MGUS – monoclonal gammopathy of unknown significance (monoklonalna gamapatija nepoznatog značenja)

POEMS SY – Polineuropatija, Organomegalija, Endokrine abnormalnosti, M-komponenta, Skin changes (promjene na koži)

NHL – non Hodgkinov limfom

SZO – Svjetska Zdravstvena Organizacija

WHO- World health organisation

REAL – revidirana europsko-američka limfomska klasifikacija

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta

NF B – Nuklearni faktor kappa B

bFGF – bazični fibroblastni čimbenik rasta

TGF- β – transformirajući čimbenik rasta-beta

TGF- α - transformirajući čimbenik rasta-alfa

PDGF – čimbenik rasta deriviran iz trombocita

HGF - hepatoljni čimbenik rasta

EGF - epidermalni čimbenik rasta

G-CSF - granulocitini kolonija stimulirajući faktor

IL-1, IL-6, IL-8,- Interleukini

MCP-1 - monocitni kemotaktični protein

TNF- α - tumor necrosis factor

IFN- α – interferon-alfa

PI – proliferacijski indeks

MI – mitotski indeks

Rb – retinoblastom gen

MPI – međunarodni prognostički indeks

HE – hemalaun eozin

ABC metoda - avidin biotin peroksidaza metoda

HRP – horse redish peroksidaza

AP – alkalna fosfataza

MACS- Magnetic cell sorting, sortiranje stanica pomoću magneta

mRNA-messenger RNA, glasnička ribonukleinska kiselina

PRILOG II

Popis korištenih kemikalija :

Alkalna fosfataza (engl. Alcaline peroxidase- AP) Boethringer, Njemačka

3-aminopropiltrinetoksisilan, C₆H₁₇NO₃Si, Sigma, SAD

3,3' diamino-benzidine, DAB, Sigma, SAD

Citratni pufer, DAKO No.S2031

Etilen- diamino-tetraoctena kiselina (EDTA)

Eozin, Shandon Inc., SAD

Etanol (70%, 90%,100%) CH₃CH₂OH, Kemika, Hrvatska

Hematoksilin, C₆H₁₄O₆, Shandon Inc.,SAD

Ksilol C₆H₁₀, Kemika, Hrvatska

Xylene substytute, DAKO

Medij za montiranje-balzam, Entellan ®, Merck, Njemačka

Vodikov peroksid (30%),H₂O₂, Kemika, Hrvatska

Parafin, Shandon Inc, SAD

Paraformaldehid (4%) Sigma, SAD

1-Propanol C₃H₈O, Kemika,Hrvatska

Streptavidin peroksidaza (engl. Peroxidase-POD) Boethringer,Njemačka

Vodeni medij za montiranje, Aquatex®, Merck, Njemačka.

APC,

PI, propidij jodid

Popis korištenih uređaja

Automatski imunobojac DAKO TECHMATE HORIZON, Manufactured by L J L Biosystems Inc.

Protočni citometar FaxAria Becton-Dickinson, USA

Digestor, Koterman, Njemačka

Digitalna kamera C-3030 ZOOM, Olympus , Japan

Dispenzor, Microm, Njemačka

Histokinet,

Mikrotom , MicromHM340E, Njemačka

Mikrovalna pećnica, Samsung Selection M92

Svijetlosni mikroskop, BX51, BX41, Olympus, Japan

Termostat, Ehret,Njemačka

Centrifuga, Jouan, Njemačka

Vaga, Mettler E200, SAD

Puferi i otopine

PBS (fosfatima puferirana fiziološka otopina) pH 7,2

140 mM Natrij klorid (NaCl) , 2,7mM Kalij klorid (KCl), 6,5 mM Natrij hidrogen fosfat-2-hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), 1,5 mM Kalij dihidrogenfosfat (KH_2PO_2), 0,7 mM Kalcij klorid (CaCl_2), 0,7 mM Magnezij klorid-6-hidrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)

Citratni pufer pH 6,0

50 mM limunska kiselina ($\text{C}_6\text{H}_2\text{O}_2 \times \text{H}_2\text{O}$), 50 mM Natrij hidrogenfosfat-2-hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)

TBS (tris- puferirana fiziološka otopina) pH 7,6

1M Tris HCl, 1M natrij klorid (NaCl)

MACS pufer, pH 7,2

PBS (fosfatima puferirana fiziološka otopina) pH 7,2, BSA (bovine serum albumin) i 2Mm EDTA, u omjeru 1:20.

FACS pufer, pH 7,2

PBS (fosfatima puferirana fiziološka otopina) pH 7,2 i 0,5 % FCS (fetal calve serum) (uz dodatak azida (opcionalno)).

CURRICULUM VITAE

EUROPSKI FORMAT ŽIVOTOPISA



OSOBNI PODACI

Ime i prezime

ŠTIFTER SANJA

Adresa

VODOVODNA 35, 51000, RIJEKA, R HRVATSKA

Telefon

212 004

Faks

E-mail

sstifter@medri.hr

Državljanstvo

hrvatsko

Datum rođenja

09.04.1972.

RADNO ISKUSTVO

- Datumi (od - do)

-0D 01.02.2000. ZAPOSLENA KAO ZNANSTVENI NOVAK NA PROJEKTU, NA ZAVODU ZA PATOLOGIJU MEDICINSKOG FAKULTETA U RIJECI

- 1997-1998. ODRAĐEN STAŽ U KBC RIJEKA

- 1997-2000. VOLONTER NA ZAVODU ZA PATOLOGIJU MEDICINSKOG FAKULTETA U RIJECI

Medicinski fakultet u Rijeci

patologija

znanstveni novak

obaveze i dužnosti znanstvenog novaka na doktoratu u sklopu projekta i obavljanje zadataka specijaliste patologa

2002-2006. specijalizacija iz patološke anatomije

2004. stjecanje stupnja magistra znanosti

1998-2000. poslijediplomski znanstveni studij

1999.- državni ispit

1991-1997. dodiplomski studij, stjecanje zvanja doktora medicine

1987-1991. CUO za KUZ Mirko Lenac, stjecanje zvanja farmaceutskog tehničara

- specijalizacija iz patologije (završen stručni poslijediplomski studij)

specijalista patolog

mr.sc., VSS

- Naziv i vrsta organizacije izobrazbe i stručnog usavršavanja
- Glavni kolegiji/uključene profesionalne vještine
- Naziv dobivenog zvanja
- Stupanj prema državnoj klasifikaciji

1993-1997.

Medicinski fakultet Rijeka

demonstrator na Zavodu za patologiju

AKTIVNOSTI TIJEKOM ŠKOLOVANJA

- Datumi (od - do)
- Ustanova
- Naziv aktivnosti

- Funkcija

STRUČNO USAVRŠAVANJE

- Godina

demonstratura, sudjelovanje u provođenju vježbi i seminara na zavodu za patologiju

- 24. Svjetski Kongres Patologa i Laboratorijske medicine, održan u Kuala Lumpuru, od 20-24. Kolovoza 2007.
- 12. Hrvatski hematološki kongres sa međunarodnim sudjelovanjem, održan u Opatiji od 13-15. Svibnja, 2007.
- 3. Hrvatski kongres Patologije i sudske medicine,
- 3. Hrvatski kongres Kliničke citologije,
- 1. Hrvatski simpozij citotehnologije, s međunarodnim sudjelovanjem, održan u Opatiji od 8-11. Svibnja, 2005;
- 19th European Congress of Pathology , održan u Ljubljani od 6-11, Rujna, 2003.
- 24th International Congress of International Academy of Pathology, održan u Amsterdamu od 5-10. Listopada 2002.
- Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I kategorije. Obdukcija – kada, zašto i kako. Zagreb, Hrvatska, Svibanj 23,2003.
- XVII International Meeting of Adriatic Society of Pathology Brijuni, Croatia, 2002, June 28-30.
- The XXXIII Memorial meeting for professor Janez Plečnik, An update of diagnostic approach to malignant lymphoma. Ljubljana, Slovenia, 2002, Prosinac, 5-6.
- 13th Ljudevit Jurak Interantional Symposium on comparative pathology, održan u Zagrebu od 7-8.Lipnja 2002.
- Scientific Communication in Biomedicine, In organization of: Croatian Medical Journal, Rijeka University School of Medicine and Croatian Academy of Medical Sciences. Rijeka, Croatia, 2001, Lipanj 14-16.
- The Second European-American Intensive Course in Clinical and Forensic Genetics (Frontiers in Molecular and Cellular Medicine Session). Dubrovnik, Croatia, 2001, September 3-14.

- Ustanova

- Područje usavršavanja

- Naziv usavršavanja

STRUČNI ČLANCI I ZNANSTVENI RADOVI

- Autori

- Naziv

- Časopis

- Napomena

- Autori

- Naziv

- Časopis

- Napomena

- Autori

- Naziv

- Časopis

- Napomena

- Autori

- Naziv

- Časopis

Stifter S

The role of nuclear factor kappaB on angiogenesis regulation through monocyte chemotactic protein-1 in myeloma.

Med Hypotheses. 2006;66(2):384-6.

rad je dio teme doktorske disertacije prijavljene i prihvaćene 2005.

Stemberger-Papić S, Stanković T, Vrdoljak-Mozetic D, Versa-Ostojić D, Krasević M, Stifter S, Audy-Jurković S.

Morphometry and digital AgNOR analysis in cytological imprints of benign, borderline and malignant serous ovarian tumours.

Cytopathology. 2006 Dec;17(6):382-9.

Kovacevic M, Simic O, Jonjic N, Zaputovic L, Stifter S, Stalekar H.

Apoptotic cell death and cardiovascular diseases; clinical implications.

Med Hypotheses. 2006;67(2):429-30.

Kovacević M, Simić O, Jonjić N, Stifter S.

Apoptosis and cardiopulmonary bypass.

J Card Surg. 2007 ;22(2):129-34.

- Napomena
 - Autori Kovacević M, Simić O, Matana A, Lucin K, Stifter S.
 - Naziv Pulmonary valve papillary fibroelastoma. A case report.
 - Časopis Tumori. 2005;91(4):364-5.
- Napomena
 - Autori Bosnar A, Stemberga V, Cuculic D, Zamolo G, Stifter S, Coklo M.
 - Naziv Suicide rate after the 1991-1995 War in Southwestern Croatia.
 - Časopis Arch Med Res. 2004;35(4):344-7.
- Napomena
 - Autori Stemberga V, Dobi-Babic R, Bosnar A, Cuculic D, Fuckar D, Stifter S, Kusec R, Marusic-Vrsalovic M, Jonjic N.
 - Naziv Primary non-Hodgkin lymphoma of the humerus following traumatic injury: case report.
 - Časopis Hematol Oncol. 2003;21(3):109-14.
- Napomena
 - Autori Jonjic N, Zamolo G, Stifter S, Fuckar D, Gruber F, Sasso F, Rizzardi C, Melato M.
 - Naziv Cytomorphological variations, proliferation and angiogenesis in the prognosis of cutaneous melanoma.
 - Časopis Clin Exp Dermatol. 2003;28(3):310-4.
- Napomena
 - Autori Petkovic M, Zamolo G, Muhvic D, Coklo M, Stifter S, Antulov R.
 - Naziv The first report of extraosseous Ewing's sarcoma in the rectovaginal septum.
 - Časopis Tumori. 2002;88(4):345-6.
- Napomena
 - Autori Bosnar A, Stemberg V, Zamolo G, Stifter S.
 - Naziv Increased suicide rate before and during the war in southwestern Croatia.
 - Časopis Arch Med Res. 2002;33(3):301-4.
- Napomena
 - Autori Zamolo G, Coklo M, Stifter S, Bosnar A, Markic D, Pavlovic-Ruzic I.
 - Naziv Solid variant of alveolar rhabdomyosarcoma of the spermatic cord.
 - Časopis Wien Klin Wochenschr. 2005;117(9-10):323.
- Napomena
 - Autori Valkovic T, Fuckar D, Stifter S, Matusan K, Hasan M, Dobrila F, Jonjic N.
 - Naziv Macrophage level is not affected by monocyte chemotactic protein-1 in invasive ductal breast carcinoma.
 - Časopis J Cancer Res Clin Oncol. 2005;131(7):453-8.
- Napomena
 - Autori Fuckar D, Dekanic A, Stifter S, Mustac E, Krstulja M, Dobrila F, Jonjic N.
 - Naziv VEGF expression is associated with negative estrogen receptor status in patients with breast cancer.
 - Časopis Int J Surg Pathol. 2006;14(1):49-55.
- Napomena
 - Autori Duletić-Nacinović A, Sever-Prebelić M, Stifter S, Jonjić N, Hasan M, Labar B.
 - Naziv Interleukin-6 in patients with aggressive and indolent non-Hodgkin's lymphoma: a
 - Časopis Clin Oncol (R Coll Radiol). 2006 May;18(4):367-8
- Časopis
 - Autori Stifter S, Cindrić-Stančin, Zamolo G, Čoklo M, Petković M, Jonjić N.
 - Naziv Carcinoid tumour with rare clinical presentation: a case report
 - Časopis Comp Clin Path 2004;13:29-31.
- Napomena
 - Rad je citiran u Index Medicusu

**NAGRADE, PRIZNANJA I
STIPENDIJE**

- Godina
- Vrsta i naziv

ČLANSTVA

2007,

Godišnja nagrada za najboljeg mladog znanstvenika iz područja kliničkih znanosti Medicinskog fakulteta u Rijeci

1994-1997. - Član sveučilišnog Kluba 4+

1999. – Hrvatska liječnička komora (HLK)

2002. – Hrvatsko društvo za patologiju i sudsku medicinu

**OSOBNE VJEŠTINE I
ZNANJA**

MATERINJI JEZIK

OSTALI JEZICI

HRVATSKI

ENGLESKI

TALIJANSKI

**SOCIJALNE VJEŠTINE I
ZNANJA**

Život i rad s drugim ljudima, u multikulturalnim okruženjima, na mjestima na kojima je komunikacija važna i u situacijama u kojima je timski rad ključan (npr. kultura i sport), itd.

OD 1994-2002. SAM BILA AKTIVNI ČLAN, VOLONTER SLUŽBE TRAŽENJA PRI DRUŠTVU CRVENOG KRIŽA GRADA RIJEKA

VOZAČKA/E DOZVOLA/E

posjedujem B- kategoriju