

Ekspresija ciklina D1 u koštanoj srži pacijenata s multiplim mijelomom prije i poslije terapije bortezomibom

Expression of cyclin D1 in bone marrow of multiple myeloma patients before and after bortezomib treatment

Ita Hadžisejdić^{1*}, Emina Babarović¹, Marija Livajić¹, Ivana Budisavljević², Toni Valković², Nives Jonjić¹

¹Zavod za patologiju i patološku anatomiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

²Klinika za internu medicinu, Odjel za hematologiju, KBC Rijeka, Rijeka

Sažetak. Cilj: Imunohistokemijski procijeniti ekspresiju ciklina D1 na mijelomskim stanicama u koštanoj srži pacijenata s multiplim mijelomom (MM), liječenih bortezomibom te dobivene podatke usporediti s kliničko-patološkim parametrima i odgovorom na terapiju. **Ispitanici i metode:** Ekspresija ciklina D1 analizirana je ubioptičkim uzorcima koštane srži 24 pacijenta s MM-om prije i nakon provedene terapije bortezomibom. Za određivanje ekspresije ciklina D1 na mijelomskim stanicama korištena je dvostruka imunohistokemijska metoda koja omogućava istovremeno bojanje uzorka s dva protutijela (u ovom slučaju s CD138 za identifikaciju plazma stanica i ciklinom D1). Pozitivnom reakcijom smatralo se nuklearno obojenje naciklin D1, bilo kojeg intenziteta, u $\geq 10\%$ plazma stanica. Rezultati su potom korelirani s kliničko-patološkim podacima pacijenata ispitivane skupine. **Rezultati:** Nuklearna ekspresija ciklina D1 u plazma stanicama oboljelim od MM-a prije terapije nađena u je 9/24 pacijenta, a ukupno negativnih pacijenata bez ikakvog nuklearnog bojanja 13/24 ili s bojanjem na ciklin D1 u $< 10\%$ stanica 2/24 bilo je 15/24. Nakon terapije bortezomibom 5/24 pacijenta bilo je pozitivno na ciklin D1, dok je ukupno 19/24 pacijenata bilo negativno, tj. bez ikakvog nuklearnog bojanja 17/24 ili je imalo $< 10\%$ tumorskih stanica 2/24 pozitivno na ciklin D1. U ovoj studiji nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji ciklina D1 prije i nakon provedene terapije bortezomibom ($p = 0,084$) niti s nekim od kliničko-patoloških parametara. **Zaključak:** Rezultati i razina ekspresije ciklina D1 uvelike variraju unutar različitih ispitivanih skupina, a također ovise i o terapiji koju su pacijenti dobivali, stoga je za utvrđivanje značaja ciklina D1 na prognozu i korelaciju s kliničko-patološkim karakteristikama potrebna veća i homogenija skupina pacijenata.

Cljučne riječi: bortezomib; ciklin D1; imunohistokemija; multipli mijelom

Abstract. Objective: To evaluate, immunohistochemically expression of cyclin D1 in myeloma cells in the bone marrow of multiple myeloma (MM) patients treated with bortezomib and compare obtained data with clinico-pathological parameters and response to therapy. **Patients and methods:** Twenty four patients with MM treated with bortezomib were included in this study. To determine the expression of cyclin D1 in the bone marrow prior to and after bortezomib treatment, we used double immunohistochemical method, which allows simultaneous staining of the sample with two antibodies (in this case with CD138 (plasma cell marker) and cyclin D1). A positive reaction was considered when $\geq 10\%$ plasma cells showed cyclin D1 nuclear staining, at any intensity. The results were correlated with patient's clinico-pathological data. **Results:** The nuclear expression of cyclin D1 in the plasma cells of patients with MM before therapy was found in 9/24 cases and there was 15/24 negative patients, including patients without any nuclear staining 13/24 or with nuclear staining for cyclin D1 but in $< 10\%$ of plasma cells 2/24. After bortezomib treatment, 5/24 patients were positive for cyclin D1 while 19/24 patients were negative, including patients without any nuclear staining 17/24 or they had $< 10\%$ of cyclin D1 positive tumor cells 2/24. In this study there was no statistically significant difference in the expression of cyclin D1 before and after bortezomib treatment ($p = 0.084$) as well as any correlation with some of the clinical or pathological

***Dopisni autor:**

Dr. sc. Ita Hadžisejdić, dr. med.
Zavod za patologiju i patološku anatomiju,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka
e-mail: ita.hadzisejdic@medri.uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

parameters. **Conclusion:** The results and the level of expression of cyclin D1 vary within different study groups and depend as well on the prior treatment patients received. Therefore to determine the prognostic significance of cyclin D1 expression and its correlation with clinico-pathological features a larger and more homogeneous group of patients is required.

Key words: bortezomib; cyclin D1; immunohistochemistry; multiple myeloma

UVOD

MM je plazma stanična novotvorina koja nastaje od B limfocita, podrijetla germinalnog centra. Ovu neizlječivu malignu bolest karakterizira multifokalno nakupljanje atipičnih plazma stanica, prisutnost monoklonskog M proteina u serumu i/ili urinu uz sekundarno zahvaćanje i disfunkciju brojnih organskih sustava (osteolitičke lezije, zatajivanje bubrega, anemija, rekurentne infekcije, hiperkalcijemija i neuropatija). Na MM otpada oko 1 % svih malignih oboljenja te oko 10 – 15 % svih hematoloških neoplazmi. Bolest obično pogađa starije osobe, s prosječnom dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze od oko 65 godina^{1,2}, a dijagnoza se postavlja kombinacijom kliničko-patoloških, radioloških i biokemijskih parametara. Već više od 40 godina kortikosteroidi i kemoterapeutici predstavljaju osnovu u liječenju MM-a^{3,4}, no u posljednjem desetljeću liječenje se znatno promijenilo zbog uvođenja imunomodulacijskih lijekova kao što su talidomid, lenalidomid te inhibitora proteosoma, bortezomiba⁵. Djelovanje bortezomiba temelji se na blokiranju multikatalitičkog enzima 26S proteosoma koji razgrađuje abnormalne ili oštećene proteine, označene i usmjerene putem ubikvitina za razgradnju, a naročito su bitni proteini koji su ključni u staničnom ciklusu i prepisivanju gena⁶. Budući da su takvi proteini zastupljeni u većim količinama tijekom karcinogeneze, kada se stanice nekontrolirano umnažaju, što je ključno za opstanak samih tumorskih stanica, inhibicija putem proteosomskog puta u stanicama tumora dovest će do apoptoze i smrti stanica⁶. Glavni cilj djelovanja bortezomiba nije isključivo mijelomska tumorska stanica nego je njegov mehanizam djelovanja mnogo složeniji te utječe i na mikrookoliš koštane srži regulirajući koštanu pregradnju tako da smanjuje razinu osteoklast-aktivirajućih faktora, RANKL (engl. *receptor*

activator of nuclear factor kappa-B ligand) i DKK1 (engl. *dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1*)⁷, te povećava nivo alkalne fosfataze i osteokalcina, koji su markeri za formiranje kosti⁸. Također bortezomib inhibira diferenciranje osteoklasta i potiče proliferaciju osteoblasta tako što inducira njihovu diferencijaciju iz mezenhimalnih matičnih stanica u osteoblaste^{7,9}. MM je heterogena bolest pa tako i sama prognoza može varirati, dok je sveukupno preživljenje za neke pacijente preko 9 godina, za neke je taj vremenski period kraći od 4

MM je plazma stanična novotvorina koja nastaje od B limfocita, podrijetla germinalnog centra na koju otpada oko 10 – 15 % svih hematoloških neoplazmi. MM je heterogena bolest, pa je tako i sveukupno preživljenje za neke pacijente preko 9 godina, a za neke je taj vremenski period kraći od 4 mjeseca. Stoga je bitno točno odrediti značajne molekularne markere koji bi mogli predvidjeti učinak terapije i/ili biti od prognostičkog značaja za pacijente koji boluju od ove bolesti.

mjeseca. Bitno je, stoga, točno odrediti značajne molekularne markere koji bi mogli predvidjeti učinak terapije i/ili biti od prognostičkog značaja za pacijente koji boluju od ove bolesti⁵. Studije pokazuju da su gotovo svi slučajevi MM-a povezani s poremećajem ekspresije barem jednog od proteina, ciklina D1, D2 i D3, što indirektno sugerira da bi mogli imati prognostički značaj. Protein, ciklin D1, produkt je *CCND1* gena koji preko ciklin ovisnih kinaza (cdk) dovodi do fosforilacije retinoblastomskog proteina (pRB) i posljedičnog otpuštanja E2F transkripcijskog faktora, što potom dovodi do aktivacije gena, odgovornih za prolaz stanice iz G1 u S fazu staničnog ciklusa, što u konačnici rezultira replikacijom DNA-a i pojačanom proliferacijom stanica. Prekomjerna ekspresija ciklina D1 može se naći u mnogim humanim novotvorinama, uključujući MM, limfom plaštene zone, rak dojke te hepatocelularni karcinom¹⁰. Prekomjerna ekspresija ciklina D1 posljedica je amplifikacije istoimenog gena ili češće translokacije t(11;14)(q13;q32), što je rani onkogeni događaj u mnogim humanim tumorima, pa tako između ostalog i u MM-u¹¹. Neke od studija pokazuju da je snažna ekspresija ciklina D1 kod MM-a

povezana s uznapredovalim kliničkim stadijem bolesti, višim histološkim stupnjem i povećanom proliferativnom aktivnosti, smanjenom renalnom funkcijom i većom razinom $\beta 2$ mikroglobulina^{12,13}. Također postoje i druge studije koje pokazuju oprečne rezultate vezano uz spomenute kliničko-patološke parametre^{14,15}. Neka od istraživanja pokazala su da nema razlike u ekspresiji u novodijagnosticiranih i pacijenata s refraktnom ili recidivirajućom bolesti, što korelira s opažanjem da svi podtipovi MM-a, liječeni po terapij-

Istraživanja pokazuju da prekomjerna ekspresija ciklina D1 korelirala s dugotrajnim odgovorom na terapiju i dužim preživljenjem kod pacijenata liječenih bortezomibom. Pojačana ekspresija ciklina D1 kod MM-a suprimira aktivnost STAT-3 i rezultira povećanom osjetljivosti stanice na apoptozu, što za posljedicu ima manje agresivan tumorski rast.

skim protokolima koji se trenutno koriste, s vremenom recidiviraju¹⁵. Ubikvitin-proteasomni put razgradnje također regulira ekspresiju ciklina D1, D2 i D3 pa se tako i ciklin D1 ubrzano razgrađuje putem 26S proteasoma, stoga bortezomib povećava njegovu razinu *in vivo*. Neke od studija pokazuju da prekomjerna ekspresija ciklina D1 korelira s dugotrajnim odgovorom na terapiju i dužim preživljenjem kod pacijenata liječenih bortezomibom^{10,14}. Cilj ove studije bio je imunohistokemijski evaluirati ekspresiju ciklina D1 u uzorcima koštane srži pacijenata s MM-om, prije i nakon provedene terapije bortezomibom te dobivene podatke usporediti s kliničko-patološkim parametrima i odgovorom na terapiju.

ISPITANICI I METODE

Ispitanici

U ovo istraživanje uključena su 24 pacijenta kojima je postavljena dijagnoza MM-a u periodu od 2008. do 2014. na Odjelu za hematologiju Klinike za internu medicinu KBC-a Rijeka. Medijan dobi pacijenata bio je 66 godina (raspon: 48 – 85 godina). Bioptički uzorci koštane srži za svakog pacijenta uzeti su dva puta, jedan uzorak prije započete terapije bortezomibom, a drugi nakon provedene terapije za procjenu odgovora na tera-

piju. U istraživanje su uključeni svi pacijenti redom koji su liječeni bortezomibom i kod kojih su postojali svi potrebni klinički podatci te dovoljna količina očuvanog bioptičkog materijala prije i nakon provedene terapije, a isključeni su pacijenti koji su liječeni drugim protokolima i pacijenti s asimptomatskim MM-om koji ne zahtijevaju liječenje već kliničko praćenje. Stadij bolesti svih pacijenata određivao se prema Durie-Salmon klasifikaciji¹ te Internacionalnom sustavu stadija bolesti za mijelom, tj. ISS klasifikaciji¹, a parametri koji su bili analizirani su: dob, spol, prisutnost litičkih lezija kosti, razina hemoglobina (g/L), tj. prisutnost anemije (razina hemoglobina za 20g/L manja od donje granice normale, donja granica 138 g/L muškarci, 119 g/L žene), razina kreatinina ($\mu\text{mol/L}$), tj. razvoj renalne insuficijencije (razina kreatinina iznad gornje granice normale, gornja granica 117 $\mu\text{mol/L}$ muškarci i 96 $\mu\text{mol/L}$ žene), elektroforezom serumskih proteina dokazani monoklonalni šiljak (imunoglobulini (Ig) ili laki lanci Ig) i „fenotip” lakih lanaca Ig (kappa ili lambda). Skupine odgovora na terapiju definirane su prema kriterijima Internacionalne radne skupine za mijelom¹⁶, kompletan terapijski odgovor, vrlo dobar parcijalni odgovor, parcijalni odgovor, stabilna bolest i progresija bolesti. S obzirom ne to da je u našoj studiji samo jedan pacijent imao progresiju bolesti, pacijenti su za potrebe statističke obrade podataka podijeljeni u dvije skupine: na one koji nisu odgovorili na terapiju (bez odgovora i progresija bolesti) i one koji su postigli bilo koji odgovor na terapiju (kompletan terapijski odgovor, vrlo dobar parcijalni odgovor, parcijalni odgovor). Svi uzorci koštane srži rutinski su obrađeni na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci po standardnom protokolu. Ukratko, uzorci su fiksirani u Schafferovom fiksativu 24 sata i dekalcinirani u osteodecu 4 do 5 sati, a nakon toga su uklopljeni u parafin i rezani te rutinski obojani hemalaun eozinom (HE), PAS metodom te bojanjem po Giemsi, Gomoryju i Berlinskim modrilom. Također, svi su uzorci rutinski imunohistokemijski obojani s anti-CD138, marker specifičan za plazma stanice, (klon MI15, m7228, DAKO, Glostrup, Danska), te lake lance imunoglobulina, Iggkappa (No. 40191, DAKO, Glostrup, Danska) i Iglambda (No. 40193, DAKO, Glostrup, Danska) protutijelima da bi se procijenio udio

plazma staničnih infiltrata (CD 138+ stanice) u koštanoj srži i provjerilo imaju li restrikciju lakih lanaca Ig. U ovome istraživanju svi su uzorci prikupljeni u skladu s etičkim i bioetičkim principima te se u svakom trenutku osigurala privatnost ispitanika uključenih u istraživanje, kao i zaštita tajnosti podataka.

Imunohistokemijsko bojanje

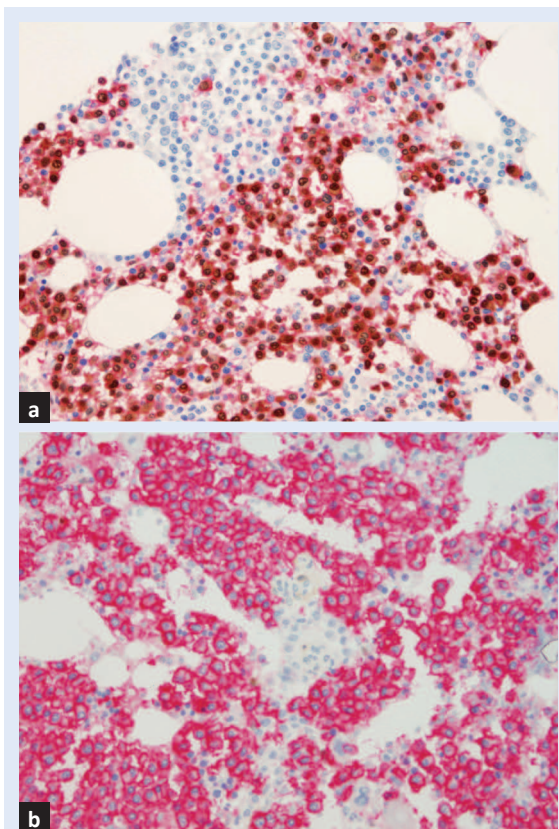
Parafinski rezovi debljine 3 do 5 μm sušeni su preko noći na 55 °C, te potom deparafinizirani i dehidrirani standardnim postupkom. Za otkrivanje antigenskih epitopa molekula od interesa primijenjen je toplinom inducirani pretretman, a sam postupak imunohistokemijskog bojanja se načinio u automatskom imunobojaču (DakoAutostainer Plus, DakoCytomation Colorado Inc, Fort Collins, CO, SAD). Za određivanje izražaja ciklina D1 u mijelomskim stanicama korištena je dvostruka imunohistokemijska metoda, CD138+ciklin D1. Dvostruka imunohistokemijska metoda omogućava istovremeno bojanje uzorka s dva protutijela (u ovom slučaju s CD138 i ciklinom D1 (klon SP4, NeoMarkers, Fremont, SAD)) primjenom *DAKO EnVisionTMDoublestainSystem* (K5361), tako što se dva antigena u istom uzorku označavaju kontrastnim bojama; tj. protutijelom CD138 označe se membrane plazma stanica, a pozitivitet se vizualizira crveno s Chromgen Red, dok se izražaj ciklina D1 (slika 1) prikazuje kao nuklearni pozitivitet vizualiziran smeđim kromogenom DAB. Kao negativna kontrola za sva imunohistokemijska bojenja korišteni su rezovi na koje je umjesto primarnih protutijela nanjena puferska otopina (DAKO).

Procjena imunohistokemijskog bojanja

Korištenjem svjetlosnog mikroskopa (Olympus CX41RF, Tokyo, Japan) određen je postotak obojivosti mijelomskih stanica i to pregledom cijelog uzorka koštane biopsije. Pozitivnom reakcijom smatralo se samo nuklearno bojanje na ciklin D1, bilo kojeg intenziteta, u $\geq 10\%$ plazma stanica, prikazanih pomoću CD138 membranskog bojanja.

Statistička obrada podataka

Ovisno o razini izražaja ciklina D1, pacijenti su podijeljeni u dvije skupine: ciklin D1 pozitivni i ciklin D1 negativni, prije i poslije terapije bortezomibom. Za usporedbu varijabli između dviju skupina



Slika 1. Uzorci koštane srži bojeni dvojom imunohistokemijskom metodom s CD138 i ciklinom D1. Protutijelom anti-CD138 prikazane su membrane mijelomskih stanica crveno, a ekspresija ciklina D1 vidi se kao smeđi nuklearni pozitivitet. a) uzorak koštane srži s ciklin D1 pozitivnim mijelomskim stanicama (povećanje 200 \times); b) uzorak koštane srži s ciklin D1 negativnim mijelomskim stanicama (povećanje 200 \times).

s kliničko-patološkim parametrima koristili su se χ^2 test ili Fisherov egzaktni test. Za usporedbu i određivanje razlike plazma staničnih infiltrata te postotka ciklin D1 pozitivnih mijelomskih stanica, prije i nakon provedene terapije koristio se Wicoxonov test. Podaci su obrađeni pomoću računalnog programa MedCalc 12.2.1.0 (*MedCalcSoftware*, Ostend, Belgija) uz razinu statističke značajnosti $p < 0,05$.

REZULTATI

U ispitivanoj skupini pacijenata (tablica 1) sa simptomatskim MM-om bilo je 10 žena i 14 muškaraca, s rasponom dobi od 48 do 85 godina (medijan 66). U našem uzorku većina pacijenata 14/24 bila je u Durie-Salmon kliničkom stadiju bolesti III, dok su svi preostali pacijenti 10/24 bili

Tablica 1. Kliničko-patološki parametri pacijenata s multiplim mijelomom

Obilježje	MM (N = 24)
Dob (godine)	66
Medijan (raspon)	(48 – 85)
Spol (M/Ž)	14/10
Durie-Salmon stadij bolesti	
I	0
II	10
III	14
Durie-Salmon subklasifikacija	
A	16
B	8
ISS stadij bolesti	
I	3
II	8
III	13
Koštane lezije	
Prisutne	14
Nisu nađene	10
*Hemoglobin (g/L)	
Anemija – da	14
Anemija – ne	8
Nije određeno	2
[§] Kreatinin (μmol/L)	
RI-da	8
RI-ne	15
Nije određeno	1
Sekretorni/bez sekrecije	24/0
Tip paraproteina IgG	21
IgA	2
Samo laki lanci	1
Tip lakih lanaca	
κ	20
λ	4
Udio plazma stanica u koštanoj srži prije terapije	
< 50 %	14
≥ 50 %	10
Udio plazma stanica u koštanoj srži poslije terapije	
< 50 %	23
≥ 50 %	1
Odgovor na terapiju	
Odgovorili	23
Nisu odgovorili	1

ISS – internacionalni sustav stadija bolesti za mijelom;
 *anemija-hemoglobin 20 g/L ispod donje granice normale (138 g/L za muškarce; 119 g/L za žene);
[§]renalna insuficijencija (RI) – serumski kreatinin iznad gornje granice normale (117 μmol/L za muškarce; 96 μmol/L za žene).

u Durie-Salmon kliničkom stadiju bolesti II. Također, u ispitivanoj skupini nije bilo pacijenata u Durie-Salmon kliničkom stadiju bolesti I 0/24. S obzirom na ISS stadij bolesti, najveći broj pacijenata bio je u stadiju III 13/24, zatim u stadiju II 8/24, te najmanje u stadiju I 3/24. Najveći broj pacijenata, njih 14/24 imalo je litičke koštane lezije, dok je bez koštanih promjena bilo 10 pacijenata. Od 22 pacijenta za koje su dobiveni klinički podaci 14 ih je bilo anemično, a 8/22 pacijenta imalo je uredne vrijednosti hemoglobina. Nadalje, za 23 pacijenta bili su dostupni podaci za procjenu renalne insuficijencije koja je utvrđena u 8 pacijenata, a 15/23 pacijenta imalo je urednu bubrežnu funkciju. Kod svih se pacijenata elektroforezom serumskih proteina dokazao monoklonski šiljak koji je većinom bio IgG razreda 21/24, dva pacijenta imala su IgA monoklonski šiljak 2/24, a samo kod jednog pacijenta je on bio u razredu lakih lanaca imunoglobulina 1/24. Imunohistokemijskim kao i biokemijskim analizama seruma kod svih pacijenata se našla restrikcija lakih lanaca imunoglobulina i to kod 20/24 je bila kappa, a kod 4/24 je bila lambda restrikcija.

Prilikom evaluacije koštane srži prije početka terapije bortezomibom 14/24 pacijenta imalo je udio infiltracije plazma stanicama manji od 50 %, dok je 10/24 pacijenta imalo ≥ 50 % mijelomskih stanica u srži, a nakon terapije 23/24 ih je imalo udio tumorskih stanica manji od 50 % te je samo 1/24 pacijenta imao udio plazma stanica ≥ 50 %. Ovo smanjenje u udjelu infiltracije plazma stanicama nakon terapije bortezomibom bilo je statistički značajno u odnosu na uzorak prije terapije ($p < 0,0001$) (tablica 2). U bioptičkim uzorcima koštane srži prije provedene terapije nuklearna ekspresija ciklina D1 u plazma stanicama uočena je u 9/24 uzorka, s time da je u 4 uzorka nuklearna ekspresija ciklina D1 uočena u više od 50 % plazma stanica (slika 1). Negativnih uzoraka na ciklin D1 bilo je 15/24 prije provedene terapije, u 13/24 uzorka bojenje je bilo kompletno negativno u svim plazma stanicama, a u 2/24 uzorka uočena je nuklearna ekspresija ciklina D1 u < 10% plazma stanica. U uzorcima nakon provedene terapije bortezomibom pozitivna ekspresija ciklina D1 uočena je u 5/24 uzorka, dok ih je negativno bilo 19/24, s time da je 17 uzoraka bilo kompletno negativno, a u 2/24

uzorka uočena je nuklearna ekspresija ciklina D1 u < 10 % plazma stanica. Među pacijentima koji su i nakon terapije ostali pozitivni na ciklin D1 su pacijenti koji su prije terapije imali > 50 % mijelomskih stanica pozitivnih na ciklin D1 (njih 4) te su imali i obilnu infiltraciju koštane srži plazma stanicama, tj. > 50 % (njih 5). Opažena razlika u ekspresiji ciklina

D1 u uzorcima prije i nakon provedene terapije nije statistički značajna, no nalazimo statistički trend ($p = 0,084$) (tablica 2). Također nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji ciklina D1 između skupina pacijenata s obzirom na različite kliničko-patološke parametre, prije i nakon provedene terapije, a ovi rezultati zbirno su prikazani u tablici 3.

Tablica 2. Udio plazma stanica i ekspresija ciklina D1 prije i nakon terapije bortezomibom (Bz)

MM = 24	Prije terapije Bz	Poslije terapije Bz	*P vrijednost
Udio plazma stanica			
< 50 %	14	23	< 0,001
≥ 50 %	10	1	
Ciklin D1 pozitivni (≥ 10 % stanica)	9	5	0,084
Ciklin D1 negativni (< 10 % stanica)	15	19	

* Fisherov egzakti test

Tablica 3. Korelacija ekspresije ciklina D1 prije i poslije terapije bortezomibom s kliničko-patološkim parametrima

Parametar	Prije terapije			Poslije terapije		
	Ciklin D1 +	Ciklin D1 -	p vrijednost*	Ciklin D1 +	Ciklin D1 -	P vrijednost*
Durie-Salmon stadij bolesti			0,830			0,552
II	3	7		1	9	
III	6	8		4	10	
ISS stadij bolesti			0,422			0,327
I/II	3	8		1	10	
III	6	7		4	9	
Koštane lezije			1,000			0,614
Prisutne	6	9		4	11	
Nisu prisutne	3	6		1	8	
Hemoglobin (g/L)			0,649			0,630
Anemija – da	6	8		2	7	
Anemija – ne	2	6		2	12	
Kreatinin (μmol/L)			0,371			1,000
§RI – da	4	4		1	4	
RI – ne	4	11		3	15	
Sekretorni			0,533			0,098
IgG	7	14		3	18	
IgA i laki lanci	2	1		2	1	
Laki lanci			0,258			0,544
κ	9	11		5	15	
λ	0	4		0	4	
Udio plazma stanica u koštanoj srži			0,091			1,000
< 50 %	3	11		5	18	
≥ 50 %	6	4		0	1	
Odgovor na terapiju			1,000			1,000
Odgovorili	9	14		5	18	
Nisu odgovorili	0	1		0	1	

* korišten je Fisherov egzakti test; ISS – internacionalni sustav stadija bolesti za mijelom; anemija-hemoglobin 20 g/L ispod donje granice normale (138 g/L za muškarce; 119 g/L za žene); §renalna insuficijencija (RI) – serumski kreatinin iznad gornje granice normale (117 μmol/L za muškarce; 96 μmol/L za žene)

RASPRAVA

Brojna istraživanja usmjerena na razumijevanje genetičke heterogenosti MM-a pridonijela su razvoju novih učinkovitijih lijekova te time otvorila mogućnost bolje individualizirane terapije pacijenata. Uvođenje novih lijekova u liječenje oboljelih od MM-a uvelike je pridonijelo boljem preživljenju pacijenata te se ono udvostručilo s 3 – 4 godine na 6 – 7 godina, no u većine se, nakon dobrog početnog odgovora, razvija relaps i rezistencija na lijekove. Tijek bolesti je različit pa se na jednom kraju spektra nalaze pacijenti s agresivnom bolešću koja brzo postaje rezistentna na terapiju, dok su s druge strane pacijenti s indolentnijim tijekom bolesti koji zahtijevaju česte kontrole, intermitentnu terapiju i dugotrajno praćenje. Stoga je bitno odrediti molekularne markere koji bi mogli predvidjeti učinak terapije i/ili biti od prognostičkog značaja za pacijente koji boluju od ove bolesti⁵. Studije pokazuju da su gotovo svi slučajevi MM-a povezani s poremećajem ekspresije barem jednog od proteina iz obitelji ciklina, što indirektno sugerira da bi mogli imati prognostički značaj, međutim, u literaturi se susreću oprečni rezultati vezani za ekspresiju ciklina D1, povezanosti s kliničko-patološkim karakteristikama te prognozom. U našoj studiji 9/24 pacijenta bilo je imunohistokemijski pozitivno na ciklin D1 prije terapije bortezomibom, dok je nakon terapije udio pozitivnih stanica u koštanoj srži bio 5/24 (tablica 2). Postotak ciklin D1 pozitivnih mijelomskih stanica se u različitim studijama kreće od 25 – 57 %¹⁷. Razlike u razini ekspresije ciklina D1 među studijama prepisuju se razlikama u malom broju te karakteristikama ispitivanih skupina pacijenata (novootkiveni slučajevi MM-a, pacijenti s relapsom bolesti, refraktorna bolest), razlikama u referentnoj vrijednosti za nuklearni pozitivitet na ciklin D1 (u većini studija je on ≥ 10 % stanica) te razlikama u osjetljivosti i metodama koje se koriste. Studije pokazuju da se putem fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH), polimeraza lančanom reakcijom (PCR), mikročip (*microarray*) analize razina izražaja ciklina D1 detektira u rasponu od 45 – 50 % slučajeva¹⁷. U našoj studiji nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji ciklina D1 prije i poslije terapije bortezomibom, kao ni statistički značajna povezanost s nekim od kliničko-

patoloških parametara. Neke studije ukazuju da je pojačana ekspresija ciklina povezana s većim stupnjem aktivnosti bolesti, odnosno da su ciklin D1, ISS stadij bolesti i dob > 65 godina povezani s lošijim preživljenjem¹². Također neke od studija su pokazale povezanost između ekspresije ciklina D1 i višeg histološkog gradusa bolesti, povećane proliferacijske aktivnosti bolesti, smanjene renalne funkcije i više razine $\beta 2$ mikroglobulina^{12,13,18}. Neka od istraživanja pokazala su suprotne rezultate, odnosno u studijama u kojima su MM pacijenti bili liječeni bortezomibom prekomjerna ekspresija ciklina D1 bila je neovisan prognostički parametar povezan s dugotrajnijim odgovorom na terapiju¹⁴. No druge su pak studije pokazale nešto drugačije rezultate, odnosno Kelley i sur.¹⁵ u skupini od 94 pacijenta nisu pronašli razliku u ekspresiji ciklina D1 kod novodijagnosticiranih s MM-om u odnosu na pacijente s relapsom bolesti ili refraktornim MM-om, a također nisu pronašli nikakvu korelaciju između razine izražaja ciklina D1 i kliničko-patoloških karakteristika. Uvođenje novih lijekova u liječenje pacijenata s MM-om, kao što je bortezomib, dovelo je do produženja preživljenja kako kod novootkrivenih tako i kod pacijenata s relapsom ili refraktornom bolesti¹⁹. U našoj skupini pacijenata također je pronađen pozitivan učinak terapije bortezomibom jer je nađena statistički značajna razlika u udjelu infiltracije mijelomskim stanicama u koštanoj srži (tablica 2). Bortezomib djeluje preko 26S proteosomskog puta, a ciklin se razgrađuje putem ubikvitin-proteosomskog puta za degradaciju, što je u korelaciji s istraživanjima koja su pokazala da bortezomib povećava aktivnost ciklina D1 u *in vivo* eksperimentima¹⁷. Objašnjenje korelacije bolje prognoze i pojačane ekspresije ciklina D1 kod MM-a moglo bi biti zbog vezanja ciklina D1 za antiapoptotički transkripcijski faktor STAT-3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*), što suprimira aktivnost STAT-3 i rezultira povećanom osjetljivošću stanice na apoptozu te manje agresivan tumorski rast¹⁰. U kliničkoj studiji na malom broju pacijenata liječenih bortezomibom nađena je pozitivna korelacija između prekomjerne ekspresije ciklina D1 te dugotrajnijeg odgovora na terapiju i bolju prognozu^{14,20}. S obzirom na raznolikost dobivenih rezultata i šarolikost ispitivanih skupina jasno je

zaključiti da je izvođenje generaliziranih zaključaka vezano uz prognostičku i prediktivnu vrijednost ciklina D1 kod oboljelih od MM-a kompleksan zadatak. Rezultati i razina izražaja ciklina D1 uvelike variraju unutar različitih ispitivanih skupina, a također ovise i o samoj terapiji koju su pacijenti dobivali. Stoga je bitno u budućnosti pacijente podijeliti u skupine s jednakim terapijskim protokolima te analizirati razinu ekspresije ciklina D1 i korelirati ih s kliničko-patološkim obilježjima.

ZAKLJUČAK

Ono što možemo potvrditi ovim istraživanjem, a što je u korelaciji s ranijim istraživanjima, je da je imunohistokemijska analiza pouzdana metoda za određivanje ekspresije ciklina D1 te da je bortezomib učinkovit lijek kod liječenja refraktornih ili pacijenata s relapsom bolesti, a za utvrđivanje značaja ciklina D1 na prognozu i korelaciju s kliničko-patološkim karakteristikama bit će potrebna veća i homogenija ispitivana skupina ispitanika.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. McKenna RW, Kyle RA, Kuehl WM, Grogan TM, Harris NL, Coupland RW. Plasma cell neoplasm. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. (eds). WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: IARC, 2008;200-12.
2. Barlogie B, Shaughnessy J, Epstein J, Sanderson R, Anaisie E, Walker R et al. Plasma Cell Myeloma. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT (eds). Williams Hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 2005;1501-33.
3. Alexanian R, Barlogie B, Dixon D. High-dose glucocorticoid treatment of resistant myeloma. *Ann Intern Med* 1986;105:8-11.
4. Gertz MA, Garton JP, Greipp PR, Witzig TE, Kyle RA. Aphase II study of high-dose methyl prednisolone in refractory or relapsed multiple myeloma. *Leukemia* 1995;9:2115-8.
5. Zeng W, Meng F, Liu Z, Mao X, Luo L, Zheng M et al. Bortezomib-based chemotherapy regimens can improve response in newly diagnosed multiple myeloma patients with bcl-2 and survivin overexpression. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7:4239-46.
6. Kouroukis TC, Baldassarre FG, Haynes AE, Imrie K, Reece DE, Cheung MC. Bortezomib in multiple myeloma: systematic review and clinical considerations. *Curr Oncol* 2014;21: 573-603.
7. Terpos E, Heath DJ, Rahemtulla A, Zervas K, Chantry A, Anagnostopoulos A et al. Bortezomib reduces serum dickkopf-1 and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand concentrations and normalises indices of bone remodelling in patients with relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol* 2006;135:688-92.
8. Terpos E, Sezer O, Croucher P, Dimopoulos MA. Myeloma bone disease and proteasome inhibition therapies. *Blood* 2007;110:1098-104.
9. Mukherjee S, Raje N, Schoonmaker JA, Liu JC, Hideshima T, Wein MN et al. Pharmacologic targeting of a stem/progenitor population in vivo is associated with enhanced bone regeneration in mice. *J Clin Invest* 2008;118:491-504.
10. Ngo BT, Felthaus J, Hein M, Follo M, Wider D, Ihorst G et al. Monitoring bortezomib therapy in multiple myeloma: screening of cyclin D1, D2, and D3 via reliable real-time polymerase chain reaction and association with clinico-pathological features and outcome. *Leuk Lymphoma* 2010;51:1632-42.
11. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 2005;106:296-303.
12. Tasidou A, Roussou M, Terpos E, Kastritis E, Gkatzamanidou M, Gavriatopoulou M et al. Increased expression of cyclin-D1 on trephine bone marrow biopsies in dependently predicts for shorter overall survival in patients with multiple myeloma treated with novel agents. *Am J Hematol* 2012;87:734-6.
13. Kojima M, Motoori T, Tamaki Y, Igarashi T, Matsumoto M, Shimizu K et al. Cyclin D1 protein overexpression in extramedullary plasmacytoma: a clinicopathologic study of 11 cases. *J Clin Exp Hematol* 2009;49:53-6.
14. Dawson MA, Opat SS, Taouk Y, Donovan M, Zammit M, Monaghan K et al. Clinical and Immunohistochemical features associated with a response to bortezomib in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2009;15:714-22.
15. Kelley TW, Baz R, Hussein M, Karafa M, Cook JR. Clinical significance of cyclin D1, fibroblast growth factor receptor 3, and p53 immunohistochemistry in plasma cell myeloma treated with a thalidomide-based regimen. *Hum Pathol* 2009;40:405-12.
16. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K et al. International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-73.
17. Padhi S, Varghese RG, Ramdas A. Cyclin D1 expression in multiple myeloma by immunohistochemistry: Case series of 14 patients and literature review. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2013;34:283-91.
18. Pruneri G, Fabris S, Baldini L, Carboni N, Zagano S, Colombi MA et al. Immunohistochemical analysis of cyclin D1 shows deregulated expression in multiple myeloma with the t(11;14). *Am J Pathol* 2000;156:1505-13.
19. Laubach JP, Mitsiades CS, Hideshima T, Schlossman R, Chauhan D, Munshi N et al. Bortezomib in the management of multiple myeloma. *Cancer Manag Res* 2009;1:107-17.
20. Cook JR, Hsi ED, Worley S, Tubbs RR, Hussein M. Immunohistochemical analysis identifies two cyclin D1+ subsets of plasma cell myeloma, each associated with favorable survival. *Am J Clin Pathol* 2006;125:615-24.