







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**  
**ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ**  
**ΣΤΟ ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ**

**ΗΛΙΑΣ Σ. ΠΕΣΣΑΧ**  
Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013**



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202,  
παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»



**Ημερομηνία αίτησης του κ. Πέσσαχ Ηλία:** 24-2-2005

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 551<sup>α</sup>/29-3-2005

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Ελισάφ Μωυσής Καθηγητής Παθολογίας

Μέλη

Μπουραντάς Κωνσταντίνος, Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας

Τσιάρα Σταυρούλα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας

**Ανασύσταση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** Αριθμ Συνεδρ. 567<sup>α</sup>/29-11-2005

Επιβλέπων

Μπουραντάς Κωνσταντίνος, Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας

Μέλη

Μπάη Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Τσιάρα Σταυρούλα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 1-11-2006

*«Διερεύνηση πρωτεϊνών ρυθμιστικών του κυτταρικού κύκλου στο Πολλαπλό Μυέλωμα».*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :** 753<sup>α</sup>/18-6-2013

1. Μπουραντάς Κωνσταντίνος, Ομότιμος Καθηγητής Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Μπάη Μαρία Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Μπριασούλης Ευάγγελος Καθηγητής Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Βούλγαρης Σπυρίδωνας Αναπληρωτής Καθηγητής Νευροχειρουργικής Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Τσιάρα Σταυρούλα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Γούσια Άννα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Κυρτσώνη Μαρία-Χριστίνα Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας Παν/μίου Αθηνών





Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 20-6-2013

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Τζαφλίδου Μαργαρίτα**

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής





Αφιερώνεται στους αγαπημένους μου  
γονείς *Σόλων* και *Ινές*  
και σύζυγο *Έστερ*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η επικρατούσα άποψη για την αξία της “διατριβής επί διδακτορία” είναι η προσφορά του υποψηφίου ερευνητή στη γνώση και στην επιστήμη που υπηρετεί. Σε ότι με αφορά, αυτό που περισσότερο αξίζει στο παρόν πόνημα, είναι η στερέωση της αγάπης μου στην έρευνα και στην Αιματολογία.

Ανάμεσα στους ανθρώπους που μου ενέπνευσαν την αγάπη αυτή, οφείλω να ξεχωρίσω με ιδιαίτερο σεβασμό τους καθηγητές μου κ. Κωνσταντίνο Μπουραντά, κα Χριστίνα Κυρτσώνη, κ Παναγιώτη Παναγιωτίδη, κ. Θεόδωρο Βασιλακόπουλο, κα Μαρία Αγγελοπούλου, και την εισηγήτρια του θέματος της διδακτορικής μου διατριβής κα Μαίρη Μπάη, που τύχη αγαθή, κατηύθυνε και τις ερευνητικές μου προσπάθειες.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στην Αιματολογική κλινική και στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, και δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την συμβολή σημαντικών ανθρώπων και συνεργατών οι οποίοι με στήριξαν και με υποστήριξαν καθ’ όλη τη διάρκεια της προσπάθειας μου.

Πάνω απ’ όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ Κωνσταντίνο Μπουραντά, που μου έδωσε την “ευκαιρία” να αποδείξω τι αξίζω και μου ενέκρινε την εκπόνηση αυτής της διατριβής. Ιδιαίτερες ευχαριστίες επίσης απευθύνω στην καθηγήτρια μου κα Μαίρη Μπάη για την εποπτεία της διατριβής, την υπομονή της μαζί μου και γενικότερα για την καθολική της παρουσία στην προσπάθεια μου αυτή. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω την αναπλ. καθηγήτρια μου κα Σταυρούλα Τσιάρα για την στήριξη της και της εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, καθ’ όλη τη πορεία της διατριβής.

Η ευγνωμοσύνη μου εκφράζεται και προς τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, για τη συμμετοχή τους στη διαδικασία κρίσης και βελτίωσης αυτής της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην επιμ. Α’ κα Σεβαστή Καμινά, την επικ. καθηγήτρια κα Άννα Γούσια, και την ειδικευόμενη κα Παπούδου Αλεξάνδρα, του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, οι οποίες από την πρώτη στιγμή με έκαναν να αισθανθώ καλοδεχούμενος στο χώρο, ενώ παράλληλα διευκόλυναν με κάθε δυνατό τρόπο την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Επίσης ευχαριστώ την

παρασκευάστρια του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής κα Άντα Χριστοδούλου, για την μετάδοση της εμπειρίας της και τη βοήθειά της σε οτιδήποτε χρειαζόμουν.

Ιδιαίτερη θέση στην καρδιά μου έχει και ο αναπλ. καθηγητής κ. Σπυρίδων Βούλγαρης, μέλος της επταμελούς επιτροπής. Πάντοτε παρών κοντά μου, οξυδερκής, πρακτικός, δάσκαλος αλλά και φίλος καλός, βοήθησε όλη μου η προσπάθεια αυτή να κυλήσει παρά τις δυσκολίες.

Θα ήθελα από καρδιάς επίσης να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ Τζων Καλεφεζρά, ο οποίος μου παρείχε απεριόριστη υποστήριξη από την έναρξη της διατριβής μέχρι και σήμερα.

Ευχαριστώ επίσης την κα Αφροδίτη Κατσαράκη, χωρίς την πολύτιμη βοήθειά της οποίας, θα ήταν αδύνατο να γίνει η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της διατριβής αυτής.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και σε όλους τους φίλους και συνεργάτες μου στο Λαϊκό νοσοκομείο, κα Βασιλική Μπάρτζη, κα Τατιάνα Τζένου, κα Άννα Ευθυμίου, κα Κατερίνα Μπιτσάνη, κα Μαρία Δήμου, και κα Ειρήνη Ρισσάκη. Χωρίς την κατανόησή και υπομονή τους, θα ήταν ακόμη πιο δύσκολο να τελειώσει η διατριβή αυτή.

Επίσης ευχαριστώ όλους τους καλούς μου φίλους, Π. Χατζητάκη, Γ. Παππαιωάννου, Γ. Μαγκυριάδη, Κ. Κυριάκη, Α. Σώκο, Χ. Σκεύα, Έ. Καλεφεζρά, Π. Κολυβήρα, Π. Ράπη, Α. Ράπη, Λ. Κολοκούρα, Χ. Οικονόμου, και πολλούς ακόμα, για την κατανόησή τους κάθε φορά που ‘‘χανόμουν’’ προκειμένου να ολοκληρώσω τη διατριβή αυτή.

Αφήνω για το τέλος, τους πιο σημαντικούς ανθρώπους για μένα. Τους γονείς μου Ινές και Σόλων, και την σύζυγό μου Έστερ. Χωρίς την πολύτιμη διαρκή συμπαράστασή τους, στήριξή τους, και την υπομονή τους, δε θα είχα πετύχει τίποτα ως τώρα. Τη διατριβή μου λοιπόν αυτή την αφιερώνω σ’ αυτούς.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....</b>	<b>7</b>
<b>II. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>11</b>
<b>A. ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ (ΠΜ) .....</b>	<b>13</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>13</b>
<b>2. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ .....</b>	<b>14</b>
<b>3. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ .....</b>	<b>15</b>
<b>4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ .....</b>	<b>18</b>
<b>5. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ .....</b>	<b>20</b>
<b>6. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ .....</b>	<b>24</b>
6.1 Οστικές αλλοιώσεις .....	26
6.2 Μικροαγγειοπάθεια .....	27
6.3 Αμυλοείδωση .....	28
6.4 Ο νεφρός του Μυελώματος .....	29
6.5 Διασπορά .....	31
6.6 Εκτροπή του πλασματοκυτταρικού μυελώματος σε πλασματοκυτταρική Λευχαιμία .....	32
<b>7. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ .....</b>	<b>32</b>
<b>8. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ .....</b>	<b>33</b>
8.1 β2 μικροσφαιρίνη .....	33
8.2 LDH .....	34
8.3 Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες .....	34
8.4 Χρωμοσωμικές ανωμαλίες .....	34
8.5 Ιστολογική διαφοροποίηση .....	34
8.6 Ποσοστό διήθησης .....	38
8.7 Πρότυπα διήθησης .....	38
8.8 Οστικές αλλοιώσεις .....	39
8.9 Αγγειογένεση .....	40
8.10 Παραπρωτεΐναιμία .....	45
8.11 Ηλικία και φύλο .....	47
8.12 Κλινικό στάδιο .....	48

<b>9. ΘΕΡΑΠΕΙΑ</b> .....	<b>50</b>
9.1 ΘΑΛΙΔΟΜΙΔΗ (THALIDOMIDE) .....	51
9.2 ΛΕΝΑΛΙΔΟΜΙΔΗ (REVLIMID) .....	52
9.3 ΒΟΡΤΕΖΟΜΙΜΠΗ (VELCADE) .....	52
9.4 ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ .....	54
9.5 ΑΛΛΟΓΕΝΗΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ .....	54
9.6 ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ .....	55
9.7 ΝΕΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ .....	55
<b>B. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ</b> .....	<b>56</b>
1. Γενικά στοιχεία .....	56
2. Μετάβαση του κυττάρου από τη G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου .....	59
3. Μετάβαση του κυττάρου από τη G2 στη φάση M του κυτταρικού κύκλου .....	67
<b>III. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>71</b>
<b>1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>73</b>
1.1 Υλικό .....	73
1.2 Μέθοδοι .....	73
1.2.1 Περιγραφή της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου .....	74
1.3 Αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων .....	76
1.4 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων .....	76
<b>2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>78</b>
2.1. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΠΜ κατά τη διάγνωση. ....	78
2.2. Εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών κατά τη διάγνωση. ....	82
2.3.α. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, κυκλίνης D3, στο μυελό των οστών ασθενών με ΠΜ. ....	85
2.3.β. Ανοσοϊστοχημική έκφραση (>10% των κυττάρων) των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, κυκλίνης D3, στο μυελό των οστών ασθενών με ΠΜ. ....	91
2.4. Συσχετίσεις της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, κυκλίνης D3 στο μυελό των οστών (συνεχείς μεταβλητές). ....	92
2.5. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 στο μυελό των οστών, και των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με ΠΜ κατά τη διάγνωση. ....	94



2.5.α. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 στο μυελό των οστών, και του τύπου του ΠΜ. ....	94
2.5.β. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 στο μυελό των οστών, του σταδίου του ΠΜ και του φύλου. ....	94
2.5.γ. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 στο μυελό των οστών, και της ύπαρξης ή μη οστικής νόσου και νεφρικής νόσου στους ασθενείς με ΠΜ. ....	95
2.5.δ. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 και του ποσοστού διήθησης του μυελού των οστών. ....	95
2.5.ε. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 στο μυελό των οστών, της ηλικίας διάγνωσης της νόσου και του χρόνου προ έναρξης πρώτης θεραπείας. ....	96
2.5.στ. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 στο μυελό των οστών, και του χρόνου επιβίωσης των ασθενών από τη διάγνωση. ....	97
2.6 Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 στο μυελό των οστών και των εργαστηριακών ευρημάτων των ασθενών με ΠΜ κατά τη διάγνωση. ....	98
<b>3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>101</b>
<b>4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>114</b>
<b>5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>117</b>
<b>6. SUMMARY</b> .....	<b>119</b>
<b>7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>121</b>



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το Πολλαπλό Μυέλωμα (ΠΜ) είναι μια κακοήθης Β – νεοπλασία, που προέρχεται από λεμφοκύτταρα του βλαστικού κέντρου, τα οποία διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και αθροίζονται στο μυελό των οστών. Η νόσος θεωρείται ακόμη ανίατη και ευθύνεται για το 20% όλων των θανάτων από αιματολογική κακοήθεια.

Τα τελευταία πενήντα χρόνια δοκιμάστηκαν διάφοροι χημειοθεραπευτικοί συνδυασμοί, χωρίς όμως να αποδειχθεί μέχρι πρόσφατα κάποιος καλύτερος του κλασσικού συνδυασμού μελφαλάνης και πρεδνιζολόνης. Την περασμένη μόλις δεκαετία η αυτόλογη μεταμόσχευση περιφερικών στελεχιαίων κυττάρων αποτέλεσε τη μόνη θεραπευτική επιλογή που αύξησε σημαντικά τα ποσοστά πλήρους ύφεσης, το διάστημα ελεύθερο νόσου και την συνολική επιβίωση. Εν τούτοις, και με τη θεραπευτική αυτή μέθοδο, σχεδόν όλοι οι ασθενείς υποτροπιάζουν, γίνονται ανθεκτικοί στη χημειοθεραπεία και τελικά πεθαίνουν από τη νόσο.

Τα τελευταία χρόνια, η καλύτερη κατανόηση πιθανών στόχων του ΠΜ και των μηχανισμών της αντοχής του στα χορηγούμενα φάρμακα οδήγησαν στην εισαγωγή νέων παραγόντων για τη θεραπεία του. Τέτοιοι παράγοντες είναι η θαλιδομίδη, η λεναλιδομίδη και η μπορτεζομίμη που είτε μόνοι τους, είτε σε συνδυασμούς μεταξύ τους ή με τις κλασικές θεραπείες (χημειοθεραπεία και αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων), άλλαξαν την πορεία της νόσου και βελτίωσαν σημαντικά το προσδόκιμο επιβίωσης της. Ωστόσο, παρά τη χρήση και αυτών των νέων θεραπευτικών παραγόντων, όλοι οι ασθενείς με ΠΜ τελικά υποτροπιάζουν και καταλήγουν. Συνεπώς, η ανάγκη χάραξης νέων στρατηγικών αντιμετώπισης του νοσήματος αυτού καθίσταται προφανής.

Τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα, αντίθετα με τα φυσιολογικά που είναι κύτταρα τελικού σταδίου διαφοροποίησης, διατηρούν την ικανότητά κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αυτοανανέωσης. Έτσι, ενώ κατά τη σταθερή φάση της νόσου τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα αθροίζονται στο μυελό των οστών εξαιτίας διαταραχών των μηχανισμών της απόπτωσης, κατά την επιταχυνόμενη φάση, αθροίζονται λόγω διαταραχών της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Οι διαταραχές αυτές της ρύθμισης πιθανώς να οδηγούν σ' ανθεκτικότητα στη θεραπεία, στην εμφάνιση υποτροπών, και γενικότερα σε επιθετικότερη κλινική συμπεριφορά.

Η είσοδος του κυττάρου σε κυτταρικό κύκλο και η εξέλιξη του, ρυθμίζονται από τη συντονισμένη δράση ενεργών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων αποτελούμενων από

κυκλίνες και κυκλινόεξαρτώμενες κινάσες (CDKs), τα οποία αναστέλλονται από τους αναστολείς των κυκλινόεξαρτώμενων κινασών (CDKis). Πρόσφατα, διάφορες μοριακές μελέτες των μηχανισμών που ελέγχουν τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S, ανέδειξαν έναν κεντρικό ρόλο των κυκλινών D (D1, D2 και D3) και των κυκλινόεξαρτώμενων κινασών τους (CDK) 4 και 6. Τα συμπλέγματα κυκλίνης D – κυκλινόεξαρτώμενης κινάσης 4 ή 6, προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω φωσφορυλίωσης / απενεργοποίησης της πρωτεΐνης Rb στην G1 φάση του κύκλου. Ως αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης αυτής, μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο E2F, απελευθερώνονται και ενεργοποιούνται προάγοντας περαιτέρω τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αντιγραφή του DNA. Η διαδικασία αυτή φαίνεται να ελέγχεται αρνητικά από την p16 και άλλους αναστολείς των κυκλινόεξαρτώμενων κινασών.

Ο κεντρικός ρόλος που διαφαίνεται να έχει το μονοπάτι της κυκλίνης D – pRb – p16 στον κυτταρικό κύκλο, υποστηρίζεται περαιτέρω από την παρουσία συχνών διαταραχών του σε πλειάδα κακοήθων παθήσεων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αντιμετάθεση (11;14) στα λεμφώματα της οριακής ζώνης, που ενεργοποιεί το γονίδιο της κυκλίνης D1 και συνεπακόλουθα οδηγεί σε υπερέκφρασή της πρωτεΐνης D1. Συχνό εύρημα επίσης είναι σε πολλές κακοήθειες οι απαλείψεις και οι μεταλλάξεις του γονιδίου Rb στη χρωμοσωμική ζώνη 13q14, καθώς και η υπερμεθυλίωση του γονιδίου p16. Φαίνεται πως η αναστολή της δράσης των πρωτεϊνών p16 και pRb, καθώς και η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 και των κυκλινόεξαρτώμενων κινασών, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση.

Από τα παραπάνω διαφαίνεται πως και στην παθογένεση του ΠΜ πρέπει να εμπλέκονται διαταραχές του μονοπατιού κυκλίνης D – pRb – p16. Πράγματι, σύμφωνα με ένα μοντέλο ταξινόμησης βασισμένο σε μοριακές διαταραχές, φαίνεται να υπάρχουν 2 διαφορετικά μονοπάτια νεοπλασματικής εκτροπής στο ΠΜ, τα οποία μπορεί και να αλληλοεπικαλύπτονται. Το υποδιπλοειδικό μονοπάτι, το οποίο συνήθως περιλαμβάνει αρχικές ογκογενετικές διαταραχές και περιπτώσεις μυελωμάτων με υψηλή συχνότητα εμφάνισης αντιμεταθέσεων του γονιδίου της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (IgH) στη χρωμοσωμική ζώνη 14q32 και το υπερδιπλοειδικό μονοπάτι, το οποίο συνήθως συμβάλει στην ογκογένεση με άγνωστους ακόμα μηχανισμούς, και χαρακτηρίζεται από τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 και 21. Στις μισές περίπου περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ, ανευρίσκεται 1 από τις 5 αντιμεταθέσεις της περιοχής IgH, οι οποίες

απορυθμίζουν τελικά τα γονίδια των κυκλινών D και προκαλούν υπερέκφραση των πρωτεϊνών. Οι αντιμεταθέσεις αυτές είναι οι 11q13, 6p21 και 16q23 (C maf), 20q11 (B maf), 4p16 (FGFR3/MMSET), που έχουν ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση των κυκλινών D1, D3 και D2 αντίστοιχα.. Πέρα όμως από διαταραχές των γονιδίων των κυκλινών D, που φαίνεται να συμμετέχουν σημαντικά στην παθογένεια του ΠΜ, υπάρχουν ενδείξεις και για διαταραχές του γονιδίου p16 μέσω μεθυλίωσης / απενεργοποίησης (σε ασθενείς με MGUS και ΠΜ), καθώς και για απενεργοποίηση της δράσης της πρωτεΐνης Rb μέσω φωσφορυλίωσης.

Στις μέρες μας, παρά το γεγονός ότι υπάρχουν αποτελέσματα αναφορικά με την έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου στο ΠΜ, εν τούτοις είναι αντιφατικά μεταξύ τους. Επομένως, στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε συστηματική ανάλυση του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 και της έκφρασης πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο (κυκλίνες D1, D2, D3, A, B1 και E, p16 και pRb) σε 62 οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με ΠΜ. Τα ευρήματα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης συσχετίστηκαν με κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της παθογένεσης της νόσου και εξεύρεση πιθανών προγνωστικών παραγόντων και θεραπευτικών στόχων.



# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**





## A. ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Πολλαπλούν ή Πλασματοκυτταρικό Μυέλωμα (ΠΜ) είναι ένα κακόηθες αιματολογικό νόσημα που οφείλεται σε επέκταση ενός κλώνου ανοσοεκκριτικών Β – λεμφοκυττάρων τελικού σταδίου διαφοροποίησης, τα οποία τυπικά εκκρίνουν μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη (παραπρωτεΐνη ή Μ πρωτεΐνη) [1, 2, 3]. Η έναρξη της νόσου αφορά συνήθως στο μυελό των οστών και συνοδεύεται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό του νεοπλασματικού κλώνου εντός των μυελοχώρων με συνεπακόλουθο περιορισμό της φυσιολογικής αιμοποίησης σε αυτούς [4, 5]. Σπανιότερα το ΠΜ προσβάλλει πρωτοπαθώς εξωμυελικά όργανα με συχνότερα αυτά του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος [6, 7].

Η νόσος διαδράμει με υφέσεις και εξάρσεις για χρονικό διάστημα που ποικίλλει κατά μέσο όρο από μερικούς μήνες έως τέσσερα χρόνια [8, 9], οπότε οι ασθενείς καταλήγουν συνεπεία των επιπλοκών της. Σε σπάνιες περιπτώσεις η επιβίωση φθάνει ή ξεπερνά τη δεκαετία [10]. Η βαρύτητα της νόσου βελτιώνεται σημαντικά με τη θεραπεία, χωρίς όμως η τελευταία να επιτυγχάνει πλήρη ίαση [11, 12, 13, 14].

Στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα παράγουν και εκκρίνουν πλήρεις ανοσοσφαιρίνες (με βαριές και ελαφρές αλυσούς), ή χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες (Bence-Jones) που ισοδυναμούν μόνο στις ελαφρές κ ή λ αλυσούς, ή σπανιότερα τίποτα [15, 16, 17].

Κάθε νεοπλασματικός κλώνος εκκρίνει ένα και μόνο τύπο βαρείας (IgA, D, G και σπανιότερα E ή M) και ένα μόνο τύπο ελαφράς (κ ή λ) ανοσοσφαιρίνης, που αποτελεί και το «σήμα κατατεθέν» της νόσου [15, 18]. Σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις παρατηρείται έκκριση μονοκλωνικών ανοσοσφαιριών περισσότερων του ενός τύπου, από ένα ή και περισσότερους νεοπλασματικούς κλώνους (πολυκλωνικό ΠΜ) [19], ενώ άλλοτε τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα παράγουν αλλά δεν εκκρίνουν κλωνική ανοσοσφαιρίνη (μη εκκριτικό ΠΜ) [20].

## 2. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου (Πίνακας 1) προκαλούνται άμεσα από τις νεοπλασματικές διηθήσεις, ενδο- ή και εξωμυελικά, ενώ εμμέσως είναι αποτέλεσμα της έκπτωσης της χυμικής ανοσίας του οργανισμού, αλλά και της εκκρινόμενης κλωνικής πρωτεΐνης (παραπρωτεΐναιμία) [5, 21, 22]. Οι παραγόμενες παραπρωτεΐνες κρυσταλλοποιούνται και επικάθονται στους ιστούς, προκαλώντας αγγειοπάθεια ή αμυλοείδωση οργάνων (κυρίως του νεφρού, που χρονίως οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια), αλλά και αιμορραγικές εκδηλώσεις, σύνδρομο υπεργλοιοίτητας του αίματος και εκφυλιστικές νευροπάθειες [23, 24, 25, 5, 26].

Οι εκδηλώσεις της νόσου συνήθως αφορούν σε αναιμία, οστικά άλγη, παθολογικά κατάγματα, υπερασβεστιαμία, και νεφρική ανεπάρκεια (CRAB), ενώ σε μικρότερο αριθμό ασθενών μπορεί να συνυπάρχουν ηπατομεγαλία και λεμφαδενοπάθεια [11, 13, 27]. Σπληνομεγαλία παρατηρείται λιγότερο συχνά [28].

Η νόσος συνήθως μεταπίπτει σε ανθεκτικές μορφές, μερικές φορές με λευχαιμική φάση (διαφυγή νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων στο περιφερικό αίμα σε ποσοστό τουλάχιστον  $2 \times 10^9/l$ , ή 20% των κυκλοφορούντων κυττάρων του αίματος) [29, 30, 31], ή σπανιότερα μικρό ποσοστό ασθενών, που αφορά σε αυτούς που επιζούν μεταξύ 5-10 χρόνια από τη διάγνωση και κυμαίνονται στο 10% των περιπτώσεων, παρουσιάζουν δευτεροπαθώς μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ), ή οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ) [11, 18, 32].

**Πίνακας 1.** Συχνότερες εκδηλώσεις του Πολλαπλού Μυελώματος.

<b>Προσβολή οστών</b>	Οστεοπόρωση, παθολογικά κατάγματα, οστικά άλγη, υπερασβεστιαμία
<b>Αναιμία</b>	Κατάληψη του μυελού των οστών από τη νεοπλασματική διήθηση, περιορισμός αποτελεσματικής αιμοποίησης
<b>Νεφροπάθεια</b>	Αμυλοείδωση, νεφροπάθεια ασβεστίου, νεφροπάθεια ελαφρών αλύσεων, ουρική νεφροπάθεια
<b>Νευροπάθεια</b>	Εκφυλιστική νευροπάθεια.
<b>Αύξηση ΤΚΕ</b>	Συγκόλληση ερυθρών αιμοσφαιρίων με την μεσολάβηση της παραπρωτεΐνης και σχηματισμός ερυθροκυτταρικών στηλών
<b>Λοιμώξεις</b>	Καταστολή παραγωγής φυσιολογικών ανοσοσφαιρινών, πνευμονιοκοκκικές (συχνότερα) λοιμώξεις

### 3. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ

Στην κλινική πρακτική το Πλασματοκυτταρικό Μυέλωμα ανήκει στα πλασματακυτταρικά νεοπλάσματα (Πίνακας 2). Σ'αυτά, ανοσοϊστοχημικά, στα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα ανιχνεύονται μονοτυπικές κυτταροπλασματικές ανοσοσφαιρίνες, ενώ στερούνται επιφανειακών. Επιπλέον, αυτά εκφράζουν τους αντιγονικούς δείκτες CD138, CD38, και CD79a, ενώ είναι CD20-, όπως άλλωστε και τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα. Αντίθετα από τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα που είναι CD19+, τα νεοπλασματικά είναι σχεδόν πάντοτε CD19-. Επιπρόσθετα, στο 67-79% των περιπτώσεων παρατηρείται ανώμαλη έκφραση του δείκτη CD56 αλλά και άλλων δεικτών όπως CD20, CD117 και CD10. Σε ορισμένες περιπτώσεις εκφράζεται η κυκλίνη D1. Η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής οφείλεται στην διαμετάθεση t(11;14) στην οποία εμπλέκεται το γονίδιο CCND1 [33]. Τέλος, η χρώση για τον δείκτη CD138 βοηθά στην ποσοτικοποίηση των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων της οστεομυελικής βιοψίας και οι χρώσεις για ελαφρές αλύσους των ανοσοσφαιρινών στην ανίχνευση μονοτυπικών ανοσοσφαιρινών.

**Πίνακας 2.** Ταξινόμηση πλασματοκυτταρικών νεοπλασιών (WHO, 2008) [33].

<b>Μονοκλωνική γαμμαπάθεια απροσδιόριστης σημασίας (MGUS)</b>
<b>Πλασματοκυτταρικό μυέλωμα</b> Ποικιλίες: Ασυμπτωματικό (λανθάνον/smoldering) πλασματοκυτταρικό μυέλωμα Μη εκκριτικό μυέλωμα Πλασματοκυτταρική λευχαιμία
<b>Πλασματοκύττωμα</b> Μονήρες πλασματοκύττωμα των οστών Εξωμυελικό πλασματοκύττωμα
<b>Νόσοι εναπόθεσης μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών</b> Πρωτοπαθής αμυλοείδωση Συστηματικές νόσοι εναπόθεσης ελαφρών και βαριών αλύσεων
<b>Οστεοσκληρυντικό μυέλωμα (POEMS σύνδρομο)</b>

Τα αληθή πλασματοκυτταρικά νεοπλάσματα καθώς και τα σύνδρομα που οφείλονται στην εναπόθεση ανοσοσφαιρινών στους ιστούς είναι τα εξής:

**A. Μονοκλωνική γαμμαπάθεια απροσδιόριστης σημασίας**

(Monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS) [33].

Η μονοκλωνική γαμμαπάθεια απροσδιόριστης σημασίας χαρακτηρίζεται από: α) την παρουσία στον ορό μονοκλωνικής πρωτεΐνης/M-πρωτεΐνης σε συγκέντρωση <30g/L, β) την παρουσία στον μυελό των οστών μονοκλωνικών πλασματοκυττάρων σε ποσοστό <10%, γ) την απουσία βλάβης τελικού οργάνου (υπερκαλιαιμία, νεφρική ανεπάρκεια, αναιμία, οστικές αλλοιώσεις) και δ) την απουσία ενός Β-λεμφώματος ή άλλης νόσου που δύναται να παράγει Μ-πρωτεΐνη

**B. Μονήρες πλασματοκύττωμα των οστών (Solitary plasmacytoma of bone) [33].**

Το μονήρες πλασματοκύττωμα των οστών είναι ένας εντοπισμένος όγκος των οστών αποτελούμενος από μονοκλωνικά πλασματοκύτταρα.

**Γ. Εξωμυελικό πλασματοκύττωμα (Extraosseous plasmacytoma) [33].**

Το εξωμυελικό πλασματοκύττωμα είναι ένα εντοπισμένο πλασματοκυτταρικό νεόπλασμα, το οποίο αναπτύσσεται σε ιστούς άλλους εκτός των οστών.

**Δ. Νόσοι εναπόθεσης μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών**

(Monoclonal immunoglobulin deposition diseases) [33].

Οι νόσοι εναπόθεσης μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών είναι στενά σχετιζόμενες διαταραχές, που χαρακτηρίζονται από εναπόθεση ανοσοσφαιρινών σε σπλάχνα και σε μαλακά μόρια με επακόλουθο διαταραχή της λειτουργίας τους. Η υποκείμενη διαταραχή είναι τυπικά ένα πλασματοκυτταρικό νεόπλασμα ή σπανιότερα ένα λεμφοπλασματοκυτταρικό νεόπλασμα, ωστόσο ανοσοσφαιρίνες εναποτίθενται στους ιστούς πριν την ανάπτυξη εμφανούς όγκου. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες νόσων εναπόθεσης μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών: η πρωτοπαθής αμυλοείδωση και η νόσος εναπόθεσης ανοσοσφαιρινών.

**Ε. Οστεοσκληρυντικό μυέλωμα (σύνδρομο POEMS)**

(Osteosclerotic myeloma/ POEMS syndrome) [33].

Το οστεοσκληρυντικό μυέλωμα είναι μία πλασματοκυτταρική νεοπλασία χαρακτηριζόμενη από ίνωση, οστεοσκληρυντικές αλλοιώσεις των οστικών δοκίδων και συχνή συνύπαρξη λεμφαδενίτιδας που ομοιάζει με την πλασματοκυτταρική ποικιλία της νόσου του Castleman. Αποτελεί μέρος ενός σπάνιου συνδρόμου χαρακτηριζόμενου από πολυνευρίτιδα, οργανομεγαλία, ενδοκρinoπάθεια,

μονοκλωνική γαμαπάθεια και δερματικές βλάβες (Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, Monoclonal gammopathy, Skin changes/ POEMS σύνδρομο).

**ΣΤ. Πλασματοκυτταρικό μυέλωμα (Plasma cell myeloma) [33].**

Τυπικά, το πλασματοκυτταρικό μυέλωμα διηθεί το μυελό των οστών όπου οι αλλοιώσεις είναι εκτεταμένες με την μορφή των πολυεστιακών οστεολυτικών βλαβών και εστιακών ογκόμορφων αλλοιώσεων. Εξωμυελική προσβολή παρατηρείται μόνο σε προχωρημένα στάδια της νόσου. Η νόσος εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα κλινικών μορφών, όπως συμπτωματικό πλασματοκυτταρικό μυέλωμα, ασυμπτωματικό (λανθάνον/smoldering) πλασματοκυτταρικό μυέλωμα, μη εκκριτικό μυέλωμα και πλασματοκυτταρική λευχαιμία. Τα διαγνωστικά κριτήρια του συμπτωματικού και του ασυμπτωματικού πλασματοκυτταρικού μυελώματος παρατίθενται στον Πίνακα 3.

Στο μη εκκριτικό μυέλωμα δεν ανιχνεύεται Μ-πρωτεΐνη στον ορό, ενώ στον μυελό των οστών ανοσοϊστοχημικά ανευρίσκονται μονοτυπικά πλασματοκύτταρα, εύρημα ενδεικτικό διαταραχής της απέκκρισης της ανοσοσφαιρίνης από τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα. Στην παθογένεση του μη εκκριτικού μυελώματος είναι δυνατόν να εμπλέκονται μεταλλάξεις των γονιδίων των μεταβλητών περιοχών των ελαφρών αλύσεων των ανοσοσφαιρινών ή μεταβολές των σταθερών περιοχών των ελαφρών αλύσεων των ανοσοσφαιρινών.

Στην πλασματοκυτταρική λευχαιμία εξ ορισμού ο αριθμός των μονοκλωνικών πλασματοκυττάρων του περιφερικού αίματος πρέπει να είναι  $>2 \times 10^9/L$  ή αυτά να αποτελούν το 20% των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Στη κλινική αυτή μορφή, νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα ανευρίσκονται εκτός του περιφερικού αίματος και του μυελού των οστών σε εξωμυελικούς ιστούς, όπως σπλήνα και ήπαρ καθώς και πλευριτικό, εγκεφαλονωτιαίο και περιτοναϊκό υγρό. Πλασματοκυτταρική λευχαιμία είναι δυνατόν να εμφανιστεί κατά την είσοδο της νόσου (πρωτοπαθής) ή κατά την τελική φάση του πλασματοκυτταρικού μυελώματος (δευτεροπαθής).

**Πίνακας 3.** Διαγνωστικά κριτήρια πλασματοκυτταρικού μυελώματος [33].**Συμπτωματικό πλασματοκυτταρικό μυέλωμα****M-πρωτεΐνη στον ορό και στα ούρα**

(Συνήθως IgG&gt;30g/L ή IgA&gt;25g/L ή ελ.άλυσοι στα ούρα &gt;1g/24hr ).

**Μονοκλωνικά πλασματοκύτταρα ή εικόνα πλασματοκυττώματος στον μυελό των οστών**

(Συνήθως μονοκλωνικά πλασματοκύτταρα στο μυελό &gt;10%).

**Ευρήματα σχετιζόμενα με βλάβες τελικών οργάνων ή ιστών**

(υπερκαλιαιμία, νεφρική ανεπάρκεια, αναιμία, βλάβες στα οστά).

**Ασυμπτωματικό (λανθάνον/smoldering) πλασματοκυτταρικό μυέλωμα****M-πρωτεΐνη ορού στα επίπεδα του μυελώματος (>30g/L)****KAI / H****≥10% πλασματοκύτταρα στο μυελό των οστών****Απουσία ευρημάτων σχετιζόμενων με βλάβες τελικών οργάνων ή ιστών**

(υπερκαλιαιμία, νεφρική ανεπάρκεια, αναιμία, βλάβες στα οστά)

ή συμπτώματα σχετιζόμενα με μυέλωμα

**4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ**

Το ΠΜ αντιστοιχεί διεθνώς στο 1% όλων των κακοήθων νέοπλασιών του ανθρώπου και στο 10-15% όλων των κακοήθων αιματολογικών νοσημάτων του [34, 35]. Τα ποσοστά αυτά είναι υψηλότερα στους Νέγρους απ' ότι στους Καυκάσιους και στους άντρες παρά στις γυναίκες [36, 37]. Το ΠΜ αποτελεί τη συχνότερη αιματολογική κακοήθεια ανάμεσα στους Νέγρους και τη δεύτερη στους Λευκούς [38, 39]. Στις χώρες της Κεντρικής Ευρώπης το ποσοστό αυτό φαίνεται να υπερβαίνει το 13%, ενώ στους λευκούς πληθυσμούς της Βόρειας Αμερικής φθάνει το 14.4% [40]. Γενικά η νόσος φαίνεται να παρουσιάζει πτωτικές τάσεις επιπολασμού από τον Βορρά προς το Νότο [40, 41, 42].

Ο επιπολασμός του ΠΜ έχει υπολογισθεί κατά μέσο όρο στις 2-4 νέες περιπτώσεις ανά 100,000 άτομα κάθε χρόνο [43, 44]. Αν και η νόσος παρουσίασε παγκοσμίως μία αύξηση της τάξης του 45% μεταξύ του 1940 και του 1970, τα αυξημένα ποσοστά που παρουσιάζει από τη δεκαετία του 80 μέχρι σήμερα και φθάνουν σχεδόν στο διπλάσιο των προηγούμενων περιόδων (δεκαετίες 50 και 70), οφείλονται μάλλον στη σημαντική βελτίωση των μεθόδων διάγνωσης του ΠΜ παρά σε αυτήν καθ' εαυτήν τη νόσο [45, 46]. Στις χώρες του Δυτικού κόσμου από το 1980 έως και σήμερα, η

αυξητική αυτή τάση είναι της τάξης του 10-15% [46, 47]. Η επέκταση του ηλικιακού εύρους προσβολής από τις μεγαλύτερες ηλικίες (μέσος όρος τα 70 χρόνια στις δεκαετίες 50 και 70) προς τη μέση ηλικία της ζωής (50-60 χρόνια) φαίνεται εν τούτοις να είναι πραγματική [45, 48, 49].

Η νόσος επίσης παρουσιάζει επαγγελματική κατανομή, προσβάλλοντας συχνότερα τις αισθητικούς, τους εργάτες εξόρυξης και επεξεργασίας προϊόντων πετρελαίου, μετάλλων, μεταλλικών ελαίων, ξύλου, δέρματος και ασβέστου [42, 49, 50, 51]. Το τελευταίο εξηγεί τα αυξημένα ποσοστά επιπολασμού της νόσου και στους εκπαιδευτικούς (κιμωλία) [48, 52]. Η τραγική εμπειρία από τους επιζώντες του ατομικού ολοκαυτώματος της Hiroshima και Nagasaki έδειξε ότι υψηλές δόσεις ραδιενέργειας (100 cGy) προκαλούν αύξηση των κρουσμάτων ΠΜ μέχρι και πέντε φορές περισσότερο από ότι στο γενικό πληθυσμό [53]. Το γεγονός πάντως ότι η νόσος είναι επίσης αυξημένη ανάμεσα σε εργάτες πυρηνικών εργοστασίων και γενικότερα σε ασχολούμενους με ραδιενεργά υλικά, υποδηλώνει την επικινδυνότητα ακόμα και μικρότερων δόσεων ραδιενέργειας [54]. Αυξημένη επιδημιολογική τάση για νόσηση παρουσιάζουν επίσης οι επαγγελματικές ομάδες που εκτίθενται στην ακτινοβολία X (ακτινολόγοι, ακτινοθεραπευτές) [55] καθώς και άτομα που χρησιμοποιούν καθαρτικά σκευάσματα για μεγάλο χρονικό διάστημα [42].

Το γεγονός της αυξητικής τάσης του ΠΜ τα τελευταία χρόνια, πυροδότησε αντίστοιχη αύξηση των επιδημιολογικών ερευνών για τον εντοπισμό νέων παραγόντων κινδύνου. Έτσι με βάση πρόσφατα δεδομένα ο κατάλογος των επαγγελμάτων με αυξημένο κίνδυνο νόσησης επεκτείνεται στους ηλεκτρολόγους, τους επιστήμονες ηλεκτρονικών συστημάτων, τους επισκευαστές ηλεκτρονικών υπολογιστών, τους τεχνίτες μηχανών, αλλά και τους παραγωγούς φυτικών γεωργικών προϊόντων, τους ράφτες (φυτικές ίνες) και τους κτηνοτρόφους [48, 52, 56]. Σημαντικό κίνδυνο νόσησης παρουσιάζουν επίσης άτομα που εκτίθενται στη μιογία, το βινύλιο και τη σκόνη [52, 57].

Οι προσπάθειες προσδιορισμού παραγόντων κινδύνου ανάμεσα σε διαφορετικές κοινωνικο-οικονομικές ομάδες, αντανakλούν μάλλον την ενασχόληση των ασθενών με κάποιο από τα παραπάνω επαγγέλματα, παρά αυτήν καθ'εαυτήν την κοινωνικο-οικονομική τους κατάσταση. Έτσι αυξημένα ποσοστά επιπολασμού της νόσου παρατηρούνται τόσο ανάμεσα στις τάξεις χαμηλού και μέσου εισοδήματος (οδοκαθαριστές, εργάτες κατασκευής οδικών έργων, υδραυλικούς, αγρότες, αισθητικούς), όσο και στις υψηλού (γιατρούς, εργολάβους κατασκευαστικών έργων,

εξόρυξης μετάλλων ή πετρελαίου, εκδότες, κτλ) [49, 55, 58]. Εν κατακλείδι ουσίες με έντονη αντιγονικότητα φαίνεται να δίνουν το έναυσμα στους μηχανισμούς νεοπλασματικής εκτροπής σε αυτές τις ομάδες ασθενών, στις οποίες συνυπάρχουν και άλλοι προδιαθεσικοί παράγοντες, ως επί το πλείστον γονιδιακοί [59, 60, 61].

## **5. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ**

Όπως σε όλα τα νεοπλάσματα έτσι και στην αιτιολογία του ΠΜ εμπλέκονται περισσότεροι του ενός παράγοντες με πολυσχιδείς και αλληλοεπικαλυπτόμενους μηχανισμούς. Το αρχικό ερέθισμα στην έναρξη της νόσου φαίνεται να είναι κάποιος αντιγονικός ερεθισμός, που στις περισσότερες περιπτώσεις παραμένει άγνωστος [60]. Λιγότερο συχνά ο ερεθισμός αυτός μπορεί να σχετίζεται με αντιγόνα του επαγγελματικού περιβάλλοντος [61]. Του αρχικού αυτού ερεθίσματος έπονται μηχανισμοί δημιουργίας νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων, που αφορούν τόσο στα φυσιολογικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος τους [62, 63], όσο βεβαίως και στο γονιδίωμά τους [19, 64].

Όσον αφορά στα φυσιολογικά στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών, έχει αποδειχθεί ότι παράγουν μεγάλα ποσά ιντερλευκίνης 6 (IL-6), η οποία ασκεί παρακρινή δράση στα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα, αναστέλλοντας την απόπτωσή τους και επάγοντας αγγειογενετικούς μηχανισμούς για τη συντήρησή τους [43, 65, 66]. Η παραγωγή της IL-6 από τα στρωματικά κύτταρα αυξάνει ακόμη περισσότερο κατόπιν αλληλεπίδρασής τους με τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα, εγκαθιστώντας κατά τον τρόπο αυτό «συμβιωτικούς» μηχανισμούς επιβίωσης και ανάπτυξης [1, 67, 68]. Έχει επιπλέον διατυπωθεί η άποψη ότι η μόλυνση των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών (κυρίως των δενδριτικών) από ιούς όπως ο ερπητοϊός HHV-8, ενεργοποιεί αυξητικούς και αντιαποπτωτικούς μηχανισμούς στα ανοσοεκκριτικά B- κύτταρα, επάγοντας παράλληλα την παραγωγή και έκκριση αγγειογενετικών κυτοκινών, όπως του VEGF, από τα τελευταία [62]. Τα μολυσμένα δενδριτικά κύτταρα με τον παραπάνω φαινότυπο καθίστανται συνεπώς ικανά να συντηρήσουν την υφιστάμενη B-κυτταρική νέοπλασία [69].

Κατά τη διάρκεια της ενεργού φάσης της νόσου έχει ακόμη παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-2 από τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα [70, 71]. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες λύουν ενζυμικά τις βασικές μεμβράνες των αγγειακών τοιχωμάτων, εξασφαλίζοντας τη διαφυγή των

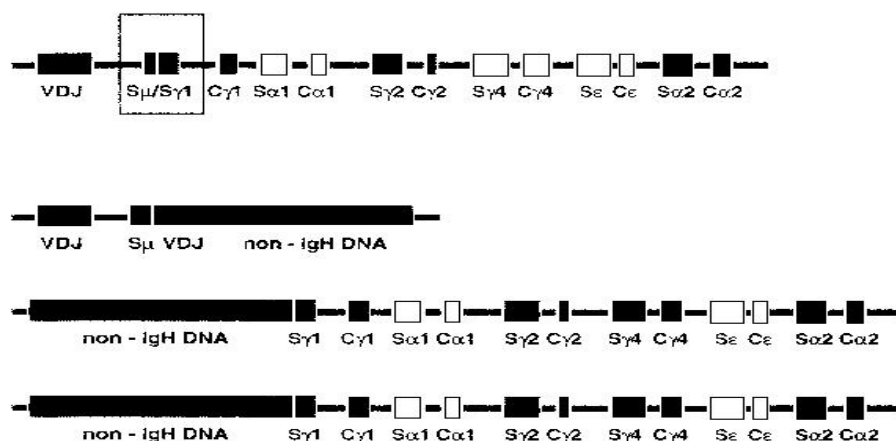


νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων από τους αυλούς των αγγείων αλλά και την αυξημένη εξωμυελική επέκταση της νόσου, ιδιαίτερα κατά την ενεργό φάση της [71, 72, 73].

Τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα φαίνεται ακόμα ότι παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως LFA-1, N-CAM/CD56, ICAM-1, VCAM-1 και VLA-4, μέσω των οποίων προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, εξασφαλίζοντας αφ' ενός την αμεσότερη άλληλεπίδρασή τους με αυτά και αφ' ετέρου τη διαφυγή τους από τους αγγειακούς αυλούς [74, 75, 76, 77].

Μερικά από τα παραπάνω φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των νέοπλασματικών πλασματοκυττάρων (επαγωγή αγγειογένεσης, αναστολή απόπτωσης, έκφραση μορίων προσκόλλησης κ.ο.κ) φαίνεται ότι κληρονομούνται σε αυτά από τα φυσιολογικά τους αντίστοιχα, ενώ άλλα σχετίζονται αιτιολογικά με εκτροπή των φυσιολογικών γονιδιακών μηχανισμών τους [78]. Η εκτροπή αυτή φαίνεται να αφορά σε όλο το φάσμα της μοριακής παθολογίας και εκτείνεται από τις σωματικές μεταλλάξεις [79], τις μεταθέσεις [23] ή απαλείψεις γονιδιακών περιοχών [80], τις γονιδιακές αναδιατάξεις [81] μέχρι και την έκφραση ογκογονιδίων [82]. Με την εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων *in situ* υβριδισμού, φασματικής ταυτοποίησης καρύοτυπου και συγκριτικού γενομικού υβριδισμού [83, 84, 85], αποδείχθηκε τα τελευταία χρόνια η παρουσία χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα κύτταρα του μυελώματος, σε ποσοστό μέχρι και 90% των περιπτώσεων.

Οι πιο καλά μελετημένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο ΠΜ αφορούν σε μεταθέσεις στο γονίδιο των ανοσοσφαιρινών που μεταφράζει τις βαρείες αλυσούς (IGH) και εδράζεται στην περιοχή του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 14 (14q32) [23, 86]. Έτσι, ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες δύο τμήματα του DNA (S<sub>μ</sub> και S<sub>γ</sub> ή S<sub>α</sub>) του γονιδίου 14q32 αναδιατάσσονται εντός των περιοχών του γονιδίου αυτού που μεταφράζει τις ανοσοσφαιρίνες IgM, IgG και IgA αντίστοιχα, στο ΠΜ τα τμήματα του DNA S<sub>μ</sub>, S<sub>γ</sub> και S<sub>α</sub> αναδιατάσσονται σε άλλες περιοχές του γονιδίου, με αποτέλεσμα την τροπή της παραγωγής φυσιολογικής ανοσοσφαιρίνης από IgM σε κλωνική IgG ή IgA, ανάλογα με τη θέση εισόδου των τμημάτων του DNA (Σχήμα1) [87].



**Σχήμα 1.** Αναδιάταξη ανοσοσφαιρινικού DNA σε φυσιολογικές συνθήκες και στο Πολλαπλούν Μυέλωμα.

Σε μεγάλο ποσοστό ασθενών με ΠΜ έχουν επίσης ανιχνευθεί χρωμοσωμικές ανωμαλίες του τύπου των μεταθέσεων και των απαλείψεων που αφορούν στο γονίδιο της ανοσοσφαιρίνης των βαρέων αλύσεων (Πίνακας 4).

**Πίνακας 4.** Χρωμοσωμικές ανωμαλίες στη γονιδιακή περιοχή του 14q32. [88, 89, 90, 91, 92, 93, 94].

Ανωμαλίες του τύπου της μετάθεσης	t(4;14)(p16;q32)
	t(6;14)(p25;q32)
	t(8;14)(q24;q32)
	t(9;14)(p13;q32)
	t(11;14)(q13;q32)
	t(14;16)(q32;q22-23)
Ανωμαλίες του τύπου της απάλειψης	13q14
	17p13
	11q

Η παρουσία ογκογονιδίων στο γονιδίωμα των νεοπλασματικών πλασματοκυτταρικών κλώνων (Πίνακας 5), επίσης φαίνεται να εμπλέκεται στους μηχανισμούς αναδιάταξης του γονιδίου 14q32 των φυσιολογικών ανοσοσφαιρινών [95, 96, 97, 98].

**Πίνακας 5.** Ογκογονίδια στο γονιδίωμα των πλασματοκυττάρων που εμπλέκονται στην κακοήγη εξαλλαγή τους [95, 99, 100, 101, 102, 103].

<b>Ογκογονίδιο</b>	<b>Χρωμοσωμική περιοχή</b>
<b>c-myc</b>	<b>8q24</b>
<b>n-myc</b>	<b>2p23</b>
<b>bcl-2</b>	<b>18q21</b>
<b>bcl-6</b>	<b>3q27</b>
<b>cycline D1</b>	<b>11q13</b>
<b>cycline D3</b>	<b>12p13</b>
<b>FGFR3, MMSET</b>	<b>4q16</b>
<b>IRF4</b>	<b>6p25</b>
<b>MLL</b>	<b>11q23</b>
<b>c-maf</b>	<b>16q23</b>

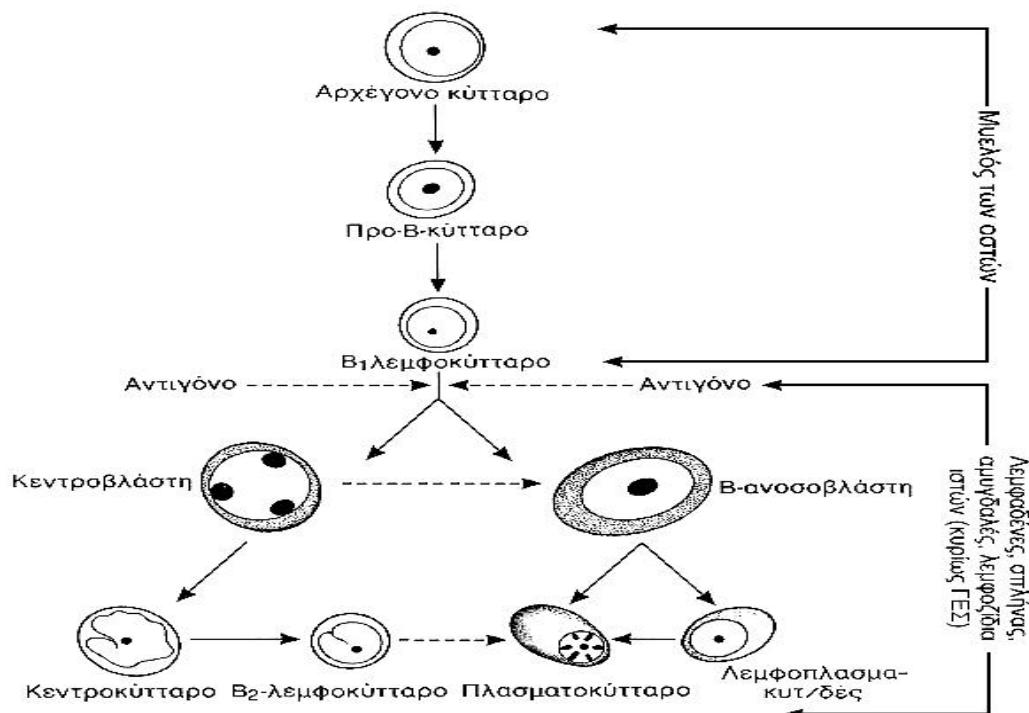
Τέλος, έχουν αναφερθεί και ανωμαλίες του τύπου της ανευπλοειδίας, που αφορούν σε άλλα χρωμοσώματα (μονοσωμίες του χρωμοσώματος 13, τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 3, 5, 6, 7, 9, 11, 15, 17 και 19, απαλείψεις στα χρωμοσώματα 13, 14, 16 και 22, προσθήκες στα χρωμοσώματα 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 και 21) [19, 59, 104, 105, 106] που εμπλέκονται στην παθογένεση του ΠΜ με άγνωστους μέχρι σήμερα μηχανισμούς.

Ενδιαφέρουσα είναι επίσης η ανεύρεση έκφρασης των γονιδίων Rb, p16 και Ki-67 σε ασθενείς με ΠΜ, έκφραση η οποία συσχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησης των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων. Οι ίδιοι συγγραφείς υποστηρίζουν επίσης ότι η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο p53 συσχετίζεται με προχωρημένα στάδια της νόσου, χαμηλή ιστολογική διαφοροποίηση και αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα [107]. Ο Kerbel και συνεργάτες (1996) [108] επιπλέον διατυπώνουν την άποψη ότι ογκογονίδια όπως τα *ras*, *fos*, *HER-2/neu*, *Src* και *raf*, προσδίδουν στους νεοπλασματικούς κλώνους αυξημένη αγγειογενετική ικανότητα, μέσω υπερέκφρασης του VEGF. Σε αντιστοιχία με τους παραπάνω, ο Kondo και συνεργάτες (1994) [109] αναφέρουν ότι η έκφραση του γονιδίου BRAF στο ΠΜ ελέγχει τόσο τους μηχανισμούς απόπτωσης όσο και τους μηχανισμούς αγγειογένεσης της νεοπλασίας.

Ως προς την αιτιολογία της εξωμυελικής επέκτασης της νόσου, μέσω των οστεολυτικών φαινομένων που αυτή παρουσιάζει, φαίνεται να εμπλέκεται η ενεργοποίηση ή αναστολή διαφόρων οδών. Με βάση σχετικά πρόσφατες έρευνες, η ρύθμιση της οστικής ισορροπίας φαίνεται να επιτελείται μέσω της οδού RANKL/OPG [26, 110]. Τα κύτταρα του ΠΜ σύμφωνα με τις έρευνες αυτές, παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών RANKL (επαγωγή οστεοκλασίας), παράλληλα όμως επάγουν την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών και από φυσιολογικά στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών [111, 112]. Τα κύτταρα του ΠΜ επιπλέον, αναστέλλουν τη δράση του γονιδίου OPG με αποτέλεσμα τη δραματική ανατροπή της οστικής ισορροπίας προς όφελος της αποδόμησης [113, 114]. Έτσι τελικά, φαίνεται να εξηγείται η αυξημένη απορρόφηση οστού που παρατηρείται εγγύς των περιοχών του μυελού των οστών με αυξημένη πυκνότητα νεοπλασματικών διηθήσεων [115, 116].

## 6. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η πρωτοπαθής εντόπιση του ΠΜ αφορά στη συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών στο μυελό των οστών (ποσοστό 85% των περιπτώσεων) [117, 118]. Αυτό οφείλεται στο ότι οι μηχανισμοί της φυσιολογικής ιστογένεσης και ωρίμανσης, τουλάχιστον στα αρχικά στάδια (έως τα B1 λεμφοκύτταρα), των φυσιολογικών πλασματοκυττάρων εδράζονται στο μυελό των οστών (Σχήμα 2) [2, 119].



Σχήμα 2. Αναπαράσταση διαφοροποίησης της B-κυτταρικής σειράς

Η ενεργοποίηση των μηχανισμών πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης του B1 λεμφοκυττάρου σε ώριμο ανοσοεκκριτικό πλασματοκύτταρο, πυροδοτούνται όταν το πρώτο έρθει σε επαφή με κάποιο αντιγόνο [120]. Η επαφή αυτή γίνεται στα περιφερικά λεμφικά όργανα όπως λεμφαδένες και σπλήνα [37, 121]. Τα φυσιολογικά ώριμα πλασματοκύτταρα στο μυελό των οστών, δεν υπερβαίνουν σε ποσοστό το 5% του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού του και κατανέμονται ως επί το πλείστον περιτριχοειδικά [122, 123].

Όταν η αντιγονική επίδραση αντίθετα επισυμβαίνει σε έδαφος προηγηθείσας γονιδιακής εκτροπής, αντί να οδηγήσει στην παραγωγή φυσιολογικών πλασματοκυττάρων, κινητοποιεί μηχανισμούς κακοήθους εξαλλαγής τους από το επίπεδο του αρχέγονουκυττάρου στο μυελό των οστών [124, 125]. Η επέκταση του νεοπλασματικού κλώνου τροφοδοτείται από πλήθος κυτοκινών. Η IL-4 κινητοποιεί τα αδρανή κυτταρικά στοιχεία της B-σειράς να συνθέσουν DNA, ενώ η IL-5 επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα νεοπλασματικά κύτταρα της σειράς. Η IL-6 που φυσιολογικά ενεργοποιεί την ωρίμανση των άωρων B-λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα, στο ΠΜ ενεργοποιεί την νεοαγγειογένεση και την οστεοκλασία [126, 127, 128, 129].

Στην παθοφυσιολογία της νόσου συμμετέχουν και κυτταρικά στοιχεία του στρώματος του μυελού των οστών. Τα τελευταία, διεγερόμενα από τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα επάγουν την αγγειογένεση και το ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού του νεοπλάσματος, αναστέλλοντας παράλληλα την κυτταρική απόπτωση [130, 131, 132, 133, 134].

Η νεοπλασματική εκτροπή των πλασματοκυττάρων είναι, όπως στα περισσότερα νεοπλάσματα, πολυσταδιακή και φαίνεται να ξεκινά από την μονοκλωνική γαμμαπάθεια ακαθόριστης σημασίας (Monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), να εξελίσσεται ακολούθως στο ασυμπτωματικό ΠΜ, και τελικά στο τυπικό πλασματοκυτταρικό μυέλωμα [3, 4, 135]. Σύμφωνα με τους Kyle και συνεργάτες (1983) [10] ποσοστό 20-50% των ασθενών με MGUS μεταπίπτει σε ΠΜ εντός δεκαετίας. Το γεγονός της έναρξης του ΠΜ από την MGUS, ενισχύει και η ανεύρεση ταυτόσημου γονιδιακού πρότυπου έκφρασης από τα δύο αυτά νοσήματα [136, 137, 138]. Η διάκριση ωστόσο της MGUS (Πίνακας 6) από το αρχόμενο ΠΜ δεν είναι πάντα ευχερής σε ιστολογικό επίπεδο, οπότε θα πρέπει να συνεκτιμώνται και άλλες παράμετροι της νόσου [139, 140].

**Πίνακας 6.** Κριτήρια διάγνωσης της MGUS (WHO 2008) [33]

Μ-πρωτεΐνη στον ορό <30 g/L Μονοκλωνικά πλασματοκύτταρα <10% στην βιοψία μυελού Απουσία οστεολυτικών αλλοιώσεων Μη ύπαρξη ενδείξεων άλλης Β-λεμφοϋπερπλαστικής εξεργασίας
--

Στις εξωμυελικές πρωτοπαθείς εντοπίσεις της νόσου αντίθετα, η νεοπλασματική εκτροπή φαίνεται να αφορά σε σωματικές μεταλλάξεις στα B<sub>2</sub> λεμφοκύτταρα μνήμης και στα κύτταρα των βλαστικών κέντρων των λεμφοζιδίων, αφήνοντας ανεπηρέαστο το μυελό των οστών [124, 141].

**Οστικές αλλοιώσεις**

Οι συχνότερες εντοπίσεις της νόσου στο μυελό των οστών, λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι το ΠΜ είναι μία κατ' εξοχήν πάθηση της μεσης και μεγάλης ηλικίας, αφορούν στις περιοχές αιμοποίησης κατά την ενήλικη ζωή. Έτσι συχνότερα προσβάλλονται τα οστά του κορμού, ιδιαίτερα οι σπόνδυλοι της θωρακικής και οσφυικής μοίρας της σπονδυλικής στήλης, οι πλευρές, το στέρνο, και η λεκάνη, αλλά και τα οστά της κορυφής του κρανίου [142, 143, 144]. Περιφερικότερες θέσεις του σκελετικού συστήματος προσβάλλονται εξαιρετικά σπάνια και σχεδόν πάντα σε προχωρημένα στάδια της νόσου [143, 145].

Η ενεργοποίηση της οστεοκλαστικής δραστηριότητας επάγεται από τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα τόσο μέσω της οδού RANKL/OPG, όσο και από την έκκριση κυτοκινών από αυτά [111, 146, 147]. Οι κυτοκίνες που σήμερα είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη διαδικασία των οστεολύσεων είναι η IL-1, ο TNF-α, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP-1, 2 και 9, καθώς και οι πρωτεΐνες IGF-4 (πρωτεΐνη ομοιάζουσα με τον ινσουλινικό παράγοντα αύξησης), MIP-Ia (πρωτεΐνη μακροφάγων φλεγμονής) και PTHrP (πρωτεΐνη σχετιζόμενη με παραθορμόνη). Στην παθοφυσιολογία των οστεολύσεων που συνοδεύουν το ΠΜ σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν και φυσιολογικά στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών, όπως οι ινοβλάστες και οι οστεοκλάστες, επίσης μέσω της οδού RANKL/OPG [148, 149]. Οι οστεοκλάστες είναι μακροφάγα που προέρχονται από την μονοκυτταρική σειρά του μυελού των οστών τα οποία εντός του τελευταίου διαφοροποιούνται προς την κατεύθυνση των οστεοκλαστών [150, 151]. Τα κύτταρα αυτά φυσιολογικά εκφράζουν τον παράγοντα RANKL, ο οποίος είναι μέλος της οικογένειας του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) [112]. Η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής εξασφαλίζει την επιβίωση και αύξηση των οστεοκλαστών, ενώ παράλληλα αναστέλλει την απόπτωσή τους [97, 146, 147].

Ο παράγοντας RANKL εκφράζεται επιπλέον από την Β-κυτταρική σειρά καθώς και από πλήθος νεοπλασμάτων, ανάμεσα στα οποία είναι και το ΠΜ [152, 153]. Η υπερέκφραση του RANKL σε ασθενείς με ΠΜ είναι αφ' ενός αποτέλεσμα της άμεσης παραγωγής του από τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα και αφ' ετέρου της επαγωγής της αυξημένης παραγωγής του από τις οστεοκλάστες. Η επαγωγή αυτή επιτελείται μέσω άμεσης επαφής των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων με τις οστεοκλάστες (έκφραση μορίων προσκόλλησης), καθώς επίσης και με παρακρινείς μηχανισμούς. Έτσι κυτοκίνες όπως οι IL-1α, IL-1β και IL-6 που εκκρίνονται από τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα, φαίνεται να επάγουν την υπερ-έκφραση του RANKL από τα στρωματικά κύτταρα [111, 154], ενώ η κυτοκίνη MIP-1 φαίνεται να επάγει την οστεοκλαστική δράση με ανεξάρτητους του RANKL μηχανισμούς [115]. Παράλληλα, η παρακρινής δράση των κυττάρων του ΠΜ στις στρωματικές ινοβλάστες επάγει την έκκριση του αυξητικού ινοβλαστικού παράγοντα (FGF-2) από τις τελευταίες, ο οποίος με τη σειρά του επάγει τη δημιουργία νέων οστεοκλαστών [116, 148, 149].

Η οστεοκλαστική δραστηριότητα αυξάνεται ακόμα περισσότερο από την αναστολή της έκφρασης του γονιδίου OPG από τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα, τα πρωτεϊνικά προϊόντα του οποίου (οστεοπρωτεγερίνες) δεσμεύουν τους υποδοχείς RANKL και επάγουν την παραγωγή οστεοβλαστών [114, 153, 155]. Αντίθετα, σε ασθενείς με MGUS ή ΠΜ με εξωμυελικές πρωτοπαθείς εντοπίσεις, η ισορροπία της οδού RANKL/OPG δεν διαταράσσεται [154, 156].

### **Μικροαγγειοπάθεια**

Οι συστηματικές εκδηλώσεις του ΠΜ είναι σε μεγάλο βαθμό αποτέλεσμα της μικροαγγειοπάθειας που προκαλούν οι κλωνικές ανοσοσφαιρίνες, αλλά και της αμυλοείδωσης [25, 157, 158]. Η μικροαγγειοπάθεια είναι του τύπου της κρουοσφαιριναιμίας του συνδρόμου Raynaud, της πορφυρίας ή της κνίδωσης όταν οι παραπρωτεΐνες (ιδίως οι IgG και IgM) σχηματίζουν (σε χαμηλές θερμοκρασίες) συμπλέγματα στα τοιχώματα των αγγείων, ή του τύπου του συνδρόμου της υπεργλοιότητας όταν οι παραπρωτεΐνες (ιδίως οι IgA και IgM) σχηματίζουν συμπλέγματα στη συστηματική κυκλοφορία. Αποτέλεσμα των τελευταίων είναι η εκδήλωση συμπτωμάτων αιμορραγικών, από το κεντρικό νευρικό σύστημα, καθώς και προβλημάτων όρασης [5, 23,24,25].

## Αμυλοείδωση

Αμυλοείδωση παρατηρείται μόνο σε ποσοστό 15% των ασθενών με ΠΜ, η παρουσία της ωστόσο είναι εξαιρετικά επιβαρυντική τόσο στην παθοφυσιολογία του μυελού των οστών όσο και στην παθοφυσιολογία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας που συχνά συνοδεύει τη νόσο (νεφρός του μυελώματος) [33, 159, 160].

Το αμυλοειδές αντιστοιχεί σε άμορφη ομοιογενή ουσία ηωσινοφιλούς χροιάς, η οποία επικάθεται και αθροίζεται στα μεσοκυττάρια διαστήματα διαφόρων ιστών. Η συσσώρευση αυτή οδηγεί σταδιακά σε συμπίεση, ατροφία και τελικά σημαντική απώλεια των κυττάρων του παρεγχύματος των οργάνων, καθώς και σε αύξηση των τελευταίων σε μέγεθος και σύσταση [24, 25, 161].

Ανάλογα με τον τύπο της αμυλοείδωσης, στη σύνθεση του αμυλοειδούς συμμετέχουν τα τρία παρακάτω συστατικά: 1. Το κύριο συστατικό: Αντιστοιχεί σε πρωτεϊνικά νημάτια με ινώδη διαμόρφωση που προέρχονται: (α). Από τις κ ή λ ελαφρές αλύσους των ανοσοσφαιρινών, ή ακόμα και από κλάσματά τους, που περιλαμβάνουν όλο το μεταβλητό και μέρος μόνο του σταθερού τμήματός τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα κύριου συστατικού αυτής της προέλευσης είναι το λεύκωμα Bence-Jones [162, 163] (β) Από παραγωγή στο ήπαρ της πρωτεΐνης οξείας φάσης SAA σε συνθήκες οξείας φλεγμονής, άθροιση και πολυμερισμό της στους ιστούς. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί πρόδρομο ουσία του αμυλοειδούς [164].

2. Το δευτερεύον συστατικό: Πρόκειται για μεγάλα μόρια πρωτεϊνικής σύστασης με άλλοτε άλλη σύνθεση (P component) στα οποία συμμετέχουν και γλυκοπρωτεΐνες [157]. 3. Πολυσακχαρίτες: Τα μόρια των σακχάρων ενσωματώνονται σταδιακά στις προϋπάρχουσες αθροίσεις του κύριου συστατικού και πολυμερίζονται σχηματίζοντας ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους [165].

Ανάλογα με τους μηχανισμούς παραγωγής του αμυλοειδούς, η αμυλοείδωση χαρακτηρίζεται ως: 1. Πρωτοπαθής αμυλοείδωση: Οφείλεται σε παραγωγή και πολυμερισμό κλωνικών ανοσοσφαιρινών. Αυτού του τύπου η αμυλοείδωση συνοδεύει όλες τις Β λεμφοϋπερπλασίες, μέσα στις οποίες εντάσσεται και το ΠΜ [157]. 2. Δευτεροπαθής αμυλοείδωση: Πρόκειται για αμυλοειδώσεις που οφείλονται σε χρόνιες καταστρεπτικές κακοήθειες ή κληρονομικές νόσους, όπου η αυξημένη κυτταρική καταστροφή υπερφορτώνει το δικτυοενδοπλασματικό και ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού με πρωτεΐνες οι οποίες πολυμερίζονται σε αμυλοειδές [166, 167]. Σε ποσοστό 5-10% των ασθενών με ΠΜ η αμυλοείδωση είναι δευτεροπαθής [159, 168]. 3. Κληρονομική αμυλοείδωση: Στις περιπτώσεις αυτές το



αμυλοειδές δεν περιέχει ανοσοσφαιρίνες. Κλασσικό παράδειγμα κληρονομικής αμυλοείδωσης είναι ο οικογενής μεσογειακός πυρετός [24]. 4. Εντοπισμένη αμυλοείδωση: Αυτός ο τύπος αμυλοείδωσης αφορά σε ένα μόνο όργανο και οφείλεται σε μηχανισμούς τοπικής παραγωγής του αμυλοειδούς (αμυλοείδωση καρδιάς σε ηλικιωμένα άτομα, νησιδίων του Langerhans από πολυμερισμό προϊόντων γλυκογόνου ή ινσουλίνης, θυρεοειδούς από πολυμερισμό προϊόντων καλσιτονίνης κ.ο.κ.) [12, 20].

Οι εναποθέσεις αμυλοειδούς στο μυελό των οστών μπορεί να κατανέμονται μόνο περιαγγειακά, μόνο στο διάμεσο στρώμα, ή να είναι μικτού τύπου [105].

### **Ο νεφρός του Μυελώματος**

Η νεφρική ανεπάρκεια και η συνεπαγόμενη ουραιμία αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά τις λοιμώξεις στους ασθενείς με ΠΜ προχωρημένου σταδίου [144, 160, 169]. Οι νεφρικές αλλοιώσεις στους ασθενείς αυτούς είναι αφ' ενός μεν αποτέλεσμα της μικροαγγειοπάθειας που προκαλούν οι παραπρωτεϊνικές εναποθέσεις στα αγγειακά τοιχώματα και της συνεπαγόμενης ισχαιμίας, αφ'ετέρου δε της αμυλοείδωσης (πρωτοπαθούς ή δευτεροπαθούς) και της έκπτωσης της χυμικής ανοσίας του οργανισμού (Πίνακες 7, 8) [162, 170].

**Πίνακας 7.** Αίτια νεφρικής ανεπάρκειας στο Πολλαπλούν Μυέλωμα

#### **ΤΟΞΙΚΑ**

Λεύκωμα Bence-Jones

Σωληναριακή οξέωση

Σύνδρομο Fanconi

Απώλεια ηλεκτρολυτών

#### **ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ**

Υπερασβεστιαμία

Υπερουριχαιμία

Εξωκυττάριος αφυδάτωση

#### **ΛΟΙΜΩΔΗ**

Έκπτωση χυμικής ανοσίας

Σωληναριακή απόφραξη

Χημειοθεραπεία

#### **ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΗ**

Πρωτοπαθής

Δευτεροπαθής

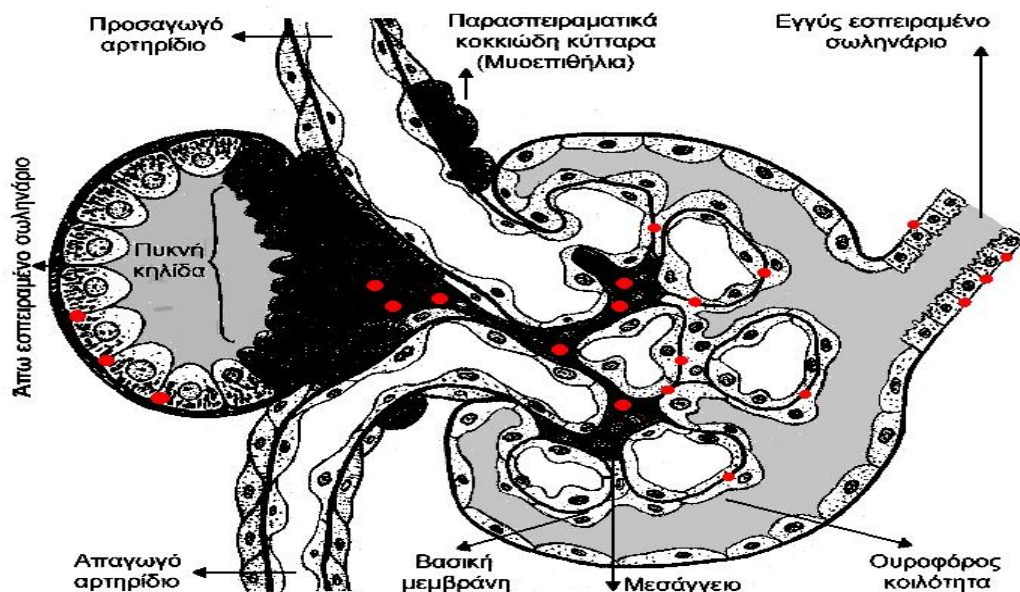
**Πίνακας 8.** Συχνότητα νεφρικής ανεπάρκειας σε σχέση με τον τύπο της παραπρωτεΐνης.

Παραπρωτεΐνη	IgG	IgA	IgD	κ ή λ
Συχνότητα	60%	23%	1%	16%

Ο Van Gise και συνεργάτες (1982) [171] αποδίδουν την έναρξη των μηχανισμών της νεφρικής ανεπάρκειας στην τοξική επίδραση του λευκώματος Bence-Jones στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια. Ως γνωστόν τα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων ρυθμίζουν την ωσμωτικότητα των ούρων με απορρόφηση ή αποβολή ύδατος και ηλεκτρολυτών μέσω της αντλίας καλίου-νατρίου-χλωρίου. Η απώλεια της ρύθμισης αυτής συνεπάγει αύξηση της ενδοσπειραματικής πίεσης, μείωση της σπειραματικής κάθαρσης του αίματος, αύξηση της γλοιότητας και μείωση της ροής του αίματος στη συστηματική κυκλοφορία, ισχαιμία, σωληναριακή ατροφία και ίνωση του νεφρικού παρεγχύματος. Την ισχαιμία επιδεινώνει ακόμη περισσότερο η υπάρχουσα μικροαγγειοπάθεια και την ίνωση η ενδεχόμενη παρουσία αμυλοείδωσης [23, 160, 172].

Στο φάσμα της παθοφυσιολογίας της νεφρικής ανεπάρκειας (Σχήμα 3) συνήθως περιλαμβάνονται: 1. Σωληναριακές αλλοιώσεις: Αποτελούν τις πιο χαρακτηριστικές αλλοιώσεις του «νεφρού του μυελώματος» και εντοπίζονται στα εσπειραμένα και αθροιστικά σωληνάκια. Οι αλλοιώσεις αφορούν σε παρουσία κυλίνδρων στα σωληναριακά τοιχώματα και ανάπτυξη φαγοκοκκιωμάτων του τύπου του ξένου σώματος γύρω από αυτούς. Οι εν λόγω κύλινδροι παρουσιάζουν ηωσινόφιλη χροιά και αποτελούνται από κρυσταλλοποιημένες προσμίξεις λευκωματίνης, ινωδογόνου, πρωτεϊνών, IgG και κ ή λ αλύσων ανοσοσφαιρινών. Στη σύσταση των παραπάνω κυλίνδρων ενίοτε συμμετέχουν και άλατα ασβεστίου ή και ποσότητες κυτταροπλάσματος αποδομημένων κυττάρων [159, 173]. 2. Σπειραματικές αλλοιώσεις: Αυτές αφορούν σε εναποθέσεις ηωσινόφιλων κυλίνδρων του παραπάνω τύπου, καθώς και ελαφρών αλύσων ανοσοσφαιρινών στις βασικές μεμβράνες των αγγειακών σπειραμάτων, εναποθέσεις αμυλοειδούς στο αγγειακό δίκτυο και τη μεσαγγειακή ουσία των σπειραμάτων, ή ακόμα και εναποθέσεις ανοσοσυμπλεγμάτων του τύπου των IgG-λ-Μ σε αυτά [71, 160].

Όλες οι παραπάνω αλλοιώσεις οδηγούν στη λειτουργική ανεπάρκεια του νεφρού (οξεία όταν επιπλέκεται με λοιμώξεις, ή χρόνια) [21, 41, 171].



**Σχήμα 3.** Αναπαράσταση αγγειώδους σπειράματος με τις θέσεις προσβολής των ιστολογικών του δομών από το ΠΜ.

### Διασπορά

Η έκφραση μορίων προσκόλλησης από τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα, καθώς και η έκκριση μεταλλοπρωτεϊνών από αυτά, ιδιαίτερα κατά την ενεργό φάση της νόσου, τους προσδίδουν την ικανότητα της διασποράς [77, 174]. Αντίθετα λεμφοκύτταρα στα οποία η νεοπλασματική αποδιαφοροποίηση οδηγεί σε απώλεια της έκφρασης των παραπάνω χαρακτηριστικών, εγκλωβίζονται εντός του αυλού των αγγείων και δίνουν γένεση σε ενδαγγειακά λεμφώματα [175].

Στην παθοφυσιολογία της εξωμυελικής διασποράς του ΠΜ συμμετέχουν η οδός RANKL/OPG, καθώς και η δράση των κυτοκινών που περιγράφονται στην παθοφυσιολογία των οστικών αλλοιώσεων. Ενδιαφέρον είναι να επισημανθεί ότι σε μυελώματα με εξωμυελική πρωτοπαθή εντόπιση, στα οποία η οστική προσβολή δεν εξυπηρετεί τη διασπορά τους, η λειτουργία της οδού RANKL/OPG είναι φυσιολογική [154, 156].

Οι συχνότερες θέσεις διασποράς του ΠΜ είναι ο σπλήνας και το ήπαρ, από όπου και η νόσος διασπείρεται στα υπόλοιπα όργανα. Ακολουθούν οι λεμφαδένες και οι νεφροί, ενώ λιγότερο συχνά προσβάλλονται ο γαστρεντερικός σωλήνας, οι πνεύμονες και το νευρικό σύστημα [77, 174, 176].

## **Εκτροπή του πλασματοκυτταρικού μυελώματος σε πλασματοκυτταρική λευχαιμία**

Σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν η νόσος παρουσιάζει εκτεταμένη πλασμαβλαστική εκτροπή, μπορεί να μεταπέσει σε λευχαιμική φάση. Αυτές αντιστοιχούν στο 1% όλων των περιπτώσεων ΠΜ [31, 177]. Στις περιπτώσεις πλασματοκυτταρικής λευχαιμίας, ο μυελός των οστών παρουσιάζει εκτεταμένη – διάχυτη διήθηση από μέσης ή και χαμηλής διαφοροποίησης νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα [29, 30].

### **7. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ**

Τα σημερινά χρησιμοποιούμενα διαγνωστικά κριτήρια στο ΠΜ, αποτελούν συνήθως συνδυασμό κλινικών εκδηλώσεων και εργαστηριακών παραμέτρων, όπως την ανεύρεση οστεολυτικών αλλοιώσεων, παραπρωτεϊναιμίας στον ορό ή στα ούρα των ασθενών και νεοπλασματικό πληθυσμό στα επιχρίσματα του μυελού των οστών σε ποσοστό άνω του 10% του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού [139, 178, 179, 180]. Οι παράμετροι αυτές είναι εντούτοις ενδεικτικές, όχι όμως αποδεικτικές της νόσου, αφού οι οστεολυτικές αλλοιώσεις μπορεί να συνοδεύουν οξείες ή χρόνιες λευχαιμίες, Hodgkin ή μη Hodgkin λεμφώματα καθώς και μεταστατικά καρκινώματα, η παραπρωτεϊναιμία να αφορά σε περιπτώσεις μονοκλωνικής γαμμαπάθειας, νόσου Waldenstrom, εμφώματα οριακής ζώνης, πρωτοπαθούς αμυλοείδωσης ή και Β λεμφωμάτων, ενώ ποσοστό πλασματοκυττάρων άνω του 10% μπορεί να παρατηρηθεί σε νόσο Waldenstrom ή και αντιδραστικές υπερπλασίες [32, 181, 182, 183]. Επιπλέον, η ύπαρξη μονοκλωνικότητας για τη διάγνωση της νόσου δεν επαρκεί από μόνη της, αφού δεν μπορεί να διακρίνει το ΠΜ από τις περιπτώσεις μονοκλωνικής γαμμαπάθειας, νόσου Waldenstrom, ή λεμφωμάτων [157, 184]. Από την άλλη πλευρά, ο καθορισμός μονοκλωνικότητας σε βιοπτικό υλικό μυελού των οστών είναι ανέφικτος στις περιπτώσεις που η νεοπλασματική διήθηση δεν υπερβαίνει το 5% του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού του [122, 123, 185]. Επίσης, λαμβάνοντας υπ'όψιν τη συχνά εστιακή προσβολή του μυελού των οστών από τη νόσο, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδιά αυτής, η διάγνωσή της νόσου αλλά και ο καθορισμός του ποσοστού διήθησής της στα επιχρίσματα του μυελού των οστών δεν είναι αντιπροσωπευτικός [117, 186, 187]. Συνεπώς τα κλινικά συστήματα σταδιοποίησης που βασίζονται στα επιχρίσματα του μυελού των οστών δεν επαρκούν [117, 188, 189].

Με βάση όλα τα παραπάνω, πολλοί συγγραφείς επισημαίνουν την αναγκαιότητα τεκμηρίωσης της διάγνωσης της νόσου με ιστολογικά κριτήρια [122, 188, 190, 191]. Έτσι, η διάγνωση του ΠΜ πιστοποιείται με την ιστολογική εξέταση βιοψίας οστού, όπου διαπιστώνεται παρουσία πλασματοκυττάρων παθολογικού φαινοτύπου (πολυπύρρηνα, κενотоπιώδη) σε ποσοστό άνω του 20% των μη ερυθροειδών κυττάρων του μυελού [192, 193, 194]. Η δυνατότητα ιστολογικής διάγνωσης της νόσου από την ΟΜΒ δεν καταργεί παρ'όλα αυτά την αναγκαιότητα συνεκτίμησης των κλινικών παραμέτρων του ασθενούς, ή ακόμα των επιχρισμάτων αίματος και μυελού των οστών [122, 191, 195].

## **8. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

Η αξία καθορισμού προγνωστικών δεικτών στο ΠΜ εντοπίζεται τόσο στον καθορισμό ομάδων ασθενών διαφορετικού προσδόκιμου επιβίωσης, όσο και στη δυνατότητα που παρέχουν για οργάνωση διαφορετικών θεραπευτικών στρατηγικών με σκοπό την αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης τους [196, 197, 198]. Είναι προφανές ότι ο συνδυασμός τέτοιων δεικτών, παρέχει περισσότερες πληροφορίες και δυνατότητες στρατηγικού σχεδιασμού για την αντιμετώπιση της νόσου, απ'ότι μία και μόνον παράμετρος, όσο ασφαλής και αν είναι αυτή [199, 200, 201]. Ωστόσο, αν και η προσπάθεια καθορισμού τέτοιων παραμέτρων στο ΠΜ έχει επιταθεί ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, δεν έχει ακόμη επιτευχθεί συναίνεση ως προς το ποιες από αυτές έχουν πραγματικά προγνωστική αξία, αλλά ούτε και ως προς τη μεθοδολογία εκτίμησής τους.

### **β2 μικροσφαιρίνη**

Η β2 μικροσφαιρίνη αντιστοιχεί σε μία χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνη που σχηματίζει την ελαφρά αλυσίδα του κοινού λευκοκυτταρικού αντιγόνου. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυτής στον ορό και στα ούρα ασθενών με ΠΜ ανευρίσκεται κατά κανόνα αυξημένη. Η αύξηση αυτή σχετίζεται με χαμηλό προσδόκιμο επιβίωσης, και παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού της ανταπόκρισης των ασθενών στη χημειοθεραπεία και στη μεταμόσχευση μυελού των οστών [192, 202, 203, 204].

Η προγνωστική αξία της μεθόδου ωστόσο μειώνεται σημαντικά μετά από παρέλευση δύο χρόνων επιβίωσης του ασθενούς [197, 205, 206].

### **Γαλακτική Δευδρογονάση (LDH)**

Υψηλές συγκεντρώσεις της LDH στον ορό ασθενών με ΠΜ σχετίζονται με πιο επιθετικές μορφές της νόσου και με χειρότερη πρόγνωση [199, 201, 207]. Το μειονέκτημα της χρησιμοποίησης του δείκτη αυτού είναι ότι η LDH ανιχνεύεται σε ένα μικρό (5-11%) μόνο ποσοστό ασθενών με ΠΜ και παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις σε διαφορετικούς πληθυσμούς [196, 198, 201].

### **Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες**

Κατά καιρούς έχουν προταθεί πλήθος ανοσοϊστοχημικών δεικτών για τον καθορισμό της πρόγνωσης του ΠΜ με βάση την αυξημένη ή όχι έκφρασή τους. Παρόλα αυτά, κανένας δε φαίνεται να εκφράζεται σταθερά σε όλους τους ασθενείς με ΠΜ και η δυνατότητα χρησιμοποίησης τους ως ανεξάρτητων προγνωστικών δεικτών φαίνεται να υστερεί ακόμα σημαντικά έναντι των άλλων προγνωστικών μεθόδων [2, 118, 208].

### **Χρωμοσωμικές ανωμαλίες**

Αν και οι σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε ασθενείς με ΠΜ ταξινομούνται ανάμεσα στις πιο αξιόπιστες για τον καθορισμό της νόσου, το κόστος εφαρμογής τους τις καθιστά απαγορευτικές για πολλά διαγνωστικά κέντρα [94, 209]. Με τη χρήση των μεθόδων αυτών παρέχεται η δυνατότητα ανίχνευσης ενός ευρέος φάσματος ανωμαλιών, από ανευπλοειδίες έως και ογκογονίδια [96, 105, 210]. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες που ανιχνεύθηκαν στο ΠΜ (Πίνακας 4) και σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση της νόσου εντοπίζονται συχνότερα στα χρωμοσώματα 11 και 13 και συγκεκριμένα στις χρωμοσωμικές περιοχές 11q, 11q13, 13q14 και 17p13, καθώς επίσης και στην περιοχή 14q32 [90, 91, 92].

### **Ιστολογική διαφοροποίηση**

Ο καθορισμός του βαθμού ιστολογικής διαβάθμισης του ΠΜ θεωρείται από τους περισσότερους ως ένας από τους πιο σταθερούς, αναπαραγωγίμους και αξιόπιστους προγνωστικούς δείκτες της νόσου [211, 212, 213]. Το σταθερότερο ιστολογικό εύρημα που θέτει την υπόνοια της κακοήθειας είναι η διαταραχή της αναλογίας πυρήνα -κυτταροπλάσματος του πλασματοκυττάρου [211, 214, 215]. Αν και το κυτταρόπλασμα του νεοπλασματικού πλασματοκυττάρου είναι συνήθως ώριμο, ο

πυρήνας παρουσιάζει διάχυτη κατανομή της χρωματίνης ή εμφανές πυρήνιο. Η παρουσία κυτταροπλασματικών ανωμαλιών αφορά στην ποσότητα και τη χρωστική αντίδραση του κυτταροπλάσματος, που κυμαίνεται από βασεόφιλο (απώλεια της συσκευής Golgi), έως έντονα ηωσινόφιλο και με «φλογοειδή» κυτταρικά όρια [216, 217]. Το κυτταρόπλασμα μπορεί επίσης να περιέχει κρυστάλλους, κενοτόπια ή διατεταμένους σάκκους ενδοπλασματικού δικτύου, βασίφιλο υλικό (Mott cells) ή ακόμα να περικλείει ποικίλου μεγέθους σφαιρικά ηωσινόφιλα σωματίδια που αντιστοιχούν σε αθροίσεις παθολογικής πρωτεΐνης (Russell bodies) [218]. Αντίστοιχα έγκλειστα μπορεί να παρατηρηθούν και στον πυρήνα των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων (Dutcher bodies) [202].

Ανάλογα με το βαθμό αποδιαφοροποίησης των πλασματοκυττάρων μπορεί να παρατηρηθούν :

1. Εκσεσημασμένη κυτταρική πολυμορφία.
2. Αυξημένο κυτταρικό μέγεθος, έως και γιγάντιες κυτταρικές μορφές.
3. Ιδιαίτερη αύξηση της αναλογίας πυρήνα - κυτταροπλάσματος, μέχρι και πλασμαβλαστικές μορφές.
4. Πυρηνική λοβίωση.
5. Πολυπύρηνες κυτταρικές μορφές, μερικές φορές μέχρι και 40 πυρήνες σε ένα μόνο κύτταρο.
6. Αυξημένος μιτωτικός δείκτης.
7. Κανιβαλισμός (φαγοκυττάρωση άλλων κυττάρων) από τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα.

Οι πρώτες προσπάθειες συστηματοποίησης των παραπάνω μορφολογικών χαρακτηριστικών σε βαθμούς ιστολογικής διαφοροποίησης, έγιναν από τους Bayrd ED (1948) [211] και Azar HA (1973) [219]. Με βάση το πρότυπο διαβάθμισης του ΠΜ σε τρεις βαθμούς ιστολογικής διαφοροποίησης από τους παραπάνω ερευνητές, οι Bartl και Frisch [220] διατύπωσαν το 1995 το εξής σύστημα ιστολογικής ταξινόμησης της νόσου:

#### 1. Καλά διαφοροποιημένο ή χαμηλού βαθμού κακοηθείας ΠΜ

Σχετικά ώριμα πλασματοκύτταρα με μικρή μόνο κυτταρική ατυπία. Ο πυρήνας είναι τοποθετημένος σε έκκεντρη θέση και περικλείει πυκνή χρωματίνη, ενώ το κυτταρόπλασμα είναι βασεόφιλο με σαφή περιπυρηνική άλω.

## 2. Μέτρια διαφοροποιημένο ή ενδιάμεσου βαθμού κακοηθείας ΠΜ

Τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερου βαθμού κυτταρική ατυπία και δυσπλασία, αλλά απουσιάζουν οι βλαστικές κυτταρικές μορφές. Ο πυρήνας παρουσιάζει λιγότερο έκκεντρη εντόπιση, η χρωματίνη είναι λιγότερο πυκνή με περιοχές όμως συμπύκνωσης, καθώς και ένα ή περισσότερα πυρήνια. Το κυτταρόπλασμα είναι ελλειπτικό.

## 3. Χαμηλά διαφοροποιημένο ή υψηλού βαθμού κακοηθείας ΠΜ

Τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα παρουσιάζουν σημαντικό βαθμό πυρηνική πολυμορφία και ατυπία, καθώς και πλασμαβλαστική μορφολογία. Οι τελευταίες παρουσιάζουν μεγάλους, κεντρικά τοποθετημένους πυρήνες με μεγάλα πυρήνια και λιγοστό, ελαφρά βασεόφιλο κυτταρόπλασμα.

Οι ίδιοι συγγραφείς (Bartl και Frisch) ακολούθως συσχέτισαν τους τρεις παραπάνω βαθμούς διαφοροποίησης με την πρόγνωση της νόσου, προσδιορίζοντας τους μέσους όρους επιβίωσης των ασθενών σε 60, 32 και 10 μήνες αντίστοιχα [221, 222]. Ο Sukranichnant και συνεργάτες (1994) [223] διατύπωσαν επιπλέον την άποψη ότι ασθενείς με ΠΜ στους οποίους τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα έχουν αυξημένο μιτωτικό δείκτη (πάνω από μία πυρηνοκινησία ανά οπτικό πεδίο μεγάλης μεγέθυνσης) παρουσιάζουν μικρότερο ποσοστό επιβίωσης.

Η παρουσία κυττάρων με πλασμαβλαστική μορφολογία στη νέοπλασματική διήθηση, φαίνεται επίσης να επιβαρύνει την πρόγνωση, αναλογικά με την αύξηση του ποσοστού των πλασμαβλαστών (Πίνακας 9). Με βάση λοιπόν την παρουσία πλασμαβλαστών στη νεοπλασματική διήθηση ο Greipp και συνεργάτες [224] διαπίστωσαν συσχέτιση με την πρόγνωση στο 2% των περιπτώσεων, ενώ οι ομάδες των Paule (1988) [225] και Bartl (1998) [220] τουλάχιστον στο 50% των ασθενών με ΠΜ. Αντίθετα, ο Sukranichnant και συνεργάτες (1994) [223] δεν διαπίστωσαν ουσιαστική συσχέτιση της πλασμαβλαστικής μορφολογίας με την επιβίωση των ασθενών, αλλά επισήμαναν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ αυξημένου μιτωτικού δείκτη (τουλάχιστον μία πυρηνοκινησία ανά οπτικό πεδίο μεγάλης μεγέθυνσης) και πτωχής πρόγνωσης.



**Πίνακας 9.** Μορφολογικά κριτήρια πλασμαβλάστη [224, 226, 227].

1. Μεγάλο πυρηνικό μέγεθος (>10μm) ή μεγάλο πυρήνιο (>2μm)
2. Λεπτοκοκκιώδης κατανομή της χρωματίνης με καθόλου ή ελάχιστες συμπηκνώσεις της.
3. Μικρή ποσότητα κυτταροπλάσματος (επιφάνεια μικρότερη από το μισό της αντίστοιχης επιφάνειας του πυρήνα).
4. Ελατωμένη ή απύσα περιπυρηνική διαύγαση του κυτταροπλάσματος.

Ο Goasguen και συνεργάτες (1999) [208] από την άλλη πλευρά υιοθέτησαν ως πιο αξιόπιστη την μορφολογική αξιολόγηση του ΠΜ με βάση το ποσοστό των ωριμότερων μόνο κυτταρικών μορφών με κριτήρια την αναλογία πυρήνα - κυτταροπλάσματος και τη μορφολογία της χρωματίνης και του πυρηνίου. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, ασθενείς με παρουσία καλά διαφοροποιημένων νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων σε ποσοστό μικρότερο των 2/3 του συνολικού νεοπλασματικού διηθήματος, παρουσίαζαν καλύτερη επιβίωση από ασθενείς με παρουσία καλά διαφοροποιημένων νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων σε ποσοστό μεγαλύτερο των 2/3 του συνολικού νεοπλασματικού κυτταρικού πληθυσμού. Μία άλλη ερευνητική ομάδα του Wutke (1981) [228], αξιολόγησαν την παρουσία ώριμων, ώριμων και ανώριμων (μικτών) και πλασμαβλαστικών κυτταρικών μορφών στη διήθηση, και διαπίστωσαν ότι η επιβίωση των ασθενών ήταν 39.7, 16.1 και 9.8 μήνες αντίστοιχα. Επιπλέον υποστήριξαν ότι με την ίδια μορφολογική μέθοδο είναι δυνατό να προσδιοριστεί το ποσοστό των περιπτώσεων με εξωμυελική επέκταση της νόσου. Καθόρισαν δε το ποσοστό αυτό στο 20% αναφορικά με την επικράτηση των ωριμότερων κυτταρικών μορφών, στο 67% αναφορικά με τη μικτή μορφολογία και στο 69-100% με την επικράτηση των πλασμαβλαστών στη διήθηση.

Ο Sailer και συνεργάτες (1995) [229] χρησιμοποίησαν το συνδυασμό πλειόμορφης και πλασμαβλαστικής μορφολογίας ως βάση της ιστολογικής σταδιοποίησης τους και χαρακτήρισαν ως πιο προγνωστικά αξιόπιστο τον συνδυασμό του βαθμού διαφοροποίησης, του ποσοστού καθώς και της κατανομής της διήθησης του μυελού των οστών. Τέλος, ο Fritz και συνεργάτες (1984) [30], θεωρούν το συνδυασμό της διαφοροποίησης και του αυξητικού δείκτη του ΠΜ ως πιο προγνωστικά σημαντικά.

## Ποσοστό διήθησης

Το ποσοστό διήθησης του μυελού των οστών από το ΠΜ, ανάλογα με την πρώτη διάγνωση της νόσου και τις υποτροπές ή τις υφέσεις της, μπορεί να ποικίλλει από 2-5%, μέχρι και 95-100% του συνόλου των κυτταρικών στοιχείων του μυελού [179, 230, 231]. Το ποσοστό διήθησης του μυελού των οστών από ΠΜ συσχετίζεται άμεσα με την πρόγνωση της νόσου. Ο Rich και συνεργάτες (1997) [232] υπολογίζουν την επιβίωση των ασθενών αυτών στους 27 μήνες όταν το ποσοστό διήθησης κυμαίνεται μεταξύ 20-50% του κυτταρικού μυελού, και σε 16 μήνες όταν το ποσοστό αυτό υπερβαίνει το 50%. Ο Cherng και συνεργάτες (1991) [196] συσχετίζουν την πρόγνωση με το ποσοστό διήθησης του μυελού των οστών μόνο στις περιπτώσεις που η τελευταία είναι της τάξης του 70% και άνω.

Σε κάθε περίπτωση πάντως, καθολική συμφωνία φαίνεται να υπάρχει στον ορισμό της πλήρους ύφεσης της νόσου με βάση το ποσοστό διήθησής της στο μυελό των οστών. Το ποσοστό αυτό καθορίζεται στο 5% του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού του μυελού και αντικατοπτρίζει τις περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ οι οποίοι ανταποκρίνονται στη θεραπευτική αγωγή [123, 233, 237, 235].

## Πρότυπα διήθησης

Τρία βασικά πρότυπα νεοπλασματικής διήθησης του μυελού των οστών παρατηρούνται στο πολλαπλό μύελωμα. Αυτά είναι το διάμεσο, το οζώδες και το διάχυτο. Συχνά δε, παρατηρείται συνύπαρξη και αλληλοεπικάλυψη των προτύπων αυτών [117, 236, 237]:

1. Διάμεση διήθηση: Τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα κατανέμονται διάσπαρτα ανάμεσα στα κύτταρα του αιμοποιητικού και λιπώδους μυελού.
2. Οζώδης διήθηση: Τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα κατανέμονται σε οζώδεις ή συμπαγείς ταινιοειδείς/δοκιδώδεις αθροίσεις.
3. Διάχυτη διήθηση: Κατάληψη των μυελοχώρων από νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα χωρίς ενδιάμεση παρεμβολή κυττάρων του αιμοποιητικού ή του λιπώδους μυελού.

Ο Bartl και συνεργάτες (1982) [221] ήταν οι πρώτοι που διατύπωσαν την άποψη ότι η κατανομή της διήθησης του μυελού των οστών στο ΠΜ σχετίζεται με την πρόγνωση της νόσου. Σύμφωνα με τους συγγραφείς αυτούς η πρόγνωση χειροτερεύει όταν κατά την πορεία της νόσου το πρότυπο διήθησης από διάμεσο γίνεται οζώδες

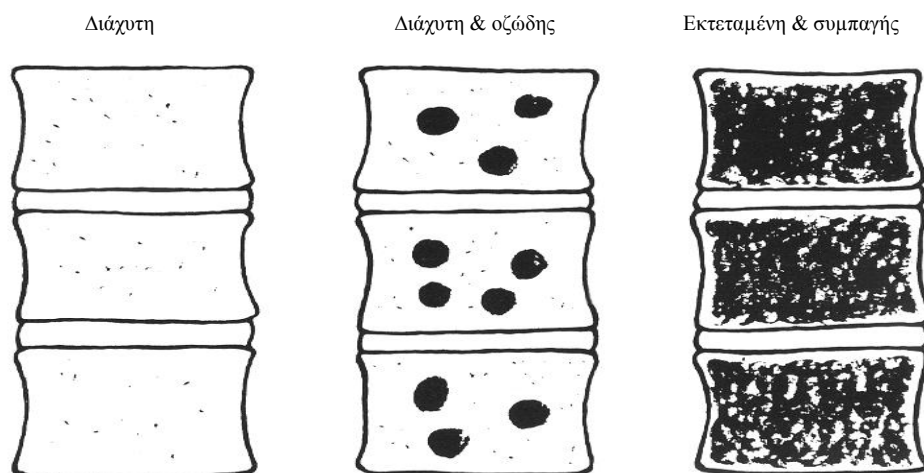
και ακολούθως διάχυτο. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε 15 χρόνια μετά από τον Pich και συνεργάτες (1997) [232]. Οι ίδιοι συγγραφείς υποστήριξαν ότι το πρότυπο διήθησης του μυελού των οστών μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης της νόσου. Αντίθετα, ο Sukranichnant και συνεργάτες (1994) [223] υποστήριξαν ότι η επιβίωση δεν παρουσιάζει ουσιαστικές διακυμάνσεις μεταξύ οζώδους και συμπαγούς ή μικτών προτύπων διήθησης, αλλά μειώνεται στους 15.2 μήνες όταν η διήθηση είναι εκτεταμένη και με διάχυτο πρότυπο ανάπτυξης. Τέλος ο Sailer και συνεργάτες (1995) [238] διαπίστωσαν ότι το πρότυπο κατανομής της διήθησης στερείται προγνωστικής αξίας και υποστήριξαν ότι ο συνδυασμός και άλλων μορφολογικών παραμέτρων (διαφοροποίηση, μιτωτικός δείκτης) ίσως να καθορίζει την πρόγνωση του πολλαπλού μυελώματος.

### **Οστικές αλλοιώσεις**

Οστικές αλλοιώσεις σχετιζόμενες με ΠΜ εκδηλώνονται στο 70-80% των περιπτώσεων. Αυτές αφορούν σε διάχυτη οστεοπόρωση με μείωση του πάχους των οστικών δοκίδων και σε οστεολύσεις με απορρόφηση οστίτη ιστού από τις οστεοκλάστες συνοδευόμενες συχνά από υπερασβεστιαμία [143, 145, 150]. Οι αλλοιώσεις αυτές μπορεί να είναι διάχυτες, διάχυτες και οζώδεις, ή εκτεταμένες και συμπαγείς, ανάλογα με το στάδιο της νόσου (Σχήμα 5). Συχνότερα αυτές έχουν μικτό (διάχυτο και οζώδες) πρότυπο κατανομής [114, 144, 153].

Το πρόβλημα της οστεοπόρωσης σε ασθενείς άνω των 50 ετών είναι παγκοσμίως οξυμένο, ιδιαίτερα στο γυναικείο πληθυσμό. Η οστεοπόρωση του ΠΜ που παρατηρείται σε αντίστοιχο ηλικιακό φάσμα ασθενών, θα πρέπει να διαφοροδιαγιγνώσκεται από την οστεοπόρωση της μεγάλης ηλικίας [115, 142, 239].

Διαταραχές της οδού RANKL/OPG φαίνεται να εξηγούν επαρκώς την παρουσία οστεολυτικών αλλοιώσεων σε ασθενείς με ΠΜ [110, 111, 148, 240]. Το μοντέλο της λειτουργίας αυτής της οδού επιβεβαιώνεται και από τη δράση φαρμάκων όπως τα διφωσφονικά, που αναστέλλουν την οστική αποδόμηση. Έτσι, σε ασθενείς με ΠΜ υπό αγωγή με τα παραπάνω φάρμακα παρατηρείται μείωση της έκφρασης του RANKL, καθώς και ανάσχεση ή ακόμα και εξαφάνιση των οστικών αλλοιώσεων σε ποσοστό 61.59% και 11.26% αντίστοιχα [147, 239, 241]. Μείωση της έκφρασης του RANKL με συνοδό εντυπωσιακή μείωση των οστεολύσεων, παρουσιάζουν και ασθενείς υπό αγωγή με πρωτεϊνικά σκευάσματα οστεοπρωτεγερίνης [97, 242, 243].



**Σχήμα 5.** Πρότυπο κατανομής των οστικών αλλοιώσεων στο ΠΜ

Ο Burkhardt και συνεργάτες (1987) [142] επισημαίνουν την ύπαρξη συχέτισης μεταξύ διάχυτης οστεοπόρωσης και διάχυτης νεοπλασματικής διήθησης του μυελού των οστών, καθώς και συχέτισης μεταξύ οστεοκλαστικής δραστηριότητας και ποσοστού διήθησης του μυελού. Το οζώδες πρότυπο διήθησης του μυελού των οστών είναι αυτό που συνοδεύει συχνότερα τις οστεολύσεις.

Σε ότι αφορά στη συσχέτιση του βαθμού των οστικών αλλοιώσεων με την επιβίωση των ασθενών με ΠΜ οι απόψεις και πάλι δίστανται. Η αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα σχετίζεται κατά τον Bartl και συνεργάτες (1987) [244] με χειρότερη πρόγνωση. Ανάλογα είναι τα ευρήματα του Hofbauer και συνεργατών (1999) [241], οι οποίοι επιπλέον συνδέουν την πρόγνωση της νόσου με τις διακυμάνσεις της υπερασβεστιαϊμίας των ασθενών. Ο Scutellari και συνεργάτες (1992) [143] συνδυάζοντας την παρουσία των οστικών αλλοιώσεων με το κλινικό στάδιο των ασθενών, επισημαίνουν σημαντική προγνωστική συσχέτιση και εντοπίζουν τις αλλοιώσεις αυτές κατά σειρά συχνότητας στους σπονδύλους, το κρανίο, τη λεκάνη και τις πλευρές. Ο Umeda και συνεργάτες (2002) [144] αντίθετα δεν βρίσκουν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών αυτών σε σχέση με την οστεοπόρωση ή τις οστεολυτικές αλλοιώσεις, αναφέρουν δε μεγαλύτερη συχνότητα οστικών αλλοιώσεων σε ασθενείς ηλικίας 65 ετών και άνω.

### **Αγγειογένεση**

Ως αγγειογένεση ορίζεται το φαινόμενο της δημιουργίας νέων αγγείων από το υφιστάμενο αγγειακό δίκτυο. Η αγγειογένεση αποτελεί φυσιολογικό μηχανισμό ο οποίος ενεργοποιείται κατά την εμβρυϊκή ζωή, στην επούλωση τραυμάτων, κατά τη

διάρκεια του καταμήνιου κύκλου, καθώς και σε καταστάσεις υποξίας (έμφραγμα μυοκαρδίου, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια κ.α.) [245, 246, 247, 248]. Σε φυσιολογικές συνθήκες, όταν το αγγειογενετικό ερέθισμα υφεθεί ή αρθεί, κινητοποιούνται αντιαγγειογενετικοί μηχανισμοί για τον τερματισμό της αγγειογενετικής διαδικασίας [132, 249, 250] και απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων [251, 252, 253].

Η έρευνα κατά τη διάρκεια των 20 τελευταίων ετών έχει καταδείξει ότι η πλειονότητα των κακοήθων όγκων χρησιμοποιεί τους αγγειογενετικούς μηχανισμούς του οργανισμού για την ανάπτυξη και διασπορά τους, αναστέλλοντας παράλληλα τις φυσιολογικές οδούς ελέγχου της αγγειογένεσης και της απόπτωσης [48, 254, 255, 256]. Η ενεργοποίηση των αγγειογενετικών μηχανισμών από κακοήθη νεοπλάσματα έχει αποδειχθεί από πληθώρα ερευνητών σε συμπαγείς όγκους, όπως αυτούς του μαστού, του προστάτη αδένου, του γαστρεντερικού σωλήνα, του ουροποιητικού συστήματος κ.α [257, 258, 259, 260, 261]. Η έρευνα που αφορά στο ρόλο της αγγειογένεσης σε κακοήθη αιματολογικά νοσήματα εντούτοις, είναι μέχρι στιγμής περιορισμένη και συχνά με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Η ερευνητική διαδικασία στα κακοήθη αιματολογικά νοσήματα επιπλέον, πέραν από τα προβλήματα μεθοδολογίας στην ποσοτική εκτίμηση της αγγειογένεσης, επιπλέκεται ακόμη περισσότερο και από το γεγονός της πολυπλοκότητας της αγγειογενετικής διαδικασίας στα νοσήματα αυτά, καθώς και της πληθώρας των παραγόντων που ρυθμίζουν την έκβασή της [262, 263, 264, 265].

Από έρευνες σε *in vitro* αλλά και *in vivo* συνθήκες, έχει εντοπισθεί μεγάλος αριθμός κυτοκινών, γονιδίων και μηχανισμών που ρυθμίζουν την αγγειογένεση σε φυσιολογικές αλλά και παθολογικές καταστάσεις (Πίνακας 10). Ανάμεσα στους μέχρι σήμερα γνωστούς παράγοντες που επάγουν την αγγειογένεση, ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας ανάπτυξης (Vascular endothelial growth factor, VEGF) έχει την ισχυρότερη και ειδικότερη αγγειογενετική και μιτογόνο επίδραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο VEGF ενεργοποιεί επίσης τους μηχανισμούς διαφοροποίησης και μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και την έκφραση μορίων προσκόλλησης από αυτά, τόσο με αυτοκρινείς όσο και με παρακρινείς μηχανισμούς [9, 266, 267]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την άλλη πλευρά, ανήκουν στα πιο βιολογικά ενεργά κύτταρα του στρώματος των ιστών και είναι δυνατόν να αντιπροσωπεύουν μέχρι και ποσοστό 25% της μάζας των κακοήθων όγκων. Έχει μάλιστα υπολογισθεί ότι ένα και μόνο ενδοθηλιακό κύτταρο μπορεί να τροφοδοτήσει μέχρι και 50 κακοήθη κύτταρα [194, 268, 269].

Τα σημαντικότερα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος των ιστών που εμπλέκονται στη διαδικασία της αγγειογένεσης, τόσο φυσιολογικά, όσο και επαγόμενα από κυτοκίνες νεοπλασματικών κυττάρων, είναι τα μαστοκύτταρα, τα μακροφάγα και οι ινοβλάστες. Τα κύτταρα αυτά παράγουν και εκκρίνουν τον VEGF αλλά και άλλες αγγειογενετικές κυτοκίνες, όπως τον αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF), τον βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (bFGF) και τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF-BB). Οι κυτοκίνες αυτές συνδεόμενες στους αντίστοιχους υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων προϋπαρχόντων αγγείων, πυροδοτούν τους αγγειογενετικούς μηχανισμούς [270, 271, 272, 273].

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της διευκρίνισης του ρόλου της αγγειογένεσης στους συμπαγείς κακοήθεις όγκους οδήγησαν, κατά την τελευταία κυρίως δεκαετία, στην έρευνα του αγγειογενετικού φαινομένου σε κακοήθη αιματολογικά νοσήματα, συμπεριλαμβανομένου και του ΠΜ. Ο Barlogie και συνεργάτες (1989) [233] παρατήρησαν ότι τα εντόνως αυξανόμενα και καλά διαφοροποιημένα πλασματοκύτταρα προάγουν την αγγειογένεση τόσο με παρακρινείς όσο και με αυτοκρινείς μηχανισμούς μέσω παραγωγής και έκκρισης της IL-6. Ο VEGF παράλληλα με την αγγειογενετική δράση που ασκεί, μέσω της διέγερσης των ιντεκρινών ανβ3 και ανβ5, διεγείρει και τη μετανάστευση των πλασματοκυττάρων [70, 169]. Αντίστοιχα ο Cozzolino και συνεργάτες (1989) [1] παρατήρησαν έκφραση της IL-1β από τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα, ενώ ο Dominici και συνεργάτες (2001) [274] παρατήρησαν αυξημένη δραστηριότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων σε ασθενείς με ΠΜ. Τόσο σε in vitro όσο και σε in vivo μελέτες διαπιστώθηκε επίσης ότι τα κύτταρα του ΠΜ παράγουν και εκκρίνουν τον VEGF, ενώ παράλληλα με την παραγωγή της IL-6 επάγουν και την παραγωγή της από στρωματικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντός τους. Η IL-6 επάγει με τη σειρά της την έκφραση του VEGF στα κύτταρα του μυελώματος και του στρώματος του μυελού των οστών, ενώ παράλληλα **αναστέλλει** την απόπτωση των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων [245, 275, 276, 277, 278]. Η αυξημένη αγγειογένεση που πολλοί ερευνητές επισημαίνουν σε ασθενείς με ΠΜ δε σχετίζεται με την αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα της νόσου, αλλά αντίθετα τόσο η οστεοκλαστική δραστηριότητα όσο και η αγγειογενετική διαδικασία επάγονται από την IL-6 [142, 279].

**Πίνακας 10.** Ρύθμιση της Αγγειογένεσης [73, 278, 280, 281, 282, 283, 284, 285]

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ANTI-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
Vascular endothelial growth factor (VEGF-B, C, D)	Angiostatin
Placental growth factor (PlGF)	Endostatin
Basic fibroblast growth factor (bFGF)	Angiopoietin-2
Acidic fibroblast growth factor (aFGF)	Interferon $\alpha$ , $\gamma$
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Human interferon-inducible protein 10 (IP-10)
Platelet-derived epidermal growth factor (PDEGF)	Thrombospondin
Hepatocyte growth factor (HGF)	Antithrombin-III fragment
Epidermal growth factor (EGF)	Fibronectin
Insulin-like growth factor (IGF-1)	Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2)
Tumor necrosis factor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	Platelet factor 4 fragment
Transforming growth factor (TGF- $\alpha$ , $\beta$ )	Epidermal growth factor fragment
Hypoxia inducible factors (HIF-1, 2, 3)	Tissue inhibitor of metalloproteinases
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	Retinoic acid
Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)	Thalidomide
Angiogenin	Interleukin 1 (IL-1)
Angiopoietin-1	Interleukin 12 (IL-12)
Interleukin 2 (IL-2)	Anti-VEGF
Interleukin 6 (IL-6)	Anti-Vitaxin
Interleukin 8 (IL-8)	Anti- $\alpha$ V $\beta$ 3
Vitaxin $\alpha$ V $\beta$ 3	Leukemia inhibitory factor
Leptin	Proliferin Prolactin N terminal fragment
Tie-1, 2	Troponin-1
Osteopontin	Vasostatin

Άλλοι ερευνητές διατυπώνουν την άποψη ότι η δράση ορισμένων αγγειογενετικών παραγόντων όπως του PDGF, του TNF- $\alpha$ , του παράγοντα αύξησης των κερατινοκυττάρων (KGF) και των MMP-2 στα κύτταρα του μυελώματος, επάγουν την έκφραση του VEGF, ενώ η IL-3 και IL-10 εμποδίζουν την παραγωγή και έκκρισή του από αυτά [98, 286, 287]. Τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα παρουσιάζουν επιπλέον υπερέκφραση και άλλων αγγειογενετικών κυτοκινών, όπως του HGF του b-FGF και των MMP-2. Η έκφραση των VEGF, HGF, και b-FGF στις περιπτώσεις αυτές είναι εντονότερη στο μυελό των οστών από ότι στο περιφερικό αίμα και αυξάνει ακόμη περισσότερο σε προχωρημένα στάδια της νόσου [82, 288, 289]. Η αυξημένη έκφραση των MMP-2 από τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα σε συνδυασμό με την αυξημένη αγγειογενετική δραστηριότητα τους, έχει επίσης συσχετισθεί με την αυξημένη εξωμυελική επέκταση της νόσου κατά την ενεργό φάση της [290]. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής έχει ακόμη παρατηρηθεί και αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων του ΠΜ και των αγγειακών ενδοθηλίων, γεγονός που διευκολύνει την εξαγγείωση και εξωμυελική επέκταση του νεοπλάσματος [291].

Ορισμένοι συγγραφείς από την άλλη πλευρά, υποστηρίζουν ότι σε ασθενείς με ΠΜ που αντιμετωπίστηκαν με αντιαγγειογενετική αγωγή, διαπιστώθηκε σημαντική μείωση των αγγειογενετικών κυτοκινών VEGF και b-FGF [218, 292, 293], ενώ άλλοι υποστηρίζουν ότι ο αυξημένος αγγειογενετικός δείκτης (micro-vessel density, MVD) που παρουσιάζουν οι ασθενείς αυτοί, παραμένει σημαντικά υψηλός ακόμα και μετά από πλήρη ύφεση της νόσου [289, 294]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι ο δείκτης MVD είναι χαμηλός ή και άνευ σημασίας σε ασθενείς με γαμμαπάθεια ακαθορίστου σημασίας (MGUS) και μη ενεργό ΠΜ, ενώ αυξάνει εντυπωσιακά σε ασθενείς με ενεργό ΠΜ. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην διατύπωση της άποψης ότι η MGUS και το μη ενεργό ΠΜ αντιστοιχούν στην προαγγειακή φάση της νόσου, ενώ το ενεργό ΠΜ στην αγγειακή φάση της [44, 279, 290]. Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι και οι παρατηρήσεις της άμεσης συσχέτισης του δείκτη MVD με τη φάση της νόσου, την εξέλιξη και την πρόγνωση της [295, 296, 297]. Άλλοι ερευνητές αντίθετα υποστηρίζουν, ότι η αύξηση του δείκτη MVD συμβαίνει ταυτόχρονα με την αύξηση της διήθησης του μυελού των οστών από τα πλασματοκύτταρα, τόσο σε ασθενείς με MGUS και μη ενεργό ΠΜ, όσο και σε ασθενείς με ενεργό ΠΜ και συμπίπτει χρονικά με τη φάση S του κυτταρικού κύκλου [128, 298]. Έχει επίσης υποστηριχθεί η άποψη ότι η αύξηση της αγγειογένεσης συμπίπτει με την εκδήλωση των συμπτωμάτων της γαμμαπάθειας και ότι ο δείκτης MVD αυξάνει ανεξάρτητα από την πυκνότητα και το ποσοστό της νεοπλασματικής διήθησης στο μυελό των οστών [71, 298].

Ασυμφωνία υπάρχει επίσης όσον αφορά και στα αποτελέσματα των αντι-αγγειογενετικών θεραπευτικών σχημάτων, καθώς και στην αξία του προσδιορισμού του δείκτη MVD. Έτσι, οι Singhal (1999) [47] και Ahn (2001) [245] υποστηρίζουν ότι ο δείκτης MVD σχετίζεται μόνο με την επιβίωση του όγκου και όχι με την επιβίωση των ασθενών και ο Kumar και συνεργάτες (2002, 2004) [247, 299] δεν βρίσκουν σημαντική συσχέτιση στα ποσοστά επιβίωσης ασθενών με ΠΜ στους οποίους ο δείκτης MVD μειώθηκε μετά από αντιαγγειογενετική θεραπεία (Θαλιδομίδη). Σε συμφωνία με τους παραπάνω ο Schreiber και συνεργάτες (2000) [300] επισημαίνουν ότι ο δείκτης MVD δεν σχετίζεται με το στάδιο της νόσου, τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή την επιβίωση αλλά με χρωμοσωμικές ανωμαλίες στην περιοχή 11q, καθώς και απαλείψεις του τύπου 23q14 και 17p13. Ο Vacca και συνεργάτες (1994-2001) αντίθετα, διαπίστωσαν ότι ο δείκτης MVD σχετίζεται τόσο με το στάδιο της νόσου, όσο και με την αυξητική δραστηριότητα των κυττάρων της, την εξέλιξη και την πρόγνωση της [71, 128, 290, 291, 298].



Με βάση τα παραπάνω, το βέβαιο από τη μέχρι σήμερα ερευνητική εμπειρία είναι ότι η σημασία του προσδιορισμού του VEGF στον ορό των ασθενών αυτών, παραμένει αδιευκρίνιστη [259, 274, 301].

### **Παραπρωτεΐναιμία**

Οι ανοσοσφαιρίνες αντιστοιχούν σε γλυκοπρωτεΐνες μεγάλης αντιγονικότητας και φυσιολογικά κάθε μόριό τους αποτελείται από δύο ίδιους τύπους βαριών και δύο ίδιους τύπους ελαφρών αλύσεων. Σε διαφορετικά μόρια της ίδιας ανοσοσφαιρίνης μπορεί όμως να υπάρχουν διαφορετικές ελαφρές αλυστοι (δύο κ ή δύο λ) [21, 22, 25]. Η δομή των κλωνικών ανοσοσφαιρινών του ΠΜ είναι ίδια με αυτήν των αντίστοιχων φυσιολογικών όσον αφορά στις βαριές αλυσους, αλλά οι ελαφρές αλυστοι είναι μόνο τύπου κ ή μόνο τύπου λ σε όλα τα μόρια των παραπρωτεΐνων [37, 302, 303].

Η παραγωγή και έκκριση ανοσοσφαιρινών από τα κύτταρα του ΠΜ αποτελεί δείκτη του βαθμού διαφοροποίησης των νεοπλασματικών κυττάρων. Η απώλεια της εκκριτικής δραστηριότητας εν τούτοις, δεν φαίνεται να σχετίζεται με απόδιαφοροποίηση των νεοπλασματικών κυττάρων, αλλά με αναστολή της λειτουργίας αυτής κατά τη φάση του έντονου κυτταρικού πολλαπλασιασμού του νεοπλάσματος. Έτσι είναι δυνατόν καλά διαφοροποιημένα εκκριτικά μυελώματα να μεταπέσουν σε εξ' ίσου καλά διαφοροποιημένα μη εκκριτικά και αντίστροφα [21, 302, 304].

Η αναλογία των ελαφρών αλύσεων (κ/λ) κυμαίνεται σε καταστάσεις αντιδραστικής πλασματοκυττάρωσης μεταξύ 0.4 έως 3.5, σε περιπτώσεις μονοκλωνικής γαμμαπάθειας μεταξύ 0.2 έως 0.3 και στο ΠΜ μεταξύ  $\leq 0.1$  έως  $\geq 11.2$ . Στο ΠΜ η αναλογία αυτή σε συνδυασμό με τη μονοκλωνική βαριά αλυσσο είναι κ/λ: 3/1 για την IgG, 4/4 για την IgM και 0/2 στις περιπτώσεις απουσίας βαρείων αλύσεων [17, 37, 305]. Σε ότι αφορά στις βαρείες αλυσους, η φυσιολογική τους αναλογία είναι IgG: 51%, IgA: 37%, IgD: 1% και IgE: <1% [17, 138, 306].

Στο ΠΜ η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών παρουσιάζει παραπρωτεΐναιμία τύπου IgG και IgA βαριών αλύσεων. Στο 60% των περιπτώσεων η εκκρινόμενη ανοσοσφαιρίνη είναι IgG, στο 20% είναι IgA, λιγότερο συχνά (ποσοστό < 1%) IgD ενώ ακόμα σπανιότερα IgM και IgE [37, 303, 305]. Η σπανιότητα των IgM μονοκλωνικών μυελωμάτων ερμηνεύεται εν πολλοίς από την παθολογική αναδιάταξη DNA στο γονίδιο 14q32 και τη συνεπαγόμενη τροπή παραγωγή κλωνικής ανοσοσφαιρίνης IgG ή IgA από την IgM [23, 86, 87]. Σε ποσοστό λιγότερο του 1% των ασθενών με ΠΜ παρατηρείται έκκριση μόνο βαριών αλύσεων (νόσος βαριών

αλύσεων) [16, 122], ενώ σε ποσοστό 15-20% παρατηρείται έκκριση μόνο ελαφρών αλύσεων (Bence Jones) [25, 161]. Μικρός αριθμός ασθενών (ποσοστό 1-4%) δεν παρουσιάζει έκκριση παραπρωτεΐνης στον ορό ή τα ούρα (μη εκκριτικό ΠΜ) [37, 307], ενώ σε ακόμα πιο μικρό ποσοστό (0.3-0.5% όλων των μυελωμάτων) η νόσος παρουσιάζει έκκριση περισσότερων της μίας βαριών αλύσεων (πολυκλωνικό ΠΜ) [17, 21].

Οι βαριές ανοσοσφαιρίνες IgA, D, E, G και M, ανιχνεύονται λόγω του υψηλού μοριακού τους βάρους στον ορό των ασθενών με ΠΜ, ενώ η πρωτεΐνη Bence-Jones ανιχνεύεται μόνο στα ούρα (εκτός των περιπτώσεων συνύπαρξης νεφρικής ανεπάρκειας). Η ανίχνευση αυτή γίνεται στον ορό με ηλεκτροφόρηση, κατά την οποία οι κλωνικές ανοσοσφαιρίνες σχηματίζουν ηλεκτροφορητική αιχμή στην περιοχή των  $\gamma$  σφαιρινών. Με ηλεκτροφόρηση ταυτοποιείται και το κλάσμα των ελαφρών αλύσεων στα ούρα των ασθενών, κατόπιν συμπυκνώσεώς τους [15, 24, 122]. Η πιθανότητα διάγνωσης ΠΜ αυξάνει όταν η παραπρωτεΐναιμία υπερβαίνει τα 30 g/l, ή όταν ανιχνεύεται IgA σε συγκεντρώσεις άνω των 10 g/l [303, 304, 306]. Τόσο οι ελαφρές όσο και οι βαριές άλυστοι των ανοσοσφαιρινών ταυτοποιούνται με μεγάλη ακρίβεια και σε ιστοπαθολογικές τομές από προσβεβλημένους ιστούς με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας. Με τις μεθόδους αυτές η ταυτοποίηση των κλωνικών πρωτεϊνών είναι εφικτή σε κυτταρικό επίπεδο ακόμα και σε περιπτώσεις που η ηλεκτροφόρηση δεν ανιχνεύει εκκριτική δραστηριότητα της νόσου [305, 308].

Η αυξημένη παραπρωτεΐναιμία σχετίζεται σύμφωνα με πολλούς συγγραφείς με χειρότερη πρόγνωση. Ειδικότερα ο Dammaco και συνεργάτες (1980) [16] υποστήριξαν ότι η έκκριση των ανοσοσφαιρινών IgA, D και E σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση ενώ οι Jancelewicz (1975) [307] και Abildgaard (1997) [15] υποστήριξαν επιπλέον ότι ασθενείς με παραπρωτεΐναιμία ελαφρών μόνο αλύσεων παρουσιάζουν ακόμα χειρότερη πρόγνωση. Αντίθετα, ο Blade και συνεργάτες (1998) [309] διατύπωσαν την άποψη ότι ασθενείς με παραπρωτεΐναιμία ελαφρών μόνο αλύσεων έχουν καλύτερη πρόγνωση καθώς και ότι παρατηρείται αυτή συνήθως σε νεαρούς ασθενείς. Κακή πρόγνωση στους ασθενείς με παραπρωτεΐναιμία IgE ανέφεραν επίσης ο Osterborg και συνεργάτες (1996) [303], οι οποίοι συσχέτισαν τον τύπο αυτό με αυξημένα ποσοστά εκτροπής του ΠΜ σε πλασματοκυτταρική λευχαιμία. Επίσης σύμφωνοι με τους παραπάνω είναι και ο Alexanian και συνεργάτες (1980) [178], οι οποίοι συσχέτισαν την έκκριση κλωνικής IgG με καλύτερη πρόγνωση, ενώ σε ότι αφορά στην παραπρωτεΐναιμία των ελαφρών

αλύσεων, οι Alexanian (1980) [178] και Eckert (1986) [17] υποστήριξαν ότι σε ασθενείς με έκφραση λ μονοκλωνικών αλύσεων η πρόγνωση είναι χειρότερη από αυτούς με έκφραση κ μονοκλωνικών αλύσεων. Τέλος, καλύτερη πρόγνωση φαίνεται να συσχετίζεται με μη εκκριτικά, οστεοσκληρυντικά (IgG-λ, IgA-λ) μυελώματα, καθώς και με συμπαγή πλασματοκυτώματα [219, 306, 310].

### **Ηλικία και φύλο**

Το ΠΜ αποτελεί καθ'υπεροχήν ασθένεια της μέσης και μεγάλης ηλικίας και είναι συχνότερο στους άνδρες παρά στις γυναίκες [34, 35, 36]. Η μεγάλη ηλικία θεωρείται μάλιστα ως ένας από τους σοβαρότερους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου, αφού στο ηλικιακό φάσμα από 55 ετών και άνω παρατηρείται σημαντική έκπτωση των μηχανισμών ανοσολογικής επίβλεψης του οργανισμού [45, 142, 311].

Το ποσοστό προσβολής από τη νόσο σε άτομα νεότερα των 40 ετών δεν υπερβαίνει το 2%, ενώ σε άτομα ηλικίας μικρότερης των 30 ετών η προσβολή από τη νόσο θεωρείται εξαιρετικά σπάνια [312, 313, 314]. Προσβολή ατόμων παιδικής ηλικίας από ΠΜ αναφέρεται επίσης εξαιρετικά σπάνια και τα περισσότερα από τα άτομα αυτά δε φαίνεται να πληρούν τα διαγνωστικά κριτήρια της νόσου [309, 315, 316].

Ο Blade και συνεργάτες (1996) [312] υποστηρίζουν ότι σε ασθενείς ηλικίας μικρότερης των 40 ετών, όπου και η νόσος παρουσιάζει μικρότερο επιπολασμό, η πρόγνωση είναι καλύτερη απ' ό,τι σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας. Το ποσοστό των ασθενών ηλικίας κάτω των 30 ετών ήταν σύμφωνα με την έρευνα αυτή 0.3% του συνόλου των ασθενών με ΠΜ και το ποσοστό των ασθενών ηλικίας κάτω των 40 ετών 2.2%. Η μέση επιβίωση των παραπάνω ασθενών ήταν 54 μήνες και η δεκαετής επιβίωση μετά από συμβατική θεραπεία 13%. Σύμφωνα με τους ίδιους συγγραφείς, ασθενείς με ΠΜ ηλικίας μικρότερης των 40 ετών παρουσιάζουν περισσότερο συχνά παραπρωτεϊναιμία ελαφρών μόνο αλύσεων και κατά συνέπεια συχνότερες νεφρικές επιπλοκές [309].

Σε συμφωνία με τους παραπάνω όσον αφορά στην προγνωστική σημασία του ηλικιακού αυτού φάσματος, ο Riccardi και συνεργάτες (1998) [314] προσδιορίζουν την μέση επιβίωση στους 82 μήνες, ενώ σε ασθενείς ηλικίας 66 ετών και άνω στους 31-44 μήνες. Ο Corso και συνεργάτες (1998) [315] επεκτείνουν το ηλικιακό εύρος το οποίο σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση στα 50 έτη και κάτω. Ο Kurabayashi και συνεργάτες (1999) [316] συνδυάζοντας την ηλικία με βιοχημικά ευρήματα του αίματος και το κλινικό στάδιο των ασθενών, βρίσκουν ποσοστά επιβίωσης που

κυμαίνονται από 11.1 έως 50% για ασθενείς ηλικίας 65 ετών και άνω και ποσοστά που κυμαίνονται από 33.3 έως 92.9% για ασθενείς ηλικίας κάτω των 65 ετών. Συσχετίζοντας την ηλικία με την μικροαγγειακή πυκνότητα του μυελού των οστών ασθενών με ΠΜ, ο Pruneri και συνεργάτες (2002) [297] αναφέρουν χειρότερη πρόγνωση στις μεγαλύτερες ηλικίες με αυξημένο δείκτη MVD. Από την άλλη, σε ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν με μεταμόσχευση μυελού των οστών, η ηλικία δε φαίνεται να παρουσιάζει προγνωστική σημασία [317], ενώ άλλοι συγγραφείς, αμφισβητούν την προγνωστική σημασία της ηλικίας των ασθενών με ΠΜ [214, 318, 319].

Ως προς το φύλο οι διακυμάνσεις των ποσοστών επιβίωσης φαίνεται να επιβαρύνουν περισσότερο τους άνδρες. Αυτό φαίνεται να αποτελεί απόρροια τόσο του μεγαλύτερου επιπολασμού της νόσου σε ασθενείς άρρενος φύλου, όσο και στο ότι οι τελευταίοι παρουσιάζουν μικρότερα ποσοστά επιβίωσης και στο γενικότερο πληθυσμό, ανεξαρτήτως της νόσου [38, 49, 56]. Η επαγγελματική έκθεση εξάλλου των ανδρών σε αντιγονικά ερεθίσματα που εμπλέκονται στην παθογένεια του ΠΜ είναι συχνότερη από ότι η αντίστοιχη στις γυναίκες, αφού τα πλείστα από τα επαγγέλματα αυτά (εργάτες εξόρυξης και επεξεργασίας προϊόντων πετρελαίου, μεταλλικών ελαίων, μετάλλων, ξύλου, δέρματος και ασβέστη, ηλεκτρολόγοι, επισκευαστές ηλεκτρονικών υπολογιστών, τεχνίτες μηχανών, υδραυλικοί κτλ) ασκούνται παραδοσιακά από άντρες [48, 50, 57, 105]. Στον αντίποδα των παραπάνω διαπιστώσεων, άλλοι συγγραφείς δε βρίσκουν αξιόλογη προγνωστική συσχέτιση μεταξύ της έκβασης της νόσου και του φύλου των ασθενών [42, 46, 58, 214].

### **Κλινικό στάδιο**

Ένα από τα πλέον διαδεδομένα συστήματα που χρησιμοποιούνται στην κλινική πρακτική για τη σταδιοποίηση ασθενών με ΠΜ (σύστημα Durie-Salmon) [320], χρησιμοποιεί τις παρακάτω παραμέτρους αξιολόγησης:

1. Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης αίματος
2. Συγκέντρωση ασβεστίου αίματος
3. Συγκέντρωση παραπρωτεϊνών ορού και ούρων
4. Οστικές αλλοιώσεις
5. Συγκέντρωση κρεατινίνης αίματος

Οι συνδυασμοί των τιμών των τεσσάρων πρώτων παραμέτρων διαβαθμίζουν τους ασθενείς σε τρία εξελικτικά στάδια της νόσου, ενώ με τους δείκτες A ή B που συνοδεύουν τα στάδια αυτά, καθορίζονται τα επίπεδα της κρεατινίνης στο αίμα των

ασθενών (Πίνακας 11).

Με βάση το σύστημα αυτό οι Durie και Salmon εκτίμησαν ότι ασθενείς σταδίου IA παρουσιάζουν μέση επιβίωση 5 ετών, ενώ σε ασθενείς σταδίου IIIB η μέση επιβίωση περιορίζεται στους 15 μήνες. Σε επαναξιολόγηση μεγαλύτερου αριθμού περιστατικών, οι Salmon και Cassady [180] εκτίμησαν τη μέση επιβίωση σε 61.2 μήνες για το στάδιο IA, σε 54.5 μήνες σε ασθενείς σταδίου II (A ή B), σε 30.1 μήνες για το στάδιο IIIA και σε 14.7 μήνες για το στάδιο IIIB. Ο Sukranichnant και συνεργάτες (1994) [223] σε αντίστοιχη μελέτη εκτίμησαν ότι ασθενείς σταδίου III παρουσιάζουν μέση επιβίωση 21.5 μηνών, ενώ ασθενείς σταδίου II και I επιβίωση 52.9 και 51.1 μηνών αντίστοιχα. Σε συμφωνία με τους παραπάνω σε ότι αφορά στην προγνωστική αξία του κλινικού σταδίου, η ερευνητική ομάδα του Merlini (1980) [189] εκτίμησε την επιβίωση ασθενών σταδίου I στους 50.1 μήνες, των ασθενών σταδίου II στους 50.1 έως 31.6 μήνες και των ασθενών σταδίου III στους 31.6 μήνες, ενώ ο Bartl και συνεργάτες (1987) [244] προσδιόρισαν την πενταετή επιβίωση σε ποσοστά κάτω του 20% για ασθενείς σταδίου III, 20% έως 50% για ασθενείς σταδίου II και πάνω από 50% για ασθενείς σταδίου I.

**Πίνακας 11.** Σύστημα σταδιοποίησης του Π.Μ. κατά Durie-Salmon, [2, 136, 154]

<b>Στάδιο I</b>	<u>Όλα τα παρακάτω</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>Χαμηλές συγκεντρώσεις παραπρωτεΐνης: (IgG &lt; 5 g/dl, IgA &lt; 3 g/dl, πρωτεΐνη Bence-Jones &lt; 4 g/24h)</li> <li>Οστικές αλλοιώσεις απύσες ή περιορισμένες σε συμπαγείς εστίες</li> <li>Φυσιολογικά επίπεδα αιμοσφαιρίνης, ασβεστίου ορού και μη κλωνικών ανοσοσφαιρινών</li> </ol>
<b>Στάδιο II</b>	Ενδιάμεσες τιμές μεταξύ σταδίου II και III. Η μάζα των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών κυμαίνεται μεταξύ 0.6 και 1.20 κύτταρα X10 <sup>12</sup> ανά m <sup>2</sup>
<b>Στάδιο III</b>	<u>Ένα τουλάχιστον από τα παρακάτω</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>Υψηλές συγκεντρώσεις παραπρωτεΐνης: (IgG &gt; 7 g/dl, IgA &gt; 5 g/dl, πρωτεΐνη Bence-Jones 12 g/24h)</li> <li>Λυτικές οστικές αλλοιώσεις προχωρημένου σταδίου (τουλ. 1 κάταγμα)</li> <li>Αιμοσφαιρίνη &lt; 8.5 g/dl, ασβέστιο ορού 12 mg/dl</li> </ol>
<b>Υποσταδιοποίηση</b>	<b>A:</b> Κρεατινίνη ορού < 2 mg/dl <b>B:</b> Κρεατινίνη ορού > 2 mg/dl

Συνδυάζοντας το κλινικό στάδιο των ασθενών με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ΠΜ ο Fritz και συνεργάτες (1984) [214] προσδιόρισαν ομάδες υψηλού, ενδιάμεσου και χαμηλού κινδύνου, στις οποίες βρήκαν ποσοστά επιβίωσης 72, 23 και 6 μήνες αντίστοιχα. Επιπλέον, μελέτη του Xu και συνεργατών (2002) [151] έδειξε συσχέτιση ΠΜ προχωρημένου κλινικού σταδίου με χαμηλή ιστολογική διαβάθμιση, αυξημένο μιτωτικό δείκτη καθώς και υψηλή αγγειογενετική δραστηριότητα.

Όλοι οι παραπάνω συγγραφείς θεωρούν ότι το κλινικό στάδιο των ασθενών με ΠΜ, όπως αυτό καθορίστηκε από τους Durie και Salmon, σε συνδυασμό με τα ευρήματα της OMB, καθορίζει πληρέστερα την πρόγνωση της νόσου. Από την άλλη, στην κατεύθυνση καλύτερου καθορισμού κριτηρίων για το διαχωρισμό των ασθενών έχουν δημοσιευτεί διάφορα μεταγενέστερα συστήματα κατάταξης. Από αυτά ξεχώρισε το διεθνές σύστημα σταδιοποίησης (ISS). Το σύστημα αυτό στηρίχτηκε στη μελέτη μεγάλου αριθμού ασθενών και θεωρείται εξαιρετικά αξιόπιστο, είναι δε πολύ εύχρηστο αφού βασίζεται στη χρήση δύο απλών και εύκολα διαθέσιμων εργαστηριακών παραμέτρων. Της  $\beta$ -2 μικροσφαιρίνης και της αλβουμίνης [321] (Πίνακας 12).

**Πίνακας 12.** Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης (ISS) για το Πολλαπλούν Μυέλωμα

ΣΤΑΔΙΟ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΔΙΑΜΕΣΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ
1	$\beta$ 2-μικροσφαιρίνη <3,5 mg/L & αλβουμίνη >3,5 gr/dL	62 μήνες
2	$\beta$ 2-μικροσφαιρίνη <3,5 mg/L & αλβουμίνη <3,5 gr/dL ή $\beta$ 2-μικροσφαιρίνη 3,5-5,5 mg/L	44 μήνες
3	$\beta$ 2-μικροσφαιρίνη >5,5 mg/L	29 μήνες

## 9. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Για περίπου μισό αιώνα καμία από τις συνδυασμένες χημειοθεραπείες δεν φάνηκε να υπερτερεί έναντι του κλασικού συνδυασμού μελφαλάνης και πρεδνιζολόνης (Melphalan, Prednisone - MP) [322, 323]. Την τελευταία δεκαετία όμως η εισαγωγή της αυτόλογης μεταμόσχευσης ως θεραπεία εκλογής στους ασθενείς ηλικίας <65 ετών φαίνεται ότι προσφέρει αυξημένα ποσοστά πλήρους ύφεσης (complete remission-CR), συνολικής επιβίωσης (overall survival - OS) και κυρίως διαστήματος χωρίς νόσο (event free survival - EFS), καθιστώντας το ΠΜ ένα χρόνια νόσημα [322, 324]. Το ΠΜ αποτελεί ένα παρθένο στόχο για να δοκιμαστούν νέες θεραπείες με

σκοπό τη μεγαλύτερη επιβίωση και αν είναι δυνατόν την ίαση. Τρεις είναι οι νέοι αυτοί παράγοντες που αποκαλούνται και ‘‘οι τρεις σωματοφύλακες’’: η θαλιδομίδη (Thalidomide – T), η λεναλινομίδη (Revlimid - R) και η βορτεζομίμη (Velcade – V).

## 1. ΘΑΛΙΔΟΜΙΔΗ (THALIDOMIDE)

Ένα παλιό φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε τη δεκαετία του ‘60 για την υπερεμεσία της κύησης, με τερατογόνο δράση, έμελλε να ξανάρθει στο προσκήνιο το 1999, όταν χρησιμοποιήθηκε από την ομάδα του Barlogie στο υποτροπιάζον ή στο ανθεκτικό ΠΜ [325].

Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης της είναι η αντιαγγειογενετική και ανοσοτροποποιητική της δράση (συμπεριλαμβανομένης και της αναστολής του TNF-a).

Η θαλιδομίδη σε δόσεις από 200 – 800 mgg ημερησίως, μόνη της ή καλύτερα σε συνδυασμό με δεξαμεθαζόνη, έδειξε ποσοστά ανταπόκρισης 40% και median OS 14 μήνες [326], στο υποτροπιάζον ΠΜ. Τα μεγάλα αυτά ποσοστά ανταπόκρισης στην υποτροπιάζουσα νόσο, σε συνδυασμό με την από του στόματος χορήγηση, οδήγησαν τους ερευνητές να θέλουν να δοκιμάσουν τη θαλιδομίδη ως θεραπεία πρώτης γραμμής.

Οι μελέτες των Rajkumar [327] και Weber [328] με τη θαλιδομίδη 200 mgg ημερησίως + δεξαμεθαζόνη 40 mgg τις ημέρες 1-4, 9-12 και 17-20 (THAL-DEX), για 4 κύκλους, έδειξε σαφή υπεροχή του συνδυασμού έναντι της δεξαμεθαζόνης, με ποσοστά συνολικής ανταπόκρισης 60%. Έτσι ο κλασικός συνδυασμός VAD (vincristine, adriamycin, dexamethasone) σαν θεραπεία εφόδου πριν τη μεταμόσχευση, που επικράτησε τα τελευταία 30 χρόνια, τείνει να εγκαταλειφθεί στις ΗΠΑ και την Ευρώπη. Παράλληλα η προσθήκη της θαλιδομίδης στο κλασικό σχήμα MP (MPT), ως θεραπεία εφόδου, σε ασθενείς >65 ετών ή σε ασθενείς που δεν μπορούν να υποβληθούν σε μεταμόσχευση φαίνεται ότι έχει σαφή υπεροχή και θεωρείται σήμερα το gold standard. [329].

### Παρενέργειες της θαλιδομίδης:

1. Περιφερική νευροπάθεια, που μπορεί να είναι μη αναστρέψιμη αν δεν γίνει προσαρμογή της δόσης ή διακοπή του φαρμάκου. Η καλή λήψη του ιστορικού προς αυτή την κατεύθυνση, σε κάθε επίσκεψη, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση.
2. Θρομβοεμβολικά επεισόδια κυρίως σε συνδυασμό με δεξαμεθαζόνη και ανδριαμυκίνη ιδίως κατά την πρωτοδιάγνωση. Τα ποσοστά φθάνουν και 20% σε

ορισμένες μελέτες. Συνιστάται πλέον απαραίτητα η συνοδός χορήγηση αντιπηκτικών ή ασπιρίνης.

3. Χρόνια κόπωση, δυσκοιλιότητα και σπανίως μυελοτοξικότητα.

## 2. ΛΕΝΑΛΙΝΟΜΙΔΗ (REVLIMID)

Πρόκειται για ανοσοτροποποιητικό παράγοντα νεότερης γενιάς, που κατασκευάστηκε για να αποφευχθεί η νευροτοξικότητα που προκαλεί η θαλιδομίδη, αλλά αποδείχθηκε δραστική ακόμη και στο ΠΜ που δεν ανταποκρίνεται στη θαλιδομίδη. Εν τούτοις ενοχοποιείται για θρομβώσεις και η χορήγηση ασπιρίνης ή αντιπηκτικών είναι απαραίτητη ημερησίως.[330]. Επίσης προκαλεί μυελοτοξικότητα (αναιμία, λευκοπενία, θρομβοπενία).

Δύο μεγάλες μελέτες φάσης 2, μία στην Αμερική και μία στην Ευρώπη, που χρησιμοποίησαν το Revlimid σε δόση 25mg ημερησίως, για 21 μέρες, σε κύκλο 28 ημερών και δεξαμεθαζόνη 40 mg τις ημέρες 1-4, 9-12 και 17-20 (REV-DEX), είχαν σαν αποτέλεσμα 48% PR + CR στο υποτροπιάζον ΠΜ [331]. Με βάση αυτά τα δεδομένα εισήχθη το Revlimid στη φαρέτρα των νέων φαρμάκων για το ΠΜ. Ακολούθησαν μελέτες φάσης 2 στους νεοδιαγνωσθέντες με ΠΜ με ποσοστά ανταπόκρισης PR + CR έως και 80% [332]. Η μείωση δε της δεξαμεθαζόνης σε 40 mg τις ημέρες 1, 8, 15, και 22 , μόνο, κάθε κύκλου, είχε σαν συνέπεια την καλύτερη ανοχή της θεραπείας με λιγότερες λοιμώξεις και θρομβοεμβολικά επεισόδια, χωρίς όμως να επηρεαστεί η ανταπόκριση στη θεραπεία.

## 3. ΒΟΡΤΕΖΟΜΙΜΠΗ (VELCADE)

Πρόκειται για ένα πολύ δραστικό αναστολέα του πρωτεοσώματος, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του μεταρραφικού παράγοντα NF-κΒ μέσω της διάσπασης του αναστολέα του IκΒ. Ο NF-κΒ αφού ενεργοποιηθεί μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, όπου προκαλεί την αντιγραφή γονιδίων, που εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση. Αναστολή του πρωτεοσώματος έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένη απόπτωση. Φαίνεται ότι αυτό είναι πιο έντονο στα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα πλασματοκύτταρα. Το Velcade δρα επιπλέον και στο στρώμα του μυελού των οστών. Έτσι ο νέος αυτός παράγοντας αποτελεί ένα ιδανικό φάρμακο για το ΠΜ [333]. Οι τρεις παρακάτω μελέτες ανέδειξαν το Velcade σε πρωτοποριακό παράγοντα για το ΠΜ:



A) Μελέτη SUMMIT {Velcade 1.3 mgr/m<sup>2</sup> για 8 κύκλους κάθε 21 μέρες τις ημέρες 1, 4, 8 και 11 ). Ποσοστά ανταπόκρισης PR+ CR 35% [334].

B) Μελέτη APEX (συγκρίθηκε το Velcade με τη δεξαμεθαζόνη στο υποτροπιάζον ΠΜ και έδειξε την υπεροχή του πρώτου) [335].

Γ) Μελέτη CREST (συγκρίθηκε η δραστηριότητα του Velcade σε διάφορες δόσεις αναλογικά με την τοξικότητα και βρήκε ότι και η δόση 1 mgr/m<sup>2</sup> είναι εξίσου αποτελεσματική, ιδίως στη συνδυασμένη χημειοθεραπεία

Το Velcade επιπλέον φάνηκε ότι είχε και τα παρακάτω πλεονεκτήματα:

1. Η δράση του δεν εξαρτάται από τον αριθμό ή το είδος των προηγούμενων θεραπειών
2. Η δράση του είναι ανεξάρτητη δυσμενών προγνωστικών παραγόντων όπως οι καρυοτυπικές ανωμαλίες del13, t(4;14), t(14;16), del17p, που σχετίζονται με πτωχή πρόγνωση, μεγάλη ηλικία και αυξημένη LDH.
3. Πολύ καλή δράση στην εξωμυελική νόσο (πλασματοκυττώματα - πλασματοκυτταρική λευχαιμία)
4. Αποτελεί πλέον τη θεραπεία εκλογής σε ασθενείς που πρωτοεμφανίζονται με νεφρική ανεπάρκεια λόγω της γρήγορης μέγιστης ανταπόκρισης (~2 μήνες).

Ως λογική συνέπεια των παραπάνω ήταν η χρήση του Velcade σε μελέτες φάσης 1 και 2 σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΠΜ που είναι κατάλληλοι για μεταμόσχευση. Χρησιμοποιούνται διάφοροι συνδυασμοί, σχεδόν πάντα με δεξαμεθαζόνη (VEL-DEX) με ποσοστά ανταπόκρισης μέχρι και 80%. [336].

Στους ηλικιωμένους δε, ασθενείς >65 ετών χρησιμοποιήθηκε το Velcade σε συνδυασμό με MP (MPV) συγκριτικά με MP μόνο (στη μελέτη VISTA), με αποτελέσματα υπέρ του MPV αλλά με μεγαλύτερη τοξικότητα [337].

Ανεπιθύμητες ενέργειες του Velcade είναι η κόπωση, η αιματολογική τοξικότητα, κυρίως η αναστρέψιμη θρομβοπενία, και διαταραχές από το ΓΕΣ. Η πιο σοβαρή όμως ανεπιθύμητη ενέργεια είναι η νευροτοξικότητα. Αφορά την επιπολής και την εν τω βάθει αισθητικότητα αλλά και το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Χρειάζεται μεγάλη προσοχή για να γίνει σωστή εκτίμηση των συμπτωμάτων του ασθενούς και ανάλογα προσαρμογή ή διακοπή του φαρμάκου. Αν και τις περισσότερες φορές η νευροτοξικότητα είναι αναστρέψιμη, μέσα σε ένα εξάμηνο, πολλοί ασθενείς επιτυγχάνουν πλήρη ύφεση αλλά ταλαιπωρούνται από αισθητικοκινητικά προβλήματα. Σε αντίθεση τέλος με τη θαλιδομίδη και το Revlimid, το Velcade δεν ενοχοποιείται για θρομβώσεις.

#### 4. ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ

Με όλα αυτά τα καινούρια φάρμακα και τους συνδυασμούς τους σε εξέλιξη προκύπτουν πολλά ερωτήματα ως προς το ποια είναι η ιδανικότερη θεραπεία για το ΠΜ σήμερα.

Μέχρι σήμερα η αυτόλογη μεταμόσχευση (autologous peripheral blood stem cell transplantation - APBSCT) αποτελεί τη θεραπεία εκλογής για όλους τους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΠΜ <65 ετών, γιατί προσφέρει μεγάλα ποσοστά CR και OS (έως και 40% στα 7 χρόνια) [338].

Σήμερα με την εισαγωγή των νέων παραγόντων, που υπόσχονται μεγάλα ποσοστά CR, αναρωτιέται κανείς αν είναι ακόμη απαραίτητη. Όπως είναι γνωστό η πλήρης ύφεση στο ΠΜ δεν είναι ο μόνος παράγοντας που οδηγεί στη μακρά επιβίωση. Αντίθετα μια πολύ καλή μερική ύφεση που διαρκεί πολλά χρόνια είναι ο καλύτερος δείκτης μακράς επιβίωσης [339]. Επιπλέον, δεν είναι γνωστό πόσο διαρκεί η ύφεση που επιτυγχάνουν οι νέοι παράγοντες όταν σταματήσει η χορήγηση τους. Από τα μέχρι σήμερα δεδομένα φαίνεται ότι η δράση τους έχει ημερομηνία λήξης.

Τελικά η αυτόλογη μεταμόσχευση είναι η μόνη θεραπεία που προσφέρει μακρά επιβίωση με τη λιγότερη τοξικότητα. Και αν για μερικούς ασθενείς δεν έχει καταφέρει να αλλάξει τη φυσική πορεία του νοσήματος, προσφέρει καλύτερη ποιότητα ζωής και αρκετά χρόνια ελεύθερα νόσου.

#### 5. ΑΛΛΟΓΕΝΗΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ

Τα τελευταία χρόνια με τη χρήση της κυτταρογενετικής, του FISH και του GEP (Gene expression profile), έχει γίνει μία νέα ταξινόμηση του ΠΜ [340] σε:

- A) Σταθερού κινδύνου ΠΜ [υπερδιπλοειδία, t(11;14), t(6;14) στον καρυότυπο]
- B) Υψηλού κινδύνου ΠΜ [del 13, υποδιπλοειδία στον καρυότυπο, t(4;14), t(14;16), del17p με FISH, LI >3].

Στο ΠΜ υψηλού κινδύνου το OS είναι κάτω από τρία χρόνια ακόμη και μετά από διπλή αυτόλογη μεταμόσχευση (tandem). Σε αυτούς τους ασθενείς φαίνεται ότι οι νέοι παράγοντες έχουν θέση στη θεραπεία εφόδου για την επίτευξη της καλύτερης ύφεσης. Επίσης σε αυτούς τους ασθενείς έχει θέση και η αλλογενής μεταμόσχευση.

Στην πραγματικότητα η αλλογενής μεταμόσχευση είναι η μόνη θεραπεία που προσφέρει ίαση στο ΠΜ. Ωστόσο η μεγάλη τοξικότητα (treatment related mortality – TRM) που φθάνει και το 40%, την καθιστά απαγορευτική στις περισσότερες των περιπτώσεων.

## 6. ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Με τις σημερινές θεραπευτικές επιλογές, η ακτινοθεραπεία έχει συμπληρωματικό ρόλο μόνο στη θεραπευτική αντιμετώπιση του ΠΜ. Μπορεί να είναι τοπική ή ολόσωμη και χρησιμοποιείται για περιορισμό της νεοπλασματικής μάζας σε περιπτώσεις παραπληγίας (από πίεση του νωτιαίου μυελού) και άμεσης ανακούφισης των ασθενών από τα οστικά άλγη. Χρησιμοποιείται επίσης ως αγωγή προετοιμασίας (μαζί με χημειοθεραπεία) για μεταμόσχευση μυελού των οστών [18, 233, 234].

## 7. ΝΕΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Φυσικά ήταν αναμενόμενο εφόσον μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί η ιδανική θεραπεία για το ΠΜ η φαρέτρα των παραγόντων να συνεχίζει να εμπλουτίζεται. Έτσι, μερικοί από τους παράγοντες αυτούς που υπόσχονται μόνοι τους ή σε συνδυασμό, να κάνουν το ΠΜ χρόνια νόσο είναι οι παρακάτω:

- 1 . Παράγοντες που έχουν στόχο το PI3k/Akt δρόμο (Akt αναστολέας, perifosine, rapamycin, enzastaytrin).
- 2 . Παράγοντες που στοχεύουν τη MAPK πρωτεΐνη
3. Αναστολείς των HSP90 (17-AAG, KOS953, IPI504)
4. Μονοκλωνικά αντισώματα (SGN40 και Rituximab)
5. Παράγοντες που στοχεύουν στην οστική νόσο του ΠΜ (anti-RANKL, anti-DKKI αντισώματα).

## B. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

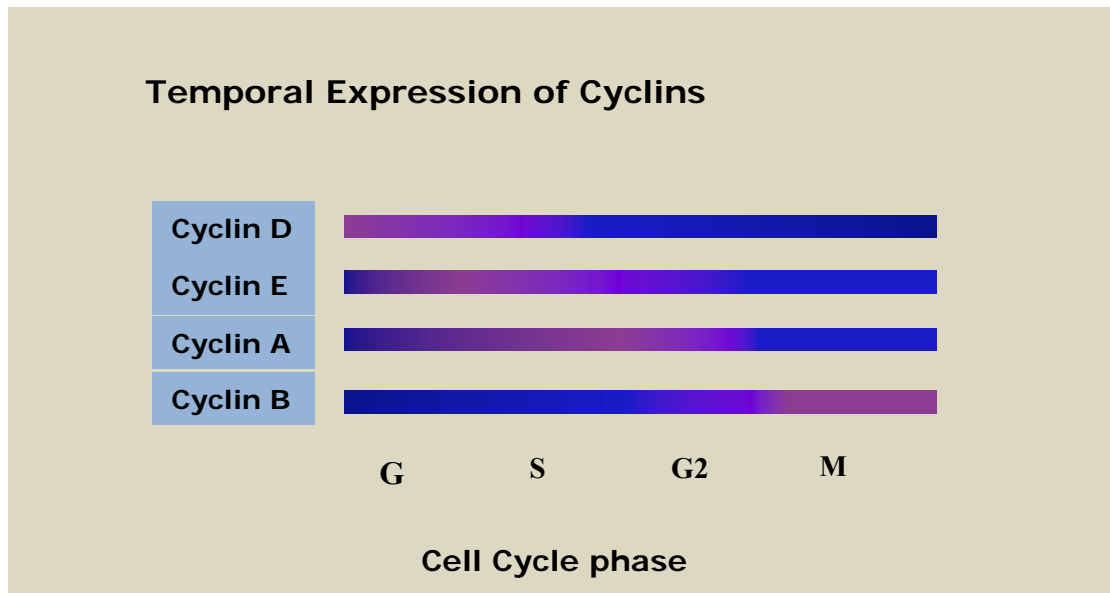
### 1. Γενικά στοιχεία

Η ικανότητα ενός κυττάρου να πολλαπλασιάζεται και να δημιουργεί ακριβή "αντίγραφα" του αποτελεί μία ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία η οποία απαιτεί υψηλή "πιστότητα" για κάθε οργανισμό. Οι μοριακοί μηχανισμοί ελέγχου που χρησιμοποιούνται τα κύτταρα για αναδιπλασιασμό χαρακτηρίζεται από οργάνωση και σημαντικού βαθμού διατήρηση κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Την τελευταία δεκαετία έχει εκδηλωθεί έντονο ενδιαφέρον για τον κυτταρικό κύκλο που στηρίζεται στην υπόθεση ότι διαταραχές στη ρύθμιση του οδηγούν σε γενετική αστάθεια η οποία προδιαθέτει σε νεοπλασματική εξαλλαγή [341].

Μελέτες σε καλλιέργειες ιστών και πειραματόζωα προσδιόρισαν το ρόλο ρυθμιστικών πρωτεϊνών, των κυκλινών και των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKIs) καθώς και ενζύμων, των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclindependent kinases, CDKs) και φωσφατασών στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Ο κυτταρικός κύκλος προχωρά με τη δράση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων αποτελούμενων από κυκλίνες και CDKs (κινάσες σερίνης/ θρεονίνης) τα οποία ελέγχουν τη φωσφορυλίωση παραγόντων του κύκλου, όπως είναι η πρωτεΐνη Rb.

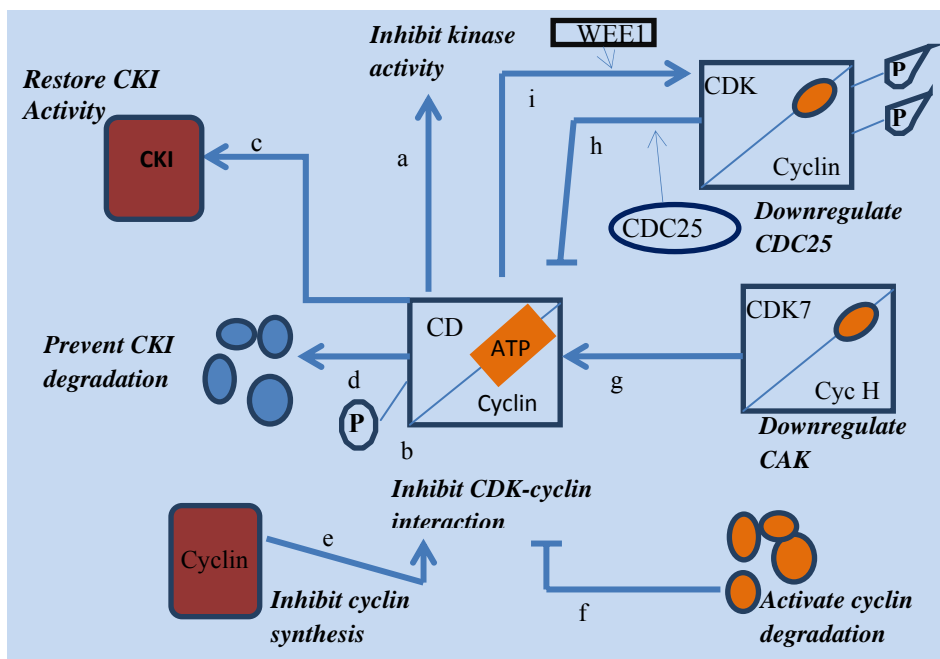
Οι κυκλίνες είναι πρωτεΐνες που συντίθενται σε καθορισμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και αποδομούνται γρήγορα [Σχήμα 1]. Εκτός από τον έλεγχο της σύνθεσης των κυκλινών, λειτουργεί επίσης μηχανισμός ρύθμισης της αποδόμησής τους. Οι κυκλίνες αποτελούν τη ρυθμιστική υπομονάδα του συμπλέγματος, ενώ οι CDKs, η συγκέντρωση των οποίων παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αποτελούν τις καταλυτικές υπομονάδες.

Η δραστηριότητα των συμπλεγμάτων ελέγχεται από τα αυστηρώς ρυθμιζόμενα επίπεδα των κυκλινών. Η ενεργοποίηση του συμπλόκου απαιτεί τη φωσφορυλίωση της CDK σε θέση θρεονίνης από το σύμπλεγμα κυκλίνη H - Cdk7 (CDK-activating kinase/CAK) [342]. Επιπρόσθετα, άλλα αμινοξέα (τυροσίνη και θρεονίνη) πρέπει να αποφωσφορυλιωθούν και αυτό πραγματοποιείται είτε με αναστολή κινασών (Wee1/Myt1), είτε με ενεργοποίηση φωσφατασών (Cdc25 A, B, C). Τέλος, η δραστηριότητα των συμπλεγμάτων ελέγχεται και από μία άλλη κατηγορία πρωτεϊνών, τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKIs).



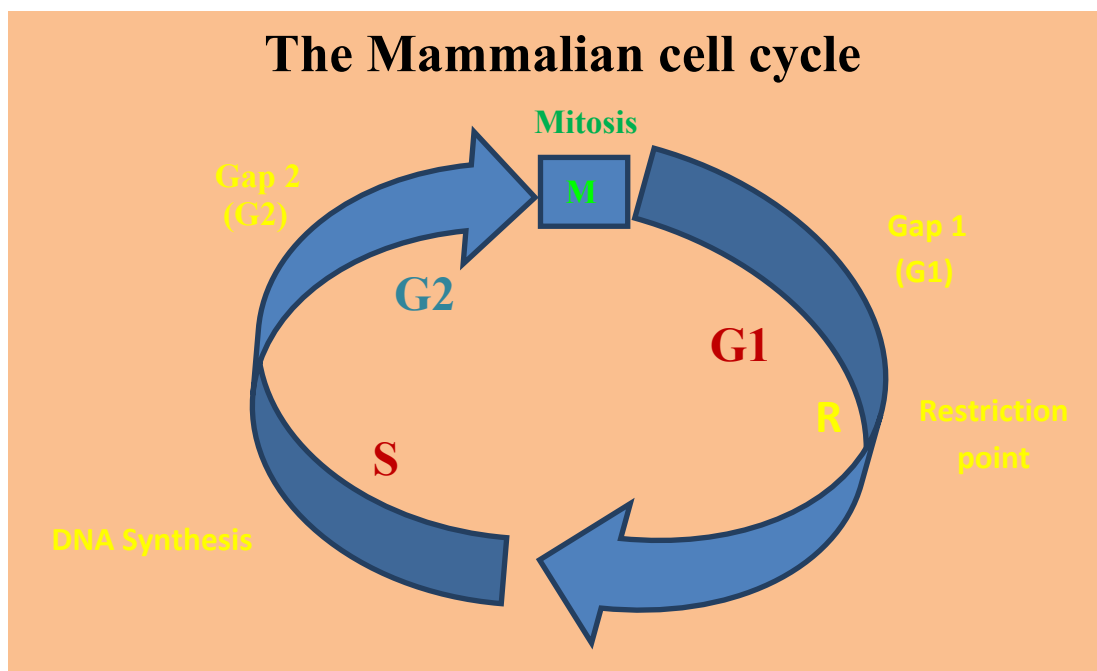
**Σχήμα 1.** Έκφραση των κυκλινών στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Όλα τα παραπάνω σημεία ελέγχου της ενεργότητας των συμπλόκων κυκλινών-CDKs αποτελούν δυνητικά θεραπευτικούς στόχους [Σχήμα 2] και περιλαμβάνουν: (α) άμεση αναστολή της δραστηριότητας της CDK, (β) αναστολή της αλληλεπίδρασης κυκλίνης-CDK, (γ) ενίσχυση της λειτουργίας των CDKIs με αύξηση των επιπέδων τους ή (δ) αναστολή της αποδόμησής τους, (ε) αναστολή της σύνθεσης κυκλινών ή (ζ) επαγωγή της αποδόμησής τους, (η) αναστολή των CAKs ή (θ) των Cdc25 φωσφατασών και τέλος (ι) ενεργοποίηση των ανασταλτικών κινασών.



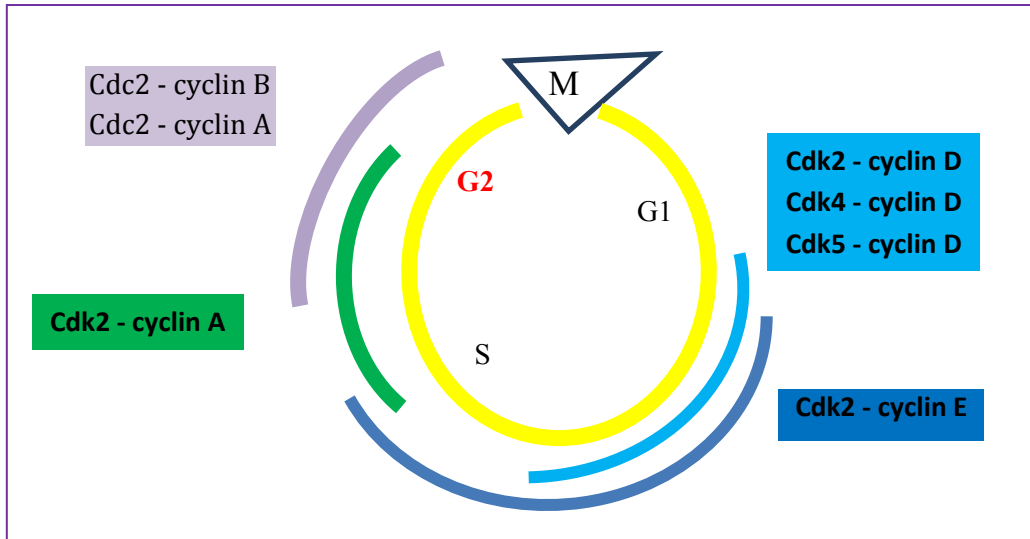
**Σχήμα 2.** Ρύθμιση της δραστηριότητας των συμπλεγμάτων κυκλινών-CDKs και δυνατότητες θεραπευτικής παρέμβασης.

Ο αναδιπλασιασμός του γονιδιώματος και η διαίρεση του κυττάρου σε δύο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα [Σχήμα 3] περιλαμβάνει 4 ξεχωριστές φάσεις (G1: 1st gap phase, S: DNA synthesis phase, G2: 2nd gap phase, M: mitosis), ενώ η απουσία αυξητικών παραγόντων απαραίτητων για την είσοδο του κυττάρου στην G1 οδηγεί σε μία φάση ηρεμίας (G0), η παραμονή στην οποία μπορεί να είναι μόνιμη ή αναστρέψιμη [343]. Τα περισσότερα κύτταρα σε ένα ενήλικο ανθρώπινο οργανισμό βρίσκονται σε φάση ηρεμίας και με εξαίρεση εκείνα τα οποία έχουν φθάσει σε κατάσταση τελικής διαφοροποίησης, διατηρούν τη δυνατότητα εισόδου στον κυτταρικό κύκλο.



**Σχήμα 3.** Σχηματική παράσταση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου.

Έως σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 13 CDKs οι οποίες κωδικοποιούνται στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Εκτός από το ρόλο των CDKs στον κυτταρικό κύκλο τα τελευταία χρόνια αναγνωρίστηκε η σημασία τους και σε άλλες λειτουργίες όπως η απόπτωση, η κυτταρική διαφοροποίηση και η μεταγραφή. Τα σημαντικότερα γνωστά ρυθμιστικά συμπλέγματα κυκλινών-CDKs που συμμετέχουν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου είναι της κυκλίνης D1-cdk4, το οποίο ελέγχει την πρόοδο της φάσης G1, της κυκλίνης E-cdk2, το οποίο καθορίζει την είσοδο στη φάση S, της κυκλίνης A-cdk2, το οποίο ρυθμίζει τη διέλευση από τη φάση S και της κυκλίνης B-cdc2, το οποίο ελέγχει την είσοδο στη φάση M [Σχήμα 4].



**Σχήμα 4.** Σχηματική παράσταση των μεταβολών των συμπλεγμάτων κυκλινών/CDKs κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

Από τα προηγούμενα γίνεται κατανοητό ότι η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται από τη λειτουργία ρυθμιστικών πρωτεϊνών, μεταλλάξεις ή διαταραχή στη δράση των οποίων συνοδεύονται από σημαντικές επιπτώσεις στην κυτταρική διαίρεση. Οι πολύπλοκες διαντιδράσεις μεταξύ των παραπάνω πρωτεϊνών και ενζύμων καθώς και με τα προϊόντα των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων δεν έχουν πλήρως διευκρινισθεί [344, 345, 346, 347].

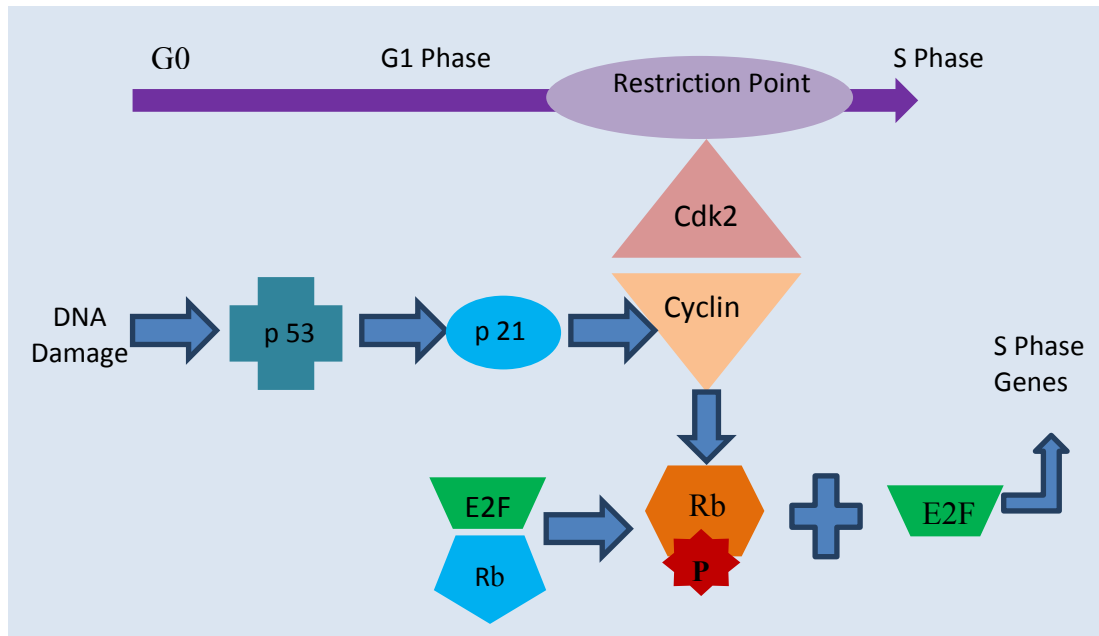
## **2. Μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου**

### **p53**

Δύο ιδιαίτερα σημαντικοί ρυθμιστικοί παράγοντες είναι η πρωτεΐνη p53 και το προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (pRb). Ο έλεγχος της ακεραιότητας του γονιδιώματος αποτελεί σημαντική διαδικασία στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και πραγματοποιείται σε μεγάλο βαθμό από την πρωτεΐνη p53. Μετά από βλάβη του DNA, η φυσιολογική μορφή της p53 (wild type) διακόπτει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και προκαλεί παραμονή του κυττάρου στη φάση G1, εξασφαλίζοντας έτσι το απαιτούμενο χρονικό διάστημα για επιδιόρθωση του γενετικού υλικού πριν τον αναδιπλασιασμό του. Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης της p21waf1/cip1 η οποία αναστέλλει τη δραστηριότητα συμπλεγμάτων κυκλινών / κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών [Σχήμα 5].

Εάν η επιδιόρθωση του γενετικού υλικού δεν είναι δυνατή, η p53 κινητοποιεί διαδικασία κυτταρικού θανάτου μέσω αποπτωτικών μηχανισμών [348, 349]. Απώλεια

της λειτουργίας της p53 οδηγεί σε γενετική αστάθεια και διαταραχή της απόπτωσης και συμβάλλει στη διαδικασία της κακοήθους εξαλλαγής. Εκτός από τη σημασία της πρωτεΐνης p53 στην καταστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, πρόσφατες μελέτες εισηγούνται ανάλογο ρόλο της p53 και στην παραμονή του κυττάρου στη φάση G2 μετά από βλάβη του γενετικού υλικού [350].



**Σχήμα 5.** Καταστολή του κυττάρου στη φάση G1 μέσω της πρωτεΐνης p53 μετά από βλάβη του DNA.

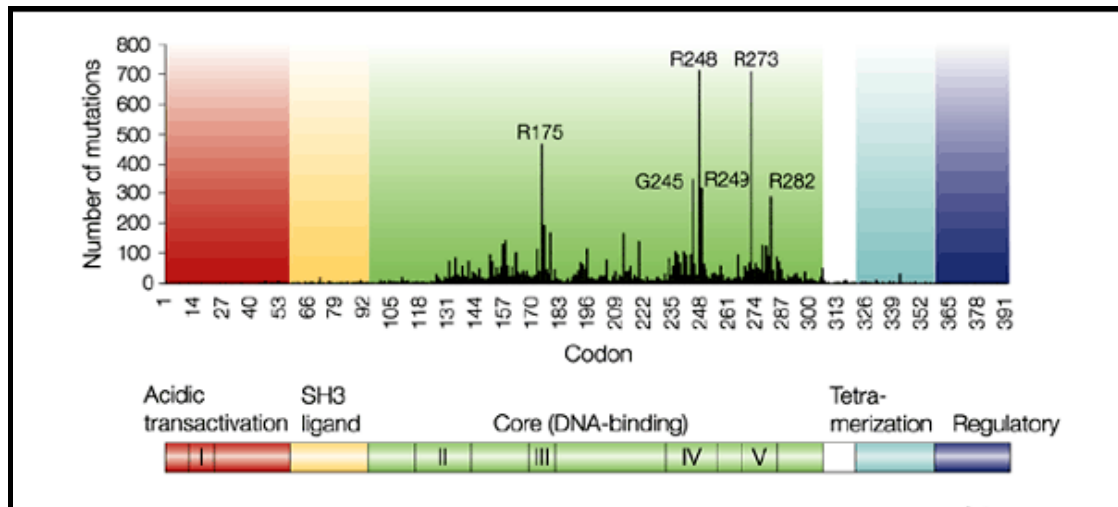
Το γονίδιο (TP53) το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53 εμφανίζει τη μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων στα ανθρώπινα κακοήθη νεοπλάσματα, ενώ το φάσμα των μεταλλάξεων ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων τύπων καρκίνου [351]. Υπολογίζεται ότι τουλάχιστον το 50% των όγκων συνοδεύονται από διαταραχές του γονιδίου TP53, ενώ το 95% των μεταλλάξεων αφορά στην κεντρική περιοχή δέσμευσης του DNA (core DNA-binding domain) [Σχήμα 6]. Η φυσιολογική πρωτεΐνη p53 (wild type) έχει μικρό χρόνο ημιζωής, γεγονός που δεν επιτρέπει την ανίχνευσή της στους ιστούς κατά τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο. Αντίθετα, μεταλλαγμένες μορφές έχουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής με αποτέλεσμα να υπερεκφράζονται ανοσοϊστοχημικά.

Εκτός όμως από την παρουσία μεταλλάξεων, η λειτουργία της p53 επηρεάζεται και από μία άλλη πρωτεΐνη, την mdm2 (hdm2 στον άνθρωπο). Η μεταγραφή του γονιδίου mdm2 βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο της φυσιολογικής p53. Η πρωτεΐνη mdm2 δεσμεύει τη φυσιολογική p53, αναστέλλει τη ρυθμιστική μεταγραφική δραστηριότητά της, ενώ παράλληλα ευοδώνει την αποδόμησή της από το σύστημα της



ουμπικουιτίνης (ubiquitin) με τελικό αποτέλεσμα η υπερέκφραση της mdm2 να αδρανοποιεί την p53 [352]. Η βλάβη του γενετικού υλικού φυσιολογικά ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση Atm η οποία εμποδίζει τη δέσμευση της mdm2 στην p53 μέσω φωσφορυλίωσης της τελευταίας σε θέσεις σερίνης από την κινάση Chk2.

Σε μερικά νεοπλάσματα όπως τα σαρκώματα έχει διαπιστωθεί απενεργοποίηση της p53 μέσω υπερέκφρασης της mdm2, ενώ στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχει παρατηρηθεί δέσμευση της p53 και αύξηση της αποδόμησής της από την πρωτεΐνη E6 του ιού Human Papilloma Virus (HPV) [353, 354, 355, 356].



**Σχήμα 6.** Συχνότητα και κατανομή των μεταλλάξεων της πρωτεΐνης p53.

## pRb

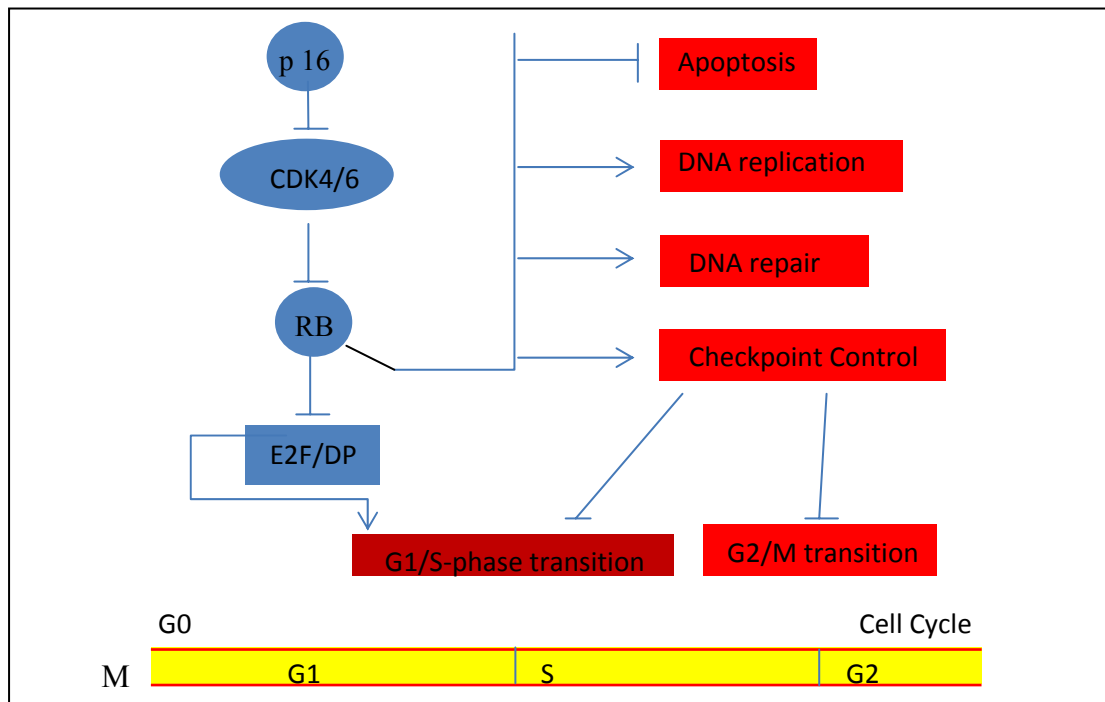
Κυρίαρχο ρόλο στη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση αναδιπλασιασμού του DNA (φάση S) διαδραματίζει η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης pRb, η οποία οδηγεί σε απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού αυτού μορίου [357]. [Σχήμα 5]. Τα επίπεδα της pRb παραμένουν σταθερά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ενώ η ενεργότητά της καθορίζεται από την κατάσταση φωσφορυλίωσής της. Η pRb βρίσκεται στην ενεργό, υποφωσφορυλιωμένη μορφή της κατά τη φάση G0 και έως το μέσο της G1, ενώ φωσφορυλιώνεται και αδρανοποιείται προς το τέλος της G1 και κατά τη φάση S, παραμένοντας σε υψηλό βαθμό φωσφορυλίωσης κατά τη διάρκεια της φάσης G2 [358].

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η pRb αποτρέπει την είσοδο στη φάση S σχετίζεται άμεσα με την αλληλεπίδρασή της με το μεταγραφικό παράγοντα E2F-1 και τη συνοδό του υπομονάδα DP [359]. Ο παράγοντας αυτός αποτελεί το βασικό μέλος μίας οικογένειας τουλάχιστον 6 μεταγραφικών παραγόντων και λειτουργεί ενεργοποιώ-

ντας τη μεταγραφή ποικιλίας γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων συμμετέχουν στη διαδικασία σύνθεσης του DNA. Η υποφωσφορυλιωμένη pRb σχηματίζει σύμπλοκα με αυτούς τους παράγοντες και τους αδρανοποιεί, καταστέλλοντας έτσι την έκφραση γονιδίων. Η αναστολή της ενεργοποίησης αυτών των γονιδίων μέσω της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης pRb με τον E2F-1 ερμηνεύει την κατασταλτική δράση της pRb στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου [360].

Αντίθετα, φωσφορυλίωση της pRb οδηγεί σε απελευθέρωση των μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στη μετάβαση από τη φάση G1 στην S [361]. Επιπρόσθετα της ικανότητάς της να αναστέλλει τη μετάβαση στη φάση S, η pRb θεωρείται ότι συμμετέχει στη ρύθμιση μίας ποικιλίας λειτουργιών όπως είναι η επιδιόρθωση του γενετικού υλικού, η απόπτωση, η κυτταρική διαφοροποίηση κ.ά. [Σχήμα 7].

Υποστηρίζεται ότι σε περίπτωση αναστολής της δράσης της pRb, η φυσιολογική λειτουργία της p53 αντισταθμίζει μέσω απόπτωσης την απορρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και αποτρέπει τη νεοπλασματική εξαλλαγή [345]. Μεταλλάξεις του γονιδίου Rb έχουν διαπιστωθεί σε νεοπλάσματα, οι περισσότερες από τις οποίες αφορούν στην περιοχή δέσμευσης των πρωτεϊνών (pocket region) της pRb με συνέπειες στη λειτουργικότητά της.

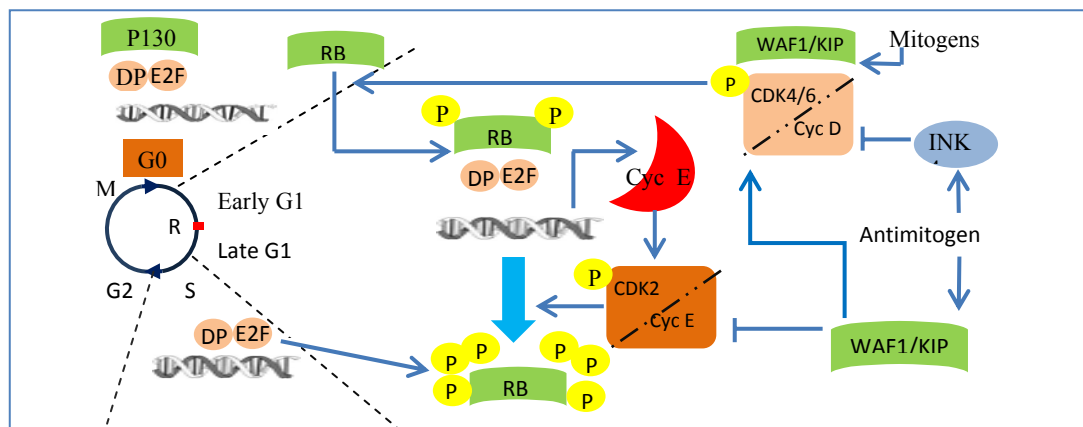


**Σχήμα 7.** Συμμετοχή της πρωτεΐνης pRb στον έλεγχο της μετάβασης της φάσης G1 στην S και άλλες πιθανές λειτουργίες της.

Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb σε θέσεις σερίνης /θρεονίνης απαιτεί την παρουσία κυκλινών οι οποίες σχηματίζουν συμπλέγματα με τις CDKs. Οι κυκλίνες οι οποίες συμμετέχουν στη μετάβαση από τη φάση G1 στην S είναι οι κυκλίνες D (D1, D2 και D3) και η κυκλίνη E [362] [Σχήμα 8]. Κατά τη μετάβαση από τη φάση G0 στην G1 αρχίζει υπό την επίδραση μιτογόνων η σύνθεση των κυκλινών τύπου D, τα επίπεδα των οποίων φθάνουν στο μέγιστο κοντά στη μετάβαση από τη φάση G1 στην S. Η σύνδεση της κυκλίνης τύπου D με την CDK οδηγεί σε ενεργοποίηση του ενζύμου [363]. Στο μέσο και έως το τέλος της φάσης G1 παρατηρείται αύξηση της ενεργότητας του συμπλέγματος της κινάσης cdk4 με την κυκλίνη D1 που επάγει τη φωσφορυλίωση της pRb [364].

Η μερική φωσφορυλίωση της pRb από το σύμπλεγμα κυκλίνη D1-cdk4 επιτρέπει στο μεταγραφικό παράγοντα E2F να επάγει κατά το τέλος της φάσης G1 την ενεργοποίηση του γονιδίου της κυκλίνης E και τη σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης [365]. Η σύνθεση του συμπλέγματος κυκλίνη E-cdk2 αρχίζει κατά το τέλος της φάσης G1 και συνεχίζεται σε μέγιστο βαθμό κατά τη μετάβαση G1-S. Το σύμπλεγμα αυτό είναι ο αναγκαίος και καθοριστικός του ρυθμού παράγοντας για τη μετάβαση στη φάση S μέσω περαιτέρω φωσφορυλίωσης της pRb και απελευθέρωσης του μεταγραφικού παράγοντα E2F [366]. Μετά την είσοδο στη φάση S η κυκλίνη E αποδομείται και η cdk2 σχηματίζει σύμπλοκο με την κυκλίνη A.

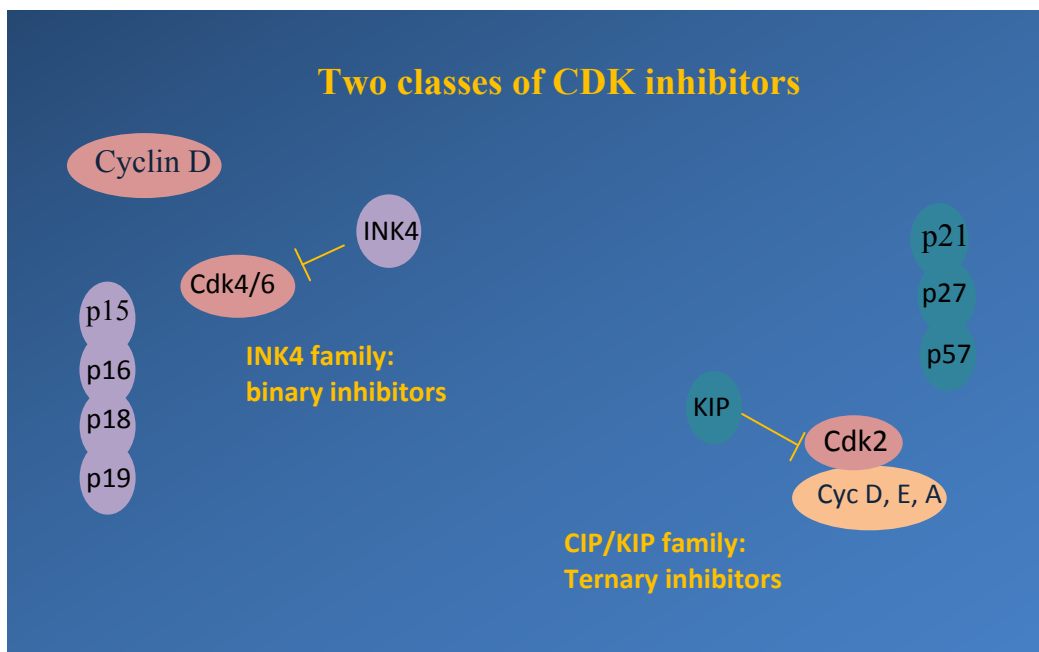
Γονιδιακή ενίσχυση και υπερέκφραση της κυκλίνης D1 καθώς επίσης υπερέκφραση της κυκλίνης E έχει παρατηρηθεί σε αρκετούς τύπους νεοπλασμάτων. Γονιδιακή ενίσχυση και υπερέκφραση της cdk4 και cdk6 αλλά και μεταλλάξεις των αντίστοιχων γονιδίων που οδηγούν σε αδυναμία δέσμησης CDKIs έχουν επίσης διαπιστωθεί σε αρκετές περιπτώσεις νεοπλασιών, ενώ αντίθετα μεταλλάξεις της cdk2 και των μεταγραφικών παραγόντων E2F σπάνια έχουν περιγραφεί.



**Σχήμα 8.** Ρύθμιση της φάσης G1 και της μετάβασης από το περιοριστικό σημείο G1/S.

## CDKIs

Η δραστηριότητα των συμπλεγμάτων κυκλίνης / CDK ελέγχεται επίσης από μία κατηγορία ανασταλτικών πρωτεϊνών, τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKIs). Έως σήμερα έχουν αναγνωρισθεί δύο ομάδες CDKIs (Σχήμα 9). Η μία (CIP/KIP family) περιλαμβάνει τις p21<sup>waf1/cip1</sup>, p27<sup>kip1</sup> και p57<sup>kip2</sup>, ενώ η δεύτερη ομάδα (INK 4 family) αποτελείται από τις p16<sup>ink4a</sup>, p15<sup>ink4b</sup>, p18<sup>ink4c</sup> και p19<sup>ink4d</sup>. Η πρώτη ομάδα CDKIs έχει την ιδιότητα να δεσμεύει σύμπλοκα κυκλινών με CDKs που ελέγχουν τη μετάβαση από τη φάση G1 στην S [367] ενώ η δεύτερη αναστέλλει εκλεκτικά τη δημιουργία συμπλόκων της κυκλίνης D με τις κινάσες cdk4 και cdk6 [368]. Αν και τα μέλη της οικογένειας CIP/KIP δεσμεύουν συμπλέγματα της κυκλίνης D, E και A με τις αντίστοιχες CDKs, θεωρείται ότι ο κύριος στόχος αυτής της ομάδας CDKIs είναι το σύμπλοκο κυκλίνη E-cdk2 [369]. Οι πρωτεΐνες αυτές μέσω αυστηρού ελέγχου των επιπέδων τους συμβάλλουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αδρανοποιώντας τα συμπλέγματα κυκλινών-CDKs, εμποδίζοντας έτσι την ανεξέλεγκτη φωσφορυλίωση της pRb και την απελευθέρωση των μεταγραφικών παραγόντων E2F.



**Σχήμα 9.** Αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclin dependent kinase inhibitors, CDKIs).

**p21<sup>waf1/cip1</sup>**

Η p21<sup>waf1/cip1</sup> δεσμεύει και αναστέλλει τη δράση των συμπλεγμάτων κυκλίνη D1-cdk4, κυκλίνη E-cdk2, κυκλίνη A-cdk2 καθώς και κυκλίνη B-cdc2 αποτελώντας έτσι καθολικό αναστολέα CDKs [367]. Τα συμπλέγματα κυκλινών-CDKs που περιέχουν 1 μόριο p21<sup>waf1/cip1</sup> είναι ενεργά, ενώ αυτά που περιέχουν πολλαπλά μόρια καθίστανται ανενεργά, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία της στοιχειομετρίας της p21<sup>waf1/cip1</sup> για τη δράση της [370].

Μεταλλάξεις του γονιδίου p21/Waf1 δεν ανιχνεύονται συχνά, ενώ ο κύριος μηχανισμός ρύθμισης της p21<sup>waf1/cip1</sup> φαίνεται να είναι σε επίπεδο μεταγραφής. Η μεταγραφή του p21/Waf1 ελέγχεται από την p53. Έχει ήδη αναφερθεί ότι σε περίπτωση βλάβης του DNA η φυσιολογική p53 επάγει την έκφραση της p21<sup>waf1/cip1</sup> με συνέπεια την αναστολή της δράσης των CDKs, αποφυγή της φωσφορυλίωσης της pRb και απελευθέρωσης των παραγόντων E2F, με τελικό αποτέλεσμα την παραμονή στη φάση G1 [371]. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι λειτουργεί και ανεξάρτητος της p53 μηχανισμός επαγωγής της πρωτεΐνης p21<sup>waf1/cip1</sup>.

**p27<sup>kip1</sup>**

Η p27<sup>kip1</sup> (kinase inhibitory protein-1) εμφανίζει σημαντικού βαθμού ομοιότητα αλληλουχίας με την p21<sup>waf1/cip1</sup> και αναστέλλει την ενζυμική δραστηριότητα των συμπλεγμάτων κυκλίνη E-cdk2 και κυκλίνη A-cdk2 με αποτέλεσμα την μη μετάβαση των κυττάρων από τη φάση G1 στην φάση S. Η p27<sup>kip1</sup> δεσμεύει επίσης το σύμπλοκο κυκλίνη D1 cdk4 χωρίς όμως να το αδρανοποιεί. Όπως αναφέρθηκε και για την p21<sup>waf1/cip1</sup>, η στοιχειομετρία της p27<sup>kip1</sup> καθορίζει εάν η πρωτεΐνη θα δράσει σαν αναστολέας ή όχι. Η p27<sup>kip1</sup> όχι μόνο αναστέλλει συμπλέγματα κυκλινών-CDKs αλλά επιπλέον παρεμποδίζει και την ενεργοποίησή τους αναστέλοντας τη φωσφορυλίωση της cdk2 στη θέση Thr160 [372, 373]. Εκτός από το ρόλο της σαν CDKI η p27<sup>kip1</sup> θεωρείται ότι πιθανά συμμετέχει και σε άλλες λειτουργίες όπως απόπτωση, έλεγχο της κυτταρικής διαφοροποίησης, αλλά και ρύθμιση της αντίστασης συμπαγών νεοπλασμάτων σε φάρμακα.

Η p27<sup>kip1</sup> επάγεται από το κυκλικό AMP, τη λοβαστατίνη, τη ραπαμυκίνη, την ταμοξιφαίνη, ενώ η ιντερλευκίνη 2 καταστέλλει την έκφρασή της [372, 373]. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι η πρωτεΐνη p27<sup>kip1</sup> αποτελεί βασικό στόχο της ενεργοποίησης

των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης όπως είναι οι EGFRs, οι οποίοι προκαλούν ελάττωση των επιπέδων της p27<sup>kip1</sup> μέσω αύξησης της αποδόμησης αλλά και μέσω μετακίνησης της πρωτεΐνης από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα [374]. Μεταλλάξεις στο γονίδιο p27/kip1 σπάνια έχουν περιγραφεί σε νεοπλάσματα [375]. Μελέτες σε κυτταρικά συστήματα έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της p27<sup>kip1</sup> ρυθμίζονται σε μεταγραφικό, μεταφραστικό ή μεταμεταφραστικό επίπεδο.

Σημαντικός αριθμός μελετών έδειξε ότι κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης η έκφραση της p27<sup>kip1</sup> ελαττώνεται [376, 377, 378, 379, 380, 381]. Η απενεργοποίηση της p27<sup>kip1</sup> κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης στον ανθρώπινο οργανισμό επιτελείται κυρίως με πρωτεόλυση από το σύστημα της ουμπικουζίνης (ubiquitin-proteasome pathway) στον πυρήνα των κυττάρων, ενώ έχει διαπιστωθεί ότι το σύμπλεγμα κυκλίνη E-cdk2 επάγει την καταστροφή της p27<sup>kip1</sup> από το σύστημα πρωτεόλυσης φωσφορυλιώνοντάς την [382]. Εναλλακτικά, η ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών hKIS και PKB/Akt προκαλεί φωσφορυλίωση της p27<sup>kip1</sup> και μετακίνησή της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα τη λειτουργική αδρανοποίησή της [383].

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτουν αρκετά στοιχεία τα οποία εισηγούνται ότι η πυρηνική έκφραση της p27<sup>kip1</sup> αποτελεί χρήσιμο προγνωστικό παράγοντα σε ποικιλία όγκων, αν και όλες οι σχετικές μελέτες δε βρίσκονται σε συμφωνία μεταξύ τους [376, 377, 379, 380, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390].

### **p16<sup>ink4a</sup>**

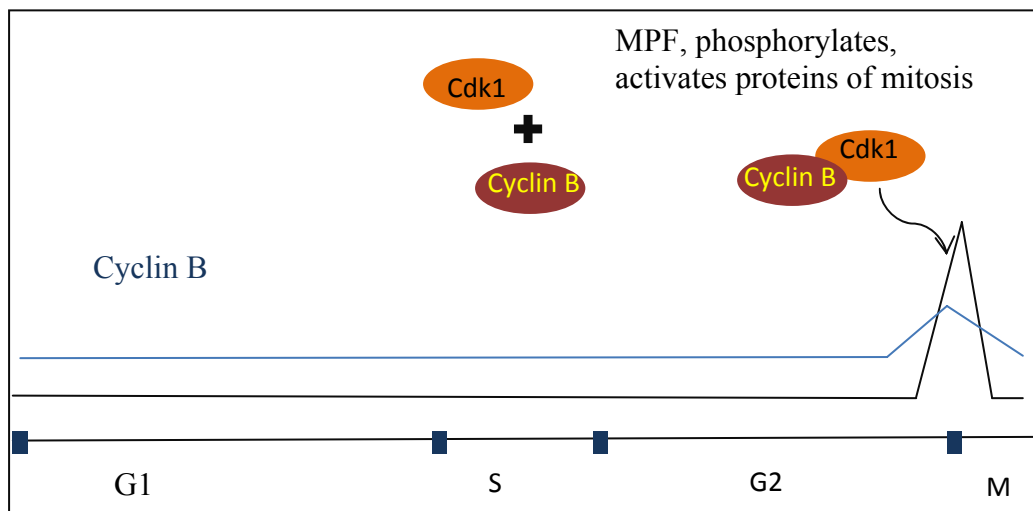
Η πρωτεΐνη p16<sup>ink4a</sup> σχηματίζει ετεροδιμερή σύμπλοκα με τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες cdk4 και cdk6 και αναστέλλει εκλεκτικά τη δημιουργία συμπλεγμάτων με την κυκλίνη D. Σημαντικού βαθμού ομοιότητα παρατηρείται μεταξύ της p16<sup>ink4a</sup> και της πρωτεΐνης p15<sup>ink4b</sup>, ενώ μικρότερου βαθμού ομοιότητα παρατηρείται με την p18<sup>ink4c</sup>.

Μεταλλάξεις του γονιδίου της p16<sup>ink4a</sup> διαπιστώνονται συχνά σε διάφορα νεοπλάσματα. Τα τελευταία χρόνια πιστεύεται ότι σχεδόν σε όλες τις νεοπλασίες στον άνθρωπο παρατηρούνται διαταραχές της οδού p16<sup>ink4a</sup> – κυκλίνη D – pRb.

### 3. Μετάβαση από τη φάση G2 στη φάση M του κυτταρικού κύκλου

Η πρωτεΐνη cdc2 ή p34<sup>cdc2</sup> ή cdk1 αποτελεί το προϊόν του γονιδίου cdc2 το οποίο περιγράφηκε για πρώτη φορά στο *Schizosaccharomyces pombe*. Η p34<sup>cdc2</sup> είναι η καταλυτική υπομονάδα ενός συμπλέγματος με δραστικότητα πρωτεϊνικής κινάσης, του MPF (Maturation or mitosis promoting factor) [391]. Ο παράγοντας MPF αποτελεί σύμπλοκο της p34<sup>cdc2</sup> με την κυκλίνη B [392]. Ο MPF παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της μίτωσης από το μύκητα έως τον άνθρωπο, καθώς η πρωτεΐνη p34<sup>cdc2</sup> εμφανίζει σημαντικό βαθμό δομική και λειτουργική διατήρηση κατά την εξέλιξη.

Μελέτες έδειξαν ότι το σύμπλοκο κυκλίνη B-cdc2 διεγείρει την έναρξη μιτωτικών γεγονότων όπως είναι ο σχηματισμός της μιτωτικής ατράκτου, η διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης και η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων [393]. Έχει διαπιστωθεί ότι η p34<sup>cdc2</sup> φωσφορυλιώνει πολλαπλά υποστρώματα και ότι αυτή η δράση κινάσης είναι μέγιστη κατά τη μετάφαση [Σχήμα 10]. Στο σημείο αυτό το σύμπλοκο κυκλίνη B-cdc2 ενεργοποιεί τον παράγοντα APC (anaphase promoting complex) ο οποίος επιτρέπει στις αδελφές χρωματίδες να αποχωριστούν μεταξύ τους, ενώ παράλληλα συμβάλλει στην αποδόμηση της κυκλίνης B μέσω σύνδεσής της με την πρωτεΐνη ουμπικουτίνη (ubiquitin).

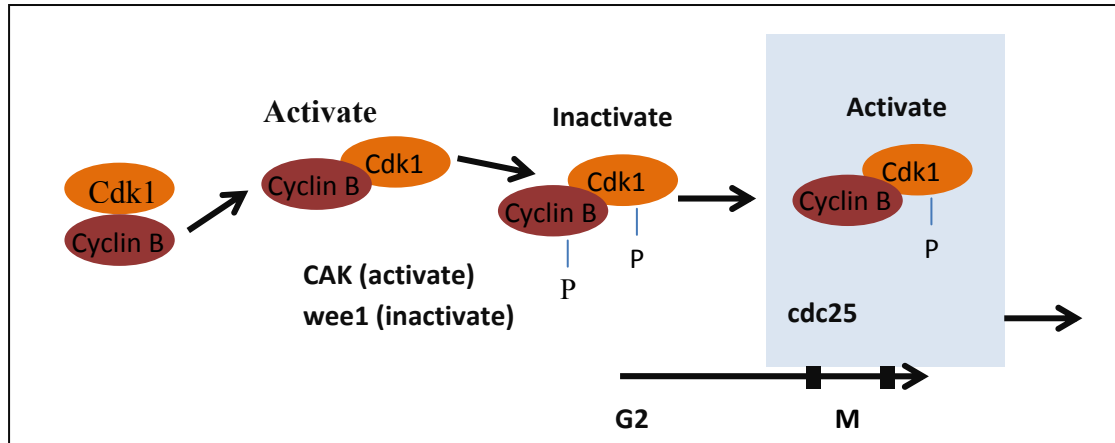


**Σχήμα 10.** Ο παράγοντας MPF αποτελεί σύμπλοκο της p34<sup>cdc2</sup> με την κυκλίνη B και διεγείρει την έναρξη μιτωτικών γεγονότων μέσω φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών.

Η  $p34^{cdc2}$  εντοπίζεται ανοσοϊστοχημικά τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των ανθρώπινων κυττάρων. Κλάσμα της πρωτεΐνης σχετίζεται με τα κεντροσώματα και αυτό δείχνει ότι η  $p34^{cdc2}$  πιθανά φωσφορυλιώνει κεντροσωμικές πρωτεΐνες οδηγώντας στη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου. Αύξηση της κεντροσωμικής έκφρασης της  $p34^{cdc2}$  παρατηρείται κατά τη φάση G2, είναι μέγιστη κατά τη μετάφαση, ενώ δραματική ελάττωση διαπιστώνεται στην έναρξη της ανάφασης [394]. Η σύνθεση της κυκλίνης B αρχίζει στο τέλος της φάσης S, ενώ η έκφρασή της είναι μέγιστη κατά τη μετάπτωση της G2 στη φάση M. Το σύμπλοκο κυκλίνη B-cdc2 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, ενώ μετακινείται προς τον πυρήνα κατά την έναρξη της μίτωσης. Η μετακίνηση του συμπλόκου στον πυρήνα απαιτεί τη φωσφορυλίωση της κυκλίνης B στο τμήμα CRS (cytoplasmic retention sequence).

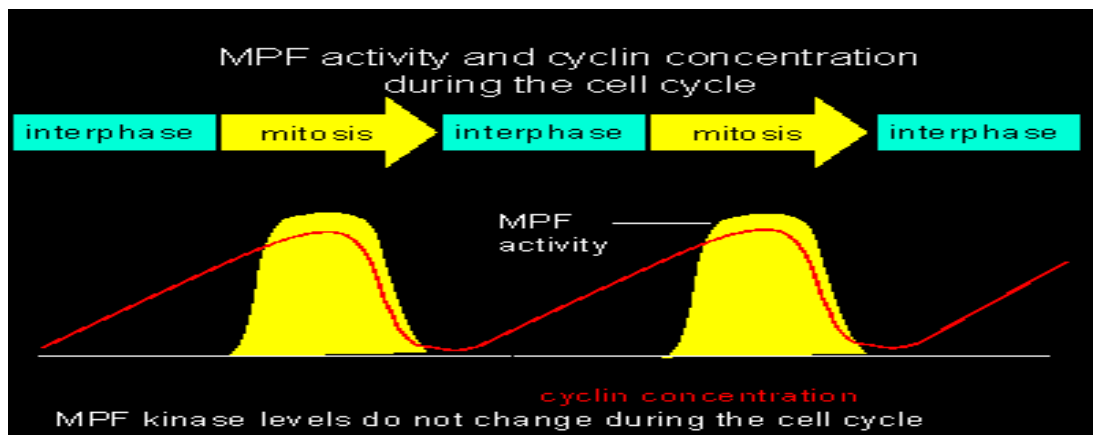
Το γονίδιο WEE1Hu κωδικοποιεί μία πρωτεϊνική κινάση (p49) η οποία φωσφορυλιώνει το σύμπλοκο κυκλίνη B-cdc2 στη θέση Tyr 15 απενεργοποιώντας το. Φωσφορυλίωση στη θέση Thr 14 από την κινάση Myt 1 προκαλεί επίσης απενεργοποίηση του συμπλέγματος [395]. Η αναστολή της δραστηριότητας του συμπλόκου αναστρέφεται με τη δράση της Cdc25C φωσφατάσης η οποία προκαλεί αποφωσφορυλίωση των θέσεων Tyr 15 και Thr 14 [396]. Η ενεργός  $p34^{cdc2}$  ασκεί θετικό feedback φωσφορυλιώνοντας τη Cdc25C, ενισχύοντας έτσι τη δράση της σαν φωσφατάση. Από το άλλο μέρος, η  $p34^{cdc2}$  ασκεί αρνητικό feedback σε κινάσες της οικογένειας WEE1 φωσφορυλιώνοντάς τις. Οι παραπάνω μηχανισμοί ερμηνεύουν την περαιτέρω αύξηση της δραστηριότητας της  $p34^{cdc2}$  μετά από την αρχική της ενεργοποίηση. Από τα προηγούμενα γίνεται αντιληπτό ότι η ισορροπία μεταξύ της Cdc25C φωσφατάσης και των κινασών της οικογένειας WEE1, η οποία πριν από την είσοδο στη μίτωση είναι προς το μέρος των κινασών, καθορίζει την έναρξη της φάσης M προκαλώντας την αρχική ενεργοποίηση της  $p34^{cdc2}$ . Εκτός από την αποφωσφορυλίωση στις θέσεις Tyr 15 και Thr 14 η ενεργοποίηση της  $p34^{cdc2}$  απαιτεί επίσης φωσφορυλίωση της κινάσης στη θέση Thr 161 από την CAK cyclin H/cdk7/mat1 complex [397] [Σχήμα 11].





**Σχήμα 11.** Ρύθμιση της δραστηριότητας του συμπλόκου κυκλίνη B-cdc2.

Πρωτεόλυση της κυκλίνης B κατά τη μετάπτωση από τη μετάφαση στην ανάφαση οδηγεί σε απενεργοποίηση του MPF, ενώ η αποδόμηση της κυκλίνης θεωρείται απαραίτητη για την έξοδο από τη μίτωση. Η πρωτεόλυση της κυκλίνης γίνεται μέσω σύζευξης με την πρωτεΐνη ουμπικουιζίνη (ubiquitin) [398]. Η εμφάνιση και εξαφάνιση του MPF κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ερμηνεύεται από τη σύνθεση και αποδόμηση της κυκλίνης B, ενώ η συγκέντρωση της  $p34^{cdc2}$  παραμένει σταθερή [Σχήμα 12].



**Σχήμα 12.** Διακύμανση των επιπέδων του παράγοντα MPF κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

Το σύμπλοκο κυκλίνη B-cdc2 συμμετέχει και σε προστατευτικούς για το κύτταρο μηχανισμούς. Βλάβη του DNA από την επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας ή άλλους παράγοντες οδηγεί σε παραμονή του κυττάρου στη φάση G2. Επίσης, έχει δειχθεί ότι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 παίζει σημαντικό ρόλο στην επιμήκυνση του χρόνου παραμονής του κυττάρου στη φάση G2 μετά από βλάβη του DNA [350, 399, 400], αν και τα φυσιολογικά κύτταρα διαθέτουν και άλλους μηχανισμούς. Η p53

προκαλεί καταστολή στη φάση G2 μέσω αναστολής της p34<sup>cdc2</sup> η οποία απενεργοποιείται ταυτόχρονα από 3 μεταγραφικούς στόχους της p53, την p21<sup>waf1/cip1</sup>, την Gadd45 και την 14-3-3σ. Η αναστολή της p34<sup>cdc2</sup> από την p21<sup>waf1/cip1</sup> σχετίζεται με διακοπή της ενεργοποίησης από την CAK, ενώ η Gadd45 διαχωρίζει την p34<sup>cdc2</sup> από την κυκλίνη B. Η πρωτεΐνη 14-3-3 εκτός από την ανασταλτική της δράση στην p34<sup>cdc2</sup> προκαλεί επίσης συσσώρευση του συμπλόκου κυκλίνη B-cdc2 στο κυτταρόπλασμα. Η καταστολή του γονιδίου της κυκλίνης B και της p34<sup>cdc2</sup> από την p53 αποτελεί έναν ακόμα σημαντικό μηχανισμό [401].

Η βλάβη του DNA κινητοποιεί επίσης οδούς απενεργοποίησης της δραστηριότητας της p34<sup>cdc2</sup> ανεξάρτητες από την p53, όπως είναι η ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών Chk1 και Chk2 από τις κινάσες Atm και Atr. Έχει διαπιστωθεί ότι η Chk1 αναστέλλει άμεσα τη δραστηριότητα της Cdc25C και δημιουργεί θέση δέσμευσης για την πρωτεΐνη 14-3-3 μέσω φωσφορυλίωσης η οποία οδηγεί στην παραμονή της φωσφατάσης Cdc25C στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, η απενεργοποίηση της Plk1 μετά από βλάβη του DNA συμβάλλει και αυτή στην αναστολή της δραστηριότητας της Cdc25C. Οι κινάσες Chk1, Chk2, Atm και Atr προκαλούν ενεργοποίηση της p53 μέσω φωσφορυλίωσης και αναστολής της αλληλεπίδρασης με την mdm2. Τέλος, έχει διαπιστωθεί ότι η κινάση Atm φωσφορυλιώνει το BRCA1 το οποίο συμμετέχει στη διαδικασία επιδιόρθωσης μετά από βλάβη, του DNA [401, 402].

Επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων όπως οι ανθρακυκλίνες στο σύμπλοκο κυκλίνη B-cdc2 ερμηνεύει εν μέρει τουλάχιστον την κυτταροτοξικότητα των παραγόντων αυτών, αποτρέποντας την είσοδο των κυττάρων στη φάση M [403].

Ο καθοριστικός ρόλος της p34<sup>cdc2</sup> στην επαγωγή της μίτωσης καθιστά το μόριο αυτό έναν αξιόπιστο δείκτη πολλαπλασιασμού των κυττάρων [404]. Υψηλά επίπεδα της p34<sup>cdc2</sup> έχουν παρατηρηθεί σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, ιδιαίτερα σε νεοπλασματικούς ιστούς, ενώ κύτταρα που δε διαιρούνται έχουν χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα [404, 405]. Αν και υπερέκφραση της p34<sup>cdc2</sup> έχει διαπιστωθεί σε διάφορες νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές, ο πιθανός ρόλος της ως προγνωστικός παράγοντας παραμένει αμφίβολου. Η προγνωστική αξία της p34<sup>cdc2</sup> στο αδενοκαρκίνωμα του προστάτη και στο κακόηθες μελάνωμα έχει αναδειχθεί στη βιβλιογραφία [406, 407, 408], ενώ μελέτες σε άλλους τύπους καρκίνου έχουν αποτύχει να δείξουν ανάλογα αποτελέσματα [409, 410].

# **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1.1 Υλικό

Το υλικό απετέλεσαν 62 περιπτώσεις ασθενών με Πολλαπλό Μυέλωμα (ΠΜ), οι οποίες συγκεντρώθηκαν από τα αρχεία του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας και της Αιματολογικής Κλινικής του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η επιλογή των περιστατικών έγινε με την προϋπόθεση ότι υπήρχαν επαρκή κλινικό – εργαστηριακά στοιχεία, και επαρκές υλικό στην όστεομυελική βιοψία της διάγνωσης, εγκλεισμένο σε κύβους παραφίνης, ώστε να πραγματοποιηθεί εκτεταμένη ανοσοϊστοχημική μελέτη των περιστατικών.

### 1.2 Μέθοδοι

Από τους κύβους παραφίνης κάθε περίπτωσης ελήφθησαν ιστολογικές τομές πάχους 3-5 μm, και πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με τη μέθοδο της στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (Labeled StreptAvidin Biotin, LSAB). Οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν κατά την ανοσοϊστοχημική ανάλυση, αφορούσαν τον κυτταρικό κύκλο και ήταν : p16, Rb, Ki67, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη E, κυκλίνη D1, κυκλίνη D2 και κυκλίνη D3. Τα πρωτοταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, η πηγή και η αραίωσή τους, παρατίθενται στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1.** Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη

Αντίσωμα	Προέλευση	Κλώνος	Αραίωση
<b>p16</b>	Santa Cruz	Rabbit polyclonal, SC-1661	1:200
<b>Rb</b>	Merck	Mouse monoclonal, LM95.1	1:50
<b>Ki67</b>	Dako SA	Mouse monoclonal, MIB-1	1:75
<b>Cyclin A</b>	Novocastra	Mouse monoclonal, 6E6	1:10
<b>Cyclin B1</b>	Novocastra	Mouse monoclonal, 7A9	1:10
<b>Cyclin E</b>	Santa Cruz	Rabbit polyclonal, SC-481	1:200
<b>Cyclin D1</b>	Novocastra	Mouse monoclonal, DCS-6	1:10
<b>Cyclin D2</b>	Santa Cruz	Rabbit polyclonal SC,-181	1:600
<b>Cyclin D3</b>	Novocastra	Mouse monoclonal, DCS-22	1:10

### 1.2.1 Περιγραφή της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου

Χρησιμοποιήθηκε η κλασική τεχνική της στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB, Labeled StreptAbidin Biotin), η οποία πραγματοποιήθηκε με την χρήση του kit Lab Vision Corporation, UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Ready-To-Use).

■ **Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση:** Τα πλακίδια τοποθετήθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 60° C για 18 ώρες. Ακολούθησε προθέρμανση διαλύματος ξυλόλης για 30' σε κλίβανο σε θερμοκρασία 60° C. Στη συνέχεια, τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ξυλόλης και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο σε θερμοκρασία 60° C για 20'. Κατόπιν μεταφέρθηκαν σε διάλυμα ξυλόλης θερμοκρασίας δωματίου για 10'. Ακολούθησε η διαδικασία ενυδάτωσης των ιστολογικών τομών με εμβάπτισή τους για 30'x2 διαδοχικά σε κατιόντα οίνοπνεύματα (100%, 96%) και τέλος σε αποσταγμένο νερό.

■ **Αποκάλυψη αντιγόνου:** Πραγματοποιήθηκε έκπλυση των πλακιδίων με νερό βρύσης x3. Ακολούθησε προθέρμανση διαλύματος κιτρικού οξέως 10% (630 ml απεσταγμένο νερό και 70 ml κιτρικό οξύ, Buffer for Antigen Retrieval) σε φούρνο μικροκυμάτων για 3'. Στη συνέχεια, τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν στο παραπάνω διάλυμα και εφαρμόστηκαν 2 κύκλοι εντός φούρνου μικροκυμάτων σε ισχύ 300Watt επί 15' για κάθε κύκλο. Κατόπιν το διάλυμα με τα πλακίδια αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10', και ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων σε απεσταγμένο νερό x3.

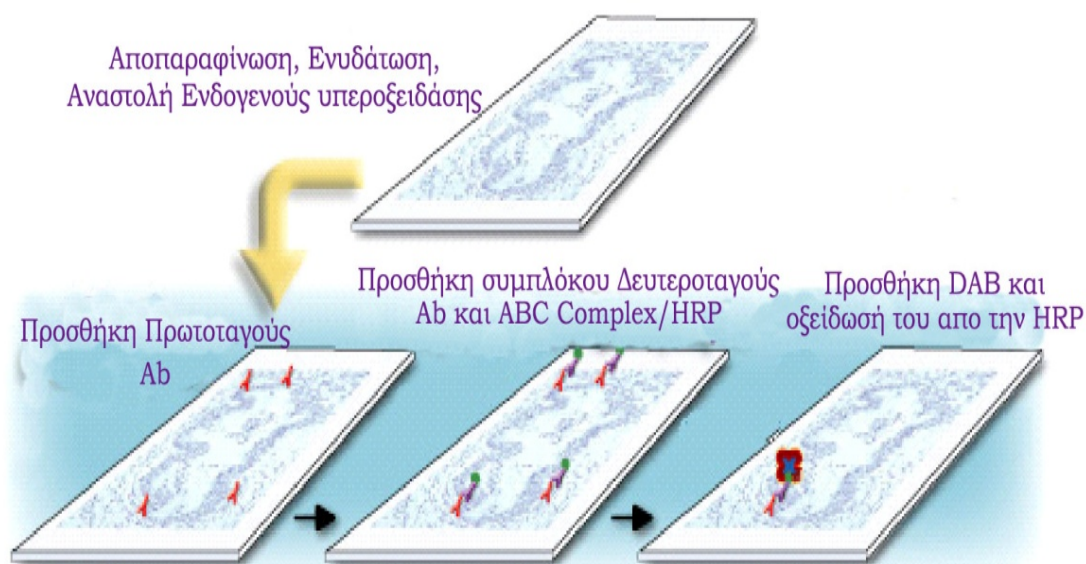
■ **Εξουδετέρωση ενδογενούς υπεροξειδάσης:** Στη συνέχεια προετοιμάστηκε διάλυμα εξουδετέρωσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης μετά από ανάμιξη 500μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) με 50 ml μεθανόλη. Τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα για 30' και τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα (εναλλακτικά, ενστάλαξη 2-3 σταγόνων από το Hydrogen Peroxide Block που παρέχεται έτοιμο στο Kit , και επώαση για 15').

■ **Προεπώαση:** Ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων με απεσταγμένο νερό x3 και με διάλυμα TBS για 5' (TBS: Tris Buffer Solution, 20g NaCl, 1.5g Tris σε 2.5 lt dH<sub>2</sub>O και pH 7.6). Στη συνέχεια γίνεται ενστάλαξη 2-3 σταγόνων Ultra V Block από το Kit και τα πλακίδια επώαστηκαν για 5' σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική χρώση (δέσμευση μη ειδικών αντιγονικών επιτόπων του ιστού).

■ **Επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα:** Μετά από έκπλυση των πλακιδίων σε TBS για 5', ακολούθησε ενστάλαξη του πρωτοταγούς αντισώματος σε αραιώση που έχει προσδιοριστεί μετά από δοκιμαστικές χρώσεις. Ακολούθησε ολονύκτια επώαση στο ψυγείο.

■ **Επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα:** Πραγματοποιήθηκε έκπλυση των πλακιδίων με διάλυμα TBS για 10' και στη συνέχεια επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα το οποίο ήταν βιοτινισμένο (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, Envision Kit, έτοιμο προς χρήση) για 30'. Ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων σε TBS για 10'. Στη συνέχεια προστέθηκε το ABC Complex/HRP (στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με το σύμπλοκο αβιδίνη-βιοτίνη-υπεροξειδάση) το οποίο επώαστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση σε TBS για 5'x2.

■ **Προσθήκη χρωμογόνων:** Για την προετοιμασία του χρωμογόνου αναμίχθηκαν 20μl DAB (χρωμογόνο, 3,3' τετραχλωρική διαμινοβενζιδίνη) σε 1ml από το αντίστοιχο Buffer. Τοποθετήθηκε διάλυμα χρωμογόνου (DAB 0.1% W/V) στις ιστολογικές τομές για 3', διαδικασία κατά την οποία το χρωμογόνο συνδέεται στο σύμπλοκο πρωτοταγούς αντισώματος-δευτεροταγούς αντισώματος-στρεπταβιδίνης και οξειδώνεται από την υπεροξειδάση (HRP) με αποτέλεσμα την χαρακτηριστική έντονη καφετή χρώση.



**Εικόνα 1.** Ανοσοϊστοχημική χρώση

■ Ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων σε απεσταγμένο νερό για 10', και επίχρωσή τους με αιματοξυλίνη 10% (προσθήκη 10ml αιματοξυλίνης 100% σε 90ml αποσταγμένου νερού) για 2'. Τέλος, οι ιστολογικές τομές ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης για 1'.

■ **Αφυδάτωση των ιστών:** Τέλος, τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν σε ανιόντα οينوπνεύματα (96%, 96%, 100%, 100%) και ξυλόλη, και η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την επικάλυψη των ιστολογικών τομών με καλυπτρίδες.

### 1.3 Αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων

Για την εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων, χρησιμοποιήθηκε αντικειμενικός φακός μεγάλης μεγέθυνσης (x 400) οπτικού μικροσκοπίου και μετρήθηκαν τα ανοσοθετικά για κάθε πρωτεΐνη κύτταρα σε 10 επιλεγμένα οπτικά πεδία που περιείχαν κύτταρα που παρουσίαζαν έκφραση της υπό μελέτης πρωτεΐνης. Ο αριθμός αυτός των ανοσοθετικών κυττάρων, διαιρέθηκε με το συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν και μετατράπηκε σε ποσοστιαία % αναλογία (θετικά κύτταρα/συνολικός αριθμός κυττάρων X100).

### 1.4 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό στατιστικής SPSS. Η επιλογή της στατιστικής μεθόδου έγινε με βάση τα ποιοτικά μεγέθη που αναλύθηκαν αλλά και με γνώμονα την αντικειμενική απόδοση των ερευνητικών ερωτημάτων που δημιουργήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης.

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι θετικές και αρνητικές περιπτώσεις για κάθε πρωτεΐνη, χρησιμοποιώντας ως κατώτερο όριο θετικότητας (cut off) το 10%. Προσδιορίστηκε ο αριθμός των ασθενών με ΠΜ κατά τύπο, στάδιο και φύλο. Προσδιορίστηκαν ακόμα οι περιπτώσεις ασθενών με οστική νόσο και με νεφρική νόσο κατά τη διάγνωση. Τέλος, προσδιορίστηκαν οι βασικές στατιστικές παράμετροι του ποσοστού διήθησης του μυελού των οστών και επιπλέον ορισμένων συνεχών μεταβλητών (μήνες επιβίωσης, ηλικία διάγνωσης, χρόνος προ έναρξης θεραπείας, εργαστηριακά ευρήματα κατά τη διάγνωση). Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν ο μέσος όρος (*mean value*), η τυπική απόκλιση της τιμής κάθε παραμέτρου (*SD, standard deviation*-δείκτης που προσδιορίζει πόσο διαφέρουν κατά μέσο όρο οι τιμές της μεταβλητής



από το μέσο όρο του συνόλου στο οποίο ανήκουν) καθώς και η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή (maximum- minimum values).

Διερευνήθηκε ενδεχόμενη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών ανά ζεύγη. Ο έλεγχος αυτός έγινε μελετώντας τις πρωτεΐνες ανά ζεύγη ως συνεχείς μεταβλητές και με την χρήση του στατιστικού συντελεστή συσχέτισης  $r$  κατά Spearman (Spearman's correlation coefficient, αριθμητικό μέτρο ή δείκτης του βαθμού της συσχέτισης μεταξύ δύο συνόλων τιμών). Σε αυτόν τον έλεγχο, όπως και στους άλλους ελέγχους, προσδιορίστηκε η στατιστική σημαντικότητα  $p$  των ευρημάτων.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε ενδεχόμενη συσχέτιση με έλεγχο  $\chi^2$ , μεταξύ της έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών και του τύπου ΠΜ, του σταδίου ΠΜ, της ύπαρξης οστικής νόσου κατά τη διάγνωση, της ύπαρξης νεφρικής νόσου κατά τη διάγνωση, του ποσοστού διήθησης της νόσου κατά τη διάγνωση, της ηλικίας διάγνωσης, του φύλου των ασθενών με ΠΜ, του χρόνου που παρήλθε από τη διάγνωση μέχρι την χορήγηση θεραπείας 1ης γραμμής (time to first treatment), και εργαστηριακών ευρημάτων κατά τη διάγνωση (Ht, Hb, WBC, PLTs, TKE, CRP, urea, cre, Tpr, Alb, LDH,  $\beta_2\mu$ , Ca).

Ακολούθησε μελέτη με τη στατιστική μέθοδο Kaplan Meier, για πιθανή συσχέτιση του χρόνου επιβίωσης των ασθενών με ΠΜ με την έκφραση των υπό μελέτη πρωτεϊνών.

## 2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 2.1. Κλινικά χαρακτηριστικά κατά τη διάγνωση των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα.

Από το σύνολο των περιστατικών που μελετήθηκαν, προσδιορίστηκε ο αριθμός των ασθενών με ΠΜ κατά τύπο, στάδιο και φύλο (Πίνακες 2, 3, 4). Προσδιορίστηκαν ακόμα οι περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ, που κατά τη διάγνωση εμφάνιζαν ή δεν εμφάνιζαν οστική νόσο και νεφρική νόσο (Πίνακες 5, 6). Επίσης προσδιορίστηκαν το ποσοστό διήθησης των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων στον μυελό των οστών κατά τη διάγνωση, η ηλικία διάγνωσης των ασθενών, οι μήνες επιβίωσης τους από τη διάγνωση και ο χρόνος προ έναρξης πρώτης θεραπείας (Πίνακας 7).

**Πίνακας 2.** Τύπος πολλαπλού μυελώματος των ασθενών που μελετήθηκαν.

ΤΥΠΟΣ ΠΜ	Αριθμός περιπτώσεων	Ποσοστό (%) αριθμού περιπτώσεων
IgG	45/62	72,5
IgA	11/62	17,8
IgM	1/62	1,6
Ελαφρών αλύσεων	4/62	6,5
Μη εκκριτικό	1/62	1,6

Από το σύνολο των περιστατικών που μελετήθηκαν, IgG τύπου ήταν 45/62 (72,5%), IgA τύπου 11/62 (17,8%), IgM τύπου 1/62 (1,6%), ελαφρών αλύσεων 4/62 (6,5%) και μη εκκριτικό μυέλωμα 1/62 (1,6%) (Πίνακας 2). Από το υλικό αυτό, μόνο οι περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ τύπου IgG και IgA αξιοποιήθηκαν στατιστικά. Οι υπόλοιποι πληθυσμοί ήταν πολύ μικροί για να μπορούν να εξαχθούν στατιστικά σημαντικά συμπεράσματα.

**Πίνακας 3.** Στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα.

ΣΤΑΔΙΟ ΠΜ	Αριθμός περιπτώσεων	Ποσοστό (%) αριθμού περιπτώσεων
A		
IA	21/62	34
IB	0/62	0
IIA	23/62	37
IIB	2/62	3
IIIA	10/62	16
IIIB	6/62	10
B		
I	21/62	34
II	25/62	40
III	16/62	26

Η σταδιοποίηση των ασθενών με ΠΜ έγινε σύμφωνα με την σταδιοποίηση των Durie και Salmon. Προκειμένου να αυξηθεί το πλήθος των περιστατικών προς στατιστική μελέτη, αυθαίρετα, έγινε και δεύτερη σταδιοποίηση των ασθενών κατά την οποία οι υποομάδες IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB ενοποιήθηκαν σε I, II και III, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με την πρώτη σταδιοποίηση, από το σύνολο των περιστατικών που μελετήθηκαν, IA ήταν 21/62 (34%), IB 0/62 (0%), IIA 23/62 (37%), IIB 2/62 (3%), IIIA 10/62 (16%) και IIIB 6/62 (10%) (Πίνακας 3). Από το υλικό αυτό, μόνο οι περιπτώσεις ασθενών σταδίου IA, IIA και IIIA αξιοποιήθηκαν στατιστικά, καθώς οι υπόλοιποι πληθυσμοί ήταν πολύ μικροί για να μπορούν να εξαχθούν στατιστικά

σημαντικά συμπεράσματα. Με τη δεύτερη σταδιοποίηση, από το σύνολο των περιστατικών που μελετήθηκαν, I ήταν 21/62 (34%), II 25/62 (40%) και III 16/62 (26%) (Πίνακας 3).

**Πίνακας 4.** Φύλο των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα.

ΦΥΛΟ	Αριθμός περιπτώσεων	Ποσοστό (%) αριθμού περιπτώσεων
άντρες	<b>30/62</b>	<b>48</b>
γυναίκες	<b>32/62</b>	<b>52</b>

Από το σύνολο των περιστατικών που μελετήθηκαν, 30/62 (48%) ήταν άντρες και 32/62 (52%) γυναίκες (Πίνακας 4).

**Πίνακας 5.** Παρουσία οστικής νόσου στους ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα.

ΟΣΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ	Αριθμός περιπτώσεων	Ποσοστό (%) αριθμού περιπτώσεων
ΝΑΙ	<b>46/62</b>	<b>74</b>
ΟΧΙ	<b>16/62</b>	<b>26</b>

**Πίνακας 6.** Παρουσία νεφρικής νόσου στους ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα.

ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ	Αριθμός περιπτώσεων	Ποσοστό (%) αριθμού περιπτώσεων
ΝΑΙ	<b>36/61</b>	<b>41</b>
ΟΧΙ	<b>25/61</b>	<b>59</b>

Από το σύνολο των περιστατικών που μελετήθηκαν, 46/62 (74%) εμφάνιζαν οστική νόσο και 16/62 (26%) δεν εμφάνιζαν (Πίνακας 5). Ως προς την ύπαρξη ή μη

νεφρικής νόσου, 36/61 (41%) εμφάνιζαν νεφρική νόσο και 25/61 (59%) δεν εμφάνιζαν (Πίνακας 6).

**Πίνακας 7.** Ποσοστό διήθησης στην οστεομυελική βιοψία, ηλικία διάγνωσης, χρόνος επιβίωσης και χρόνος προ έναρξης πρώτης θεραπείας των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα .

	Αριθμός περιπτώσεων	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
Διήθηση %	<b>62</b>	<b>52,3</b>	<b>23,50</b>	<b>10</b>	<b>90</b>
Ηλικία διάγνωσης	<b>62</b>	<b>68,2</b>	<b>10,01</b>	<b>41</b>	<b>83</b>
Μήνες επιβίωσης από την διάγνωση	<b>62</b>	<b>28,6</b>	<b>19,46</b>	<b>1</b>	<b>94,</b>
Μήνες προ έναρξης 1ής θεραπείας	<b>62</b>	<b>4,8</b>	<b>12,46</b>	<b>0</b>	<b>67</b>

Το ποσοστό διήθησης από τη νόσο κατά τη διάγνωση, προσδιορίστηκε και στις 62 περιπτώσεις ασθενών που μελετήθηκαν (Πίνακας 7). Το ποσοστό διήθησης προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο στο 52.3% των υπό μελέτη ασθενών. Η τυπική απόκλιση του ποσοστού διήθησης ήταν 23,5%. Η ελάχιστη τιμή του ποσοστού διήθησης ήταν 10%, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 90%.

Η ηλικία διάγνωσης προσδιορίστηκε και στις 62 περιπτώσεις ασθενών που μελετήθηκαν (Πίνακας 7). Η ηλικία διάγνωσης προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο στα 68,2 έτη. Η τυπική απόκλιση της ηλικίας διάγνωσης ήταν 10,01 έτη. Η ελάχιστη τιμή της ηλικίας διάγνωσης ήταν 41 έτη, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 83 έτη.

Οι μήνες επιβίωσης από τη διάγνωση προσδιορίστηκαν και στις 62 περιπτώσεις ασθενών που μελετήθηκαν (Πίνακας 7). Οι μήνες επιβίωσης από τη διάγνωση προσδιορίστηκαν κατά μέσο όρο στους 28,6 μήνες. Η τυπική απόκλιση των μηνών επιβίωσης από τη διάγνωση ήταν 19,46 μήνες. Η ελάχιστη τιμή των μηνών επιβίωσης από τη διάγνωση ήταν 1 μήνας, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 94 μήνες.

Οι μήνες προ έναρξης πρώτης θεραπείας από τη διάγνωση προσδιορίστηκαν και στις 62 περιπτώσεις ασθενών που μελετήθηκαν (Πίνακας 7). Οι μήνες προ έναρξης πρώτης θεραπείας προσδιορίστηκαν κατά μέσο όρο στους 4,8 μήνες. Η τυπική απόκλιση των μηνών προ έναρξης πρώτης θεραπείας ήταν 12,46 μήνες. Η ελάχιστη τιμή των μηνών προ έναρξης πρώτης θεραπείας από τη διάγνωση ήταν 0 μήνας, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 67 μήνες.

## 2.2. Εργαστηριακά ευρήματα κατά τη διάγνωση των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα .

Στο σύνολο των περιστατικών που μελετήθηκαν, προσδιορίστηκαν οι βασικές στατιστικές παράμετροι διαφόρων εργαστηριακών ευρημάτων κατά τη διάγνωση (Πίνακας 8).

**Πίνακας 8.** Εργαστηριακά ευρήματα κατά τη διάγνωση των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα.

ε/ε	Αριθμός περιπτώσεων	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
Ht	61	33,3	5,11	24	47,6
Hb	62	11	1,77	7,6	16,4
WBC	62	6068,7	2197	2610	12800
PLT	62	215209	63528	81000	371000
TKE	56	76,3	40,43	11	165
CRP	22	37,2	71,72	1	282
URE	59	52,5	35,53	2,1	232
CRE	61	1,4	1,52	0,6	11,4
TPR	59	10,4	13,12	3,3	108
ALB	61	3,5	0,78	0,9	6,7
LDH	60	367,8	209,36	3,5	1522
B2M	57	4141	3385	101	18398
Ca	61	9,82	1,14	7,5	18

Ο αιματοκρίτης (Ht) προσδιορίστηκε σε 61 από τις 62 περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν (Πίνακας 8). Η τιμή του Ht προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο στο 33,3%. Η τυπική απόκλιση του Ht ήταν 5,11%. Η ελάχιστη τιμή του Ht κατά τη διάγνωση ήταν 24%, ενώ η μέγιστη ήταν 47,6%.

Η αιμοσφαιρίνη (Hb) προσδιορίστηκε και στις 62 περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν (Πίνακας 8). Η τιμή της Hb προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο στα 11 g/dl. Η τυπική απόκλιση της Hb ήταν 1,77 g/dl. Η ελάχιστη τιμή της Hb κατά τη διάγνωση ήταν 7,6 g/dl, ενώ η μέγιστη ήταν 16,4 g/dl.

Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) προσδιορίστηκε και στις 62 περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν (Πίνακας 8). Ο αριθμός των WBC προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο σε 6068,7. Η τυπική απόκλιση του αριθμού των WBC ήταν 2197. Η ελάχιστη τιμή του αριθμού των WBC ήταν 2610, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 12800.

Ο αριθμός των αιμοπεταλίων (PLT) προσδιορίστηκε και στις 62 περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν (Πίνακας 8). Ο αριθμός των PLT προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο σε 215209. Η τυπική απόκλιση του αριθμού των PLT ήταν 63528. Η ελάχιστη τιμή του αριθμού των PLT ήταν 81000, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 371000.

Η ταχύτητα καθίζησης ερυθρών (ΤΚΕ) προσδιορίστηκε σε 56 από τις 62 περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν (Πίνακας 8). Η ΤΚΕ προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο σε 76,3 mm/h. Η τυπική απόκλιση της ΤΚΕ ήταν 40,43 mm/h. Η ελάχιστη τιμή της ΤΚΕ ήταν 11mm/h, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 165 mm/h.

Η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) προσδιορίστηκε σε 22 από τις 62 περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν (Πίνακας 8). Η CRP προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο σε 37,2 mg/dl. Η τυπική απόκλιση της CRP ήταν 71,72 mg/dl. Η ελάχιστη τιμή της CRP ήταν 1mg/dl, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 282 mg/dl.

Η τιμή της ουρίας (URE) προσδιορίστηκε σε 59 από τις 62 περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν (Πίνακας 8). Η τιμή της ουρίας προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο σε 52,5 mg/dl. Η τυπική απόκλιση της ουρίας ήταν 35,53 mg/dl. Η ελάχιστη τιμή της ουρίας ήταν 2,1 mg/dl, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 232 mg/dl.

Η τιμή της κρεατινίνης (CRE) προσδιορίστηκε σε 61 από τις 62 περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν (Πίνακας 8). Η τιμή της κρεατινίνης προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο σε 1,4 mg/dl. Η τυπική απόκλιση της κρεατινίνης ήταν 1,52 mg/dl. Η ελάχιστη τιμή της κρεατινίνης ήταν 0,6 mg/dl, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 11,4 mg/dl.

Η τιμή των ολικών λευκωμάτων (TPR) προσδιορίστηκε σε 59 από τις 62 περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν (Πίνακας 8). Η τιμή των TPR προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο σε 10,4 g/dl. Η τυπική απόκλιση των TPR ήταν 13,12 g/dl. Η ελάχιστη τιμή των TPR ήταν 3,3 g/dl, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 109 g/dl.

Η τιμή της αλβουμίνης (ALB) προσδιορίστηκε σε 61 από τις 62 περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν (Πίνακας 8). Η τιμή της αλβουμίνης προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο σε 3,5 g/dl. Η τυπική απόκλιση της αλβουμίνης ήταν 0,78 g/dl. Η ελάχιστη τιμή της αλβουμίνης ήταν 0,9 g/dl, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 6,7 g/dl.

Η τιμή της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) προσδιορίστηκε σε 60 από τις 62 περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν (Πίνακας 8). Η τιμή της LDH προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο σε 367,8 U/L. Η τυπική απόκλιση της LDH ήταν 209,36 U/L. Η ελάχιστη τιμή της LDH ήταν 3,5 U/L, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 1522 U/L.

Η τιμή της β2 μικροσφαιρίνης (B2M) προσδιορίστηκε σε 57 από τις 62 περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν (Πίνακας 8). Η τιμή της B2M προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο σε 4141 μg/L. Η τυπική απόκλιση της B2M ήταν 3385 μg/L. Η ελάχιστη τιμή της B2M ήταν 101 μg/L, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 18398 μg/L.

Η συγκέντρωση ασβεστίου (Ca) στο αίμα, προσδιορίστηκε σε 61 από τις 62 περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν (Πίνακας 8). Η συγκέντρωση ασβεστίου στο αίμα προσδιορίστηκε κατά μέσο όρο σε 9,82 mg/dl. Η τυπική απόκλιση της συγκέντρωσης ασβεστίου στο αίμα ήταν 1,14 mg/dl. Η ελάχιστη τιμή της συγκέντρωσης ασβεστίου στο αίμα ήταν 7,5 mg/dl, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 18 mg/dl.



**2.3.α. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3, σε οστεομυελικές βιοψίες των οστών ασθενών με ΠΜ.**

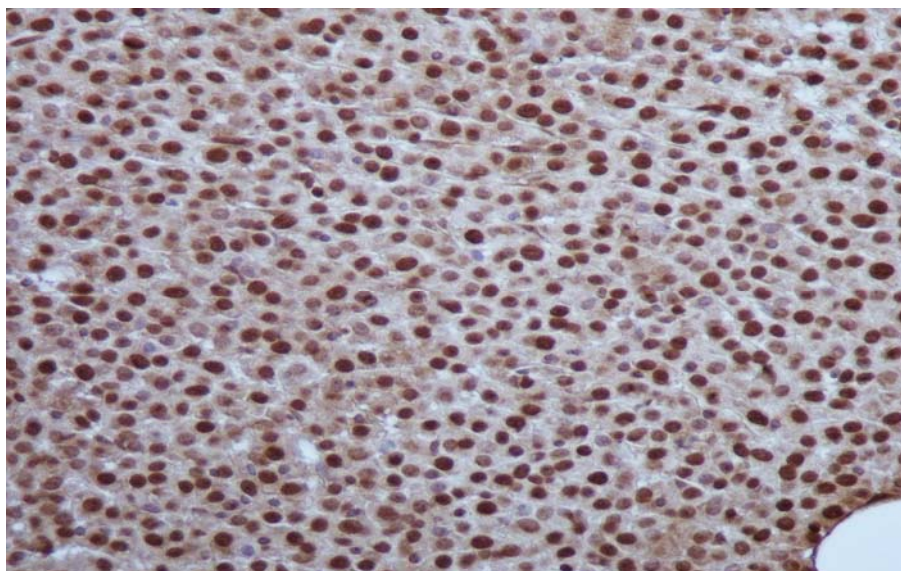
Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2 και κυκλίνης D3 ήταν πυρηνική. Η έκφραση της κυκλίνης A ήταν πυρηνική και εν μέρει διάχυτη κυταροπλασματική. Η κυκλίνη B1 είχε μηδενική ανοσοϊστοχημική έκφραση στην πλειοψηφία των δειγμάτων. Στα λίγα κύτταρα που εκφράζονταν, αυτή ήταν κυταροπλασματική και εν μέρει πυρηνική.

Οι βασικές στατιστικές παράμετροι των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών της μελέτης αυτής παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 9.

**Πίνακας 9.** Βασικές στατιστικές παράμετροι της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, κυκλίνης D3, σε οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα.

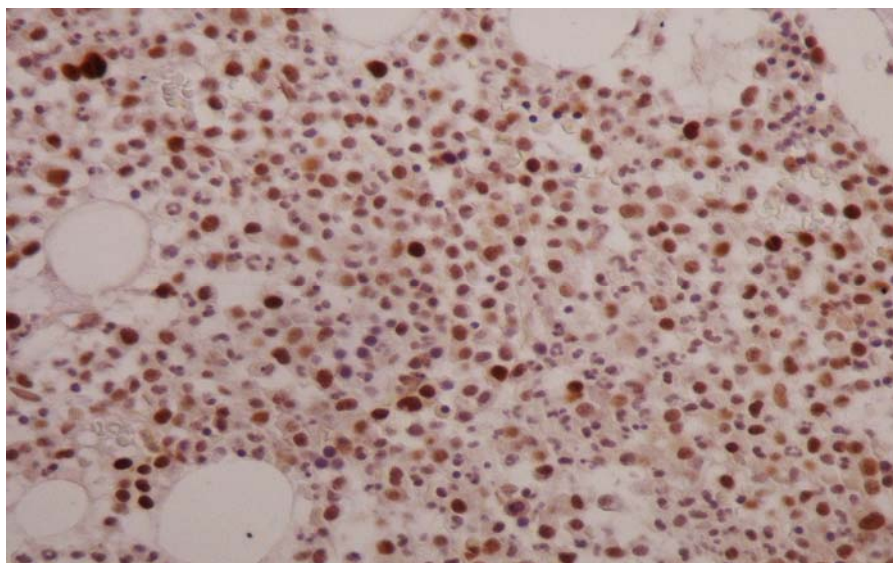
	Αριθμός περιπτώσεων	Μέσος όρος (%)	Διάμεση τιμή (%)	Τυπική απόκλιση (%)	Ελάχιστη τιμή (%)	Μέγιστη τιμή (%)
p16	62	38,56	35,0000	32,59570	0,00000	90,0000
Rb	62	35,2	27,50000	29,36103	0,00000	95,0000
Ki67	62	16,79	8,00000	18,83765	1,00000	80,0000
Cyclin A	62	8,62	7,00000	9,16199	1,00000	55,0000
Cyclin B1	62	0,98	0,00000	2,03649	0,00000	12,0000
Cyclin E	37	33,91	25,00000	28,74638	0,00000	90,0000
Cyclin D1	62	20,11	23,49	33,63161	0,00000	100,0000
Cyclin D2	62	16,61	4,00000	23,58129	0,00000	80,0000
Cyclin D3	62	4,24	1,00000	12,50008	0,00000	95,0000

Η έκφραση της πρωτεΐνης p16 εκτιμήθηκε και στις 62 περιπτώσεις ασθενών. (Εικ. 2). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 38.56% των πλασματοκυττάρων των υπό μελέτη περιπτώσεων. Η διάμεση τιμή της έκφρασης ήταν 35%. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 32.59%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη ήταν 90%.



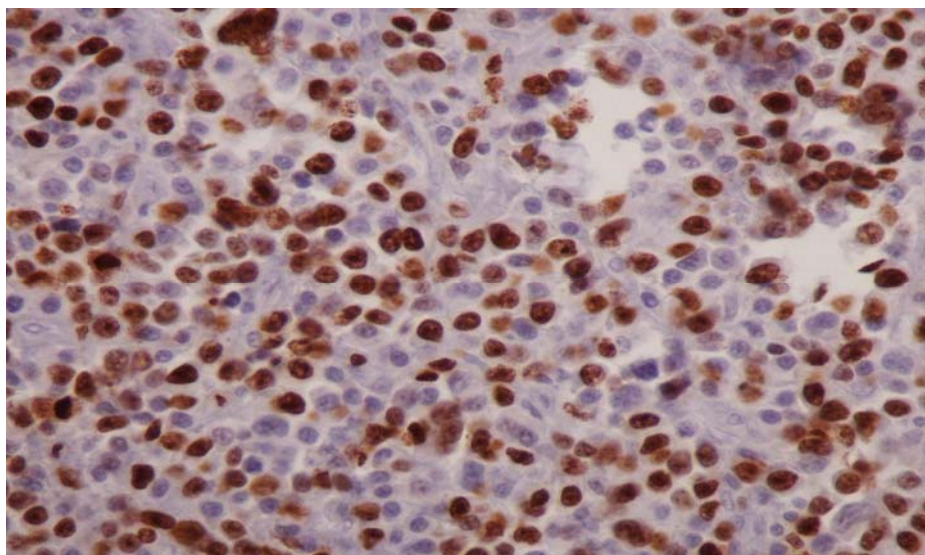
**Εικόνα 2.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης **p16** (x400) σε οστεομυελική βιοψία.

Η έκφραση της πρωτεΐνης Rb εκτιμήθηκε και στις 62 περιπτώσεις (Εικ. 3). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 35.2% των πλασματοκυττάρων των υπό μελέτη περιπτώσεων. Η διάμεση τιμή της έκφρασης ήταν 27.5%. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 29.36%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη ήταν 95%.



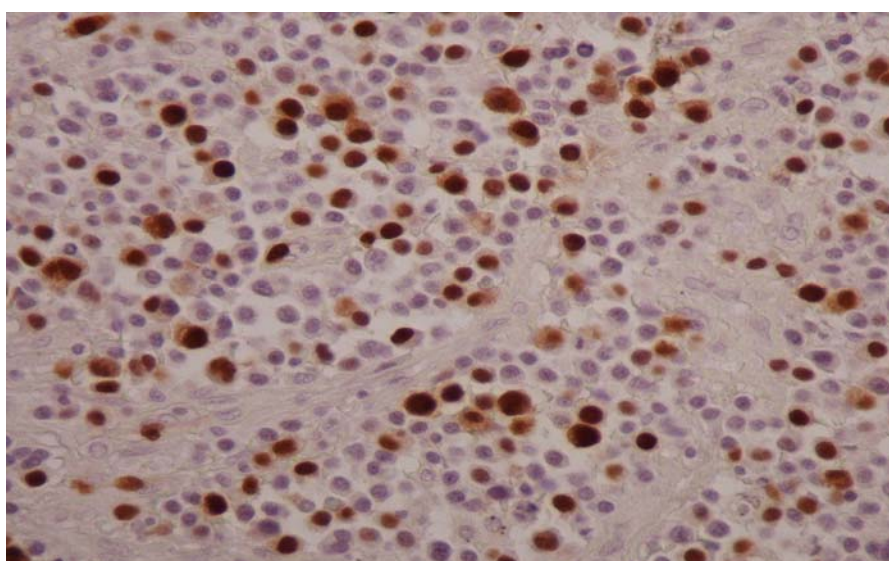
**Εικόνα 3.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης **Rb** (x400) σε οστεομυελική βιοψία.

Η έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 εκτιμήθηκε και στις 62 περιπτώσεις (Εικ. 4). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 16.79% των πλασματοκυττάρων των υπό μελέτη περιπτώσεων. Η διάμεση τιμή της έκφρασης ήταν 8%. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 18.83%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 1%, ενώ η μέγιστη ήταν 80%.



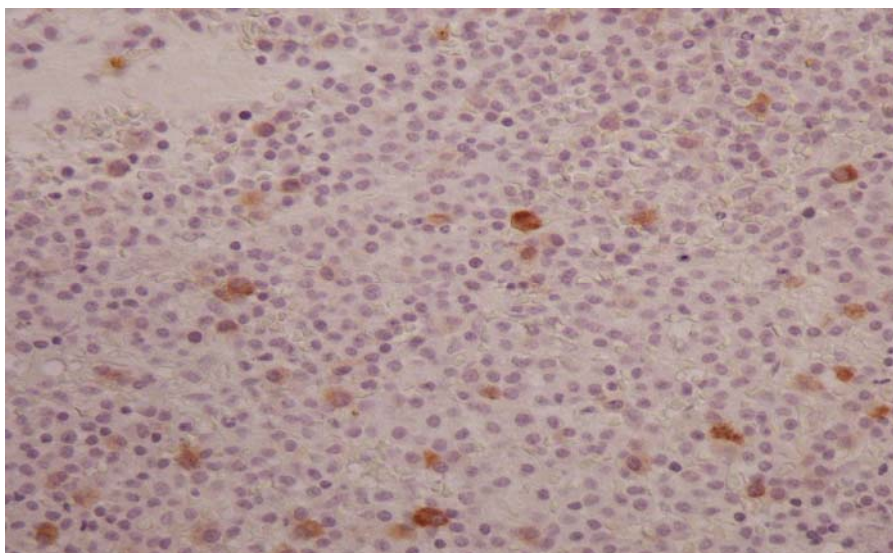
**Εικόνα 4.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 (x400) σε οστεομυελική βιοψία.

Η έκφραση της κυκλίνης A εκτιμήθηκε και στις 62 (Εικ. 5). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 8.62% των πλασματοκυττάρων των υπό μελέτη περιπτώσεων. Η διάμεση τιμή της έκφρασης ήταν 7%. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 9.16%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 1%, ενώ η μέγιστη ήταν 55%.



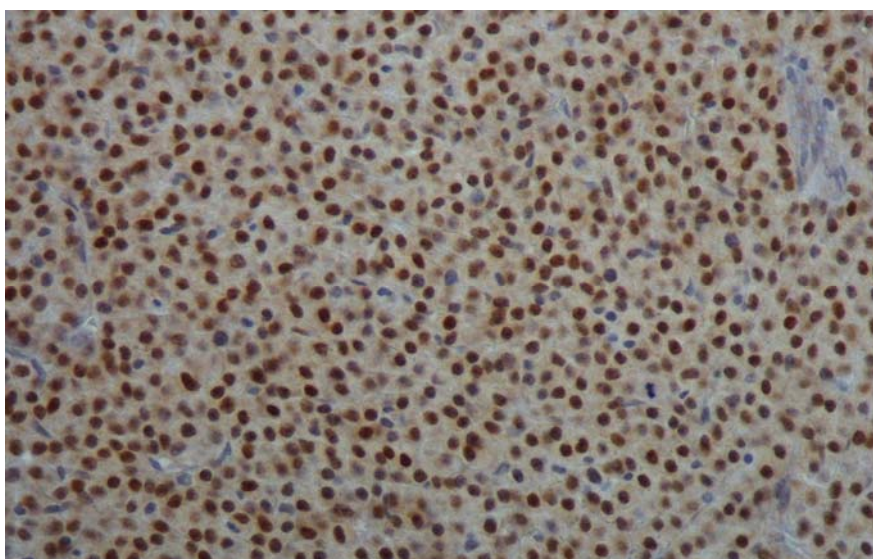
**Εικόνα 5.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης A (x400) σε οστεομυελική βιοψία.

Η έκφραση της κυκλίνης B1 εκτιμήθηκε και στις 62 περιπτώσεις (Εικ. 6). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 0.98% των πλασματοκυττάρων των υπό μελέτη περιπτώσεων. Η διάμεση τιμή της έκφρασης ήταν 0%. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 2.03%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη ήταν 12%.



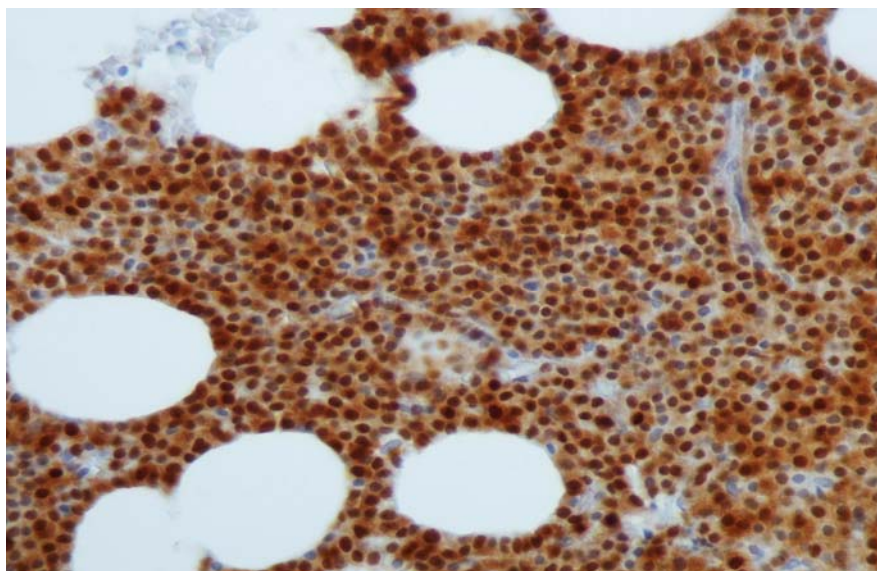
**Εικόνα 6.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης B1 (x400) σε οστεομυελική βιοψία.

Η έκφραση της κυκλίνης E εκτιμήθηκε και σε 37 από τις 62 (Εικ. 7). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 33.91% των πλασματοκυττάρων των υπό μελέτη περιπτώσεων. Η διάμεση τιμή της έκφρασης ήταν 25%. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 28.74%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη ήταν 90%.



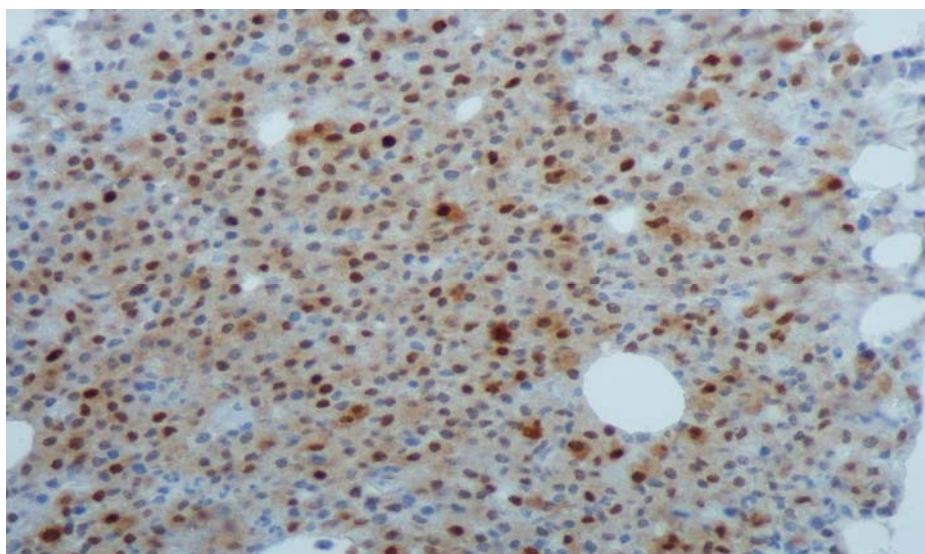
**Εικόνα 7.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης E (x400) σε οστεομυελική βιοψία.

Η έκφραση της κυκλίνης D1 εκτιμήθηκε και στις 62 περιπτώσεις (Εικ. 8). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 20.11% των πλασματοκυττάρων των υπό μελέτη περιπτώσεων. Η διάμεση τιμή της έκφρασης ήταν 23,49%. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 33.63%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη ήταν 100%.



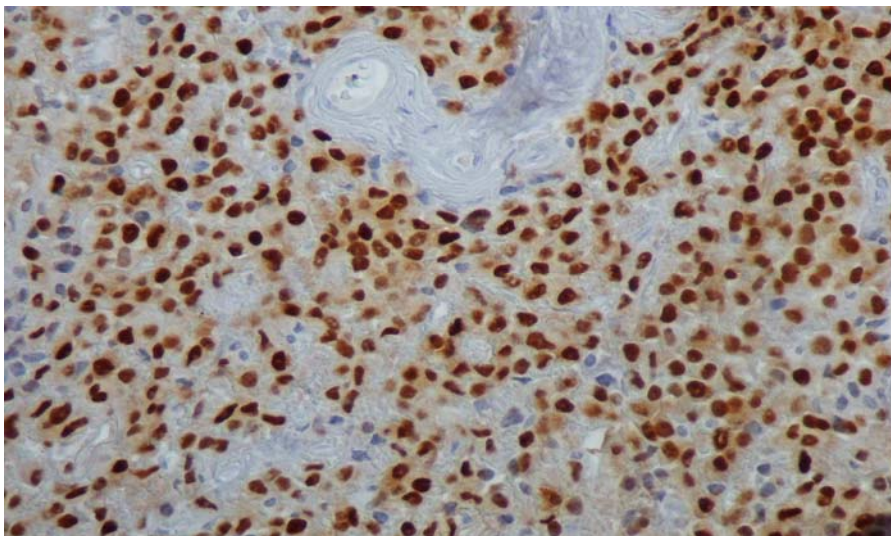
**Εικόνα 8.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης D1 (x400) σε οστεομυελική βιοψία.

Η έκφραση της κυκλίνης D2 εκτιμήθηκε και στις 62 περιπτώσεις (Εικ. 9). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 16.61% των πλασματοκυττάρων των υπό μελέτη περιπτώσεων. Η διάμεση τιμή της έκφρασης ήταν 4%. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 23.58%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη ήταν 80%.



**Εικόνα 9.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης D2 (x40) σε οστεομυελική βιοψία.

Η έκφραση της κυκλίνης D3 εκτιμήθηκε και στις 62 περιπτώσεις (Εικ. 10). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 4.24% των πλασματοκυττάρων των υπό μελέτη περιπτώσεων. Η διάμεση τιμή της έκφρασης ήταν 1%. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 12.5%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη ήταν 95%.



**Εικόνα 10.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης D3 (x40) σε οστεομυελική βιοψία.

**2.3.β. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3, σε οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα.**

Χρησιμοποιώντας ως κατώτερο όριο έκφρασης το 10% των πλασματοκυττάρων, διαπιστώθηκε ότι οι θετικές περιπτώσεις για την έκφραση της πρωτεΐνης p16 ήταν 41/62 (66%), για την Rb ήταν 42/62 (68%), για την Ki67 ήταν 29/62 (47%), για την κυκλίνη A ήταν 18/62 (29%), για την κυκλίνη B1 ήταν 1/62 (1,5%), για την κυκλίνη E ήταν 28/37 (76%), για την κυκλίνη D1 ήταν 21/62 (34%), για την κυκλίνη D2 ήταν 26/62 (42%) και για την κυκλίνη D3 ήταν 5/62 (8%) (Πίνακας 10).

**Πίνακας 10.** Έκφραση (>10% των κυττάρων) των πρωτεϊνών p16, p21, p27, p53, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, κυκλίνης D3, στο μυελό των οστών.

	<b>Αριθμός περιπτώσεων</b>	<b>Αριθμός θετικών περιπτώσεων</b>	<b>Ποσοστό (%) θετικών περιπτώσεων</b>	<b>Αριθμός αρνητικών περιπτώσεων</b>	<b>Ποσοστό (%) αρνητικών περιπτώσεων</b>
p16	62	41	66	21	34
Rb	62	42	68	20	32
Ki67	62	29	47	33	53
Cyclin A	62	18	29	44	71
Cyclin B1	62	1	1,5	61	98,5
Cyclin E	37	28	76	9	24
Cyclin D1	62	21	34	41	66
Cyclin D2	62	26	42	36	58
Cyclin D3	62	5	8	57	92

**2.4. Συσχετίσεις της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 σε οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα (συνεχείς μεταβλητές).**

Οι πιθανές συσχετίσεις της έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3, προσδιορίστηκαν υπολογίζοντας τους συντελεστές συσχέτισης  $r$  κατά Spearman (συνεχείς μεταβλητές). Ο συντελεστής αυτός αποτελεί ένα αριθμητικό μέτρο του βαθμού συσχέτισης μεταξύ δύο παραμέτρων. Επομένως δείχνει εάν η έκφραση της μίας πρωτεΐνης επηρεάζει την έκφραση της άλλης. Ταυτόχρονα, και για κάθε συντελεστή συσχέτισης υπολογίστηκε και η στατιστική σημαντικότητά  $p$ .

Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11).

**Πίνακας 11.** Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν σε οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα (συνεχείς μεταβλητές).

Ζεύγη παραμέτρων με στατιστικά σημαντική συσχέτιση	Αριθμός περιστατικών	Συντελεστής συσχέτισης $r$	Τιμή $p$
p16 & Rb	62	0,536	0,000007
p16 & Ki67	62	0,453	0,0002
p16 & cyclin A	62	0,500	0,00003
p16 & cyclin D2	62	0,255	0,045
Rb & ki67	62	0,412	0,0008
Rb & cyclin A	62	0,520	0,00001
Rb & cyclin B1	62	0,285	0,024
Ki67 & cyclin A	62	0,682	0,000
Ki67 & cyclin D2	62	0,385	0,0019
cyclin A & cyclin B1	62	0,266	0,036
cyclin B1 & cyclin E	37	0,334	0,043



Η μελέτη κατά Spearman έδειξε :

1. Η έκφραση της πρωτεΐνης p16, συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών Rb ( $r=0.536$ ,  $p=0.000007$ ), Ki67 ( $r=0.453$ ,  $p=0.0002$ ), κυκλίνης A ( $r=0.500$ ,  $p=0.00003$ ) και κυκλίνης D2 ( $r=0.255$ ,  $p=0.045375$ ) (Πίνακας 11).

2. Η έκφραση της πρωτεΐνης Rb, συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών p16 ( $r=0.536$ ,  $p=0.000007$ ), Ki67 ( $r=0.412$ ,  $p=0.0008$ ), κυκλίνης A ( $r=0.520$ ,  $p=0.00001$ ) και κυκλίνης B1 ( $r=0.285$ ,  $p=0.024$ ) (Πίνακας 11).

3. Η έκφραση της πρωτεΐνης Ki67, συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών p16 ( $r=0.453$ ,  $p=0.0002$ ), Rb ( $r=0.412$ ,  $p=0.0008$ ), κυκλίνης A ( $r=0.682$ ,  $p=0.000000$ ) και κυκλίνης D2 ( $r=0.385$ ,  $p=0.0019$ ) (Πίνακας 11).

4. Η έκφραση της κυκλίνης A, συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών p16 ( $r=0.500$ ,  $p=0.00003$ ), Rb ( $r=0.520$ ,  $p=0.00001$ ) και κυκλίνης B1 ( $r=0.266$ ,  $p=0.036$ ) (Πίνακας 11).

5. Η έκφραση της κυκλίνης B1, συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών Rb ( $r=0.285$ ,  $p=0.024$ ), κυκλίνης A ( $r=0.266$ ,  $p=0.036$ ) και κυκλίνης E ( $r=0.334$ ,  $p=0.043$ ) (Πίνακας 11). Ωστόσο πρέπει να τονισθεί το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις που μελετήθηκαν, η έκφραση της συγκεκριμένης κυκλίνης ήταν ελάχιστη έως και μηδενική.

6. Η έκφραση της κυκλίνης E, συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση της κυκλίνης B1 ( $r=0.334$ ,  $p=0.043$ ) (Πίνακας 11).

7. Η έκφραση της κυκλίνης D1, δεν συσχετίσθηκε αρνητικά ή θετικά με κανέναν από τους υπόλοιπους δείκτες.

8. Η έκφραση της κυκλίνης D2, συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών p16 ( $r=0.255$ ,  $p=0.045375$ ), και Ki67 ( $r=0.385$ ,  $p=0.0019$ ) (Πίνακας 11).

9. Η έκφραση της κυκλίνης D3, δεν συσχετίσθηκε αρνητικά ή θετικά με κανέναν από τους υπόλοιπους δείκτες.

**2.5. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 σε οστεομυελικές βιοψίες, και κλινικο-παθολογοανατομικών παραμέτρων.**

Οι πιθανές συσχετίσεις της έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 στο μυελό των οστών και του τύπου του ΠΜ, του σταδίου του ΠΜ, του φύλου των ασθενών, της παρουσίας ή μη οστικής και νεφρικής νόσου, του ποσοστού διήθησης του μυελού των οστών κατά τη διάγνωση, της ηλικίας διάγνωσης και του χρόνου προ έναρξης της πρώτης θεραπείας, προσδιορίστηκαν με εφαρμογή του ελέγχου  $\chi^2$ .

Οι πιθανές συσχετίσεις της έκφρασης των πρωτεϊνών στα ΠΜ που μελετήθηκαν, και του χρόνου επιβίωσης των ασθενών από τη διάγνωση της νόσου, προσδιορίστηκαν με τη στατιστική μέθοδο Kaplan Meier.

**2.5.α. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 σε οστεομυελικές βιοψίες, και του τύπου του πολλαπλού μυελώματος.**

Δεν προέκυψαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών, και του τύπου του ΠΜ.

**2.5.β. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, p21, p27, p53, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 σε οστεομυελικές βιοψίες, του σταδίου του πολλαπλού μυελώματος και του φύλου των ασθενών.**

Δεν προέκυψαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών, του σταδίου κατά τη διάγνωση και του φύλου των ασθενών.

**2.5.γ. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 σε οστεομυελικές βιοψίες, και της ύπαρξης ή μη οστικής και νεφρικής νόσου στους ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα.**

Η ανάλυση (έλεγχος  $\chi^2$ ) της έκφρασης των πρωτεϊνών (θετικές – αρνητικές) με την ύπαρξη ή μη οστικής νόσου και νεφρικής νόσου, έδειξε έκφραση (>10%) της κυκλίνης D2 σε 23/26 περιπτώσεις (88,5%) ασθενών χωρίς οστική νόσο και σε 3/26 περιπτώσεις (11,5%) ασθενών με οστική νόσο. Δηλαδή ασθενείς με έκφραση κυκλίνης D2, παρουσιάζουν στατιστικά μικρότερη συχνότητα εμφάνισης οστικής νόσου. Η στατιστική σημαντικότητα του ελέγχου αυτού ήταν  $p=0,02705$  (Πίνακας 12). Από την περαιτέρω ανάλυση δεν προέκυψαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

**Πίνακας 12.** Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D2 και της ύπαρξης ή μη οστικής νόσου (έλεγχος  $\chi^2$ ,  $p=0,02705$ ).

	Ασθενείς χωρίς οστική νόσο	Ασθενείς με οστική νόσο	Συνολικός Αρ. περιπτώσεων
Αριθμός κυκλίνη D2 – αρνητικών περιπτώσεων	23	13	36
Αριθμός κυκλίνη D2 - θετικών περιπτώσεων	23	3	26

**2.5.δ. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 και του ποσοστού διήθησης του μυελού των οστών.**

Η ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν με το ποσοστό διήθησης του μυελού των οστών έδειξε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά διήθησης στις περιπτώσεις με έκφραση (>10%) της κυκλίνης D2 συγκρινόμενα με αυτά των αρνητικών περιπτώσεων. Η στατιστική σημαντικότητα αυτού του ελέγχου ήταν  $p=0,006$  αντίστοιχα (Πίνακας 13). Από την υπόλοιπη ανάλυση δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

**Πίνακας 13.** Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ του ποσοστού διήθησης του μυελού των οστών και της έκφρασης της κυκλίνης D2 (έλεγχος  $\chi^2$ ).

	Μέση τιμή ποσοστού διήθησης %	Αριθμός περιστατικών	Τυπική απόκλιση	p
Cyclin D2				<b>0,006</b>
Αρνητική έκφραση	<b>45,55</b>	<b>36</b>	<b>21,96</b>	
Θετική έκφραση	<b>61,73</b>	<b>26</b>	<b>22,66</b>	

**2.5.ε. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 σε οστεομυελικές βιοψίες, της ηλικίας διάγνωσης της νόσου και του χρόνου προ έναρξης πρώτης θεραπείας.**

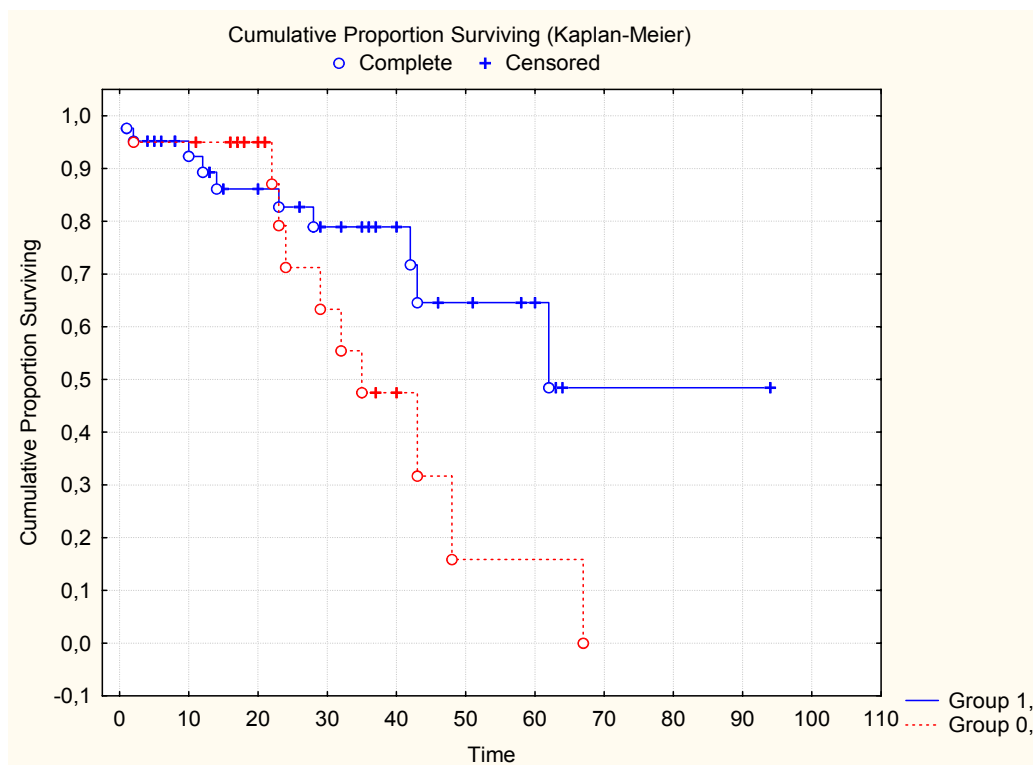
Η ανάλυση του ελέγχου  $\chi^2$  έδειξε μέση ηλικία διάγνωσης το 65<sup>ο</sup> έτος σε 26/62 (42%) ασθενείς με έκφραση της κυκλίνης D2, και μέση ηλικία διάγνωσης το 70<sup>ο</sup> έτος σε 36/62 (58%) ασθενείς με αρνητική έκφραση της κυκλίνης D2. Η στατιστική σημαντικότητα του ελέγχου αυτού ήταν  $p=0,041097$  (Πίνακας 14). Από τον υπόλοιπο έλεγχο δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

**Πίνακας 14.** Συσχέτιση μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της κυκλίνης D2 στις οστεομυελικές βιοψίες και της ηλικίας διάγνωσης της νόσου (έλεγχος  $\chi^2$ ).

	Μέση ηλικία διάγνωσης	Αριθμός περιστατικών	Τυπική απόκλιση	p
Cyclin D2				<b>0,041097</b>
Θετικές περιπτώσεις	<b>65</b>	<b>26</b>	<b>11,24</b>	
Αρνητικές περιπτώσεις	<b>70,3</b>	<b>36</b>	<b>8,56</b>	

2.5.στ. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 στις οστεομυελικές βιοψίες, και του χρόνου επιβίωσης των ασθενών από τη διάγνωση.

**Διάγραμμα 1.**



Η ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν με το χρόνο επιβίωσης των ασθενών (μέθοδο Kaplan Meier) έδειξε πως ασθενείς με ΠΜ με θετική έκφραση της πρωτεΐνης Rb στα νεοπλασματικά κύτταρα, είχαν οριακά στατιστικά μεγαλύτερη επιβίωση από τους ασθενείς με αρνητική έκφραση της πρωτεΐνης Rb,  $p=0,05707$  (Διάγραμμα 1).

Από την υπόλοιπη στατιστική ανάλυση δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

**2.6. Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p16, Rb, Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης E, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, και κυκλίνης D3 στις οστεομυελικές βιοψίες, και των εργαστηριακών ευρημάτων των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα κατά τη διάγνωση.**

Η ανάλυση ελέγχου  $\chi^2$  έδειξε αυξημένη μέση τιμή Ca (10,5) στις 25/61 (41%) περιπτώσεις ασθενών με έκφραση της κυκλίνης D2. Αντίθετα, μειωμένη ήταν η μέση τιμή Ca (9,3) στις 36/61 (49%) περιπτώσεις ασθενών με αρνητική έκφραση της κυκλίνης D2.. Η στατιστική σημαντικότητα αυτού του ελέγχου ήταν  $p=0,007964$  (Πίνακας 15).

Ως προς την τιμή της βήτα 2 μικροσφαιρίνης ( $\beta 2M$ ) του ορού κατά τη διάγνωση, η ανάλυση ελέγχου  $\chi^2$  έδειξε μέση τιμή  $\beta 2M$ : 3498 στις 25/33 (75,6%) περιπτώσεις ασθενών με έκφραση της κυκλίνης E, ενώ η μέση τιμή της  $\beta 2M$  ήταν: 6446 στις 8/33 (24,4%) περιπτώσεις ασθενών με αρνητική έκφραση κυκλίνης E. Η στατιστική σημαντικότητα του ελέγχου ήταν  $p=0,034562$  (Πίνακας 16).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε αυξημένη μέση τιμή  $\beta 2M$ : 5377 στις 23/57 (40,3%) περιπτώσεις ασθενών με έκφραση της κυκλίνης D2. Αντίθετα, μειωμένη ήταν η μέση τιμή  $\beta 2M$ : 3305 στις 34/57 (59,7%) περιπτώσεις ασθενών με αρνητική έκφραση κυκλίνης D2. Η στατιστική σημαντικότητα του ελέγχου ήταν  $p=0,021983$  (Πίνακας 16).

Ως προς την τιμή του αιματοκρίτη (Ht) και της αιμοσφαιρίνης (Hb) κατά τη διάγνωση ασθενών με ΠΜ, η ανάλυση ελέγχου  $\chi^2$  έδειξε αυξημένη μέση τιμή τους (35,1 και 11,7) στις 21/61 (34,4%) και 21/62 (33,9%) περιπτώσεις ασθενών με έκφραση της κυκλίνης D1, αντίστοιχα. Αντίθετα, μειωμένη μέση τιμή Ht και Hb (32,3 και 10,6) βρέθηκε στις 40/61 (65,6%) και 41/62 (66,1%) περιπτώσεις ασθενών με αρνητική έκφραση κυκλίνης D1, αντίστοιχα. Η στατιστική σημαντικότητα αυτών των ελέγχων ήταν  $p=0,041488$  και  $p=0,031562$  αντίστοιχα (Πίνακας 17).

**Πίνακας 15.** Στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της τιμής ασβεστίου του ορού και της έκφρασης (>10% κυττάρων) της κυκλίνης D2 στο μυελό των οστών (έλεγχος  $\chi^2$ ).

	Μέση τιμή Ca ορού	Αριθμός περιστατικών	Τυπική απόκλιση	p
Cyclin D2				<b>0,007964</b>
Αρνητική έκφραση	<b>9,3</b>	<b>36</b>	<b>0,78</b>	
Θετική έκφραση	<b>10,5</b>	<b>25</b>	<b>2,41</b>	

**Πίνακας 16.** Στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της  $\beta$ 2M του ορού και της έκφρασης (>10% κυττάρων) των κυκλινών E και D2 σε οστεομυελικές βιοψίες (έλεγχος  $\chi^2$ ).

	Μέση τιμή $\beta$ 2M ορού	Αριθμός περιστατικών	Τυπική απόκλιση	p
Cyclin E				<b>0,034562</b>
Αρνητική έκφραση	<b>6446</b>	<b>8</b>	<b>5874</b>	
Θετική έκφραση	<b>3498</b>	<b>25</b>	<b>1962</b>	
Cyclin D2				<b>0,021983</b>
Αρνητική έκφραση	<b>3305</b>	<b>34</b>	<b>1992</b>	
Θετική έκφραση	<b>5377</b>	<b>23</b>	<b>4532</b>	

**Πίνακας 17.** Συσχετίσεις μεταξύ του Ht και της Hb των ασθενών με ΠΜ και της έκφρασης (>10% κυττάρων) της κυκλίνης D1 σε οστεομυελικές βιοψίες (έλεγχος  $\chi^2$ ).

Cyclin D1	Μέση τιμή Ht	Αριθμός περιστατικών	Τυπική απόκλιση	p
Αρνητική έκφραση	<b>32,3</b>	<b>40</b>	<b>4,43</b>	<b>0,041488</b>
Θετική έκφραση	<b>35,1</b>	<b>21</b>	<b>5,88</b>	
	Μέση τιμή Hb	Αριθμός περιστατικών	Τυπική απόκλιση	p
Αρνητική έκφραση	<b>10,6</b>	<b>41</b>	<b>1,52</b>	<b>0,031562</b>
Θετική έκφραση	<b>11,7</b>	<b>21</b>	<b>2,05</b>	

Ακόμη, η ανάλυση ελέγχου  $\chi^2$  έδειξε αυξημένη μέση τιμή κρεατινίνης ορού (CRE) κατά τη διάγνωση (3,1) στις 56/61 (91,8%) περιπτώσεις ασθενών με έκφραση της κυκλίνης D3, και μειωμένη μέση τιμή CRE (1,2) στις 5/61 (8,2%) περιπτώσεις ασθενών με αρνητική έκφραση της κυκλίνης D3. Η στατιστική σημαντικότητα του ελέγχου ήταν  $p=0,005922$  (Πίνακας 18).

**Πίνακας 18.** Συσχετίσεις μεταξύ της CRE ορού και έκφρασης (>10% κυττάρων) της κυκλίνης D3 σε οστεομυελικές βιοψίες (έλεγχος  $\chi^2$ ).

	Μέση τιμή Cre ορού	Αριθμός περιστατικών	Τυπική απόκλιση	p
Cyclin D3				<b>0,005922</b>
Αρνητική έκφραση	<b>1,2</b>	<b>5</b>	<b>0,82</b>	
Θετική έκφραση	<b>3,1</b>	<b>56</b>	<b>4,63</b>	

Από τις υπόλοιπες στατιστικές αναλύσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν και των εργαστηριακών ευρημάτων των ασθενών κατά τη διάγνωση, δεν προέκυψαν άλλα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.



### 3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ΠΜ παριστά μία ανίατη αιματολογική νεοπλασία που χαρακτηρίζεται από παροδική ευαισθησία τόσο στα χορηγούμενα φάρμακα όσο και στη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων [411]. Την τελευταία δεκαετία, η καλύτερη κατανόηση του ΠΜ και η ανάπτυξη και εισαγωγή νέων παραγόντων για τη θεραπεία του, όπως η Θαλιδομίδη, η Λεναλιδομίδη και η Βορτεζομίμη, άλλαξαν την πορεία της νόσου και βελτίωσαν σημαντικά το προσδόκιμο επιβίωσης της [412, 413, 414, 415]. Ωστόσο, παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί, το ΠΜ παραμένει μέχρι και σήμερα ανίατο, με την επιβίωση των ασθενών να κυμαίνεται από μερικές βδομάδες μέχρι και περισσότερο από 20 χρόνια, ως αποτέλεσμα της κλινικής και βιολογικής του ετερογένειας [416]. Συνεπώς, καθίσταται αναγκαία η περαιτέρω κατανόηση της παθογένειας του, προκειμένου να εξευρεθούν πιθανοί νέοι θεραπευτικοί στόχοι και νέες στρατηγικές αντιμετώπισής του.

Αντίθετα με τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα, τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα διατηρούν την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται και να αυτοανανεώνονται. Έτσι, ενώ κατά τη σταθερή φάση του νοσήματος, τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα αθροίζονται στο μυελό των οστών εξαιτίας κυρίως αποπτωτικών διαταραχών [417], κατά την επιταχυνόμενη φάση φαίνεται πως πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα ως αποτέλεσμα διαταραχών της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Αυτές οι διαταραχές της ρύθμισης πιθανώς να οδηγούν σε ανθεκτικότητα στη θεραπεία, στην εμφάνιση υποτροπών, και γενικότερα σε επιθετικότερη κλινική συμπεριφορά.

Η είσοδος του κυττάρου σε κυτταρικό κύκλο και η εξέλιξη του, ρυθμίζονται από τη συντονισμένη δράση ενεργών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων αποτελούμενων από κυκλίνες και κυκλινόεξαρτώμενες κινάσες (CDKs), τα οποία αναστέλλονται από τους αναστολείς των κυκλινόεξαρτώμενων κινάσων (CDKis) [418]. Πρόσφατα, διάφορες μελέτες των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S, ανέδειξαν έναν κεντρικό ρόλο των κυκλινών D (D1, D2 και D3) και των κυκλινόεξαρτώμενων κινάσων τους (CDK) 4 και 6 [419, 420, 421, 422, 423]. Τα συμπλέγματα κυκλίνης D – κυκλινόεξαρτώμενης κινάσης 4 ή 6, προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω φωσφορυλίωσης / απενεργοποίησης της πρωτεΐνης Rb στην G1 φάση του κύκλου. Ως αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης αυτής, μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο E2F, απελευθερώνονται και ενεργοποιούνται προάγοντας περαιτέρω τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αντιγραφή του DNA.

Η διαδικασία αυτή φαίνεται να ελέγχεται αρνητικά από την p16 και άλλους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών [422, 424, 425, 426].

Ο κεντρικός ρόλος που διαφαίνεται να έχει το μονοπάτι της κυκλίνης D – pRb – p16 στον κυτταρικό κύκλο, υποστηρίζεται περαιτέρω από την παρουσία συχνών διαταραχών του σε πλειάδα νεοπλασματικών παθήσεων [419, 420, 421, 422, 423, 427]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αντιμετάθεση (11;14) στα λεμφώματα της οριακής ζώνης, που ενεργοποιεί το γονίδιο της κυκλίνης D1 και συνεπακόλουθα οδηγεί σε υπερέκφραση της πρωτεΐνης D1 [428, 429]. Συχνό εύρημα επίσης είναι σε πολλές κακοήθειες οι απαλείψεις και οι μεταλλάξεις του γονιδίου Rb στη χρωμοσωμική ζώνη 13q14, καθώς και η υπερμεθυλίωση του γονιδίου p16 [430]. Φαίνεται πως η αναστολή της δράσης των πρωτεϊνών p16 και pRb, καθώς και η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 και των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση.

Από τα παραπάνω διαφαίνεται πως και στην παθογένεση του ΠΜ πρέπει ενδεχόμενα να εμπλέκονται διαταραχές του μονοπατιού κυκλίνης D – pRb – p16 [431, 432, 433]. Πράγματι, σύμφωνα με ένα μοντέλο ταξινόμησης βασισμένο σε μοριακές διαταραχές, φαίνεται να υπάρχουν 2 διαφορετικά μονοπάτια νεοπλασματικής εκτροπής στο ΠΜ, τα οποία μπορεί και να αλληλοεπικαλύπτονται [434]. Το υποδιπλοειδικό μονοπάτι, το οποίο συνήθως περιλαμβάνει αρχικές ογκογενετικές διαταραχές και περιπτώσεις μυελωμάτων με υψηλή συχνότητα εμφάνισης αντιμεταθέσεων του γονιδίου της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (IgH) στη χρωμοσωμική ζώνη 14q32 και το υπερδιπλοειδικό μονοπάτι, το οποίο συνήθως συμβάλει στην ογκογένεση με άγνωστους ακόμα μηχανισμούς, και χαρακτηρίζεται από τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 και 21. [435, 436, 437, 438]. Στις μισές περίπου περιπτώσεις ασθενών με ΠΜ, ανευρίσκεται 1 από τις 5 αντιμεταθέσεις της περιοχής IgH, οι οποίες απορυθμίζουν τελικά τα γονίδια των κυκλινών D και προκαλούν υπερέκφραση των πρωτεϊνών [439]. Οι αντιμεταθέσεις αυτές είναι οι 11q13, 6p21 και 16q23 (C maf), 20q11 (B maf), 4p16 (FGFR3/MMSET), που έχουν ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση των κυκλινών D1, D3 και D2 αντίστοιχα [439]. Πέρα όμως από διαταραχές των γονιδίων των κυκλινών D, που φαίνεται να συμμετέχουν σημαντικά στην παθογένεια του ΠΜ, υπάρχουν ενδείξεις και για διαταραχές του γονιδίου p16 μέσω μεθυλίωσης / απενεργοποίησης (σε ασθενείς με MGUS και ΠΜ) [440, 441], καθώς και για απενεργοποίηση της δράσης της πρωτεΐνης Rb μέσω φωσφορυλίωσης [442, 443].

Αναφορικά με την κυκλίνη D1, φυσιολογικά δεν εκφράζεται στα πλασματοκύτταρα. Αντίθετα, στα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα του ΠΜ εκφράζεται στο 15 – 20% των περιπτώσεων και η έκφραση της αποδίδεται στην ύπαρξη της αντιμετάθεσης (11;14) [444, 445, 446], ενώ στο 30 – 35% των περιπτώσεων η έκφρασή της αποδίδεται σε άλλους πιθανούς μηχανισμούς όπως η τρισωμία 11 [439, 447, 448, 449, 450]. Επιπρόσθετα, λόγω του ότι η κυκλίνη D1 επάγει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου κατά τη φάση G1, είχε εκφραστεί στο παρελθόν η άποψη ότι η αυξημένη της έκφραση μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς και με επιθετική κλινική πορεία [427]. Τα δεδομένα από τη βιβλιογραφία ωστόσο, σχετικά με την υπερέκφραση της κυκλίνης D1 στο ΠΜ, είναι ωστόσο αντιφατικά.

Πυρηνική έκφραση της κυκλίνης D1 στο ΠΜ, ανακοινώθηκε για πρώτη φορά στα τέλη της δεκαετίας του 90, όταν με τη χρήση της ανοσοιστοχημείας ανευρέθη σε ποσοστό 5 – 25% των ασθενών με νόσο [451, 452]. Την ίδια περίοδο, με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), ανακοινώθηκε έκφραση κυκλίνης D1 στο 50% των περιπτώσεων, με ταυτόχρονη ανίχνευση της αντιμετάθεσης (11;14) [453].

Αργότερα, ο Pruneri και συνεργάτες έδειξαν ανοσοιστοχημικά και με *in situ* υβριδισμό (FISH), ότι η αντιμετάθεση (11;14) στο ΠΜ όντως οδηγεί σε υπερέκφραση της κυκλίνης D1 (25% ασθενών με ΠΜ), ότι η ανοσοιστοχημική έκφραση της κυκλίνης D1 είναι αξιόπιστη μέθοδος για την ανεύρεσή αυτής της αντιμετάθεσης, και ότι η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 φαίνεται να σχετίζεται με προχωρημένο κλινικό στάδιο της νόσου και παρουσία κλινικών συμπτωμάτων, υπονοώντας έτσι την ύπαρξη χειρότερης πρόγνωσης [449]. Σε μία ακόμα μελέτη, ανευρέθη ανοσοιστοχημικά, υπερέκφραση της κυκλίνης D1 στο 24% (17/71) των περιπτώσεων και υποστηρίχθηκε περαιτέρω η άποψη πως η έκφραση της κυκλίνης D1 μπορεί να αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης, ενισχύοντας παράλληλα υποθέσεις παλιότερων μελετών [450, 454, 455, 456, 457]. Επιπρόσθετα με όλα τα παραπάνω, ο Kramer και συνεργάτες ανίχνευσαν με FISH μεταλλάξεις του γονιδίου της D1 στο 17% (14/82) των ασθενών και υποστήριξαν ότι αυτές σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση [458].

Αντίθετα με τα παραπάνω, ο Fonseca και συνεργάτες υποστηρίζουν ότι ασθενείς με ΠΜ που φέρουν την αντιμετάθεση (11;14) (μέθοδος FISH) εμφανίζουν μεγαλύτερη επιβίωση σε σχέση με ασθενείς που δεν φέρουν την αντιμετάθεση αυτή [459]. Την ίδια άποψη υποστήριξε και ο Moreau και συνεργάτες, με στατιστικώς

σημαντικά αποτελέσματα σε μία σειρά ασθενών με ΠΜ που έλαβε χημειοθεραπεία υψηλής δόσης [460]. Επιπλέον, ο Sovereini και συνεργάτες ανακοίνωσαν ότι το 43% των ασθενών με νεοδιαγνωσθέν ΠΜ εμφάνιζε υπερέκφραση της κυκλίνης D1 με τη μέθοδο PCR, και είχε καλύτερη κλινική πορεία καθώς οι ασθενείς αυτοί εμφάνιζαν αυξημένης διάρκειας ύφεση της νόσου και αυξημένη επιβίωση ελεύθερης συμπτωμάτων [447]. Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα μελετών του Wilson και συνεργάτες και Rasmussen και συνεργάτες, χρησιμοποιώντας μεθόδους ανοσοιστοχημίας και PCR, αντίστοιχα [461, 462].

Οι Markovic και συνεργάτες, ανακοίνωσαν ότι 14 από 59 ασθενείς με νεοδιαγνωσθέν μύελωμα (27%) εμφάνιζαν ανοσοιστοχημική υπερέκφραση της κυκλίνης D1, χωρίς όμως αυτή να συσχετίζεται με κλινικό-παθολόγο-ανατομικές παραμέτρους, την επιβίωση των ασθενών, ή των κυτταρικό πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων [463]. Ομοίως, ο Dunphy και συνεργάτες ανακοίνωσαν ότι το 29% (12/42) των περιπτώσεων ΠΜ εμφάνιζε ανοσοιστοχημική υπερέκφραση της κυκλίνης D1, και ότι αυτή δεν συσχετίζεται με τη συνολική επιβίωση των ασθενών [464].

Επομένως τίθεται το εξής ερώτημα: Γιατί τόσο διαφορετικά και διαφορούμενα αποτελέσματα αναφορικά με τη κλινική σημασία της υπερέκφρασης της κυκλίνης D1 στο ΠΜ;

Μία πιθανή εξήγηση είναι το γεγονός ότι σε πολλές παλιότερες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα, τα οποία είχαν μικρότερη ειδικότητα σε σχέση με τα σύγχρονα. Μία άλλη πιθανή εξήγηση ίσως να είναι ότι η έκφραση της κυκλίνης D1 επηρεάζεται από διαταραχές και άλλων μηχανισμών, εκτός από τη γνωστή αντιμετάθεση (11;14), οι οποίοι δεν έχουν αποσαφηνισθεί ακόμα. Υπέρ της άποψης αυτής συνηγορεί μελέτη του Cook και συνεργατών του που υποστηρίζουν ότι οι περιπτώσεις στις οποίες εκφράζεται η κυκλίνη D1 εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση σε σχέση με αυτές που δεν εκφράζουν. Στη μελέτη αυτή δεν βρέθηκε συσχέτιση της επιβίωσης με την αντιμετάθεση (11;14) [465].

Ακόμα μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι οι τυχόν αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυκλινών, κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, και των συμπλεγμάτων που δημιουργούν αυτές μεταξύ τους. Ο Ely και συνεργάτες, υποστηρίζουν ότι η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 ή της D3, δεν είναι ικανή να προάγει την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb, και αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε ανεπάρκεια της CDK4. Αντίθετα, η ίδια ομάδα παρατήρησε ότι η αυξημένη έκφραση

συμπλεγμάτων κυκλίνης D2 με CDK 4 ή 6, συσχετίζεται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και εξέλιξη της νόσου [466]. Ομοίως, υπέρ της εξήγησης αυτής τάχθηκε και μία ακόμα ομάδα μελετητών η οποία ανακοίνωσε πως σε 2 από τις 7 υποκατηγορίες ασθενών με ΠΜ που μελέτησαν, υπήρχε υπερέκφραση της κυκλίνης D1 στα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα συγχρόνως με χαμηλή έκφραση κυκλίνης D2. Οι υποκατηγορίες αυτές χαρακτηρίστηκαν ως χαμηλού κινδύνου, ενώ η υποκατηγορία των ασθενών με ΠΜ και συνέκφραση των κυκλινών D1 και D2 χαρακτηρίστηκε ως υποκατηγορίες υψηλού κινδύνου [467].

Αντιφατικά είναι και τα ευρήματα της βιβλιογραφίας που αφορούν την κλινική σημασία της έκφρασης της κυκλίνης D1 σε ασθενείς που θεραπεύτηκαν με νέους θεραπευτικούς παράγοντες. Σε ανάλυση ασθενών με ΠΜ, που έλαβαν αγωγή με θαλιδομίδη, δεν ανευρέθηκε διαφορά της επιβίωσης μεταξύ κυκλίνης D1 θετικών (37%) και κυκλίνης D1 αρνητικών περιπτώσεων. Έτσι θεωρήθηκε πιθανό, σχήματα που συμπεριλαμβάνουν τη θαλιδομίδη, να ξεπερνούν την χειρότερη πρόγνωση των κυκλίνης D1 αρνητικών περιπτώσεων που αντιμετωπίζονταν στο παρελθόν με συμβατική χημειοθεραπευτική αγωγή και αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών [468, 469]. Σε άλλη ανοσοϊστοχημική μελέτη, η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 στην οστεομυελική βιοψία συσχετίστηκε με καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με μπορτεζομίπη [470]. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την Tasidou και συνεργάτες, σε 115 συμπτωματικούς και 15 ασυμπτωματικούς ασθενείς με ΠΜ που είχαν λάβει θεραπεία με νέους παράγοντες, το 30% (35/115) και το 7% (1/15) των ασθενών αντίστοιχα εξέφραζε την κυκλίνης D1. Στη μελέτη αυτήν, ανευρέθηκε και στις 2 υποκατηγορίες χειρότερη επιβίωση (41 vs 61 μήνες) στις κυκλίνης D1 θετικές περιπτώσεις συγκριτικά με τις κυκλίνης D1 αρνητικές περιπτώσεις [471].

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα αποτελέσματα όσον αφορά την κλινική σημασία της έκφρασης της κυκλίνης D1 στο ΠΜ είναι αντιφατικά. Στη δική μας μελέτη, ανευρέθηκε ανοσοϊστοχημική έκφραση (>10%) της κυκλίνης D1 στο 34% των περιπτώσεων νεοδιαγνωσθέντων ΠΜ. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα μελετών της υπάρχουσας βιβλιογραφίας. Ως προς την συνολική επιβίωση των ασθενών με ΠΜ, στην παρούσα μελέτη δεν ανευρέθηκε συσχέτιση της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με την έκφραση της κυκλίνης D1, όπως και στις μελέτες των Markovite και συνεργάτες και Dunphy και συνεργάτες.

Η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 στο ΠΜ όπως προαναφέρθηκε, φαίνεται να προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς μέσω της σύνδεσης της με τις CDK 4

και 6 κινάσες και τη δημιουργία ενεργών συμπλόκων, φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη Rb, η οποία με τη σειρά της απελευθερώνει/ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα E2F [472]. Ο παράγοντας αυτός είναι αναγκαίος για την είσοδο των νεοπλασματικών κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου [473]. Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού με την έκφραση της κυκλίνης D1, όπως και στην μελέτη του Markovits και συνεργάτες (2004). Ωστόσο, σε πλήρη συμφωνία με την παραπάνω πιθανή δράση της κυκλίνης D1, βρήκαμε το 76% των ασθενών μας να υπερεκφράζουν την κυκλίνη E, υποδηλώνοντας έτσι το γεγονός ότι η πλειοψηφία των πλασματοκυττάρων σε ασθενείς με ΠΜ, βρίσκεται συνήθως στη φάση S κατά τη διάγνωση. Απ' όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, αυξημένη ανοσοϊστοχημική έκφραση κυκλίνης E σε οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με νεοδιαγνωσθέν ΠΜ, περιγράφεται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία. Η παρατήρηση μας αυτή, έχοντας υπόψη αρκετές αναφορές όπου γίνεται λόγος για αυξημένη χημειοευαισθησία των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου [474, 475, 476, 477], αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς θα μπορούσε να εξηγήσει περαιτέρω τα αντικρουόμενα αποτελέσματα της συσχέτισης της έκφρασης της κυκλίνης D1 με την κλινική πορεία, και να συμβάλλει τόσο στη καλύτερη κατανόηση της παθογένειας του ΠΜ, όσο και στην αντιμετώπιση του με τη χρήση νέων θεραπευτικών παραγόντων.

Αναφορικά με την κυκλίνη E, αυτή έχει ρόλο ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου καθώς ως σύμπλοκο με την CDK2, προάγει την μετάβαση του κυττάρου από την φάση G1 στη φάση S [478, 479]. Η έκφραση της κυκλίνης E ρυθμίζεται τόσο προμεταγραφικά όσο και μεταγραφικά. Σε προμεταγραφικό επίπεδο, η έκφραση της κυκλίνης E εξαρτάται άμεσα από την παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα E2F, που με τη σειρά του εξαρτάται από την έκφραση της κυκλίνης D1 μέσω της φωσφορυλίωσης/απενεργοποίησης της πρωτεΐνης Rb που προκαλεί αυτή [480, 481]. Σε μεταγραφικό επίπεδο, η έκφραση της κυκλίνης E ρυθμίζεται από τη σύνδεσή της με την CDK2, την αυτοφωσφορυλίωσή της, και την αποδόμηση της. Πιο συγκεκριμένα, η κυκλίνη E όντας συνδεδεμένη με την CDK2 "προστατεύεται" και δεν αποδομείται (μόνο η μονομερής κυκλίνη E αποδομείται). Αφού ενεργοποιηθεί και ως σύμπλοκο μαζί με την CDK2 εκτελέσει τη δράση της, υπόκεινται σε φωσφορυλίωση, συνδέεται με μία ουμπικουιτινική λιγκάση και αποδομείται [482, 483]. Η διατήρηση ορθής ρύθμισης της έκφρασης της κυκλίνης E είναι πολύ σημαντική για την ομαλή πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα, οποιαδήποτε

διαταραχή της οδηγεί σε διαρκή έκφρασή της που με τη σειρά της μπορεί να προκαλεί γενετική αστάθεια και κακοήθεια [484].

Πράγματι, αυξημένη συγκέντρωση κυκλίνης E, είτε από υπερέκφραση της, είτε από διαταραχή της αποδόμησής της, παρατηρείται σε πολλές νεοπλασίες. Επιπλέον, η υπερέκφραση της κυκλίνης E έχει συσχετισθεί με χειρότερη επιβίωση σε ορισμένα καρκινώματα και φαίνεται να αποτελεί προγνωστικό δείκτη σε ορισμένες τουλάχιστον νεοπλασίες [479, 485, 486, 487].

Ως προς την κυκλίνη E και το ΠΜ, πρόσφατα ο Josefsberg και συνεργάτες (2012), περιέγραψαν υπερέκφραση της σε αρκετές κυτταρικές σειρές μυελωματικών κυττάρων στη φάση της μεταγραφής. Ωστόσο, στατιστικά σημαντική συσχέτιση έκφρασης μεταξύ κυκλίνης D και κυκλίνης E, όπως αναμένονταν, δεν ευρέθη. Αντίθετα, ευρέθη αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης E και του αναστολέα p27. Στην ίδια μελέτη, επίσης βρέθηκε αυξημένη αντοχή στο seliciclib (αναστολέας κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης με μεγάλη συγγένεια προς το σύμπλοκο CDK2/κυκλίνη E) ως αποτέλεσμα έκτοπης υπερέκφρασης κυκλίνης E, υποδηλώνοντας έτσι την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ενεργών συμπλόκων CDK2/κυκλίνη E, και επομένως και την αναγκαιότητα για χορήγηση επιπλέον αναστολέων σε ανάλογες περιπτώσεις ΠΜ [488]. Ομοίως και στη δική μας μελέτη, άμεση συσχέτιση μεταξύ έκφρασης των κυκλινών D1, D2 και D3, και της κυκλίνης E δεν βρέθηκε, ενώ αναδείχτηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης E και του αναστολέα p27 (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται στο ειδικό μέρος). Η αρνητική αυτή συσχέτιση, εξηγείται από το γεγονός ότι το σύμπλοκο Cdk2/Cyclin E προκαλεί φωσφορυλίωση της p27 και οδηγεί στην αποδόμησή της. Συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης E και κλινικοπαθολογικών παραγόντων ή της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με ΠΜ δεν βρήκαμε. Βρήκαμε ωστόσο, θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης E και της έκφρασης της p53 (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται στο ειδικό μέρος), υποδηλώνοντας πιθανή συμμετοχή και του μονοπατιού p53 στην παθογένεια του ΠΜ.

Αναφορικά με τις κυκλίνες D2 και D3, και τη δράση τους στο ΠΜ, λίγα είναι γνωστά μέχρι σήμερα. Η κυκλίνη D2 και πιο συγκεκριμένα τα σύμπλοκα CDK4/CDK6 – κυκλίνης D2, έχουν συσχετισθεί με επιθετικότερες μορφές νόσου [466, 467]. Από την άλλη, σύμφωνα με μελέτη του Hanamura και συνεργατών, η έκφραση της κυκλίνης D2 από μόνη της δεν καθορίζει την πρόγνωση της νόσου, και μάλλον προϋπόθεση για κάτι τέτοιο είναι η συνύπαρξη διαφόρων αντιμεταθέσεων (C-

maf, B-maf, FGFR3/MMSET). Έτσι, σύμφωνα με την άποψη αυτή, το ΠΜ μπορεί να διακριθεί σε ΠΜ υψηλού κινδύνου και ΠΜ χαμηλού κινδύνου [489]. Η άποψη αυτή, υποστηρίχθηκε περαιτέρω και από μία ακόμα μελέτη, όπου παρατηρήθηκε ότι τα μυελωματικά κύτταρα ασθενών με αντιμετάθεση (11;14), μετά από επίδραση μιτογόνων παραγόντων, αντιδρούσαν με υπερέκφραση κυκλίνης D2 [490].

Στην παρούσα μελέτη, ανευρέθη υπερέκφραση της κυκλίνης D2 στην οστεομυελική βιοψία στο 42% των περιπτώσεων με νεοδιαγνωσθέν ΠΜ. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη στην οποία περιγράφεται υπερέκφραση στο 37% των περιπτώσεων [466]. Επιπλέον βρέθηκε στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D2 και του ποσοστού διήθησης (65,71% vs 45,55%), των επιπέδων ασβεστίου στο αίμα (10,5 vs 9,3), της β2Μ (5337 vs 3305), καθώς και αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D2 και της ηλικίας των ασθενών κατά τη διάγνωση (65 vs 70). Τα αποτελέσματα αυτά, ενισχύουν την άποψη ότι η κυκλίνη D2 πρέπει ενδεχόμενα να παίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεση και στην εξέλιξη της νόσου. Πάντως στην παρούσα μελέτη δεν βρήκαμε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D2 και της επιβίωσης των ασθενών.

Ως προς την κυκλίνη D3, προάγει και αυτή την μετάβαση του κυττάρου από την φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, είτε σχηματίζοντας ενεργά σύμπλοκα με τις CDK 4 ή 6 και φωσφορυλιώνοντας την πρωτεΐνη Rb [491], είτε ακόμη αποδομώντας τον αναστολέα p27 [492]. Η κυκλίνη D3, δεν εκφράζεται φυσιολογικά στα κύτταρα, εντοπίζεται στη χρωμοσωμική ζώνη 6p21 και η έκφρασή της φαίνεται να διαταράσσεται στο 5% των ασθενών με ΠΜ, ως επακόλουθο της αντιμετάθεσης (6;14) [493, 494]. Ομοίως και στην παρούσα μελέτη ανευρέθηκε έκφραση (>10%) της κυκλίνης D3 στο 8% των ασθενών με ΠΜ κατά τη διάγνωση. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη βρέθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D3 και της έκφρασης του αναστολέα p27, και στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D3 και της p53 (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται στο ειδικό μέρος). Τα αποτελέσματα αυτά, θα μπορούσαν να δείχνουν συμμετοχή των μονοπατιών της p27 και της Rb στη δράση της κυκλίνης D3, τουλάχιστον σε μία μικρή υποομάδα ασθενών με ΠΜ. Τέλος, θετική συσχέτιση αναδείχτηκε και μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D3 και των επιπέδων κρεατινίνης ορού (3,1 vs 1,2), υποδηλώνοντας πιθανόν την τάση



ασθενείς με ΠΜ και έκφραση της κυκλίνης D3, να εκδηλώνουν συχνότερα νεφρική βλάβη από ότι ασθενείς με αρνητική έκφραση.

Αναφορικά με τις κυκλίνες A και B1, και οι 2 προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σχηματίζοντας ενεργά σύμπλοκα με την κυκλινοεξαρτώμενη κινάση 2. Η μεν κυκλίνη A, συμμετέχει στην συμπλήρωση του κυττάρου στη φάση S και την προετοιμασία να εισέλθει στην M φάση, η δε κυκλίνη B1 είναι αναγκαία για την μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G2 στη φάση M, προκειμένου να πυροδοτηθεί η μίτωση [495, 496, 497, 498, 499]. Έχοντας τα παραπάνω υπόψη, καθώς και την παραδοχή ότι η πλειοψηφία των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου κατά τη διάγνωση, δεν εκπλήσσει το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη μικρό ποσοστό περιπτώσεων ΠΜ εμφανίζει έκφραση (>10%) της κυκλίνης A (29%) και εξαιρετικά μικρό ποσοστό περιπτώσεων έκφραση της κυκλίνης B1 (1,5%). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το ποσοστό των περιπτώσεων που δεν εκφράζουν την κυκλίνη A (71%), είναι σχεδόν ταυτόσημο με το ποσοστό των περιπτώσεων με υπερέκφραση της κυκλίνης E (76%).

Η πρωτεΐνη του ρετινόβλαστώματος (pRb), φυσιολογικά αναστέλλει τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Τη δράση της αυτή, η pRb την διατηρεί όντας υποφωσφορυλιωμένη. Έτσι, η φωσφορυλίωση της είτε επαγόμενη από τις κυκλίνες D, είτε αναστελλόμενη από την πρωτεΐνη p16, αποτελεί κομβικό σημείο για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου [422]. Συνεπακόλουθα, οποιαδήποτε διαταραχή στη φωσφορυλίωση της pRb, είτε λόγω υπερέκφρασης της κυκλίνης D, είτε λόγω αναστολής της δράσης της p16, θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ογκογένεση [500].

Στο ΠΜ, γονιδιακές μεταλλάξεις του Rb περιγράφονται στο 50% περίπου των περιπτώσεων και είναι συνήθως μονόμορφες και χωρίς επιπτώσεις στη λειτουργία της pRb. Αντίθετα, δίμορφες μεταλλάξεις του γονιδίου Rb που απενεργοποιούν πλήρως την pRb, παρατηρούνται σπάνια, σε προχωρημένα στάδια της νόσου και σχετίζονται με κακή πρόγνωση [458, 501, 502, 503, 504]. Οι Gutierrez και συνεργάτες (2007) υποστηρίζουν ότι οποιαδήποτε μετάλλαξη του γονιδίου Rb, θα μπορούσε να σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση, όταν συνυπάρχουν και άλλες διαταραχές στο νεοπλασματικό πλασματοκύτταρο [505].

Ως προς την έκφραση της pRb, υποστηρίζεται ότι ανιχνεύεται κυρίως όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στην φωσφορυλιωμένη/ανενεργή της μορφή, και σε πολύ

μικρότερο βαθμό όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στην υποφωσφορυλιωμένη/ενεργό της μορφή [506]. Η άποψη αυτή υποστηρίχθηκε και από τον Kanavago και συνεργάτες (2000), όταν συνεκτιμώντας το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67, και την έκφραση της pRb σε οστεομυελικές βιοψίες ΠΜ, δεν παρατήρησαν μείωση στην έκφραση της [507]. Ομοίως και εμείς, παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της pRb και την έκφρασης του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67, ενώ το ποσοστό των ασθενών με νεοδιαγνωσθέν ΠΜ που εμφάνιζαν υπερέκφραση pRb ήταν 68% - σχεδόν ταυτόσημο με το 76% ασθενών με υπερέκφραση της κυκλίνης E ( ως δείκτη S φάσης του κυτταρικού κύκλου). Τα ευρήματα αυτά στηρίζουν περαιτέρω την άποψη πως η pRb εκφράζεται κυρίως όντας στην ανενεργό / φωσφορυλιωμένη της μορφή, καθώς και ότι η πλειοψηφία των πλασματοκυττάρων στο ΠΜ βρίσκονται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου κατά την διάγνωση. Επιπλέον, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε τάση θετικής συσχέτισης ( $p=0,057$ ) μεταξύ της έκφρασης της pRb και της συνολικής επιβίωσης των ασθενών. Το αποτέλεσμα αυτό υποστηρίζει περαιτέρω την άποψη ότι οι μονόμορφες μεταλλάξεις του Rb (που είναι η πλειοψηφία) δεν επηρεάζουν την λειτουργία των pRb, καθώς και ότι η παρουσία μόνο μιας μετάλλαξης του Rb δεν επηρεάζει την πρόγνωση των ασθενών. Επίσης, το γεγονός ότι η έκφραση της pRb όχι μόνο δεν μειώνει την συνολική επιβίωση, αλλά αντίθετα δείχνει μια τάση να την αυξάνει, πιθανόν να υποδηλώνει την ύπαρξη υποομάδας ασθενών που να σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση στο ΠΜ.

Η πρωτεΐνη p16, είναι το προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p16 που εδράζει στην χρωμοσωμική ζώνη 9p21 [508, 509]. Φυσιολογικά, αυτή συνδέεται με τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDK) 4 και / ή 6, και διακόπτει την δημιουργία συμπλόκων CDK – κυκλινών D, και συγκρατεί το κύτταρο στην φάση G1 του κυτταρικού κύκλου [510, 511, 512]. Σε διάφορες νεοπλασίες όπως και στο ΠΜ, το γονίδιο p16 απενεργοποιείται μέσω σημειακών μεταλλάξεων, μικρών και μεγάλων χρωμοσωμικών ελλειμμάτων, και κυρίως μέσω υπερμεθυλίωσης [458, 513].

Η μεθυλίωση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p16 έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση σε ασθενείς με διάφορα καρκινώματα [514, 515]. Κάτι τέτοιο δεν έχει προκύψει στο ΠΜ, και η κλινική σημασία της υπερμεθυλίωσης του p16 δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί.

Στην μελέτη του Mateos και συνεργατών, βρέθηκε μεθυλίωση του γονιδίου p16 (με PCR), στο 42% των ασθενών με ΠΜ κατά την διάγνωση, και συσχετίστηκε με

αυξημένο δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού των πλασματοκυττάρων (3 φορές μεγαλύτερο του φυσιολογικού), καθώς και με χειρότερη πρόγνωση [516]. Σε προηγούμενη μελέτη του Uchida και συνεργατών, μεθυλίωση του p16 βρέθηκε στο 58% ασθενών και συσχετίστηκε με επιθετικότερη νόσο [517]. Ομοίως, ο Guillerm και συνεργάτες υποστήριξαν ότι η μεθυλίωση του γονιδίου p16 σχετίζεται με μικρότερη επιβίωση [518].

Σε πλήρη αντιδιαστολή με τις παραπάνω μελέτες, ο Kramer και συνεργάτες (2002) ανακοίνωσαν πως η μεθυλίωση του γονιδίου p16 που βρέθηκε στο 58% των περιπτώσεων ΠΜ, δεν συσχετίζεται ούτε με την επιβίωση των ασθενών, ούτε και με προχωρημένα στάδια της νόσου. Αντίθετα φάνηκε να συσχετίζεται με την συνύπαρξη διαταραχών της κυκλίνης D1 και ελλειμμάτων του Rb [458].

Λίγα χρόνια αργότερα, ο Gonzalez και συνεργάτες περιέγραψαν μεθυλίωση του p16 στο 34% των περιπτώσεων ΠΜ και ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της μεθυλίωσης του p16 με την έκφραση της πρωτεΐνης p16, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την παρουσία κυτταρογενετικών διαταραχών, και με την επιβίωση των ασθενών. Συμπερασματικά, η ομάδα αυτή κατέληξε ότι η μεθυλίωση του γονιδίου p16 μάλλον πρέπει να είναι δείκτης γενικότερων επιγενετικών διαταραχών του ΠΜ, που πιθανώς να σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου. Επίσης, για πρώτη φορά υποστηρίχθηκε ότι η μεθυλίωση του p16 στο ΠΜ συχνά είναι μερική, ή περιλαμβάνει λιγότερο σημαντικές περιοχές του γονιδίου, με αποτέλεσμα να μην προκαλεί διαταραχές στην δράση και στην έκφραση της p16 [519]. Την υπόθεση αυτή υποστήριξε λίγο καιρό αργότερα μια ακόμα μελέτη από τον Park και συνεργάτες (2011), στην οποία αποδείχθηκε πως η συνύπαρξη 2 ή περισσότερων μεθυλίωσεων του p16 (ως πρότυπο βαριάς μεθυλίωσης p16) αποτελεί ανεξάρτητο δυσμενή προγνωστικό δείκτη σε ασθενείς με ΠΜ [520]. Επιπρόσθετα, δύο άλλες μελέτες υποστήριξαν πως στις περισσότερες περιπτώσεις ΠΜ, η πρωτεΐνη p16 συνεχίζει να εκφράζεται ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή μη μεθυλίωσης [521, 522].

Τελικά σε μια ακόμα μελέτη από τον Kim και συνεργάτες, εκφράστηκε η άποψη πως η μεθυλίωση του γονιδίου p16 δεν επιδρά στην συνολική επιβίωση των ασθενών με ΠΜ, και πως μάλλον αποτελεί μια επιγενετική διαταραχή στην παθογένεια του νοσήματος αυτού. Πιο συγκεκριμένα στη μελέτη αυτή αρχικά παρατηρήθηκε μεθυλίωση του p16 σε 39/103 (37,9%) περιπτώσεις ΠΜ. Ακολούθησε καρυοτυπικός έλεγχος. Από την ανάλυση που έγινε, παρατηρήθηκε μεθυλίωση του p16 στο 34,5% (20/58) και 42,2% (19/45) των περιπτώσεων με φυσιολογικό και παθολογικό

καρυότυπο, αντίστοιχα. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ p16 μεθυσίωσης και κυτταρογενετικών διαταραχών, ή της επιβίωσης των ασθενών, επιβεβαιώνοντας όλες τις προηγούμενες μελέτες [523].

Στην παρούσα μελέτη ανοσοϊστοχημική έκφραση (>10%) της p16 ανιχνεύθηκε στο 66% (41/62) των περιπτώσεων νεοδιαγνωσθέντων ΠΜ. Το αποτέλεσμα μας αυτό, είναι σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενων PCR μελετών, στις οποίες ευρέθη μεθυσίωση του p16 στο 34% των περιπτώσεων. Επομένως από τη δική μας μελέτη επιβεβαιώνεται η συχνή ύπαρξη μεθυσίωσης του p16 στο ΠΜ. Επιπλέον, από τη μεγάλη διαφορά μεταξύ της αρνητικής έκφρασης p16 (34%) και των βιβλιογραφικών αναφορών του ποσοστού της μεθυσίωσης, ενισχύεται περαιτέρω η άποψη των Gonzalez και συνεργατών, ότι η μεθυσίωση p16 δεν οδηγεί πάντα σε μειωμένη έκφραση p16. Ως προς την προγνωστική αξία της έκφρασης της p16 στο ΠΜ, δεν βρήκαμε επίπτωση της στην συνολική επιβίωση των ασθενών, υποστηρίζοντας περαιτέρω την άποψη ότι η μεθυσίωση p16 πιθανώς να είναι μερική ή μη καιρία, και επομένως η p16 να διατηρεί την ανασταλτική της δράση. Τέλος, στην παρούσα μελέτη, βρήκαμε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της p16 και της έκφρασης της Ki67. Το εύρημα μας αυτό είναι σημαντικό, διότι υποδεικνύει πως δεν υπάρχει απώλεια της έκφρασης της p16 κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στο ΠΜ, υποστηρίζει περαιτέρω την άποψη ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η p16 συνεχίζει να εκφράζεται ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή μη μεθυσίωσης, και υπονοεί την πιθανή απώλεια έκφρασης της p16 σε περιπτώσεις όπου το ΠΜ έχει προχωρήσει πολύ.

Η πρωτεΐνη Ki67, είναι ένα πυρηνικό αντιγόνο το οποίο ανευρίσκεται στα κύτταρα σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου εκτός της G0 [524]. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι είναι ένας αξιόπιστος δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού [507, 525, 526], και σχετίζεται με την πρόγνωση πολλών νεοπλασμάτων όπως και του ΠΜ [527, 528]. Στη παρούσα μελέτη, ανιχνεύθηκε έκφραση (>10%) της πρωτεΐνης Ki67 στο 47% των περιπτώσεων και δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της και της συνολικής επιβίωσης ασθενών με ΠΜ. Το γεγονός αυτό, μάλλον οφείλεται στο ότι στην παρούσα μελέτη χαρακτηρίστηκαν θετικές οι περιπτώσεις που εξέφραζαν την πρωτεΐνη Ki67 σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10%, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες στις οποίες ορίστηκε ως κατώτερο όριο θετικότητας η διάμεση τιμή.

Συμπερασματικά, η φωσφορυλίωση της pRb πρωτεΐνης που επάγουν από τη μία οι κυκλίνες D και τα σύμπλοκα τους, και αναστέλλει από την άλλη η πρωτεΐνη p16, έχει κεντρικό ρόλο στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και οποιαδήποτε διαταραχή στο μονοπάτι αυτό και γύρω από αυτό, φαίνεται πως οδηγεί στην παθογένεση του ΠΜ. Ως εκ τούτου, η διερεύνηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μίας ομάδας πρωτεϊνών (διενέργεια screening) τόσο κατά τη διάγνωση, όσο και κατά την πορεία του νοσήματος, θα είχε κλινική χρησιμότητα, καθώς θα βοηθούσε σημαντικά στην καλύτερη κατανόηση του ΠΜ και σε πιο στοχευμένες μορφές θεραπείας. Τέλος, στην παρούσα μελέτη ξεχωρίζει η μεγάλη συχνότητα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της κυκλίνης E, υποδηλώνοντας πως η πλειοψηφία των πλασματοκυττάρων στο ΠΜ κατά τη διάγνωση, φαίνεται να βρίσκεται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου.

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκαν τα ευρήματα προηγούμενων μελετών όσον αφορά την ανοσοϊστοχημική έκφραση (>10%) των κυκλινών D1, D2, D3, και A, σε ποσοστά 34%, 42%, 8%, και 29% αντίστοιχα, σε περιπτώσεις νεοδιαγνωσθέντων περιπτώσεων ΠΜ. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων που εκφράζει την μιτωτική κυκλίνη B1 είναι ιδιαίτερα χαμηλό (1.5%).
2. Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D1, του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki67), και της επιβίωσης των ασθενών με ΠΜ.
3. Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D2 και του ποσοστού διήθησης (65,71% vs 45,55%), των επιπέδων ασβεστίου στο αίμα (10,5 vs 9,3), της τιμής β2Μ ορού (5337 vs 3305), καθώς και στατιστικώς σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D2 και της ηλικίας κατά τη διάγνωση (65 vs 70). Ωστόσο, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της και της επιβίωσης των ασθενών με ΠΜ. Από τα παραπάνω, ενισχύεται η άποψη ότι η κυκλίνη D2 παίζει κάποιο ρόλο στην εξέλιξη της νόσου, αλλά αδυνατεί από μόνη της να καθορίσει την κλινική πορεία και την επιβίωση των ασθενών με ΠΜ.
4. Στην παρούσα μελέτη η έκφραση της κυκλίνης D3 συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση της πρωτεΐνης p27, και αρνητικά με την έκφραση της πρωτεΐνης p53. Τα αποτελέσματα αυτά, μάλλον υποδηλώνουν την συμμετοχή των μονοπατιών της p27 και της Rb (αντί της p53), στη δράση της κυκλίνης D3. Επίσης, θετική συσχέτιση αναδείχτηκε μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D3 και των επιπέδων κρεατινίνης ορού (3,1 vs 1,2). Πιθανόν οι ασθενείς με ΠΜ και υπερέκφραση της κυκλίνης D3 να εκδηλώνουν συχνότερα νεφρική βλάβη από ασθενείς με αρνητική έκφραση.
5. Στην παρούσα μελέτη για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, προσδιορίστηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης E σε οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με ΠΜ. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκε έκφραση (>10%) της κυκλίνης E στο 76% των περιπτώσεων ΠΜ. Το εύρημα αυτό πιθανόν να δείχνει ότι κατά τη διάγνωση του ΠΜ, η πλειοψηφία των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων βρίσκεται στην φάση S του κυτταρικού κύκλου.

6. Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε έκφραση της pRb στο 68% των περιπτώσεων ΠΜ και στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της pRb και του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67. Πιθανόν το εύρημα αυτό υποστηρίζει περεταίρω ότι η pRb εκφράζεται κυρίως στην ανενεργό / φωσφορυλιωμένη μορφή, καθώς και ότι η πλειοψηφία των πλασματοκυττάρων στο ΠΜ βρίσκονται στην φάση S του κυτταρικού κύκλου κατά την διάγνωση. Επιπλέον στην παρούσα μελέτη βρέθηκε τάση στατιστικά σημαντικής θετικής συσχέτισης ( $p=0,057$ ) μεταξύ της έκφρασης της pRb και της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με ΠΜ. Το εύρημα αυτό στηρίζει περεταίρω την άποψη ότι οι μονόμορφες μεταλλάξεις του Rb (που είναι η πλειοψηφία) δεν επηρεάζουν την λειτουργία των pRb, καθώς και ότι η παρουσία μόνο μιας μετάλλαξης του Rb δεν αρκεί για να αλλάξει την κλινική πορεία της νόσου.

7. Στην παρούσα μελέτη αναδείχτηκε χαμηλή έκφραση ή απώλεια της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της p16 στο 34% των ασθενών με νεοδιαγνωσθέν ΠΜ, επιβεβαιώνοντας προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν συχνή μεθυλίωση του p16. Από τη μεγάλη διαφορά μεταξύ της αρνητικής έκφρασης p16 (34%) και των βιβλιογραφικών αναφορών του ποσοστού της μεθυλίωσης (34% - 50%), ενισχύεται περεταίρω η άποψη ότι η μεθυλίωση p16 δεν οδηγεί πάντα σε μειωμένη έκφραση p16. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη δεν διαπιστώθηκε επίπτωση της έκφρασης της πρωτεΐνης p16 στην συνολική επιβίωση ασθενών με ΠΜ, εύρημα το οποίο στηρίζει την άποψη ότι η μεθυλίωση του p16 πιθανώς να είναι μερική ή μη καίρια, και επομένως η πρωτεΐνη να διατηρεί την ανασταλτική της δράση. Ακόμη, βρέθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης p16 και της έκφρασης της Ki67, εύρημα που στηρίζει την άποψη ότι δεν υπάρχει απώλεια της έκφρασης της p16 πρωτεΐνης κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στο ΠΜ, καθώς και ότι η p16 πρωτεΐνη εκφράζεται ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή μη μεθυλίωσης στο ΠΜ.





## 5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΣΤΟ ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ.

#### ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΟΥ ΠΕΣΣΑΧ ΗΛΙΑ

Μελέτες επί των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, έχουν αναδείξει έναν κεντρικό ρόλο για το μονοπάτι της κυκλίνης D – pRb – p16 στο ΠΜ. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε συστηματική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι της κυκλίνης D–pRb–p16 του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνες D1, D2, D3, A, B1 και E, p16 και pRb), σε 62 οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με νεοδιαγνωσθέν ΠΜ, σε σχέση με α) τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67, β) κλινικοπαθολογικές παραμέτρους και γ) την επιβίωση των ασθενών. Για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, προσδιορίστηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης E σε οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με ΠΜ.

Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκε ανοσοϊστοχημική, έκφραση (>10%) των κυκλινών D1, D2, D3, E, A και B1 στο 34%, 42%, 8%, 76%, 29%, και 1.5% των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα ευρήματα προηγούμενων μελετών ως προς τις κυκλίνες D1, D2, D3 και A, ενώ διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων που εκφράζει την μιτωτική κυκλίνη B1 είναι ιδιαίτερα χαμηλό. Αντίθετα, το υψηλό ποσοστό νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων που εκφράζει την κυκλίνη E, δείχνει πως κατά τη διάγνωση του ΠΜ, η πλειοψηφία τους βρίσκεται στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Ως προς τις πρωτεΐνες pRb και p16, αναδείχτηκε ανοσοϊστοχημική έκφραση (>10%) στο 68% και χαμηλή ή απώλεια της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης στο 34% των περιπτώσεων ΠΜ, αντίστοιχα, καθώς και στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης τους και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 ( $p=0,0008$  και  $p=0,0002$ , αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά, ως προς την pRb, δείχνουν ότι εκφράζεται κυρίως στην ανενεργό / φωσφορυλιωμένη μορφή, καθώς και ότι η πλειοψηφία των πλασματοκυττάρων στο ΠΜ βρίσκονται στην φάση S του κυτταρικού κύκλου κατά την διάγνωση. Ως προς την p16, επιβεβαιώνονται προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν συχνή μεθυλίωση του p16 γονιδίου, χωρίς απαραίτητα να προκαλείται

απώλεια έκφρασης της p16 πρωτεΐνης κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στο ΠΜ. Στην παρούσα μελέτη, η έκφραση της κυκλίνης D3 συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση της p27 ( $p=0,002$ ) και αρνητικά με την έκφραση της p53 ( $p=0,029$ ), υποδεικνύοντας έτσι συμμετοχή των μονοπατιών της p27 και της Rb στη δράση της κυκλίνης D3. Βρέθηκε επίσης τάση στατιστικά σημαντικής θετικής συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης της pRb και της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με ΠΜ ( $p=0,057$ ), στηρίζοντας περαιτέρω την άποψη ότι οι μονόμορφες μεταλλάξεις του γονιδίου Rb δεν επηρεάζουν την λειτουργία των pRb. Αντίθετα, δεν ανιχνεύθηκε καμία επίπτωση της έκφρασης των κυκλινών D1, D2, D3, A, B1, E και της p16, στην συνολική επιβίωση ασθενών με ΠΜ. Επιπλέον, αναδείχτηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ α) της έκφρασης της κυκλίνης D2 και του ποσοστού διήθησης, των επιπέδων ασβεστίου στο αίμα, της τιμής  $\beta 2M$  ορού ( $p=0,006$ ,  $p=0,0079$ ,  $p=0,0219$ ), και β) μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D3 και των επιπέδων κρεατινίνης ορού ( $p=0,0059$ ) καθώς και στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D2 και της ηλικίας κατά τη διάγνωση ( $p=0,041$ ). Από τα παραπάνω, ενισχύεται η άποψη ότι η μεν κυκλίνη D2 παίζει ρόλο στην εξέλιξη της νόσου, αλλά αδυνατεί από μόνη της να καθορίσει την κλινική πορεία και την επιβίωση των ασθενών με ΠΜ, οι δε ασθενείς με ΠΜ και υπερέκφραση της κυκλίνης D3 πιθανόν να εκδηλώνουν συχνότερα νεφρική βλάβη από ασθενείς με αρνητική έκφραση.

Συμπερασματικά, η φωσφορυλίωση της pRb πρωτεΐνης που επάγουν από τη μία οι κυκλίνες D και τα σύμπλοκα τους, και αναστέλλει από την άλλη η πρωτεΐνη p16, έχει κεντρικό ρόλο στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και οποιαδήποτε διαταραχή στο μονοπάτι αυτό και γύρω από αυτό, φαίνεται πως οδηγεί στην παθογένεση του ΠΜ. Ως εκ τούτου, η διερεύνηση της ανοσοιστοχημικής έκφρασης μίας ομάδας πρωτεϊνών (διενέργεια screening) τόσο κατά τη διάγνωση, όσο και κατά την πορεία του νοσήματος, θα είχε κλινική χρησιμότητα, καθώς θα βοηθούσε σημαντικά στην καλύτερη κατανόηση του ΠΜ και σε πιο στοχευμένες μορφές θεραπείας. Τέλος, στην παρούσα μελέτη ξεχωρίζει η μεγάλη συχνότητα ανοσοιστοχημικής έκφρασης της κυκλίνης E, υποδηλώνοντας πως η πλειοψηφία των πλασματοκυττάρων στο ΠΜ κατά τη διάγνωση, φαίνεται να βρίσκεται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου.

## 6. SUMMARY

### **Expression analysis of proteins participating in Multiple Myeloma cell cycle.**

**DOCTORATE THESIS BY  
PESSACH ILIAS**

Recent investigations of the molecular mechanisms governing the G1 to S phase cell cycle progression, have demonstrated a critical role for the cyclin D/pRb/p16 pathway in MM cell cycle regulation. In the present study, a systemic analysis of the immunoeexpression of proteins participating in the cyclin D/pRb/p16 pathway (cyclins D1, D2, D3, A, B1, E, and proteins p16, pRb) was performed, in 62 bone marrow core biopsies from newly diagnosed myeloma patients. Protein immunoeexpression was correlated a) with each other, b) with Ki67 proliferative activity marker, c) with patient clinicopathological parameters, and d) with patient overall survival. Also, cyclin E immunohistochemical expression was specified for the first time, in bone marrow core biopsies of newly diagnosed MM cases.

In the present study, immunoeexpression (>10%) was found to be 34%, 42%, 8%, 76%, 29%, and 1.5% for cyclins D1, D2, D3, E, A, and B1 respectively, in newly diagnosed MM cases. These results further support previous findings in respect to cyclins D1, D2, D3 and A, while mitotic cyclin B1 immunoeexpression was found to be very low. In contrast, the great incidence found of cyclin E immunoeexpression, indicates high cell numbers in the S phase in MM at diagnosis. Regarding pRb and p16 proteins, their immunoeexpression (>10%) incidence in newly diagnosed MM cases, was found to be 68% positively expressing, and 34% negatively expressing, respectively, while a statistically significant positive correlation was displayed with Ki67 expression ( $p=0.0008$ ,  $p=0.0002$ , respectively). These results, further support that pRb expression in MM is majorly an indicator of its phosphorylated inactive form, as well as that the majority of myeloma cells should be in the S phase of the cell cycle. As for p16 protein, p16 methylation seems to be a frequent event like in all previous studies, although it is not always associated with reduced gene expression. In the present study, a statistically significant positive correlation between cyclin D3 and p27 expression ( $p=0.002$ ), as well as a negative correlation between cyclin D3 and

p53 expression ( $p=0.029$ ) was displayed, possibly reflecting the p27 and pRb pathways respectively, that cyclin D3 participates in. Furthermore, an almost statistically significant positive correlation ( $p=0,057$ ) was observed between pRb expression and overall survival, which is in agreement with the opinion that monoallelic Rb deletions do not alter pRb activity. In contrast, no correlation between cyclin D1, D2, D3, A, B1, E, and p16 expression and overall survival could be displayed. Also, a statistically significant positive correlation was found a) between cyclin D2 expression and filtration rate, Ca serum levels, B2M levels ( $p=0.006$ ,  $p=0.0079$ ,  $p=0.0219$ ), and b) between cyclin D3 expression and creatinine (CRE) levels ( $p=0.0059$ ), as well as a statistically significant negative correlation, between cyclin D2 expression and age at diagnosis ( $p=0.041$ ). From all the above, it is further supported that cyclin D2 alone is insufficient for leading to aggressive disease, and that cyclin D3 overexpressing myeloma patients could possibly have a tendency for renal damage more often than in cyclin D3 negative cases.

In conclusion, phosphorylation of the pRb protein, stimulated by D-type cyclins and their partners and inhibited by p16, is a critical step in cell cycle progression and any dysregulation of this pathway could lead to MM pathogenesis. Therefore, immunohistochemical protein screening, both at diagnosis and during disease progression would have clinical significance, as this would help in MM better understanding as well as to more targeted therapeutic strategies. Finally, what stands out from this study is the great incidence of cyclin E immunohistochemical expression, indicating high cell numbers in the S phase in MM at diagnosis.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cozzolino F, Trcia M, Aldinucci D, et al. Production of interleukin-1 by bone marrow myeloma cells. *Blood* 1989; 74:380-84
2. Durie BG, Salmon SE, Moon TE, et al. Pretreatment tumor mass, cell kinetics and prognosis in multiple myeloma. *Blood* 1980; 55:364-72
3. Feiner HD, Bannan M, Marsh E, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance.. A morphologic and immunophenotypic study of bone marrow. *Mod Pathol* 1992; 5:372-9
4. Alexanian R. Monoclonal gammopathy in lymphoma. *Arch Intern Med* 1975; 135:62-6
5. Epstein J, Xiao H, He XY, et al. Markers of multiple hematopoietic cell lineages in multiple myeloma. *New Engl J Med* 1990; 322:664-8.
6. Castro EB, Lewis JS, Strong EW, et al. Plasmacytoma of paranasal sinuses and nasal cavity. *Arch Otolaryngol* 1973; 97:326-9.
7. Corwin J, Lindberg RD. Solitary plasmacytoma of bone visé extramedullary plasmacytoma and their relationship to multiple myeloma. *Cancer* 1979; 43:1007-13
8. Alexanian R. Ten-year survival in multiple myeloma. *Arch Intern Med* 1985; 145:2073-4
9. Podar K, Tai YT, Davies FE, et al. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood* 2001; 98:428-35
10. Kyle RA. Long term survival in multiple myeloma. *N Engl J Med* 1983; 308:314-21
11. Alexanian R, Dimopoulos M. The treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 1994; 330:484-8
12. Davies FE, Anderson KC. Novel therapeutic targets in multiple myeloma. *Eur J Hematol* 2000; 64:359-67
13. Gertz MA, Pineda AA, Chen MG, et al. Refractory and relapsing multiple myeloma treated by blood stem cell transplantation. *Am J Med Sci* 1995; 309:152-8
14. Myeloma Trialist's Collaborative Group: Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. *J Clin Oncol* 1998; 16:3832-8

15. Abildgaard N, Bendix HK, Krinstensen JE, et al. Bone marrow fibrosis and disease activity in multiple myeloma monitored by the aminoterminal propeptide of procollagen III in serum. *Br J Haematol* 1997; 99:641-8
16. Dammaco F, Miggietta A, Tribalto M, et al. The expanding spectrum of clinical and laboratory features of IgE myeloma. *La Ricerca Clin Lab* 1980 ; 10:583-90
17. Eckert F, Schmid L, Kradolfer D, et al. Bone marrow plasmacytosis. An immunohistological study. *Blood* 1986; 53:11-9
18. Alexanian R. Diagnosis and management of multiple myeloma in Wiernik PH, Canellos GP, Kyle RA et al. *Neoplastic Diseases of the Blood* (ed 2). New York, Churchill Livingstone 1991; 453-66
19. Gould J, Alexanian K, Goodacre A, et al. Plasma cell karyotype in multiple myeloma. *Blood* 1988; 71;453-6
20. Ghevaert C, Fournier M, Bernardi F, et al. Non-secretory multiple myeloma with multinucleated giant plasma cells. *Leuk Lymphoma* 1997; 27:185-9
21. Gordon V, Bezwoda W, Derman D, et al. Quantitation of the monoclonal plasma cell component in bone marrow from patients with serum paraproteinemia and nondiagnostic marrow morphology. *Am J Hematol* 1986; 23:81-7
22. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986; 324:73-7
23. Bergsagel PL, Chesi M, Nardini E, et al. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:13931-6
24. Cathcart ES, Ritchie RF, Cohen AS, et al. Immunoglobulins and amyloidosis. *Am J Med* 1972; 52:93-101
25. Desikan KR, Dhodapkar MV, Hough A, et al. Incidence and impact of light chain associated amyloidosis on the prognosis of patients with multiple myeloma treated with autologous transplantation. *Leuk Lymphoma* 1997; 27:315-9
26. Khosla S. The OPG/RANKL system. *Endocrinology* 2001; 142:5050-5
27. Vesole D, Tricot G, Jagannath S. Autotransplant in multiple myeloma: what have we learned? *Blood* 1996; 88:838-47
28. Tricot G, Jagannath S, Vesole DH, et al. Relapse of multiple myeloma after autologous transplantation: survival after salvage therapy. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16:7-11

29. Garcia SR, Orfao A, Gonzalez M, et al. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy and cytogenetic characteristics. *Blood* 1999; 93:1032-7
30. Garcia SR, Orfao A, San Miguel JF, et al. Primary plasma cell leukemia and multiple myeloma: one or two diseases according to the methodology-response. *Blood* 1999; 94:3608-9
31. Kyle RA, Maldonado JE, Bayrd ED. Plasma cell leukemia. Report on 17 cases. *Arch Intern Med* 1994; 133:813-8
32. Soenen V, Preudhomme C, Roumier C, et al. Myelodysplasia during the course of myeloma. Restriction of 17p deletion and p53 overexpression to myeloid cells. *Leukemia* 1998;12(2):238-41
33. The World Health Organization (WHO) 2008, Plasma cell neoplasms, pages:200-213.
33. Alberts SR, Lanier AP. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma in Alaskan natives. *J Natl Cancer Inst* 1987; 78:831-7
35. Bataille R, Harousseau JL. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 1997;336:1657-62
36. Blattner WA. Epidemiology of multiple myeloma and related plasma cell disorders: an analytic review. IN: *Progress in myeloma*, Potter M (ed), New York 1980; 1-65
37. Lennert K, Hóbnér K. The pathology of multiple myeloma. Gustav Fischer Verlag, New York 1984; 355-71
38. Culter SJ, Young JL. Third National Cancer Survey: incidence data. Washington DC, US, Government Printing Office 1975
39. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA. Classification, subtype discovery and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002; 1(2):133-43
40. Linet MS, Sioban DH, Mc Laughlin JK. A case-control study of multiple myeloma in whites with chronic antigenic stimulation, occupation and drug use. *Cancer Res* 1987; 47:2978-81
41. Landis SH, Murray T, Bolden S. Cancer Statistics 1999. *CA Cancer J Clin* 1999; 49:8-15
42. Nandakumar A, Armstrong BK, De Klerk NH. Multiple myeloma in Western Australia: a case control study in relation to occupation, father's occupation, socioeconomic status and country of birth. *Int J Cancer* 1986; 37:223-6

43. Lichtenstein A, Tu Y, Fady C, et al. Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell Immunol* 1995; 162:248-51
44. Sezer O, Niemoller K, Kaufmann O, et al. Decrease of bone marrow angiogenesis in myeloma patients achieving a remission after chemotherapy. *Eur J Haematol* 2001; 66:238-44
45. Ludwig H, Fritz E, Friedl P. Epidemiology and agedependent data on multiple myeloma. *J Natl Cancer Inst* 1982; 68:729-33
46. Silverberg E. *Cancer statistics* 1985; 35:19-35
47. Singhal S, Mehta J, Desikan R. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999; 341:1565-71
48. Figgs LW, Dosemeci M, Blair A, et al. Risk of multiple myeloma by occupation and industry among men and women: a 24-state deathcertificate study. *J Occup Med* 1994;36(11):1210-21
49. Heineman EF, Olsen JH, Pottern LM, et al. Occupational risk factors for multiple myeloma among Danish men. *Cancer Causes Control*.1992;3(6):555-68
50. Fritschi L, Siemiatycki J. Lymphoma, myeloma and occupation: results of a case-control study. *Int J Cancer* 1996; 67(4):498-503
51. Kagan E, Jacobson RJ, Yeung KY, et al. Asbestos-associated neoplasms of B-cell lineage. *Am J Med* 1979; 67:325-30
52. Pasqualetti P, Casale R, Collacciani A, et al. Work activities and the risk of multiple myeloma. A case-control study. *Med Lav* 1990; 81(4):308-19
53. Ichimaru M, T, Mikami M. Multiple myeloma among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki. *Radiation Effects Ressearch Foundation Technical report no 9-79*. Hiroshima 1979
54. Mancuso TF, Stewart A, Kneale G. Radiation exposures of Hanford workers dying from cancer and other causes. *Health Phys* 1977; 33:369-85
55. Lewis EB. Leukemia, multiple myeloma and aplastic anemia in American radiologists. *Science* 1963; 142:1492-4
56. Costantini AS, Miligi L, Kriebel D, et al. A multicenter case-control study in Italy on hematolymphopoietic neoplasms and occupation. *Epidemiology* 2001; 12(1):78-87
57. Heimann R, Lan F, McBride R, et al. Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res* 2000; 60:298-304



58. Koessel SL, Theis MK, Vaughan TL, et al. Socioeconomic status and the incidence of multiple myeloma. *Epidemiology* 1996; 7(1):4-8
59. Corradini P, Boccadoro M, Voena C, et al. Evidence for a bone marrow B cell transcribing malignant plasma cell VDJ joined to Cmu sequence in immunoglobulin IgG- and IgA-secreting multiple myelomas. *J Exp Med* 1993; 178:1091-6
60. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998; 91:3-21
61. Mac Lennan ICM. In which cells does neoplastic transformation occur in myelomatosis? *Cur Top Microb Immunol* 1992; 182:209-13
62. Berenson RJ. Etiology of multiple myeloma: What's new. *Seminars in Oncology* 1999; 26(5):2-9
63. Meininger EJ, Zetter BR. Mast cells and angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology* 1992; 3:73-9
64. Zandecki M, Obein V, Bernardi F. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: chromosomal changes are a common finding within bone marrow plasma cells. *Brit J Haematol* 1995; 90:693-6
65. Klein B, Zhang XG, Jourdan M. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin 6. *Blood* 1989; 73:517-26
66. Zhang L, Rees MCP, Bicknell R. The isolation and long-term culture of normal human endometrial epithelium and stroma. *J Cell Sci* 1995; 108:323-31
67. Bataille R, Jourdan M, Zang XG, et al. Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflection of disease severity in plasma cell dyscrasias. *J Clin Invest* 1989; 84:2008-11
68. Greipp PR, Gaillard JP, Kalish LA, et al. Independent prognostic value of soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) in Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Myeloma Trial E9487. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology* 1993; 12:404-12
69. Vescio RA, Cao J, Hong CH. Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutations but no intraclonal diversity. *J Immunol* 1995; 155:2487-97
70. Brooks PC, Strmblad S, Sanders LC, et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin  $\alpha v \beta 3$ . *Cell* 1996; 85:683-93

71. Vacca A, Ribbati D, Roccaro MA, et al. Bone marrow angiogenesis and invasive potential in patients with active multiple myeloma. *Acta Haematol* 2001; 106:162-69
72. Montecucco C, Riccardi A, Ucci G. Analysis of human myeloma cell population kinetics. *Acta Haematol* 1986; 75:153-9
73. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-74
74. Bishoff J. Cell adhesion and angiogenesis. *J Clin Invest* 1997; 99:373-6
75. Drach J, Gatringer C, Hubber H, et al. Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 by human myeloma cells. *Clin Exp Immunol* 1991; 83:418-22
76. Gupta D, Treon SP, Shima Y, et al. Adherence of myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates VEGF secretion. Therapeutic applications. *Leukemia* 2001; 15:1950-61
77. Van Camp B, Durie BGM, Spier C. Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer associated antigen:CD56. *Blood* 1990; 76:377-82
78. Tricot G, Sawyer JR, Jagannath S. Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with multiple myeloma receiving high dose therapy and autotransplants. *J Clin Oncol* 1997; 15:2659-66
79. Rak JW, Mitsubashi Y, Bayko L. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/ VPF expression implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55:4575-80
80. Rao PH, Cigudosa JC, Ning Y. Multicolor spectral karyotyping identifies new recurring breakpoints and translocations in multiple myeloma. *Blood* 1998; 92:1743-8
81. Tsuchiya H, Epstein J, Selvanayagam P. Correlated flow cytometric analysis of H-ras, p21 and nuclear DNA in multiple myeloma. *Blood* 1988; 72:796-800
82. Rak JW, Filmus J, Finkenzeller G. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Met REV* 1995; 14:263-77
83. Avet LH, Daviet A, Brigaugeau C, et al. Cytogenetic, interphase and multicolor fluorescence in situ hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis on behalf of the Intergroup Francophone du Myelome and the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Blood* 2001; 97:822-5
84. Calasanz MJ, Cigudosa JC, Odero MD, et al. Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders. Primary break points and clinical correlations. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 18:84-93

85. Cigudosa JC, Rao PH, Calasanz MJ, et al. Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization. *Blood* 1998; 91:3007-10
86. Bakkus MH, Heirman C, Van Riet I, et al. Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. *Blood* 1992; 80:2326-35
87. Rudin CM, Thompson CB. B-cell development and maturation. *Semin Oncol* 1998; 25:435-46
88. Chesi M, Nardini E, Brents LA, et al. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 1997; 16:260-4
89. Chesi M, Nardini E, Lim RSC, et al. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene MMSET, resulting in IgH/ MMSET hybrid transcripts. *Blood* 1998; 92:3025-34
90. Konigsberg R, Zojer N, Ackermann J, et al. Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2000; 18:804-12
91. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature Rev Cancer* 2002; 2:175-87
92. Merup M. Genetic abnormalities in non-Hodgkin's lymphomas and chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol* 1998; 15:79-88
93. Ong ST, Le Beau MM. Chromosomal abnormalities and molecular genetics of non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 1998; 25:447-60
94. Seong C, Delasalle K, Hayes K. Prognostic value of cytogenetics in myeloma. *Brit J Haematol* 1998; 101:189-94
95. Chesi M, Brents LA, Ely SA, et al. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that distributes to tumor progression in multiple myeloma. *Blood* 2001; 97:729-36
96. Kyle RA. Prognostic factors in multiple myeloma. *Stem Cells* 1995; 2:56-62
97. Lacey DL, Timms E, Tan HL. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93:165-76
98. Rak JW, Mitsuhashi Y, Sheehan C. Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res* 2000; 60:490-8

- 99.** Avet LH. Nonrandom distribution of chromosomal abnormalities and correlation with clinical stage and prognostic presentations: a novel model for oncogenesis of multiple myeloma. VIIIth International Myeloma Workshop. Banff, Alberta, Canada 2001; 10-11
- 100.** Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan O, et al. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 1998; 91:4457-63
- 101.** Heuber AO, Zornig M, Lyon D, et al. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-myc-induced apoptosis. *Science* 1997; 278:1305-9
- 102.** Lida S, Rao PH, Butler M. Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat Genet* 1997; 17:226-30
- 103.** Liu PC, Leong T, Quam L. Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. *Blood* 1996; 88:2699-2706
- 104.** Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, et al. The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood* 1985; 66:380-85
- 105.** Jules PPM, Ewald JBM, Kun W, et al. Hematopoietic malignancies demonstrate loss of function mutations of BAX. *Blood* 1998; 91:2991-7
- 106.** Simpson DR, Berkahn LC, Squire J. Prognostic significance of cytogenetics in patients with multiple myeloma referred for autologous stem cell transplant. *Blood* 1997; 90(Suppl 1):527-532
- 107.** Kanavaros P, Stefanaki K, Vlahonikolis J, et al. Immunohistochemical expression of the p53, p21/Waf-1, Rb, p16 and Ki67 proteins in multiple myeloma. *Anticancer Res* 2000; 20(6B):4619-25
- 108.** Kerbel RS. Commentaries on tumor angiogenesis: an introduction. *Cancer Med Rev* 1996; 15:145-7
- 109.** Kondo S, Yin D, Aoki T. bcl-2 gene prevents apoptosis of basic fibroblast growth factor- deprived murine aortic endothelial cells. *Exp Cell Res* 1994; 213:428-32
- 110.** Giuliani N, Bataille R, Mancini C, et al. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/ osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow. *Blood* 2001; 98:3527-33

- 111.** Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* 2001; 98(13):3534-40
- 112.** Heider U, Jakob C, Zavrski I. Expression of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) on bone marrow plasma cells correlates with osteolytic bone disease in patients with multiple myeloma. *Blood* 2002; 100:3190-6
- 113.** Nagai M, Kyakumoto S, Sato N. Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA encoding a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269:532-6
- 114.** Sezer O, Heider U, Zavrski I, et al. RANKL ligand and osteoprotegerin in multiple myeloma. *Blood* 2002; 10:2-21
- 115.** Abe M, Hiura K, Wilde J, et al. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1a and MIP-1b in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood* 2002; 100:2195-02
- 116.** Hjorth-Hansen H, Seifert MF, Borset M, et al. Marked osteoblastopenia and reduced bone formation in a model of multiple myeloma bone disease in severe combined immunodeficiency mice. *J Bone Miner Res* 1999; 14(2):256-63
- 117.** Buss DH, Prichard RW, Hartz JW, et al. Initial bone marrow findings in multiple myeloma. Significance of plasma cell nodules. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110:30-3
- 118.** Canale DD, Jr Collins RD. Use of bone marrow particle sections in the diagnosis of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 1974; 61:382-92
- 119.** Kubagawa H, Vogler LB, Capra JD. Studies on the clonal origin of multiple myeloma. Use of individually specific (idiotype) antibodies to trace the oncogenic event to its earliest point of expression in B-cell differentiation. *J Exp Med* 1979; 150:792-807
- 120.** Ullrich S, Zolla-Pazner S. Immunoregulatory circuits in myeloma. In: Hoffbrand AV, Lasch HG, Nathan DG. *Clinical Haematology*. Eastbourne: WB Saunders 1982; 87:111-6
- 121.** Kishimoto T. Factors affecting B-cell growth and differentiation. *Annu Rev Immunol* 1985; 3:133-7
- 122.** Durie BG. Staging and kinetics of multiple myeloma in Wiernik PH, Canellos GP, Kyle RA et al.: *Neoplastic Diseases of the Blood* (ed 2). New York, Churchill Livingstone 1991; 439-52

- 123.** Jagannath S, Barlogie B, Dicke K, et al. Autologous bone marrow transplantation in multiple myeloma: Identification of prognostic factors. *Blood* 1990; 1860-1990
- 124.** Epstein J, Barlogie B, Katzmann J, et al. Phenotypic heterogeneity in aneuploid multiple myeloma indicates pre-B cell involvement. *Blood* 1988; 71:861-5
- 125.** Jundl J. Multiple myeloma and other differentiated B-cell malignancies. *Blood: textbook of hematology*. Boston, Little Brown & Co 1987; 831-43
- 126.** Kawano M, Tanaka H, Ishikawa H. Interleukin-1 accelerates autocrine growth of myeloma cells through interleukin-6 in human myeloma. *Blood* 1989; 73:2145-8
- 127.** Seidel C, Borset M, Turesson I. Elevated serum concentrations of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma. *Blood* 1998; 91:806-812
- 128.** Vacca A, Ribbati D, Presta M, et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* 1999; 93:3064-73
- 129.** Zhang XG, Klein B, Bataille R. Interleukin 6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. *Blood* 1989; 74:11-17
- 130.** Drach J, Gatringer C, Glassi H, et al. The biological and clinical significance of the Ki-67 growth fraction in multiple myeloma. *Hematol Oncol* 1992; 10:125-9
- 131.** Girino M, Riccardi A, Luoni R, et al. Monoclonal antibody Ki-67 as a marker of proliferative activity in monoclonal gammopathies. *Acta Haematol* 1991; 85:26-31
- 132.** Guo NH, Krutzsch HC, Inman JK. Thrombospondin 1 and type1 repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. *Cancer Res* 1997; 57:1735-42
- 133.** Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-62
- 134.** Willie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68:251-306
- 135.** Avet LH, Li JY, Morineau N, et al. Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Blood* 1999; 94: 2583-9
- 136.** Drach J, Angerler J, Schuster J, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization identifies chromosomal abnormalities in plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 1995; 86:3915-21
- 137.** Latreille J, Barlogie B, Johnston D. Ploidy and proliferative characteristics in monoclonal gammopathies. *Blood* 1982; 59:43-50

- 138.** Zandecki M, Lai JL, Facon T. Multiple myeloma: Almost all patients are cytogenetically abnormal. *Brit J Haematol* 1996; 94:217-27
- 139.** Kyle RA, Greipp PR. Smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med* 1980; 302; 1347-9
- 140.** Lust JA, Donovan KA. Biology and transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Cancer Control* 1998; 5:209-216
- 141.** Witzig TE, Gertz MA, Lust JA. Peripheral blood monoclonal plasma cells as a predictor of survival in patients with multiple myeloma. *Blood* 1996; 88:1780-7
- 142.** Burkhardt R, Kettner G, Bohm W, et al. Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone* 1987; 8:157-64
- 143.** Scutellari PN, Orzincolo C, Bagni B, et al. Bone disease in multiple myeloma. A study of 237 cases. *Radiol Med* 1992; 83(5):542-60
- 144.** Umeda M, Adachi Y, Tomiyama J, et al; Society for Geriatric Hematology. Bone lesions in elderly multiple myeloma. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 2002; 39(6):631-8
- 145.** Scutellari PN, Orzincolo C. Bone disease in multiple myeloma. Analysis of 253 controlled cases, with reappraisal of diagnostic criteria and current imaging techniques. *Radiol Med* 1993; 85(3):235-46
- 146.** Seidel C, Hjertner O, Abildgaard N. Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood* 2001; 98:2269-71
- 147.** Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, et al. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor. *Bone* 1999; 25(5):517-23
- 148.** Anderson KC, Lust JA. Role of cytokines in multiple myeloma. *Sem Hematol* 1999; 36(Suppl 3):14-20
- 149.** Chikazu D, Katagiri M, Ogasawara T, et al. Regulation of osteoclast differentiation by fibroblast growth factor 2. *J Bone Miner Res* 2001; 16(11):2074-81
- 150.** Suda T, Takahashi N, Udagawa N, et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999; 20:345-7
- 151.** Xu JL, Lai R, Kinoshita T, et al. Proliferation, apoptosis and intratumoral vascularity in multiple myeloma: correlation with the clinical stage and cytological grade. *J Clin Pathol* 2002; 55(7):530-4

- 152.** Naeim F. Plasma cell dyscrasia in the pathology of bone marrow. New York, Igaku-Shoin 1992; 234-40
- 153.** Suda T, Kobayashi K, Jimi E, et al. The molecular basis of osteoclast differentiation and activation. *Novartis Found Symp* 2001; 232:235-47
- 154.** Roux S, Meignin V, Quillard J, et al. RANKL (receptor activator of nuclear factor-kappa B) and RANKL expression in multiple myeloma. *Brit J Haematol* 2002; 117(1):86-92
- 155.** Honore P, Luger NM, Sabino MAC. Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical recognition of the spinal cord. *Nature Med* 2000; 5:521-8
- 156.** Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S. Multiple myeloma disrupts the transe/thrombospondin cytokine axis to stimulate bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:11581-6
- 157.** Grogan TM, Spier CM. The B-cell immunoproliferative disorders, including multiple myeloma and amyloidosis. *Neoplastic Hematopathology*, Baltimore, Williams & Wilkins 1992; 1235-65
- 158.** Wintrobe M. Plasma cell dyscrasias and multiple myeloma. Wintrobe M (ed), Lea & Febinger, Philadelphia 1981; 1599-1623
- 159.** Kyle RA. Amyloidosis. In: Hoffbrand AV, Lasch HG, Nathan DG. *Clinical hematology*. Eastbourne: WB Saunders 1982; 11:151-80
- 160.** Kyle RA, Greipp PR, O'Fallon WM. Primary systemic amyloidosis: multivariate analysis for prognostic factors in 168 cases. *Blood* 1986; 68:220-24
- 161.** Glenner GG, Ein D, Eanes ED, et al. The creation of amyloid fibrils from Bence-Jones protein in vitro. *Science* 1971; 174:712-14
- 162.** Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidoses: the beta-fibrilloses. *N Engl J Med* 1980; 302:1333-43
- 163.** Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidoses: the beta-fibrilloses (second of two parts). *N Engl J Med* 1980; 302:1333-43
- 164.** Shirahama T, Cohen AS. High resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. *J Cell Biol* 1967; 33:679-08
- 165.** Shirahama T, Cohen AS. Intralysosomal formation of amyloid fibrils. *Am J Pathol* 1975; 81:101-9
- 166.** Pennyl R, Hughes S. Repeated stimulation of the reticuloendothelial system and the development of plasma cell dyscrasias. *Lancet* 1970; 1:77-8



167. Wohleberg H. Osteomyelitis and plasmacytomas. *N Engl J Med* 1970; 283:822-3
168. Kjeldsberg CR, Eyre HJ, Totzke H. Evidence for intracellular amyloid formations in myeloma. *Blood* 1977; 50:493-504
169. Hynes RO. Integrins: versatility modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25
170. Economopoulos T, Pappa V, Panani A, et al. Myelopathies during the course of multiple myeloma. *Haematologica* 1991; 76(4):289-92
171. Van Gise H, Klingebiel T, Mikeler E. Acute renal failure: an integrative discussion of morphologic and functional findings. *Klin Wochenschr* 1982; 60:773-34
172. Isobe T, Osseman EF. Pathologic conditions associated with plasma cell dyscrasias: a study of 806 cases. *Ann NY Acad Sci* 1972; 190:507-518
173. Lam KY, Chan KW. Unusual findings in a myeloma kidney: a light-and electron-microscopic study. *Nephron* 1993; 65:133-6
174. Bernstein LR, Lolita LA. Molecular mediators of interactions with extracellular matrix components in metastases and angiogenesis. *Curr Opin Oncol* 1994; 6:106-13
175. Duijvestijn A, Hamann A. Mechanisms and regulation of lymphocyte migration. *Path Tod* 1989; 10:23-28
176. Kapadia SB, Desai U, Cheng U. Extramedullary plasmacytoma of the head and neck; a clinicopathologic study of 20 cases. *Medicine* 1982; 61:317-29
177. Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C. Primary plasma cell leukemia and multiple myeloma: one or two disease according to the methodology. *Blood* 1999; 94:3607
178. Alexanian R. Localized and indolent myeloma. *Blood* 1980; 56:521-5
179. Durie BG, Salmon SE. Multiple myeloma, macroglobulinemia and monoclonal gammopathies. In: Hoffbrand AV, Brain MC, Hirsch J. Recent advances in hematology. Edinburgh: Churchill-Livingstone 1977; 243-56
180. Salmon SE, Cassady JR. Plasma cell neoplasms. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg S. Philadelphia JB Lippincott 1988; 1854-63
181. Ludwig H. Multiple myeloma: diagnosis, clinic and therapie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1982
182. Lukes RJ, Collins RD. Tumors of the hematopoietic system. Washington DC, AFIP 1992; 130-8

- 183.** Rywlin AM. Plasma cells, eosinophils and mast cells in the histopathology of the bone marrow. Boston, MA, Little Brown 1976; 78-86
- 184.** Taylor CR, Russell R, Chandor S. An immunohistologic study of multiple myeloma and related conditions, using an immunoperoxidase method. *Am J Clin Pathol* 1978; 70:612-22
- 185.** Wolf BC, Brady K, O'Murchadha MT. An evolution of immunohistologic stains for immunoglobulin light chains in bone marrow biopsies in benign and malignant plasma cell proliferations. *Am J Clin Pathol* 1990; 94:742-6
- 186.** Terpstra WE, Lokhorst HM, Blomjous F, et al. Comparison of plasma cell infiltration in bone marrow biopsies and aspirates in patients with multiple myeloma. *Brit J Haematol* 1992; 82:46-9
- 187.** Wutke K, Varbiro M, Rudiger KD, et al. Cytological and histological classification of multiple myeloma. *Haematologia* 1981;14(3):315-29
- 188.** Committee of the Chronic Leukemia-Myeloma Task Force, National Cancer Institute: Proposed guidelines for protocol studies. II. Plasma Cell Myeloma. *Cancer Chemother Rep* 1973 ; 4 :145-57
- 189.** Merlini G, Waldenstrom JG, Jayakar SD. A new improved clinical staging system for multiple myeloma based on analysis of 123 treated patients. *Blood* 1980; 55:1011-9
- 190.** Costa G, Engle RL, Jr Schilling A, et al. Melphalan and prednisone: an effective combination for the treatment of multiple myeloma. *Am J Med* 1973; 54:589-99
- 191.** Greipp PR. Monoclonal gammopathies: new approaches to clinical problems in diagnosis and prognosis. *Blood Rev* 1989; 3:222-36
- 192.** Bartl R, Frisch B, Diem H, et al. Bone marrow histology and serum  $\beta$ 2 microglobulin in multiple myeloma – a new prognostic strategy. *Eur J Haematol* 1989; 43(Suppl 51):88-98
- 193.** Boccadoro M, Marmont F, Tribalto M, et al. Early responder myeloma: kinetic studies identify a patient subgroup characterized by very good prognosis. *J Clin Oncol* 1989; 7:119
- 194.** Cine DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91:3527-61
- 195.** Foerester J. Multiple myeloma in Lee GR, Bithell TG, Foerester J et al. *Wintrobe's Clinical Hematology* (ed 9). Philadelphia, PA, Lea & Febiger 1993; 2219-49

196. Cherng NC, Asal NR, Kuebler JP, et al. Prognostic factors in multiple myeloma. *Cancer* 1991; 67:3150-56
197. Cuzick J De Stalova BL, Cooper EH, et al. Long-term prognostic value of serum beta-2 microglobulin in myelomatosis. *Br J Haematol* 1990; 75:506-9
198. San Miquel JF, Sanchez J, Gonzalez M. Prognostic factors and classification in multiple myeloma. *Brit J Cancer* 1989; 59 :113-8
199. Dimopoulos MA, Barlogie B, Smith TL, et al. High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma. *Ann Intern Med* 1991; 115:931-38
200. Greipp PR, Katzmann JA, O'Fallon WM, et al. Value of beta-2 microglobulin level and plasma cell labeling indices as prognostic factors in patients with newly diagnosed myeloma. *Blood* 1988; 72:219-26
201. Rajkumar SV, Greipp RP. Prognostic factors in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999; 13(6):1295-14
202. Bartl R, Frisch B, Diem H, et al. Histological, biochemical and clinical parameters for monitoring multiple myeloma. *Cancer* 1991; 68:2241-50
203. Bataille R, Durie BG, Grenier J, et al. Serum beta-2 microglobulin and survival duration in multiple myeloma. A simple reliable marker for staging. *Br J Hhaematol* 1983; 55:439-45
204. Garewal H, Durie BG, Kyle RA, et al. Serum beta-2 microglobulin in the initial staging and subsequent monitoring of monoclonal plasma cell disorders. *J Clin Oncol* 1984; 2:51-57
205. Bataille R, Vincent C, Revillard JP, et al. Serum beta-2 microglobulin binding activity in monoclonal gammopathy: Correlative study and clinical significance. *Eur J Canc Clin Oncol* 1983;19 :1075-79
206. Katzmann JA, Greipp PR, O'Fallon WF, et al. Serum beta-2 microglobulin. *Mayo Clin Proc* 1986; 61:752-56
207. Dimopoulos MA, Mouloupoulos A, Smith T, et al. Risk of disease progression in asymptomatic multiple myeloma. *Am J Med* 1993; 94:57-63
208. Goasguen JE, Zandecki M, Mathiot C, et al. Mature plasma cells as indicator of better prognosis in multiple myeloma. New methodology for the assessment of plasma cell morphology. *Leuk Res* 1999;23(12):1133-40

- 209.** Hatjiharissi E, Terpos E, Papaioannou M, Hadjileontis C, Kaloutsi V, Galaktidou G, Gerotziakas G, Christakis J, Zervas K. The combination of intermediate doses of thalidomide and dexamethasone reduces bone marrow microvessel density but not serum levels of angiogenic cytokines in patients with refractory/relapsed multiple myeloma. *Hematol Oncol* 2004; 22(4): 159-68
- 210.** Lai JL, Zandecki M, Mary JY. Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood* 1995; 85:2490-97
- 211.** Bayrd ED. The bone marrow on sternal aspiration in multiple myeloma. *Blood* 1948; 3:987-1018
- 212.** Carter A, Hocherman I, Linn S, et al. Prognostic significance of plasma cell morphology in multiple myeloma. *Cancer* 1987; 60:1060-65
- 213.** Peest D, Coldewey R, Deicher H. Prognostic value of clinical, laboratory and histological characteristics in multiple myeloma: improved definition of risk groups. *Eur J Cancer* 1994; 29:978-83
- 214.** Fritz E, Ludwig H, Kundi M, et al. Prognostic relevance of cellular morphology in multiple myeloma. *Blood* 1984; 63:1072-9
- 215.** Pasqualetti P, Casale R, Cllacciani A, et al. Multiple myeloma: relationship between survival and cellular morphology. *Am J Hematol* 1990; 33:145-7
- 216.** Peterson LC, Brown BA, Crosson JT. Application of the immunoperoxidase technique to bone marrow trephine biopsies in the classification of patients with monoclonal gammopathies. *Am J Clin Pathol* 1986; 85:688-93
- 217.** Thiele J, Arenz B, Klein H. Differentiation of plasma cell infiltrates in the bone marrow. A clinicopathological study on 80 patients including immunohistochemistry and morphometry. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1988; 412:553-62
- 218.** Rajkumar SV, Yoon SY, Li CY, et al. Angiogenesis in myeloma: expression of basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors by neoplastic plasma cells. *Blood* 1999; 94:303b
- 219.** Azar HA. The myeloma cell. In: multiple myeloma and related disorders. Potter (eds), Harper & Row, New York 1973; 86-152
- 220.** Bartl R, Frisch B. Diagnostic morphology in multiple myeloma. *Curr Diagn Pathol* 1995; 2:222-35
- 221.** Bartl R, Frisch B, Burkhardt R, et al. Bone marrow histology in myeloma: it's importance in diagnosis, prognosis, classification and staging. *Br J Haematol* 1982; 51:361-9

- 222.** Bartl R, Frisch B, Fateh MA, et al. Histologic classification and staging of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 1986; 87:342-55
- 223.** Sukpanichnant S, Cousar JB, Leelasiri A, et al. Diagnostic criteria and histologic grading in multiple myeloma: histologic and immunohistologic analysis of 176 cases with clinical correlation. *Human Pathol* 1994; 25:308-18
- 224.** Greipp PR, Leong T, Bennett JM. Plasmablastic morphology : an independent prognostic factor with clinical and laboratory correlates. Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Myeloma Trial E9486 report by the ECOG Myeloma Laboratory Group. *Blood* 1998; 91:2501-7
- 225.** Paule B, Quillard J, Bisson M. Prognostic significance of plasma cell morphology in multiple myeloma. *Nouvelle Revue Francaise D'Hematologie* 1988; 30:209-216
- 226.** Greipp PR, Raymont NM, Kyle RA, et al. Multiple myeloma: significance of plasmablastic subtype in morphological classification. *Blood* 1985; 65:305-10
- 227.** Paule B, Quillard J, Bennet P. Morphologic heterogeneity and plasmablastic transformation in advanced plasmacytic/plasmablastic myeloma. A study of 35 serial bone marrow biopsies in 9 patients. *Nouvelle Revue Francaise D'Hematologie* 1989; 31:203-9
- 228.** Wollersheim HCH, Holdrinet RSG,, Haanen C. Clinical course and survival in 16 patients with localized plasmacytoma. *Scand J Haematol* 1984; 32:423-8
- 229.** San Miquel JF, Gonzalez M, Gascon A. Immunophenotypic heterogeneity of multiple myeloma: influence on the biology and clinical course of the disease. *Brit J Haematol* 1991; 77:185-91
- 230.** Barlogie B, Jangananath S, Epstein J, et al. Biology and therapy of multiple myeloma in 1996. *Semin Hematol* 1997; 34:67-72
- 231.** Bartl R, Frisch B. Bone marrow histology in multiple myeloma: prognostic relevance of histologic characteristics. *Hemato Rev* 1989; 3:87-108
- 232.** Pich A, Chiusa L, Marmont F, et al. Risk groups of myeloma patients by histologic pattern and proliferative activity. *Am J Surg Pathol* 1997; 21:339-47
- 233.** Barlogie B, Epstein J, Selvanayagam P, et al. Plasma cell myeloma. New insights and advances in therapy. *Blood* 1989; 73:865-79
- 234.** Barlogie B. Advances in therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer RES* 1997; 3:2605-2613

- 235.** Kyle RA. Diagnosis and management of multiple myeloma and related disorders. *Prog Hematol* 1986; 14:257-82
- 236.** Caligaris GF, Bergui L, Georgetti MG, et al. Role of bone marrow stromal cells in the growth of human multiple myeloma. *Blood* 1991; 78:60-5
- 237.** Durie BG, Salmon SE. The current status and future prospects of treatment for multiple myeloma. *Clin Haematol* 1982; 11:181-210
- 238.** Sailer M, Vykoupil KF, Peest D, et al. Prognostic relevance of a histologic classification system applied in bone marrow biopsies from patients with multiple myeloma: a histopathological evaluation of biopsies from 153 untreated patients. *Eur J Haematol* 1995; 54:137-46
- 239.** Sakalova A, Herrmann Z, Gazova S, et al. Osteoporosis in multiple myeloma. *Vnitr Lek* 1998; 44(11):649-53
- 240.** Standal T, Seidel C, Hjertner O. Osteoprotegerin is bound, internalized and degraded by multiple myeloma cells. *Blood* 2002; 100:3002-7
- 241.** Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999; 140:4382-9
- 242.** Greipp PR, Facon T, Williams CD. A single subcutaneous dose of osteoprotegerin construct causes a profound and sustained decrease of bone resorption comparable to standard intravenous bisphosphonate in patients with multiple myeloma. *Blood* 2001; 98:775a
- 243.** Hofbauer LC, Schoppet M. Serum measurement of osteoprotegerin: clinical relevance and potential applications. *Eur J Endocrinol* 2001; 145:681-3
- 244.** Bartl R, Frisch B, Fateh MA, et al. Histologic classification and staging of multiple myeloma: a retrospective and prospective study of 674 cases. *Am J Clin Pathol* 1987; 87:324-55
- 245.** Ahn MJ, Park CK, Choi JH, et al. Clinical significance of microvessel density in multiple myeloma patients. *J Kor Med Scie* 2001; 16:45-50
- 246.** Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1:27-31
- 247.** Kumar S, Fonseca R, Dispenzieri A, et al. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: effect of therapy. *Brit J Haematol* 2002; 119:665-71

248. Sensibar JA. Analysis of cell death and cell proliferation at embryonic stages, normal adult and ageing prostates in human and animals. *Microsc Res Tech* 1995; 30:342-50
249. Gasparini G, Harris AL. p53 and angiogenesis in neoplasia. In: Klijn JGM, editor. Prognostic and predictive value of p53. Scientific Updates 1. European School of Oncology. Amsterdam: Elsevier 1997; 115-30
250. Kim KJ, Li B, Winer J. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 1993; 362:841-4
251. Hisano N, Yatomi Y, Satoh K, et al. Induction and suppression of endothelial cell apoptosis by sphingolipids: a possible in vitro model for cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Blood* 1999; 93:4293-9
252. Irmeler M, Thorne M, Hanne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388:190-5
253. Sarraf CE, Bowen ID. Proportion of mitotic and apoptotic cells in a range of untreated experimental tumors. *Cell Tissue Kinet* 1988; 21:45-51
254. Acenero MJ, Gonzales JF, Gallego GM, et al. Vascular enumeration as a significant prognosticator for invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1998; 16:1684-88
255. Barbareschi M, Weinder N, Gasparini G, et al. Microvessel density quantification in breast carcinomas. *Appl Immunohistochem* 1995; 3:75-84
256. Chaudhary R, Bromley M, Clarke NW, et al. Prognostic relevance of microvessel density in cancer of the urinary bladder. *Anticancer Res* 1999; 3479-84
257. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, et al. Quantification and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol* 1995; 177(3):275-83
258. Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E, et al. Vascular integrin  $\alpha v \beta_3$ : A new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4:2625-34
269. Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Clinical Reviews in Oncology/Hematology* 2001; 37:97-114
260. Graham CH, Rivers J, Kerbel RS, et al. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin malignant melanomas. *Am J Pathol* 1994; 145:510-14

- 261.** Vermeulen PB, Verhoeven D, Fierens H, et al. Microvessel quantification in primary colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Brit J Cancer* 1995; 71:340-43
- 262.** Weber DM, Rankin K, Gavino M, et al. Angiogenesis factors and sensitivity to thalidomide in previously untreated multiple myeloma. *Blood* 2000; 96:168a
- 263.** Wei Y, Lukashev M, Simon DI. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science* 1996; 273:1551-5
- 264.** Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324:1-8
- 265.** Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 2002; 99:1745-57
- 266.** Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in haematopoietic malignancies. *Cancer Res* 1999; 59:728-33
- 267.** Ferrara N, Alitalo K. Clinical application of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 1999; 1:120-2
- 268.** Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275:964-7
- 269.** Hunt BJ, Jurd KM. Endothelial cell activation. *Br Med J* 1998; 316:1328-9
- 270.** Bellamy WT. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma and other hematopoietic malignancies. *Sem Oncol* 2001; 28:551-59
- 271.** Borset M, Hjorth-Hansen H, Seidel C, et al. Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in multiple myeloma. *Blood* 1996; 88:3998-4004
- 272.** Brunner G, Nguyen H, Gabrilove J, et al. Basic fibroblast growth factor expression in human bone marrow and peripheral blood cells. *Blood* 1993; 81:631-38
- 273.** Ribatti D, Vacca A, Nico B, et al. Bone marrow angiogenesis and mast cell density increase simultaneously with progression of human multiple myeloma. *Brit J Cancer* 1999; 79:451-55
- 274.** Dominici M, Campioni D, Lanza F, et al. Angiogenesis in multiple myeloma: correlation between in vitro endothelial growth and clinical-pathological features. *Leukemia* 2001; 15:171-76



- 275.** Azra R, Safer G, Suneel M, et al. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and haemopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 1995; 86:268-76
- 276.** Chauhan D, Khabanda S, Ogata A, et al. Interleukin-6 inhibits fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells. *Blood* 1997; 89:227-31
- 277.** Chauhan D, Anderson KC. Apoptosis in multiple myeloma: therapeutic implications. *Apoptosis* 2001; 6:47-56
- 278.** Dankbar B, Padro T, Leo R, et al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 2000; 95(8):2630-36
- 279.** Laroche M, Brousset P, Ludot I, et al. Increased vascularization in myeloma. *Eur J Haematol* 2001; 66:89-93
- 280.** Holmgren L. Antiangiogenesis restricted tumor dormancy. *Cancer Med Rev* 1996; 15:241-5
- 281.** Kenyon BM, Brown F, D'Amato RJ. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp Eye Res* 1997; 64:971-978
- 282.** Klein B, Jourdan M, Vasquez A, et al. Production of growth factors by myeloma cells. *Cancer Res* 1987; 47:4856-60
- 283.** Mangi HM, Newland CA. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Brit J Haematol* 2000; 111:43-51
- 284.** O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88:277-85
- 285.** Yaccoby S, Pearse RN, Johnson CL, et al. Myeloma interacts with the bone microenvironment to induce osteoclastogenesis and is dependent on osteoclast activity. *Br J Haematol* 2002; 116(2):278-90
- 286.** Neben K, Moehler T, Kraemer A, et al. Responce to thalidomide in progressive multiple myeloma is not mediated by inhibition of angiogenic cytokine secretion. *Br J Haematol* 2001; 115:605-8
- 287.** Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13:9-12

- 288.** Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T. Vascular endothelial growth factor directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett* 2000; 473:161-64
- 289.** Sezer O, Niemoller K, Eucker J, et al. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Annal Hematol* 2000; 79:574-77
- 290.** Vacca A, Di Loreto M, Ribbati D, et al. Bone marrow of patients with active multiple myeloma. Angiogenesis and plasma cell adhesion molecules LFA-1, VLA-4, LAM-1 and CD44. *Am J Haematol* 1995; 50:9-149.
- 291.** Vacca A, Ribbati D, Roccaro MA, et al. Bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. *Sem Oncol* 2001; 28:513-50
- 292.** Rajkumar SV, Kyle AR. Angiogenesis in multiple myeloma. *Sem Oncol* 2001; 28:560-64
- 293.** Sezer O, Jakob C, Eucker J, et al. Serum levels of angiogenic cytokines, basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2001; 66:83-8
- 294.** Rajkumar SV, Leong T, Roche CP, et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2000; 6:3111-3116
- 295.** Munshi N, Wilson C.S, Penn J, et al. Angiogenesis in newly diagnosed multiple myeloma. Poor prognosis with increased microvessel density in bone marrow biopsies. *Blood* 1998; 92:98a
- 296.** Munshi N, Wilson C.S. Increased bone marrow microvessel density in newly diagnosed multiple myeloma carries a poor prognosis. *Sem Oncol* 2001; 28:565-9
- 297.** Pruneri G, Ponzoni M, Ferreri JMA, et al. Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly to survival in multiple myeloma patients. *Brit J Haematol* 2002; 118:817-20
- 298.** Vacca A, Ribbati D, Roncalli A, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Brit J Haematol* 1994; 87:503-508
- 299.** Kumar S, Witzig TE, Dispenzieri A, et al. Effect of thalidomide therapy on bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia* 2004; 18:624-27
- 300.** Schreiber S, Ackermann J, Obermair A, et al. Multiple myeloma with deletion of chromosome 13q is characterized by increased bone neovascularization. *Brit J Haematol* 2000; 110:605-09

- 301.** Di Raimondo F, Azzaro M, Paumbo AG, et al. Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. *Haematologica* 2000; 85:800-05
- 302.** Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: a review. In: Hoffbrand AV, Lasch HG, Nathan DG. *Clinical Hematology*, WB Saunders 1982; 123-50
- 303.** Osterborg A, Mellstedt H. Clinical features and staging. In: Gahrton G and Durie BGM (eds) *Multiple Myeloma*. Arnold, London, 1996
- 304.** Nakamura H, Sakamoto M, Wakasugi K, et al. Ig D-lambda multiple myeloma associated with bone marrow fibrosis. *Rinsho Ketsueki* 1991; 32:395-8
- 305.** Pinkus GS, Said JW. Specific identification of intracellular immunoglobulin in paraffin sections of multiple myeloma and macroglobulinemia using an immunoperoxidase technique. *Am J Pathol* 1977; 87:47-58
- 306.** Salmon SE. Plasma cell dysorders. In: Wyngaarden JB, Smith LH, eds. *Cecil textbook of medicine*. Philadelphia: WB Saunders 1988; 1026-36
- 307.** Jancelewicz Z, Takatsuki K, Sugae S, et al. IgD multiple myeloma. Review of 133 cases. *Arch Intern Med* 1975; 135:87-93
- 308.** Papadimitriou CS, Schwarze EW. Extramedullary non-gastrointestinal plasmacytomas. An immunohistochemical study of sixteen cases. *Pathol Res Pract* 1983; 176:306-12
- 309.** Blade J, Kyle RA. Multiple myeloma in young patients: clinical presentation and treatment approach. *Leuk Lymphoma*. 1998; (5-6):493-501
- 310.** Bataille R. Localized plasmacytomas. *Clin Hematol* 1982; 11:113-22
- 311.** Young JL, Percy CL, Arise AJ. Surveillance, epidemiology and end results: incidence and mortality data. *Nat Cancer Inst* 1981; monograph 57, 81:2330
- 312.** Blade J, Kyle RA, Greipp PR, et al. Presenting features and prognosis in 72 patients with multiple myeloma who were younger than 40 years. *Br J Haematol* 1996; 93:345-49
- 313.** Blade J, Kyle RA, Greipp PR, et al. Multiple myeloma in patients younger than 30 years. Report of 10 cases and review of the literature. *Arch Intern Med*. 1996;156(13):1463-8.

- 314.** Riccardi A, Mora O, Brugnatelli S, et al. Relevance of age on survival of 341 patients with multiple myeloma treated with conventional chemotherapy: updated results of the MM87 prospective randomized protocol. Cooperative Group of Study and Treatment of Multiple Myeloma. *Brit J Cancer*. 1998;77(3):485-91.
- 315.** Corso A, Klersy C, Lazzarino M, et al. Multiple myeloma in younger patients: the role of age as prognostic factor. *Ann Hematol* 1998;76(2):67-72
- 316.** Kurabayashi H, Kubota K, Tsuchiya J, et al. Prognostic value of morphological classifications and clinical variables in elderly and young patients with multiple myeloma. *Ann Hematol*. 1999;78 (1):19-23
- 317.** Tricot G, Spencer T, Sawyer JR. Predicting long-term event-free survival in MM patients following planned tandem autotransplants. *Br J Haematol* 2002; 116:211-7
- 318.** Greipp PR, Lust JA, O'Fallon WM, et al. Plasma cell labeling index and beta-2 microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood* 1993; 81:3382-96
- 319.** Siegel DS, Desikan KR, Mehta J. Age is not a prognostic variable with autotransplants for multiple myeloma. *Blood* 1999; 93:51-57
- 320.** 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; 36:842-55
- 321.** Greipp PR, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23:3412 - 3420.
- 322.** Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16: 481-488
- 323.** Myeloma Trialists Collaborative Group: combination chemotherapy versus melphalan and prednisone as treatment of MM: an overview of 6,663 patients from 27 randomized trials. *JCO* 1998; 16: 3832-3842
- 324.** Attal M, Harousseau JL, Stoppa M, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in MM. *N Engl J Med* 1996;335:91-97
- 325.** Singhal S, Mehta J, Desikan R et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory MM. *N Engl J Med* 1999; 341: 1565-1571
- 326.** Glasmacher A, von Lilienfeld-Toal M. The current status of thalidomide in the management of multiple myeloma. *Acta Haematol*. 2005;114 Suppl 1:3-7.

- 327.** Rajkumar SV, Rosiñol L, Hussein M, Catalano J, Jedrzejczak W, Lucy L, et al. Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2008 May 1;26(13):2171-7.
- 328.** Wang M, Weber DM, Delasalle K, Alexanian R. Thalidomide-dexamethasone as primary therapy for advanced multiple myeloma. *Am J Hematol.* 2005 Jul;79(3):194-7.
- 329.** Palumbo A, Bringhen S, Caravita T, et al. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with MM: randomized control trial. *Lancet* 2006; 367:825-831
- 330.** Knight R, DeLap PJ, Zeldis JB, et al. Lenalinomide and venous thrombosis in MM. *N Engl J Med* 2006; 354: 2079-2080
- 331.** Dimopoulos MA, Spencer A, Attal M, et al. Study of lenalinomide plus dexamethasone versus dexamethasone alone in relapsed or refractory MM: results of a phase 3 study (MM-010). *Blood* 2005; 106:230a
- 332.** Rajkumar SV, Hayman SR, Lacy MQ, et al. Combination therapy with lenalinomide plus dexamethasone for newly diagnosed MM. *Blood* 2005; 106: 4050-4053
- 333.** Orłowski RZ, Baldwin AS. NFκB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 2002; 8: 385-389
- 334.** Richardson PG, Barlogie B, Berenson J et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory MM. *N Engl J Med* 2003; 348:2609-2617
- 335.** Richardson PG, Sonneveld P, Schuster M, et al. Bortezomib or high dose dexamethasone for relapsed MM. *N Engl J Med* 2005; 352: 2487-2498
- 336.** Orłowski RZ, Voorhees PM, Garcia RA et al. Phase 1 trial of bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood* 2005; 105: 3058-3065
- 337.** Mateos MV, Hernandez JM, Hernandez MT, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with MM. *Blood* 2006; 108: 21 65-21 72
- 338.** Child JA, Morgan GJ, Davies FE, et al. High dose chemotherapy with hematopoietic stem cell rescue for MM. *N Engl J Med* 2003; 348:1875-1883
- 339.** Attal M, Harousseau JL, Facon T, et al. Single versus double autologous transplantation for MM. *N Engl J Med* 2003; 349: 2495-2502
- 340.** Fonseca T, Barlogie B, Bataille R, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res* 2004; 64:1546-1558

- 341.** Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-28.
- 342.** Fisher RP, Morgan DO. A novel cyclin associates with MO15/cdk7 to form the cdk-activating kinase. *Cell* 1994;78:713-24.
- 343.** Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989;246:603-08.
- 344.** Hirama T, Koeffler P. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995;86:841-54.
- 345.** Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995;147:545-60.
- 346.** Bartek J, Lukas J, Bartkova J. Perspective: defects in cell cycle control and cancer. *J Pathol* 1999;187:95-9.
- 347.** Dictor M, Ehinger M, Mertens F, et al. Abnormal cell cycle regulation in malignancy. *Am J Clin Pathol* 1999;112:40-52.
- 348.** Lane DP. P53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.
- 349.** Marx J. How p53 suppresses cell growth. *Science* 1993;262:1644-45.
- 350.** Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998;282:1497-1501.
- 351.** Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. P53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
- 352.** Momand J, Zambetti GP, Olson DC, et al. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992;69:1239-45.
- 353.** Allred DC, Clark GM, Elledge R, et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:200-06.
- 354.** Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ, et al. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: An important new independent indicator of prognosis? *Hum Pathol* 1993;24:469-76.
- 355.** Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, et al. p53 in node-negative breast carcinoma: An immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *J Clin Oncol* 1995;13:821-30.
- 356.** Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, et al. Prognostic factors in nodenegative breast cancer. *Ann Surg* 2002;235:10-26.

- 357.** Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 1989;58:1085-95.
- 358.** Mittnacht S, Weinberg RA. G1/S phosphorylation of the retinoblastoma protein is associated with an altered affinity for the nuclear compartment. *Cell* 1991;65:381-93.
- 359.** Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998;12:2245-62.
- 360.** Helin K, Harlow E, Fattaey A. Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 1993;13:6501-08.
- 361.** Johnson DJ, Schwarz JK, Cress WD, et al. Expression of the E2F transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 1993;365:349-52.
- 362.** Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994;79:551-55.
- 363.** Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, et al. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A-CDK2 complex. *Nature* 1995;376:313-20.
- 364.** Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, et al. D-type cyclin dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1994;14:2066-76.
- 365.** Geng Y, Eaton E, Picon M, et al. Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* 1996;12:1173-80.
- 366.** Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, et al. Human cyclin E, a nuclear protein essential for G1 to S phase transition. *Mol Cell Biol* 1995;15:2612-24.
- 367.** Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993;366:701-04.
- 368.** Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-07.
- 369.** Vidal A, Koff A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 2000;247:1-15.
- 370.** Zhang H, Hannon GJ, Beach D. P21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 1994;8:1750-58.
- 371.** El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumour suppression. *Cell* 1993;75:817-25.
- 372.** Kato JY, Matsuoka M, Polyak K, et al. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 1994;79:487-96.

- 373.** Firpo EJ, Koff A, Solomon MJ, et al. Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin-2 induced proliferation of human T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1994;14:4889-4901.
- 374.** Viglietto G, Motti ML, Fresco A. Understanding p27kip1 deregulation in cancer: down-regulation or mislocalization? *Cell Cycle* 2002;6:394-400.
- 375.** Spirin KS, Simpson JF, Takeuchi S, et al. p27/Kip1 mutation found in breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:2400-04.
- 376.** Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nature Med* 1997;3:227-30.
- 377.** Loda M, Cukor B, Tam SW, et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinoma. *Nature Med* 1997;3:231-34.
- 378.** Kawana H, Tamaru J, Tanaka T, et al. Role of p27kip1 and cyclin-dependent kinase 2 in the proliferation of non-small cell lung cancer. *Am J Pathol* 1998;153:505-13.
- 379.** Chevillet JC, Lloyd RV, Sebo TJ, et al. Expression of p27kip1 in prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1998;11:324-28.
- 380.** Jordan RC, Bradley G, Slingerland J. Reduced levels of the cell-cycle inhibitor p27kip1 in epithelial dysplasia and carcinoma of the oral cavity. *Am J Pathol* 1998;152:585-90.
- 381.** Lloyd RV, Jin L, Qian X, et al. Aberrant p27kip1 expression in endocrine and other tumors. *Am J Pathol* 1997;150:401-07.
- 382.** Vlach J, Hennrecke S, Amati B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. *EMBO J* 1997;16:5334-44.
- 383.** Viglietto G, Motti ML, Bruni P, et al. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nature Med* 2002;8:1136-44.
- 384.** Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, et al. High level expression of p27kip1 and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27kip1 and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6380-85.



- 385.** Tsihlias J, Kapusta LR, DeBuer G, et al. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998;58:542-48.
- 386.** Florenes VA, Maelandsmo GM, Kerbel RS, et al. Protein expression of the cell-cycle inhibitor p27kip1 in malignant melanoma: inverse correlation with disease-free survival. *Am J Pathol* 1998;153:305-12.
- 387.** Tan P, Cady B, Wanner M, et al. The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:1259-63.
- 388.** Singh SP, Lipman J, Goldman H, et al. Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998;58:1730-35.
- 389.** Mori M, Mimori K, Shiraishi T, et al. p27 expression and gastric carcinoma. *Nature Med* 1997;3:593.
- 390.** Esposito V, Baldi A, DeLuca A, et al. Prognostic role of the cyclindependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997;57:3381-85.
- 391.** Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971;177:129-45.
- 392.** Gautier J, Minshull J, Lohka M, et al. Cyclin is a component of Maturation-Promoting Factor from *Xenopus*. *Cell* 1990;60:487-94.
- 393.** Gerhart J, Wu M, Kirschner M. Cell cycle dynamics of an M-phase specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J Cell Biol* 1984;98:1247-55.
- 394.** Bailly E, Doree M, Nurse P, et al. p34cdc2 is located in both nucleus and cytoplasm; part is centrosomally associated at G2/M and enters vesicles at anaphase. *EMBO Journal* 1989;8:3985-95.
- 395.** Parker LL, Piwnica-Worms H. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* 1992;257:1955-57.
- 396.** Lee MS, Ogg S, Xu M, et al. cdc25+ encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34cdc2. *Mol Biol Cell* 1992;3:73-84.
- 397.** Fisher RP, Morgan DO. A novel cyclin associates with MO15 / CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 1994;78:713-24.
- 398.** Glotzer M, Murray A, Kirschner M. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 1991;349:132-38.

- 399.** Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, et al. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8493-97.
- 400.** Winters ZE, Ongkeko WM, Harris AL, et al. p53 regulates Cdc2 independently of inhibitory phosphorylation to reinforce radiation-induced G2 arrest in human cells. *Oncogene* 1998;17:673-84.
- 401.** Taylor RW, Stark RG. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001;20:1803-15.
- 402.** Smits VAJ, Medema RH. Checking out the G2/M transition. *Bioch Bioph Acta* 2001;1519:1-12.
- 403.** Ling YH, el-Naggar AK, Priebe W, et al. Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells. *Mol Pharmacol* 1996;49:832-41.
- 404.** Gannon JV, Nebreda A, Goodger NM, et al. A measure of the mitotic index: studies of the abundance and half-life of p34cdc2 in cultured cells and normal and neoplastic tissues. *Genes Cells* 1998;3:17-27.
- 405.** Kawamoto H, Koizumi H, Uchikoshi T. Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and cdc2 in nonmalignant and malignant human breast lesions: immunocytochemical and quantitative image analyses. *Am J Pathol* 1997;150:15-23.
- 406.** Kallakury BV, Sheehan CE, Ambros RA, et al. The prognostic significance of p34cdc2 and cyclin D1 protein expression in prostate adenocarcinoma. *Cancer* 1997;80:753-63.
- 407.** Kallakury BV, Sheehan CE, Rhee SJ, et al. The prognostic significance of proliferation-associated nucleolar protein p120 expression in prostate adenocarcinoma: a comparison with cyclins A and B1, Ki-67, proliferating cell nuclear antigen, and p34cdc2. *Cancer* 1999;85:1569-76.
- 408.** Tran T, Ross JS, Carlson A, et al. Mitotic cyclins and cyclindependent kinases in melanocytic lesions. *Hum Pathol* 1998;29:1085-90.
- 409.** Wiesener B, Hauser-Kronberger CE, Zipperer E, et al. p34cdc2 in invasive breast cancer: relationship to DNA content, Ki67 index and cerbB-2 expression. *Histopathology* 1998;33:522-30.
- 410.** Brien TP, Depowski PL, Sheehan CE, et al. Prognostic factors in gastric cancer. *Mod Pathol* 1998;11:870-77.

- 411.** Attal M, Harousseau JL, Facon T, Guilhot F, Doyen C, Fuzibet JG, et al. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;349:2495–2502.
- 412.** Hideshima T, Richardson P, Anderson KC. Novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Immunol Rev* 2003;194:164–176.
- 413.** Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001;61:3071–3076.
- 414.** Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999;341:1565–1571
- 415.** Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008;111:2516–20.
- 416.** Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2004;351:1860–73.
- 417.** Greipp PR, Witzig TE, Gonchoroff NJ, et al. Immunofluorescence labeling indices in myeloma and related monoclonal gammopathies. *Mayo Clin Proc* 1987;62:969–77.
- 418.** Murray AW. Recycling the cell cycle: Cyclins revisited. *Cell* 2004; 116:221–34.
- 419.** Kamb A. Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet* 1995;11: 136–140.
- 420.** Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995; 9: 1149–1163.
- 421.** Strauss M, Lukas J, Bartek J. Unrestricted cell cycling and cancer. *Nat Med* 1995; 1: 1245–1246.
- 422.** Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81: 323–330.
- 423.** Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996; 68: 67–108.
- 424.** Nevins JR. E2F, a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 1992; 258: 424–429.
- 425.** Kramer A, Carstens CP, Fahl WE. A novel CCAAT-binding protein necessary for adhesion-dependent cyclin A transcription at the G1/S boundary is sequestered by a retinoblastoma-like protein in G0. *J Biol Chem* 1996; 271: 6579–6582.

- 426.** Kramer A, Carstens CP, Wasserman WW, Fahl WE. CBP/cycA, a CCAAT-binding protein necessary for adhesion-dependent cyclin Leukemia A transcription at the G1/S boundary consists of NF-Y and a novel 115 kDa subunit. *Cancer Res* 1997; 57: 5117–5121.
- 427.** Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994; 79: 573–582.
- 428.** Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, Tassies D, Jaffe ES, Monserrat E, Rozman C. Prad-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker for mantle cell lymphoma. *Blood* 1994; 84: 2726–2732.
- 429.** De Boer CJ, van Krieken JHM, Kluin-Nelemans HC, Kluin PM, Schuurin E. Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker for mantle cell lymphoma. *Oncogene* 1995; 10: 1833–1840.
- 430.** Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5\_CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995; 1: 686–692.
- 431.** Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998; 91: 3–21.
- 432.** Gould J, Alexanian R, Goodacre A, Pathak S, Hecht B, Barlogie B. Plasma cell karyotype in multiple myeloma. *Blood* 1988; 71: 453–456.
- 433.** Barlogie B, Hoover R, Epstein J. Multiple myeloma – recent developments in molecular and cellular biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 194: 37–41
- 434.** Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:175-187.
- 435.** 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 Jul 1;106(1):296-303.
- 436.** Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98:2229-2238.
- 437.** Smadja NV, Leroux D, Soulier J, et al. Further cytogenetic characterization of multiple myeloma confirms that 14q32 translocations are a very rare event in hyperdiploid cases. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;38:234-239.

- 438.** Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, et al. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood*. 2003;102:2562-2567.
- 439.** Bergsagel PL, Kuehl WM. Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunol Rev*. 2003; 194:96-104.
- 440.** Urashima M, Teoh G, Ogata A, et al. Characterization of p16INK4A expression in multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Clin Cancer Res*. 1997;3:2173-2179.
- 441.** Guillermin G, Gyan E, Wolowicz D, et al. p16(INK4a) and p15(INK4b) gene methylations in plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2001;98:244-246.
- 442.** Juge-Morineau N, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R. The retinoblastoma susceptibility gene RB-1 in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 1997;24:229-237.
- 443.** Kulkarni MS, Daggett JL, Bender TP, Kuehl WM, Bergsagel PL, Williams ME. Frequent inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p18 by homozygous deletion in multiple myeloma cell lines: ectopic p18 expression inhibits growth and induces apoptosis. *Leukemia*. 2002;16:127-134.
- 444.** Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res* 2004;64:1546-58.
- 445.** Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 2001;20:5611-22.
- 446.** Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, et al. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 2002;99:2185-91.
- 447.** Soverini S, Cavo M, Cellini C, et al. Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation. *Blood* 2003;102:1588-94.
- 448.** Specht K, Haralambieva E, Bink K, et al. Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels. *Blood* 2004;104:1120-6.
- 449.** Pruneri G, Fabris S, Baldini L, 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.

450. Hoechtlen-Vollmar W, Menzel G, Bartl R, et al. Amplification of cyclin D1 gene in multiple myeloma: clinical and prognostic relevance. *Br J Haematol* 2000;109:30-8.
451. Zukerberg LR, Yang WI, Arnold A, Harris NL. Cyclin D1 expression in non-Hodgkin's lymphomas. *American Journal of Clinical Pathology* 103: 756, 1995.
452. Vasef MA, Medeiros LJ, Yospur LS, Sun NCJ, McCourty A, Brynes RK. Cyclin D1 protein in multiple myeloma and plasmacytoma: An immunohistochemical study using fixed, paraffin-embedded tissue sections. *Modern Pathology* 10: 927, 1997.
453. Troussard X, Avet-Loiseau H, Macro M, Mellerin MP, Malet M, Roussel M, Sola B. Cyclin D1 expression in patients with multiple myeloma. *Hematol J*. 2000;1(3):181-5.
454. Athanasiou E, Kaloutsi V, Kotoula V, Hytiroglou P, Kostopoulos I, Zervas C, Kalogiannidis P, Fassas A, Christakis JI, Papadimitriou CS. Cyclin D1 overexpression in multiple myeloma. A morphologic, immunohistochemical, and in situ hybridization study of 71 paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol*. 2001 Oct;116(4):535-42.
455. Fonseca R, Witzig TE, Gertz MA, et al. Multiple myeloma and the translocation t(11;14)(q13;q32): a report on 13 cases. *Br J Haematol*. 1998;101:296-301.
456. Lai JL, Michaux L, Dastugue N, et al. Cytogenetics in multiple myeloma: a multicenter study of 24 patients with t(11;14)(q13;q32) or its variant. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998;104:133-138.
457. Feinman R, Sawyer J, Hardin J, et al. Cytogenetics and molecular genetics in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1997;11:1-25.
458. A Kramer, B Schultheis, J Bergmann, A Willer, U Hegenbart, AD Ho, H Goldschmidt and R Hehlmann. Alterations of the cyclin D1/pRb/p16INK4A pathway in multiple myeloma. *Leukemia* (2002) 16, 1844–1851.
459. Fonseca R, Blood EA, Oken M, et al. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood*. 2002;99:3735-3741.
460. Moreau P, Facon T, Leleu X, et al. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood*. 2002;100:1579-1583.

- 461.** Wilson CS, Butch AW, Lai R, et al. Cyclin D1 and E2F-1 immunoreactivity in bone marrow biopsy specimens of multiple myeloma: relationship to proliferative activity, cytogenetic abnormalities and DNA ploidy. *Br J Haematol.* 2001;112:776-782.
- 462.** Rasmussen T, Knudsen LM, Johnsen HE. Frequency and prognostic relevance of cyclin D1 dysregulation in multiple myeloma. *Eur J Haematol.* 2001;67:296-301.
- 463.** O. Markovic, D. Marisavljevic, V. Cemerikic, N. Suvajdzic, N. Milic, and M. Colovic. Immunohistochemical Analysis of Cyclin D1 and p53 in Multiple Myeloma Relationship to Proliferative Activity and Prognostic Significance. *Medical Oncology*, vol. 21, no. 1, 73–79, 2004
- 464.** Cherie Hilborn Dunphy, Melanie Kandt Nies, Don Alexander Gabriel. Correlation of Plasma Cell Percentages by CD138 Immunohistochemistry, Cyclin D1 Status, and CD56 Expression With Clinical Parameters and Overall Survival in Plasma Cell Myeloma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007 Sep;15(3):248-54.
- 465.** 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 Apr;125(4):615-24.
- 466.** Ely S, Di Liberto M, Niesvizky R, Baughn LB, Cho HJ, Hatada EN, Knowles DM, Lane J, Chen-Kiang S. Mutually exclusive cyclin-dependent kinase 4/cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 6/cyclin D2 pairing inactivates retinoblastoma protein and promotes cell cycle dysregulation in multiple myeloma. *Cancer Res.* 2005 Dec 15;65(24):11345-53.
- 467.** Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, Epstein J, Yaccoby S, Sawyer J, Burington B, Anaissie E, Hollmig K, Pineda-Roman M, Tricot G, van Rhee F, Walker R, Zangari M, Crowley J, Barlogie B and Shaughnessy JD: The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 108:2020-2028, 2006.
- 468.** 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.* 2009Mar;40(3):405-12.

- 469.** Ngo BT, Felthaus J, Hein M, 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;51:1632–1642.
- 470.** Dawson MA, Opat SS, Taouk Y, Donovan M, Zammit M, Monaghan K, Horvath N, Roberts AW, Prince HM, Hertzberg M, McLean CA, Spencer A. Clinical and immunohistochemical features associated with a response to bortezomib in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2009 Jan 15;15(2):714-22.
- 471.** Tasidou A, Roussou M, Terpos E, Kastritis E, Gkatzamanidou M, Gavriatopoulou M, Migkou M, Eleutherakis-Papaiakovou E, Nikitas N, Anagnostou D, Dimopoulos MA. Increased expression of cyclin-D1 on trephine bone marrow biopsies independently predicts for shorter overall survival in patients with multiple myeloma treated with novel agents. *Am J Hematol.* 2012 Jul;87(7):734-6.
- 472.** Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 2005; 24:2796-809.
- 473.** Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: Old acquaintances with new faces. *Oncogene* 2005; 24:2810-26.
- 474.** Matranga CB, Shapiro GI. Selective sensitization of transformed cells to flavopiridol-induced apoptosis following recruitment to S-phase. *Cancer Res* 2002; 62:1707-17.
- 475.** Jiang J, Matranga CB, Cai D, Latham Jr VM, Zhang X, Lowell AM, Martelli F, Shapiro GI. Flavopiridol-induced apoptosis during S phase requires E2F-1 and inhibition of cyclin A-dependent kinase activity. *Cancer Res* 2003; 63:7410-22.
- 476.** Litz J, Carlson P, Warshamana-Greene GS, Grant S, Krystal GW. Flavopiridol potently induces small cell lung cancer apoptosis during S phase in a manner that involves early mitochondrial dysfunction. *Clin Cancer Res* 2003; 9:4586-94.
- 477.** Kuroda Y, Sakai A, Tsuyama N, Katayama Y, Munemasa S, Asaoku H, Okikawa Y, Nakaju N, Mizuno M, Ogawa K, Nishisaka T, Matsui H, Tanaka H, Kimura A. Ectopic cyclin D1 overexpression increases chemosensitivity but not cell proliferation in multiple myeloma. *Int J Oncol.* 2008 Dec;33(6):1201-13.
- 478.** Mazumder S, DuPree EL, Almasan A. A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4: 65–75.
- 479.** Moroy T, Geisen C. Cyclin E. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36: 1424–1439.



- 480.** Polager S, Ginsberg D. E2F - at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol* 2008;18: 528–535.
- 481.** Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002;2: 103–112.
- 482.** Clurman BE, Sheaff RJ, Thress K, Groudine M, Roberts JM. Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev* 1996;10: 1979–1990.
- 483.** Welcker M, Clurman BE. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer* 2008;8:83–93.
- 484.** Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009;9: 153–166.
- 485.** Akli S, Keyomarsi K. Cyclin E and its low molecular weight forms in human cancer and as targets for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2003;2: S38–47.
- 486.** Caldon CE, Musgrove EA. Distinct and redundant functions of cyclin E1 and cyclin E2 in development and cancer. *Cell Div* 2010;5: 2.
- 487.** Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 2005;24: 2776–2786.
- 488.** Josefsberg Ben-Yehoshua L, Beider K, Shimoni A, Ostrovsky O, Samookh M, Peled A, Nagler A. Characterization of cyclin E expression in multiple myeloma and its functional role in seliciclib-induced apoptotic cell death. *PLoS One*. 2012;7(4):e33856.
- 489.** Hanamura I, Huang Y, Zhan F, Barlogie B, Shaughnessy J. Prognostic value of cyclin D2 mRNA expression in newly diagnosed multiple myeloma treated with high-dose chemotherapy and tandem autologous stem cell transplantations. *Leukemia*. 2006 Jul;20(7):1288-90.
- 490.** J Glassford, D Kassen, J Quinn, C Stengel, K Kallinikou, A Khwaja, K L Yong. Inhibition of cell cycle progression by dual phosphatidylinositol-3-kinase and mTOR blockade in cyclin D2 positive multiple myeloma bearing IgH translocations. *Blood Cancer J*. 2012 January; 2(1): e50
- 491.** Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:222–31.
- 492.** Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501–12.

- 493.** Shaughnessy J Jr, Gabrea A, Qi Y, Brents L, Zhan F, Tian E, Sawyer J, Barlogie B, Bergsagel PL, Kuehl M. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood* 2001;98:217–23.
- 494.** Sonoki T, Harder L, Horsman DE, Karran L, Taniguchi I, Willis TG, Gesk S, Steinemann D, Zucca E, Schlegelberger B, Sole F, Mungall AJ, *et al.* Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies. *Blood* 2001;98:2837–44
- 495.** Sampath D, Shi Z, Plunkett W. Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by the Chk1-Cdc25A pathway during the S-phase checkpoint activated by fludarabine: dysregulation by 7-hydroxystaurosporine. *Mol. Pharmacol.* 2002;62, 680–688.
- 496.** Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S, Zhang H. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J. Biol. Chem.* 2003;278, 21767–21773.
- 497.** Liu D, Liao C, Wolgemuth DJ. A role for cyclin A1 in the activation of MPF and G2 M transition during meiosis of male germ cells in mice. *Dev Biol* 2000;224(2): 338-400.
- 498.** Hoffman I, Clarke PR, Marcotte MJ, Karsenti E, Draetta G. Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J* 1993;12(1): 53-63.
- 499.** Kishimoto T, Okumura E. In vivo regulation of the entry into M-phase: initial activation and nuclear translocation of cyclin B/Cdc2. *Prog Cell Cycle Res* 1997;3:241-249.
- 500.** Gillet CE and Barnes DM: Cell cycle. *J Clin Pathol: (Mol Pathol)* 1998;51:310-316
- 501.** Corradini P, Inghirami G, Astolfi M, Ladetto M, Voena C, Ballerini P, Gu W, Nilsson K, Knowles DM, Boccadoro M, *et al.* Inactivation of tumor suppressor genes, p53 and Rb1, in plasma cell dyscrasias. *Leukemia.* 1994 May;8(5):758-67.
- 502.** Dao DD, Sawyer JR, Epstein J, Hoover RG, Barlogie B, Tricot G. Deletion of the retinoblastoma gene in multiple myeloma. *Leukemia.* 1994 Aug;8(8):1280-4.
- 503.** Juge-Morineau N, Mellerin MP, Francois S, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R. High incidence of deletions but infrequent inactivation of the retinoblastoma gene in human myeloma cells. *Br J Haematol.* 1995 Nov;91(3):664-7.

- 504.** Zojer N, Königsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Krömer E, Kaufmann H, Riedl L, Gisslinger H, Schreiber S, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood*. 2000 Mar 15;95(6):1925-30.
- 505.** NC Gutierrez, MV Castellanos, ML Martín, MV Mateos, JM Hernandez, M Fernandez, D Carrera, L Rosinol, JM Ribera, JM Ojanguren, L Palomera, S Gardella, L Escoda, JC Hernandez-Boluda, JL Bello, J de la Rubia, JJ Lahuerta, JF San Miguel. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* (2007) 21, 143–150
- 506.** Urashima M, Teoh G, Chauhan D, Hoshi Y, Ogata A, Treon SP, Schlossman RL, Anderson KC. Interleukin-6 overcomes p21/WAF1 upregulation and G1 growth arrest induced by dexamethasone and interferon-gamma in multiple myeloma cells. *Blood*. 1997 Jul 1;90(1):279-89.
- 507.** Kanavaros P, Stefanaki K, Vlachonikolis J, Papalazarou D, Rontogianni D, Arvanitis D, Antonakopoulos G, Gorgoulis V, Bai M, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of the p53, p21/Waf-1, Rb, p16 and Ki67 proteins in multiple myeloma. *Anticancer Res*. 2000 Nov-Dec;20(6B):4619-25.
- 508.** Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993 Dec 16;366(6456):704-7.
- 509.** Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*. 1994 Apr 15;264(5157):436-40.
- 510.** Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell*. 1996 Apr 5;85(1):27-37.
- 511.** Furonaka O, Takeshima Y, Awaya H, Ishida H, Kohno N, Inai K. Aberrant methylation of p14(ARF), p15(INK4b) and p16(INK4a) genes and location of the primary site in pulmonary squamous cell carcinoma. *Pathol Int*. 2004 Aug;54(8):549-55.

- 512.** Xing EP, Nie Y, Song Y, Yang GY, Cai YC, Wang LD, Yang CS. Mechanisms of inactivation of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1999 Oct;5(10):2704-13
- 513.** Shapiro GI, Park JE, Edwards CD, Mao L, Merlo A, Sidransky D, Ewen ME, Rollins BJ. Multiple mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 1995 Dec 15;55(24):6200-9.
- 514.** Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Silva JM, Rodriguez R, Muñoz C, Chacón I, Sanchez R, Carballido J, Colás A, España P, Bonilla F. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. *Mutat Res.* 2003 Sep 29;530(1-2):9-17.
- 515.** Tanaka R, Wang D, Morishita Y, Inadome Y, Minami Y, Iijima T, Fukai S, Goya T, Noguchi M. Loss of function of p16 gene and prognosis of pulmonary adenocarcinoma. *Cancer.* 2005 Feb 1;103(3):608-15.
- 516.** Mateos MV, García-Sanz R, López-Pérez R, Moro MJ, Ocio E, Hernández J, Megido M, Caballero MD, Fernández-Calvo J, Báñez A, Almeida J, Orfão A, González M, San Miguel JF. Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival. *Br J Haematol.* 2002 Sep;118(4):1034-40.
- 517.** Uchida T, Kinoshita T, Ohno T, Ohashi H, Nagai H, Saito H. Hypermethylation of p16INK4A gene promoter during the progression of plasma cell dyscrasia. *Leukemia.* 2001 Jan;15(1):157-65.
- 518.** Guillerme G, Depil S, Wolowiec D, Quesnel B. Different prognostic values of p15(INK4b) and p16(INK4a) gene methylations in multiple myeloma. *Haematologica.* 2003 Apr;88(4):476-8.
- 519.** Gonzalez-Paz N, Chng WJ, McClure RF, Blood E, Oken MM, Van Ness B, James CD, Kurtin PJ, Henderson K, Ahmann GJ, Gertz M, Lacy M, Dispenzieri A, Greipp PR, Fonseca R. Tumor suppressor p16 methylation in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Blood.* 2007 Feb 1;109(3):1228-32.
- 520.** Park G, Kang SH, Lee JH, Suh C, Kim M, Park SM, Kim TY, Oh B, Min HJ, Yoon SS, Yang IC, Cho HI, Lee DS; Korean Multiple Myeloma Working Party (KMMWP). Concurrent p16 methylation pattern as an adverse prognostic factor in multiple myeloma: a methylation-specific polymerase chain reaction study using two different primer sets. *Ann Hematol.* 2011 Jan;90(1):73-9.

- 521.** Dib A, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr, Kuehl WM. Methylation and expression of the p16INK4A tumor suppressor gene in multiple myeloma. *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):1337-8.
- 522.** Dawson MA, Opat SS, Taouk Y, Donovan M, Zammit M, Monaghan K, Horvath N, Roberts AW, Prince HM, Hertzberg M, McLean CA, Spencer A. Clinical and immunohistochemical features associated with a response to bortezomib in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2009 Jan 15;15(2):714-22.
- 523.** Kim H, Jekarl DW, Kim M, Kim Y, Lim J, Han K, Min CK. Prevalence of p16 methylation and prognostic factors in plasma cell myeloma at a single institution in Korea. *Ann Lab Med*. 2013 Jan;33(1):28-33.
- 524.** Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*. 2002 Jan;40(1):2-11.
- 525.** Thaler J, Fechner F, Herold M, Huber H. Interleukin-6 in multiple myeloma: correlation with disease activity and Ki-67 proliferation index. *Leuk Lymphoma*. 1994 Jan;12(3-4):265-71.
- 526.** Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*. 1993 Nov;123(3):513-22.
- 527.** Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000 Mar;182(3):311-22.
- 528.** Dziegiel P, Salwa-Zurawska W, Zurawski J, Wojnar A, Zabel M. Prognostic significance of augmented metallothionein (MT) expression correlated with Ki-67 antigen expression in selected soft tissue sarcomas. *Histol Histopathol*. 2005 Jan;20(1):83-9.





