

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

lek. Andrzej Szczepaniak

**Znaczenie diagnostyczno - rokownicze oceny histologicznej szpiku
oraz wybranych markerów immunohistochemicznych
u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. n. med. Maciej Kaźmierczak

Poznań 2018

PODZIĘKOWANIA

Panu dr hab. n. med. Maciejowi Kaźmierczakowi
składam serdeczne podziękowania
za opiekę naukową, poświęcony czas, uwagi i sugestie
oraz nieocenioną pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy,

Panu prof. dr hab. n. med. Mieczysławowi Komarnickiemu
za możliwość przeprowadzenia pracy badawczej
oraz za pomoc w ocenie histologicznej szpiku,

mgr Annie Przybyłowicz-Chaleckiej
oraz dr n. biol. Violetcie Filas
za pomoc w wykonaniu części badań.

Pracę dedykuję Żonie i Córce

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP

1.1. Definicja szpiczaka plazmocytoowego.....	9
1.2. Epidemiologia.....	10
1.3. Metody oceny klonalności i odsetka plazmocytoów.....	11
1.3.1. Klonalność.....	11
1.3.2. Odsetek nacieczenia.....	12
1.4. Ocena morfologiczna komórek szpiczakowych w biopsji aspiracyjnej.....	12
1.5. Ocena histologiczna trepanobiopatów z badaniem immunohistochemicznym....	13
1.5.1. Włóknienie.....	15
1.5.2. Charakterystyka antygenów komórkowych stosowanych w diagnostyce szpiczaka plazmocytoowego.....	16
1.5.2.1. CD138 (syndecan-1).....	16
1.5.2.2. CD56 (Neural Cell Adhesion Molecule /NCAM/).....	16
1.5.2.3. CD20.....	17
1.5.2.4. CD117 (Mast/stem cell growth factor receptor (SCFR) lub tyrosine- protein kinase Kit).....	17
1.5.2.5. Cyklina D1.....	19
1.5.2.6. Białko p53.....	19
1.5.2.7. Łańcuchy lekkie immunoglobulin kappa/lambda.....	20
1.6. Czynniki prognostyczne w szpiczaku plazmocytoowym.....	21
1.6.1. Diagnostyka cytogenetyczna.....	22
1.6.2. Ocena zaawansowania – klasyfikacje prognostyczne.....	25
1.7. Diagnostyka obrazowa w szpiczaku plazmocytoowym.....	28
1.8. Leczenia szpiczaka plazmocytoowego.....	28
2. CELE PRACY.....	31
3. MATERIAŁ I METODY.....	32
3.1. Charakterystyka grupy badanej.....	32
3.2. Kryteria włączenia i wyłączenia do udziału w badaniu.....	32
3.3. Metodyka badań histologicznych i immunohistochemicznych.....	33
3.4. Dane kliniczne i laboratoryjne.....	35
3.5. Analiza statystyczna.....	37
4. WYNIKI.....	39
4.1. Analiza porównawcza grup z uwzględnieniem czasu wykonania trepanobiopsji:	

w momencie rozpoznania choroby oraz przy nawrocie/progresji.....	39
4.1.1. Analiza częstości występowania odchyleń laboratoryjnych	39
4.1.2. Analiza stopnia zaawansowania choroby wg klasyfikacji prognostycznych (Durie-Salmon, ISS, R-ISS).....	40
4.1.3. Analiza występowania zmian cytogenetycznych oraz klasyfikacji ryzyka cytogenetycznego.....	41
4.1.4. Analiza porównawcza występowania wybranych elementów oceny histologicznej oraz badanych markerów immunohistochemicznych.....	42
4.1.4.1. Analiza występowania nasilenia włóknienia, rodzaju nacieku, typu rozrostu oraz stopnia nacieczenia szpiku.....	42
4.1.4.2. Analiza występowania markerów immunohistochemicznych.....	45
4.2. Znaczenie rokownicze wybranych elementów oceny histologicznej oraz badanych markerów immunohistochemicznych w biopsjach szpiku w grupie pacjentów z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym.....	48
4.2.1. Znaczenie rokownicze w odniesieniu do uznanych czynników prognostycznych w szpiczaku plazmocytowym.....	48
4.2.1.1. Znaczenie nasilenia włóknienia, rodzaju nacieku, typu rozrostu, stopnia nacieczenia w szpiku kostnym.....	48
4.2.1.2. Znaczenie ekspresji markerów immunohistochemicznych (CD56, CD20, p53, CD117, cyklina D1, łańcuch lekki immunoglobulin kappa/lambda).....	50
4.2.2. Czynniki wpływające na czas całkowitego przeżycia w grupie chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym.....	52
4.2.3. Czynniki wpływające na czas wolny od progresji choroby w grupie chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym.....	55
4.3. Analiza znaczenia wybranych elementów oceny histologicznej oraz badanych markerów immunohistochemicznych jako wskaźnika dla uzyskania odpowiedzi klinicznej na leczenie pierwszej linii	59
5. DYSKUSJA.....	62
6. WNIOSKI.....	81
7. STRESZCZENIE.....	82
8. SUMMARY.....	85
9. SUPLEMENT.....	88
10. BIBLIOGRAFIA.....	92

WYKAZ SKRÓTÓW

- AML - (ang. acute myeloid leukemia) ostra białaczka szpikowa
- APO 1 - (ang. apoptosis antigen 1) antygen apoptozy 1 lub Fas lub CD95
- ASO - qPCR - (ang. allele-specific oligonucleotide quantitative PCR) ilościowy PCR z użyciem oligonukleotydów specyficznych względem allelu
- ATM* - (ang. ataxia telangiectasia mutated) gen warunkujący powstanie zespołu ataksja-teleangiektazja
- autoSCT - (ang. autologous stem cell transplantation) autologiczna transplantacja komórek macierzystych
- B - bortezomib
- BA - biopsja aspiracyjna
- BCL-2 - (ang. B-cell lymphoma 2) białko regulacyjne 2 występujące w chłoniakach B komórkowych
- białko M - białko monoklonalne
- BRAF* - (ang. serine/threonine-protein kinase B-raf) gen kodujący onkogen B-Raf
- CCND* - gen kodujący cyklinę D
- CD - (ang. cluster of differentiation) antygen różnicowania komórkowego
- CDK - (ang. cyclin-dependent kinase) kinaza zależna od cykliny
- CI - (ang. confidence interval) przedział ufności
- CR - (ang. complete remission) remisja całkowita
- CRP - (ang. C-reactive protein) białko C reaktywne
- CT - (ang. computed tomography) tomografia komputerowa
- CTD - chemioterapia zawierająca cyklofosfamid, talidomid, deksametazon
- cytIg - (ang. cytoplasmic immunoglobulin) cytoplazmatyczne immunoglobuliny
- DLEU1* - (ang. deleted in lymphocytic leukemia 1) fragment niekodujący RNA w przewlekłej białaczce limfocytowej
- DS - klasyfikacja zaawansowania klinicznego wg Durie-Salmon
- EFS - (ang. event free survival) przeżycie wolne od zdarzeń
- EMC 92 - prognostyczny profil ekspresji 92 genów w szpiczaku plazmocytowym
- EMN - (ang. European Myeloma Network) Europejska Sieć Szpiczakowa
- FC - (ang. flow cytometry) cytometria przepływowa
- FGFR 3* - (ang. fibroblast growth factor receptor 3) gen kodujący receptor dla czynnika wzrostu fibroblastów 3
- FISH - (ang. fluorescence in situ hybridization) fluorescencyjna hybrydyzacja in situ

GEP - (ang. gene expression profile) profil ekspresji genów

ggn - górna granica normy

GIST - (ang. gastrointestinal stromal tumor) nowotwory podścieliska przewodu pokarmowego

HIV - (ang. human immunodeficiency virus) ludzki wirus upośledzenia odporności

ICSH - (ang. International Council for Standardization in Hematology) Międzynarodowa Rada do Spraw Standaryzacji w Hematologii

IF - immunofiksacja

IFM - (fran. Intergroupe Francophone du Myéloma) Francuska Grupa Szpiczakowa

IGH - (ang. immunoglobulin heavy chain) łańcuch ciężki immunoglobulin

IHC - immunohistochemia

IL - interleukina

IMiDs - (ang. immunomodulatory drugs) leki immunomodulujące

IMWG - (ang. International Myeloma Working Group) Międzynarodowa Grupa Robocza ds. Szpiczaka Plazmocytoowego

IP - (ang. immunoperoxidase) barwienie immunoperoksydazowe

ISS - (ang. International Staging System) Międzynarodowa Klasyfikacja Prognostyczna

KIT - gen kodujący receptorowe białko kinazy tyrozynowej Kit

KRAS - (ang. Kirsten rat sarcoma virus oncogene) gen kodujący proto-onkogen początkowo zidentyfikowany w komórkach mięsaka

LC - (ang. light chain) łańcuch lekki

LCD - (ang. light chain disease) choroba lekkiego łańcucha

LDH - (ang. lactate dehydrogenase) dehydrogenaza mleczanowa

LFA - (ang. lymphocyte function-associated antigen) antygen związany z funkcją limfocytów

MAF - (ang. musculoaponeurotic fibrosarcoma) gen kodujący czynnik transkrypcyjny Maf

MDM2 - (ang. mouse double minute 2 homolog) białko regulacyjne wiążące p53

MF - (ang. myelofibrosis) zwłóknienie szpiku

MGUS - (ang. monoclonal gammopathy of undetermined significance) gammopatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu

MM - (ang. multiple myeloma) szpiczak plazmocytowy

MPT - chemioterapia zawierająca melfalan, prednizon, talidomid

MRD - (ang. minimal residual disease) minimalna choroba resztkowa

MS4A1 - (ang. Membrane Spanning 4-Domains A1) gen kodujący antygen CD 20

mSMART - (ang. Mayo stratification of myeloma and risk-adapted therapy) cytogenetyczna skala rokownicza w szpiczaku plazmocytowym wg Mayo

MYC - (ang. myelocytomatosis) gen kodujący czynnik transkrypcyjny Myc

NCAM - (ang. Neural Cell Adhesion Molecule) cząsteczka adhezyjna komórek nerwowych – CD56

NGS - (ang. next-generation sequencing) sekwencjonowanie nowej generacji

NO - nie osiągnięto

NRAS - (ang. neuroblastoma RAS viral oncogene) gen kodujący onkogen początkowo zidentyfikowany w komórkach neuroblastomy

NW - niewydzielający typ szpiczaka plazmocytoowego

ORR - (ang. overall response rate) odsetek całkowitych odpowiedzi

OS - (ang. overall survival) czas całkowitego przeżycia

p14ARF - (ang. alternate reading frame protein 14) białko 14 zmiennej ramki odczytu

PAD - chemioterapia zawierająca bortezomib, doksorubicynę, deksametazon

PCL - (ang. plasma cell leukemia) białaczka plazmatycznokomórkowa

PCLI - (ang. plasma cell labeling index) indeks znakowania plazmocytów

PCR - (ang. polymerase chain reaction) łańcuchowa reakcja polimerazy

PD - (ang. progressive disease) progresja choroby

PET-CT - (ang. positron emission tomography - computed tomography) pozytonowa tomografia emisyjna – tomografia komputerowa

PFS - (ang. progression free survival) czas wolny od progresji

PR - (ang. partial remission) remisja częściowa

RBI - (ang. retinoblastoma 1) gen kodujący białko siatkówczaka 1

R-ISS- (ang. Revised International Staging System) Zmodyfikowana Międzynarodowa Klasyfikacja Prognostyczna

SCF - (ang. stem cell factor) czynnik wzrostu komórek macierzystych

sCR - (ang. stringent complete remission) rygorystyczna remisja całkowita

SD - (ang. stable disease) stabilizacja choroby

sFLC - (ang. serum free light chain) wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin w surowicy

SMM - (ang. smoldering multiple myeloma) szpiczak tlący

TB - trepanobiopat - fragment kości ze szpikiem uzyskany podczas trepanobiopsji

TP53 - (ang. tumor protein 53) białko 53

UAMS 70 - (ang. University of Arkansas for Medical Sciences 70) profil ekspresji 70 genów w szpiczaku plazmocytowym

VCD - chemioterapia zawierająca bortezomib, cyklofosfamid, deksametazon

VGPR - (ang. very good partial remission) bardzo dobra remisja częściowa

VLA - (ang. very late antigen) bardzo późny antygen

VMP - chemioterapia zawierająca bortezomib, melfalan, prednizon

VTD - chemioterapia zawierająca bortezomib, talidomid, deksametazon

WHO - (ang. World Health Organization) Światowa Organizacja Zdrowia

β2M - β-2-mikroglobulina

1. WSTĘP

1.1. Definicja szpiczaka plazmocytoowego

Nowotwory z komórki plazmatycznej (końcowe stadium różnicowania limfocytów B) obejmują trzy grupy chorób: szpiczak plazmocytowy (MM), izolowany guz plazmatyczno-komórkowy i zespoły związane z odkładaniem się immunoglobulin w tkankach. Wg zaktualizowanych w 2014 roku kryteriów przez Międzynarodową Grupę Roboczą ds. Szpiczaka Plazmocytoowego (IMWG) rozpoznanie opiera się na stwierdzeniu nacieku patologicznych, klonalnych plazmocytoów, stanowiących co najmniej 10% komórek szpiku kostnego oraz na obecności minimum jednego objawu, wynikającego z klonalnego rozrostu plazmocytoów, a nie będących efektem choroby towarzyszącej lub innej uchwytnej przyczyny [1]. Do wyżej wymienionych objawów definiujących chorobę należą hiperkalcemia, uszkodzenie funkcji nerek, niedokrwistość oraz zmiany osteolityczne w koście. Od 2014 roku również u pacjentów bez cech zajęcia narządowego, u których stwierdza się nacieki klonalne plazmocytoów, stanowiący $\geq 60\%$ komórek szpiku, stosunek klonalnych do nieklonalnych wolnych łańcuchów lekkich ponad 100 oraz obecność zmian ogniskowych w badaniu rezonansu magnetycznego, należy rozpoznać postać objawową szpiczaka plazmocytoowego (Tabela 1). Wśród stanów poprzedzających rozwój szpiczaka plazmocytoowego wyróżnia się gammapatię monoklonalną o nieustalonym znaczeniu (MGUS), której rozpoznanie wiąże się z ryzykiem progresji do choroby objawowej. Wyróżniono również postać szpiczaka bezobjawowego (tłącego się - SMM) z obecnością białka monoklonalnego w surowicy $>30\text{g/l}$ lub białka monoklonalnego w dobowej zbiórce moczu $>500\text{mg}/24\text{h}$ lub obecnością klonalnego nacieku w szpiku 10-60%, bez wykazania objawów świadczących o zajęciu narządowym. Wyróżnienie szpiczaka plazmocytoowego tłącego jest istotne, ponieważ często wyprzedza ono rozpoznanie objawowego szpiczaka plazmocytoowego (ryzyko progresji w ciągu pierwszych pięciu lat wynosi ok. 10% rocznie). Obecność białka monoklonalnego (M) nie warunkuje rozpoznania szpiczaka objawowego. Nawet u około 3% chorych nie stwierdza się obecności białka M przy zwiększonym odsetku klonalnych łańcuchów lekkich lub nieprawidłowym stosunku łańcuchów kappa/lambda. Tę grupę w piśmiennictwie określa się jako chorych na szpiczaka niewydzielającego. Wyróżnia się również grono około 3-5% pacjentów z izolowanym szpiczakiem kości lub naciekiem pozaszpikowym. Obecność $>20\%$ klonalnych plazmocytoów w rozmazie krwi obwodowej lub $2 \times 10^9/\text{l}$ plazmocytoów we krwi stanowi kryterium rozpoznania pierwotnej białaczki plazmatycznokomórkowej,

charakteryzującej się zdecydowanie gorszym rokowaniem oraz niekorzystnym przebiegiem (dotyczy około 2-5% chorych z MM) [2].

Tabela 1. Zmodyfikowane kryteria narządowego uszkodzenia związanego ze szpiczakiem plazmocytowym (SLiM CRAB) [2].

Objaw	Definicja
C (Calcium) - wapń	Skorygowane stężenie wapnia w surowicy $>0,25$ mmol/l (>1 mg/dl) powyżej górnej granicy wartości referencyjnej lub $>2,75$ mmol/l (>11 mg/dl)
R (Renal Insufficiency) - niewydolność nerek	Stężenie kreatyniny w surowicy >177 μ mol/l (>2 mg/dl) lub klirens kreatyniny <40 ml/min (mierzony lub wyliczony)
A (Anemia) - niedokrwistość	Stężenie hemoglobiny <2 g/dl poniżej dolnej wartości referencyjnej lub <10 g/dl
B (Bones) - kości	≥ 1 ognisko osteolityczne w RTG, CT lub PET-CT
S (Sixty) - 60	Odsetek klonalnych plazmocytów w szpiku lub biopsji tkankowej $\geq 60\%$.
Li (Light Chains) - łańcuchy lekkie	Stosunek stężenia klonalnych do nieklonalnych (involved/uninvolved) wolnych łańcuchów lekkich w surowicy ocenianego za pomocą metody opartej o przeciwciała poliklonalne (Binding Site, UK), co najmniej 100, przy czym stężenie łańcucha klonalnego w surowicy (involved) wynosi co najmniej 100 mg/l
M (Magnetic Resonance) - tomografia rezonansu magnetycznego	Obecność co najmniej dwóch ogniskowych nacieków w badaniu rezonansu kośćca (Whole Body STIR) o wymiarze co najmniej 5 mm każdy

1.2. Epidemiologia

Wśród nowotworów układu chłonnego szpiczak plazmocytowy stanowi trzecią jednostkę pod względem liczby nowych zachorowań w Polsce wg danych z Krajowego Rejestru Nowotworów z 2014 roku (standaryzowany współczynnik zachorowalności - 3,0) [3]. Dotyczy głównie osób po 50 roku życia (w 90%), średnia wieku przy rozpoznaniu to 68-70 lat, nieco częściej mężczyzn (M:K = 1,1:1,0). W Europie współczynnik zachorowalności wynosi od 4,5 do 6 na 100 000 mieszkańców, z medianą wieku wynoszącą ok. 72 lata. W 2015 roku w Stanach Zjednoczonych rozpoznano 6000 nowych przypadków szpiczaka

plazmocytoowego oraz obserwowano 11 000 zgonów spowodowanych tą chorobą. W Polsce w 2014 roku współczynnik standaryzowany zgonów z powodu szpiczaka plazmocytoowego wynosił 2,88 dla mężczyzn i 2,1 dla kobiet. Według danych literaturowych ryzyko wystąpienia choroby u krewnych pierwszego stopnia wzrasta około 3,7 krotnie w porównaniu z populacją ogólną [2, 4]. Czas przeżycia wśród tej grupy chorych uległ w ostatnich latach wydłużeniu wg danych pochodzących ze Stanów Zjednoczonych. American Cancer Society w 2011 roku podało, iż mediana przeżycia chorych w zależności od stopnia zaawansowania wg międzynarodowej klasyfikacji prognostycznej (ISS) wynosi 62, 44 i 29 miesięcy odpowiednio dla I, II, III stopnia zaawansowania choroby. Uwzględniając zmodyfikowaną międzynarodową klasyfikację prognostyczną (R-ISS), odsetek 5 letnich przeżyć wynosi dla R-ISS I, II i III odpowiednio 82%, 62% i 40% [5]. MGUS wykrywana jest u 3-4% osób po 50 roku życia, częściej u mężczyzn. Ryzyko progresji MGUS do szpiczaka plazmocytoowego wynosi 0,5 do 1% w ciągu roku. Zdecydowana większość przypadków (80%) dotyczy ewolucji MGUS związanej z białkiem monoklonalnym innym niż IgM, a w 20% z MGUS łańcuchów lekkich [6]. Izolowany szpiczak kości, podobnie jak postać pozakostna szpiczaka plazmocytoowego, występuje w 65% przypadków u mężczyzn a mediana wieku w momencie diagnozy wynosi 55 lat. U ponad 60% pacjentów z postacią miejscową choroby dochodzi do progresji do pełnoobjawowej postaci w ciągu 10 lat [2].

1.3. Metody oceny klonalności i odsetka plazmocytów

1.3.1. Klonalność

Warunkiem rozpoznania szpiczaka plazmocytoowego jest wykazanie obecności klonalnych plazmocytów za pomocą badania immunohistochemicznego trepanobiopsatów (TB) lub badania immunofenotypowego szpiku, bądź biopsji tkankowej pozaszpikowego guza plazmocytoowego. Ocena klonalności polega na wykazaniu zaburzonej proporcji plazmocytów kappa dodatnich do plazmocytów lambda dodatnich na podstawie badania immunohistochemicznego trepanobiopsatów.

W ostatnich latach wieloparametrowa cytometria przepływowa (FC) stała się przydatnym oraz wiarygodnym narzędziem w ocenie klonalności plazmocytów. European Myeloma Network (EMN) opracowała konsensus panelu przeciwciał, które powinny być zastosowane w diagnostyce szpiczaka plazmocytoowego oraz innych dyskracji plazmocytowych. Ma on służyć nie tylko określeniu klonalności poprzez oznaczenie łańcuchów lekkich immunoglobulin, ale także aberantnego fenotypu nowotworowych plazmocytów (rekomendowany panel przeciwciał to: CD38, CD138, CD45, cytIgλ/cytIgκ,

CD19, CD56, CD20, CD117, CD28, CD27) [7]. Jednakże zastosowanie tej metody wymaga dużego doświadczenia oraz zaplecza diagnostycznego, a panele stosowanych przeciwciał wciąż pozostają tematem dyskusji.

Klonalność plazmocytów można również potwierdzić za pomocą badań cytogenetycznych lub molekularnych, przy zastosowaniu qPCR z użyciem oligonukleotydów specyficznych względem allelu (ASO – qPCR), czy sekwencjonowania nowej generacji (NGS) sekwencji VDJ. Wymienione metody wraz z wieloparametrową cytometrią przepływową stanowią najczulsze narzędzia do oceny choroby resztkowej [8]. Jednakże dostępność oraz wysokie koszty sprawiają, że są to metody stosowane jedynie w opracowaniach naukowych.

1.3.2. Odsetek nacieczenia

W odniesieniu do obowiązujących definicji choroby znaczenie ma również określenie wielkości nacieku nowotworowego. Wiarygodnymi metodami służącymi do oceny odsetka plazmocytów pozostają badanie cytologiczne szpiku oraz ocena histologiczna trepanobiopsatu wraz z barwieniem immunohistochemicznym na obecność antygenu CD138 (markera plazmocytów). Za wielkość nacieku należy przyjąć wynik badania, w którym otrzymano najwyższą wartość. Średnia liczba komórek plazmatycznych w rozmazie szpiku z biopsji aspiracyjnej wynosi od 20-36%. Z danych literaturowych wynika, że powyższe badanie oraz FC nie są miarodajnymi technikami do określenia odsetka plazmocytów, gdyż otrzymane wyniki są często niższe w porównaniu z oceną histologiczną z immunohistochemią [4, 9].

1.4. Ocena morfologiczna komórek szpiczakowych w biopsji aspiracyjnej

Ocena morfologiczna patologicznych plazmocytów w biopsji aspiracyjnej (BA) jest trudna, pomimo wprowadzonych przez Dicka'a kryteriów (Tabela 2) [10].

Tabela 2. Kryteria dla morfologicznej diagnozy nowotworów z komórek plazmatycznych.

1. Atypowe plazmocyty o morfologii wykraczającej poza normy dla procesu reaktywnego.
2. Nacieki komórek plazmatycznych widoczny na przekrojach biopsatu.
3. Blisko 100% nacieku z komórek plazmatycznych w bogatokomórkowym rozmazie szpiku lub przekroju biopsatu.
4. Mniej przydatne kryteria: wielojądrowe komórki, brak predylekcji do struktur naczyniowych.

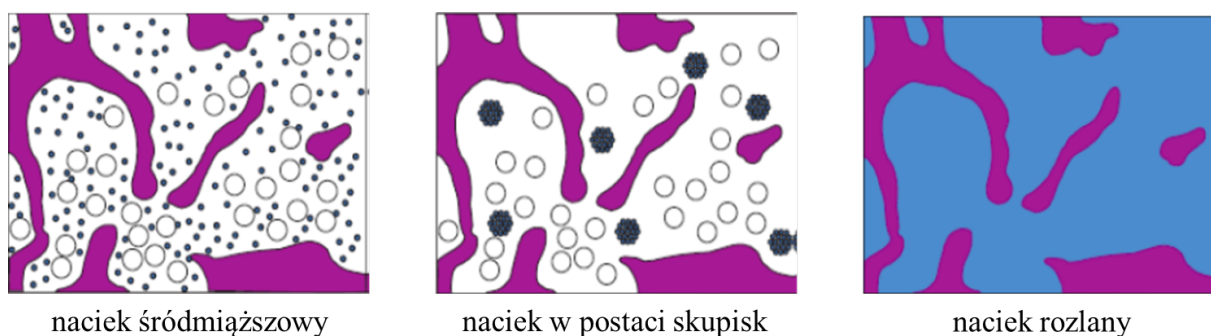
Atypowe komórki szpiczakowe są najczęściej większe od normalnych plazmocytołów. Zmiany jakościowe dotyczą zarówno jądra komórkowego jak i cytoplazmy. Komórki szpiczakowe charakteryzują się średnią do obfitej, zasadochłonną cytoplazmą, w której obserwuje się liczne zmiany, takie jak postrzępione brzegi, wakuole, ziarnistości oraz wtręty cytoplazmatyczne. Jądro jest większe, niż w komórkach prawidłowych, z mniej skondensowaną chromatyną oraz w różnym stopniu wysztancowanymi jąderkami. Około 5% pacjentów z MM posiada plazmocyty o wyglądzie małych, limfoidalnych komórek [4]. Robillard i wsp. opisali, że limfoplazmatyczna morfologia była związana ze zwiększoną ekspresją antygenu CD20 i CyklinyD1, a także częstszym występowaniem t(11;14) [11]. Dotychczas nie udało się, pomimo wielu prób, powiązać cech morfologicznych komórek z występowaniem monoklonalnych łańcuchów immunoglobulin, poza IgA. U chorych z białkiem w klasie IgA komórki szpiczakowe są pleomorficzne, większe i wielojądrzaste, często płomykowate z bladą, pofragmentowaną cytoplazmą. Częściej niż w innych typach immunologicznych (ok. 20% przypadków), jądro posiada wtręty wewnątrz. Z uwagi na cechy morfologiczne szpiczak został podzielony przez Greippa i wsp. na 4 typy cytologiczne: dojrzały, pośredni, niedojrzały oraz plazmoblastyczny. Ostatni związany jest ze znacząco krótszym czasem całkowitego przeżycia (OS) w porównaniu z pozostałymi trzema typami, między którymi nie obserwowano różnic [12]. Ocena cytologiczna szpiku jest cennym narzędziem w diagnostyce szpiczaka plazmocytołowego, jednakże nie umożliwia oceny klonalności plazmocytołów. Dlatego ma ono charakter pomocniczy i nie może samo stanowić podstaw rozpoznania szpiczaka plazmocytołowego.

1.5. Ocena histologiczna trepanobiopatów z badaniem immunohistochemicznym

Ocena histologiczna szpiku w schorzeniach hematologicznych ma ugruntowaną pozycję i powinna być stosowana w połączeniu z innymi metodami diagnostycznymi. Pozwala ona na ocenę komórkowości, utkania, architektoniki szpiku, włóknienia, podścieliska oraz obecności poszczególnych linii komórkowych, ze szczególnym uwzględnieniem zaburzeń w linii megakariopoetycznej [13]. Materiał do analizy uzyskuje się podczas zabiegu trepanobiopsji z kolca biodrowego tylnego górnego. W nielicznych przypadkach, gdy występują trudności techniczne lub szczególne uwarunkowania anatomiczne, wycinek kostny może pochodzić z innych lokalizacji, takich jak kołec biodrowy przedni górny, grzebień lub talerz kości biodrowej.

Badanie histologiczne TB opiera się na ocenie preparatów wybarwionych za pomocą metody H+E (hematoksylina–eozyna) wraz z markerami immunohistochemicznymi (IHC)

(antygenami różnicowania komórkowego (CD) oraz wybranymi białkami). Wydajność diagnostyczna tej metody w dużej mierze zależy od wielkości oraz liczby próbek. Wykazano, że trepanobiopaty o długości od 13-20mm miały najwyższą czułość diagnostyczną w limfoproliferacjach, a długość powyżej 20mm nie wpływała na wzrost odsetka nacieczenia. Czułość biopsji aspiracyjnej w diagnostyce MM określa się na ok. 88%. Wg Goyal i wsp. w blisko 8% przypadków rozpoznanie postawiono na podstawie trepanobiopsji, która pozwoliła na uwidocznienie ognisk nacieku nieodnotowanych w ocenie rozmazu. Dlatego autorzy podkreślają większą czułość diagnostyczną TB z IHC, szczególnie u chorych z niewielkim odsetkiem plazmocytów w aspiratach [14]. Biorąc pod uwagę specyfikę zajęcia szpiku w szpiczaku, w niektórych przypadkach, tylko małe skupiska komórkowe świadczą o nacieku, a jego rodzaj jest nierozdzielnie związany ze stopniem zaawansowania choroby. Wyróżnia się 3 typy nacieku plazmocytów: śródmiażdżowy, w postaci skupisk oraz rozlany (Rycina 1).



Rycina 1. Schemat przedstawiający rodzaje nacieku nowotworowego opisywane w szpiku chorych na szpiczaka plazmocytowego.

Naciek lokalny oraz śródmiażdżowy wiąże się z obecnością prawidłowych ognisk hematopoezy. W przypadku masywnego, rozlanego nacieku funkcja krwiotwórcza szpiku może być znacząco upośledzona. W postaciach zaawansowanych choroby obserwuje się progresję dwóch pierwszych rodzajów nacieczenia do rozlanego. Bazując na wielkości nacieku nowotworowego stworzono trzystopniową klasyfikację prognostyczną, opierającą się na odsetku zajęcia szpiku: I – mniej niż 20%; II - 20-50%; III - powyżej 50%. Wykazano korelację pomiędzy stopniem histologicznym, klinicznym oraz rokowaniem w przebiegu choroby. Ograniczeniem trepanobiopsji są nierzadko trudności w ocenie cech atypowych plazmocytów. W takich przypadkach jednoczasowa analiza trepanobiopatów oraz rozmazu szpiku może być kluczowa w celu postawienia prawidłowej diagnozy [4, 15, 16].

1.5.1. Włóknienie

Przybytek włókien retikulinowych oraz kolagenowych w preparatach szpiku określa się jako włóknienie. Wśród przyczyn wpływających na włóknienie szpiku wymienia się choroby z autoagresji, infekcje (sarkoidoza, gruźlica, zakażenie HIV), działanie substancji toksycznych oraz choroby nowotworowe. Włóknienie niewielkiego stopnia obserwuje się również w populacji osób zdrowych [17].

W celu wykrycia włókien retikulinowych stosuje się barwienia srebrem wykonywane metodą Gomoriego, natomiast włókna kolagenowe uwidacznia się za pomocą barwienia Mallorego lub Massona. Oceny zaawansowania włóknienia dokonuje się m.in. wg czterostopniowej skali utworzonej przez zespół ekspertów w 2005 roku (Tabela 3).

Tabela 3. Europejski konsensus dotyczący stopniowania włóknienia szpiku [17].

Stopień	Opis
MF-0	Rozproszone, linijne włókna bez skrzyżowań w odniesieniu do normalnego szpiku kostnego.
MF-1	Luźna sieć połączeń retikulinowych z licznymi skrzyżowaniami, zwłaszcza w obszarze okołonaczyniowym.
MF-2	Rozproszone i gęste zwiększenie włókien retikulinowych z masywnymi skrzyżowaniami, miejscami z ogniskami wiązek kolagenu i/lub ogniskową osteosklerotyzacją.
MF-3	Rozproszone i gęste zwiększenie włókien retikulinowych z masywnymi skrzyżowaniami, grubymi wiązkami kolagenu, z często towarzyszącą znaczącą osteosklerotyzacją.

Z danych literaturowych wynika, że zwiększenie włóknienia w przebiegu choroby nowotworowej jest negatywnym czynnikiem prognostycznym. W momencie diagnozy u około 38% chorych na szpiczaka plazmocytozy wykazano w szpiku zwłóknienie retikulinowe i kolagenowe, które w wielu przypadkach może być bardzo zaawansowane. Bardzo często szpiczak z zaawansowanym włóknieniem szpiku produkuje tylko łańcuchy lekkie immunoglobulin, jak również koreluje z rozlanym naciekiem przez plazmocyty oraz agresywniejszym przebiegiem choroby [4, 18].

1.5.2. Charakterystyka antygenów komórkowych stosowanych w diagnostyce szpiczaka plazmocytoowego.

1.5.2.1. CD138 (syndecan-1)

Przełom w rozpoznawaniu plazmocytoów nastąpił wraz z zastosowaniem CD138 (syndecan-1) - transbłonowego proteoglikanu bogatego w siarczan heparanu, który składa się z pięciu glikozaminoglikanów i jednego białka rdzeniowego. Jego rolą jest regulowanie aktywności czynników wzrostu wiążących heparan, indukcja apoptozy oraz hamowanie rozwoju szpiczaka. Bierze udział w różnicowaniu osteoblastów i osteoklastów oraz adhezji komórek szpiczakowych, co ma duże znaczenie w proliferacji, rozprzestrzenianiu pozaszpikowym komórek szpiczakowych oraz nawrotach po leczeniu.

Ekspresja CD138 jest specyficznym i czułym markerem końcowych stadiów różnicowania plazmocytoów. Nie stwierdza się go natomiast na proliferujących plazmoblastach i wcześniejszych stadiach rozwojowych limfocyta B. Raportowano jego niespecyficzną ekspresję również na komórkach nabłonkowych i nienabłonkowych guzów oraz w środowisku pozakomórkowym szpiku kostnego (gromadzenie w zrębie włóknistym). Zastosowanie tego markera pozwala na dokładniejszą ocenę liczby oraz dystrybucji plazmocytoów, dlatego powinno być rutynowo stosowane w ocenie trepanobiopsatów. W literaturze za próg znamienności przyjmowano ekspresję antygenu CD138 w co najmniej 10% komórek, co ma odzwierciedlenie w obecnie obowiązującej definicji choroby z 2014 roku [19-21]. Również w badaniu FC detekcja antygenu CD138, w połączeniu z analizą ekspresji CD38 oraz CD45, jest szczególnie czułym narzędziem do oceny minimalnej choroby resztkowej [8].

1.5.2.2. CD56 (Neural Cell Adhesion Molecule /NCAM/)

Jest to adhezyjna glikoproteina, występująca na komórkach NK, CD4+/CD8+ komórkach T oraz nowotworowych plazmocytach. Podczas embriogenezy obserwuje się jej ekspresję na komórkach neuroektodermy, gleju i mięśni szkieletowych, jak również wspomaga adhezję neuronów i mięśni podczas wzrostu. Antygen ten jest przykładem „obcego antygenu” dla komórek plazmatycznych, a jego obecność świadczy o złośliwości.

W tkance krwiotwórczej antygen CD56 odpowiada za utrzymanie plazmocytoów w niszy szpikowej, zwiększoną osteolizę, a jego niska ekspresja wiąże się z progresją do postaci białaczkowej oraz lokalizacją pozaszpikową (np. zajęcie układu nerwowego

z obecnością komórek szpiczakowych w płynie mózgowo-rdzeniowym) [22-24]. Przyjmuje się wysoką ekspresję antygeny CD56 na komórkach szpiczakowych za marker dobrego rokowania, związanego z mniejszą częstością wznów pozaszpikowych choroby [25]. Ekspresja CD56 jest obecna w 60-80% przypadków szpiczaka, wykazana zarówno metodą FC, jak i IHC. Immunohistochemicznie u chorych na szpiczaka stwierdzano obecność antygeny CD56, gdy jego ekspresja była o intensywności porównywalnej z tą na osteoblastach [26] lub w przypadku dodatniej reakcji błonowej w co najmniej 50% plazmocytów [27].

1.5.2.3. CD20 (antygen limfocytów B)

Antygen ten jest glikozylowaną aktywowaną fosfoproteiną, której rosnącą ekspresję obserwuje się na powierzchni limfocytów B począwszy od późnych pro-B limfocytów do dojrzałych form B komórkowych z wyjątkiem wczesnych form pro-B oraz prawidłowych plazmocytów [28]. U ludzi jest kodowana przez gen *MS4A1* [29]. Antygen ten jest zaangażowany w różnicowanie i dojrzewanie limfocyty B do plazmocyty. Występuje również na zmienionych nowotworowo komórkach B a także na nowotworowych plazmocytach. Ekspresja na tych ostatnich jest bardzo heterogenna i dotyczy 13-22% przypadków [30]. Rekomendacje EMN, w celu określenia aberantnego fenotypu nowotworowych komórek plazmatycznych, zawierają oznaczenie antygeny CD20 w panelu diagnostycznym szpiczaka plazmocytyowego oraz innych dyskracji plazmocytyowych [7]. Z danych literaturowych wynika, że pacjentów z ekspresją antygeny CD20, oznaczonego za pomocą immunohistochemii, w przynajmniej 10% komórek szpiczakowych, uznawano jako dodatnich w zakresie obecności tego markera [31]. Znaczenie prognostyczne CD20 na komórkach szpiczaka jest tematem nieustannych dyskusji. Część autorów zwraca uwagę na współwystępowanie z t(11;14) i mniej agresywny przebieg [11]. Inni natomiast opisują negatywny wpływ na erytropoezę [32]. Dodatkowo uważa się, że antygen ten może być potencjalnym celem terapeutycznym, gdyż przeciwciała monoklonalne anti-CD20 są stosowane w hematologii od wielu lat [30, 33].

1.5.2.4. CD117 (Mast/stem cell growth factor receptor (SCFR) lub tyrosine-protein kinase Kit)

C-Kit (CD117) to receptorowe białko kinazy tyrozynowej (typ III receptorów kinazy tyrozynowej), które u ludzi kodowane jest przez gen *KIT*, zlokalizowany na chromosomie 4.

Zbudowane jest z 3 części - zewnątrzkomórkowej, przezbłonowej oraz wewnątrzkomórkowej. Funkcjonuje jako receptor cytokinowy na powierzchni komórek, który w warunkach prawidłowych jest aktywowany przez ligand – czynnik wzrostu komórek macierzystych (SCF). W momencie związania z SCF tworzy dimer, uruchamiając swoistą aktywność kinazy tyrozynowej, która poprzez fosforylację aktywuje kaskadowe przekazywanie sygnału w komórce oraz powoduje aktywację czynników transkrypcyjnych w komórkach docelowych. Sygnalizacja przez CD117 odgrywa rolę w przeżyciu, proliferacji i różnicowaniu komórek oraz apoptozie [34]. Występuje na progenitorowych komórkach hematopoetycznych linii mieloidalnej, erytroidalnej oraz megakariocytarnej. Aktywność kinazy tyrozynowej c-Kit warunkuje prawidłowy proces krwiotworzenia w szpiku poprzez zwiększenie działania czynników wzrostu dla komórek hematopoetycznych, interleukin oraz wpływa, wraz z erytropoetyną, stymulując na prekursorowe komórki kolonii erytroidalnych. Antygen ten spotykany jest również na mastocytach, melanocytach w skórze oraz komórkach Cajala w przewodzie pokarmowym. Nadekspresja CD117 oraz aktywujące mutacje w genie kodującym c-KIT są jedną z przyczyn karcynogenezy (w nowotworach podścieliska przewodu pokarmowego (GIST), nasieniakach, ostrych białaczkach szpikowych, mastocytozie, mięsakach, nowotworach pochodzenia embrionalnego, raku drobnokomórkowym płuc, raku jasnokomórkowym nerki oraz w niektórych podtypach raka jajnika i piersi). Wykazano, że ekspresja CD117 znacząco rośnie na komórkach białaczkowych pochodzących z linii mieloidalnej, erytroidalnej oraz megakarioblastycznej, a nieco rzadziej na komórkach szpiczaka plazmocytozowego, chłoniaka Hodgkina i anaplastycznego. Obecność antygeny CD117 to wskaźnik różnicowania mieloidalnego, co jest wykorzystywane w diagnostyce i różnicowaniu pochodzenia komórek blastycznych. Jednakże w 1/3 przypadków AML nie można wykryć ekspresji tego antygeny na blastach [35-37]. Pomimo wielu badań nad znaczeniem prognostycznym antygeny c-Kit na komórkach nowotworowych, nie zostało ono jednoznacznie określone i wymaga dalszych badań. Ekspresja CD117 opisywana jest u 1/3 pacjentów ze szpiczakiem plazmocytozowym oraz u blisko 50% pacjentów z MGUS. W literaturze barwienie na obecność antygeny CD117 klasyfikowano jako ujemne (<1%), słabo dodatnie (1-4%), ogniskowo dodatnie (5-29%) oraz wysoce dodatnie (30-100%) [38]. Dane literaturowe jednoznacznie wskazują na korzystne znaczenie prognostyczne obecności antygeny CD117 u chorych na szpiczaka. Potencjalnie antygen CD117 może stać się celem terapeutycznym, gdyż wykazano skuteczność imatynibu w nowotworach GIST z mutacją dotyczącą egzonu 11. Niestety, w ostrych białaczkach oraz nasieniakach z mutacją w egzonie 17 lek ten nie był skuteczny [39].

1.5.2.5. Cyklina D1

Cyklina D1 jest białkiem z rodziny cyklin, kodowanym przez gen *CCND1*, który znajduje się na długim ramieniu chromosomu 11 (pasmo 11q13). W warunkach prawidłowych nie występuje na plazmocytach i komórkach limfoidalnych. Jego funkcją jest regulacja cyklu komórkowego. Cyklina D1 tworzy kompleks i działa jako regulatorowa podjednostka CDK4 lub CDK6 (kinazy zależnej od cyklin), powodując fosforylację produktu genu retinoblastoma a następnie prowadząc do uwolnienia czynnika transkrypcyjnego E2F. Proces ten jest wymagany do przejścia w cyklu komórkowym z fazy G1 do fazy S, umożliwiając replikację DNA i zwiększoną proliferację komórkową. Nadekspresja cykliny D1 w wyniku translokacji t(11;14) (q13; q32) (najczęstsza aberracja) lub amplifikacji genu cykliny D1 jest często obserwowana w różnych nowotworach (najczęściej w chłoniaku z komórek płaszczka oraz szpiczaku plazmocytowym) oraz może przyczyniać się do karcynogenezy [40]. Profilowanie ekspresji genów i badania FISH pozwoliły zidentyfikować istotne prognostycznie, różnorodne warianty genotypowe MM. Zasadniczo wszystkie przypadki szpiczaka z translokacjami genu łańcucha ciężkiego immunoglobulin (*IGH*) oraz hiperdiploidią są związane z zaburzoną, zwiększoną ekspresją cykliny D1, D2 lub D3. Przypadki z zaburzoną regulacją cykliny D1 lub D3 były związane z korzystnym rokowaniem w przeciwieństwie do grupy z nadekspresją cykliny D2. Chociaż większość badań dotyczących znaczenia prognostycznego cykliny D1 w MM przeprowadzono za pomocą linii komórkowych, mikromacierzy lub technik FISH, to istnieją doniesienia wykazujące przydatność IHC w ocenie prognostycznej w szpiczaku [41, 42]. Wg danych literaturowych za wynik dodatni ekspresji cykliny D1, u chorych na szpiczaka, przyjęto wartość $\geq 10\%$ komórek z dodatnią reakcją. Autorzy wyróżniają również podział na 3 grupy, w zależności od ilości dodatnich komórek: 1 + (10-19% jąder z pozytywną reakcją), 2 + (20-50% jąder z pozytywną reakcją) oraz 3 + ($\geq 50\%$ jąder z pozytywną reakcją) [43, 44].

1.5.2.6. Białko p53

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym o własnościach supresora nowotworowego, pełni funkcję regulacyjną w komórce. Dotyczy ona zwłaszcza aktywacji procesów związanych z naprawą DNA i wstrzymaniem cyklu komórkowego do czasu wykrycia uszkodzenia. W przypadku braku możliwości naprawy DNA komórka jest kierowana do apoptozy [45]. Białko p53 jest kodowane u ludzi przez gen *TP53*, który zlokalizowany jest na chromosomie 17 (*locus* 17p13). Somatyczne delecje allelu kodującego

p53 oraz mutacje punktowe *TP53* są najczęściej występującymi zmianami genetycznymi w procesie nowotworzenia u ludzi. Również u chorych na szpiczaka plazmocytoowego wykazano znaczenie rokownicze mutacji genu *TP53* oraz hemizygotycznej delecji 17p (p53). Częstość występowania mutacji punktowych jest stosunkowo niska (ok. 3%), natomiast del17p (p53) jest wykrywana u ok. 10% pacjentów w momencie diagnozy [20]. Zaburzenie to może również pojawiać się w trakcie progresji choroby, a w stadiach zaawansowanych może dotyczyć ponad 30% chorych. Obecność delecji wiąże się jednoznacznie z krótszym czasem przeżycia oraz agresywniejszym przebiegiem choroby [46-48]. Znaczenie rokownicze hemizygotycznej delecji 17p (p53) jest już udowodnione, jednakże rola pozostałego allelu p53 pozostaje nieustalona [49]. Opisuje się, że chorzy, u których dochodzi do delecji jednego ramienia chromosomu 17, mają zwiększony stopień niestabilności genomowej, co może prowadzić do mutacji w pozostałym allelu p53 [46]. Powstanie takich mutacji prowadzi do wydłużenia okresu półtrwania zmutowanego białka p53 w porównaniu z białkiem „typu dzikiego”, a w konsekwencji możliwości detekcji za pomocą oznaczeń immunohistochemicznych. Z powodu niskiego odsetka mutacji genu *TP53* oraz faktu, że nie zawsze prowadzą one do zwiększonej ekspresji białka, prawdopodobny jest udział innych mechanizmów regulacyjnych, takich jak np. molekuł p14ARF, powodujących stabilizację białka oraz jego nieprawidłową ekspresję [50]. Białko p53 wykrywane za pomocą IHC u chorych na szpiczaka było raportowane w 8-39% przypadków, a jako znamienne przyjmowano ekspresję białka w przynajmniej 10% komórek [46, 51].

1.5.2.7. Łańcuchy lekkie immunoglobulin kappa/lambda

Łańcuchy lekkie immunoglobulin to polipeptydowa składowa przeciwciała, które zbudowane są z dwóch łańcuchów ciężkich (IGH) oraz dwóch łańcuchów lekkich (LC). U ludzi wyróżnia się dwa typy łańcuchów lekkich: kappa kodowany przez locus na chromosomie 2 oraz lambda na chromosomie 22. Przeciwciała są produkowane przez dojrzałe postacie limfocytów B (plazmocyty), z których każdy ma określoną klasę LC raz na całe swoje życie. U zdrowych ludzi stosunek łańcuchów lekkich immunoglobulin kappa/lambda w surowicy mieści się w granicach 2:1. Wykorzystując nowoczesne metody wykrywania poliklonalnych LC ustalono normę dla stosunku kappa/lambda, który powinien zawierać się między 0,26 a 1,65 [52]. Komórki z linii B w tkance chłonnej posiadają łańcuchy lekkie immunoglobulin kappa lub lambda, ale nigdy oba jednocześnie. Stosując metodę immunohistochemiczną, można określić względną ilość komórek B z ekspresją LC kappa i lambda. Jeśli węzeł chłonny lub naciek chłonny w innej tkance jest odczynowy (zapalny) lub

ma charakter łagodny, powinien zawierać mieszaninę komórek kappa i lambda pozytywnych (poliklonalna populacja limfocytów). Jeżeli dominuje jeden rodzaj łańcucha lekkiego, to należy podejrzewać, że wszystkie komórki pochodzą z klonalnej populacji. Może to wskazywać na chorobę nowotworową, taką jak chłoniak z limfocytów B. Łańcuchy lekkie Ig produkowane przez klonalne plazmocyty w szpiczaku plazmocytowym nazywane są białkiem Bence'a-Jonesa [4]. W chorobach zapalnych wykazano, że LC mogą wiązać się z komórkami tuczными, wykorzystując ich zdolność do wiązania antygeny, a następnie ułatwiając ich aktywację. Aktywacja komórek tucznych powoduje uwalnianie mediatorów prozapalnych, które przyczyniają się do rozwoju choroby zapalnej [53]. Wykorzystanie barwień immunohistochemicznych wraz z oznaczeniem antygeny CD138 pozwala na określenie klonalności populacji plazmocytów u chorego z podejrzeniem dyskracji. Niejednokrotnie metoda histologiczna z IHC jest jedyną techniką pozwalającą na potwierdzenie klonalnego rozrostu plazmocytów, dlatego powinna być rutynowo stosowana w diagnostyce.

1.6. Czynniki prognostyczne w szpiczaku plazmocytowym

Chorzy na szpiczaka plazmocytoowego stanowią bardzo niejednorodną grupę z bardzo zróżnicowanym przebiegiem procesu chorobowego i czasem przeżycia (OS od <6 miesięcy do >10 lat). Dla większości jest to progresywna i nieuleczalna choroba, jednakże w dobie nowych terapii rokowanie uległo poprawie. Część chorych może mieć przebieg indolentny, nie zawsze wymagający prowadzenia terapii przeciwnowotworowej, osiągając wieloletnie okresy całkowitego przeżycia. Olbrzymie znaczenie ma wyselekcjonowanie pacjentów, u których choroba ma przebieg bardziej agresywny, szybciej dochodzi do progresji i skrócenia całkowitego czasu przeżycia. Poszukuje się czynników prognostycznych służących identyfikacji tej grupy pacjentów. Uważa się, że mogą oni odnieść korzyść z wcześniejszego włączenia leczenia oraz bardziej agresywnego postępowania terapeutycznego. Za najważniejsze zjawiska w patogenezie choroby oraz przyczyny progresji wymienia się zmiany genetyczne i molekularne. Warto również podkreślić w patofizjologii MM znaczenie mikrośrodowiska szpiku, białek macierzy zewnątrzkomórkowej, cytokin, czynników wzrostu (np. IL6), a także interakcji komórek zrębu szpiku z nowotworowymi komórkami plazmatycznymi [54, 55]. Olbrzymi wpływ na rokowanie u chorych ma wiek, obecność chorób towarzyszących, zły stan ogólny oraz słaba odpowiedź na leczenie indukujące. Określenie minimalnej choroby resztkowej (MRD) za pomocą cytometrii przepływowej po leczeniu jest również znaczącym parametrem, przewidującym czas wolny

od progresji choroby oraz czas całkowitego przeżycia, zwłaszcza u chorych poddawanych autologicznemu przeszczepieniu szpiku [8]. Dotychczas w literaturze opisywanych jest wiele czynników niekorzystnego rokowania w szpiczaku plazmocytowym, które można podzielić na kilka grup [2]:

- A. **Czynniki demograficzne oraz związane z klinicznym zaawansowaniem choroby:** wiek >65 lat, III stadium kliniczne wg Duriego-Salmona lub ISS, zły stan ogólny przed leczeniem oceniany na podstawie skali ECOG (ang. Eastern Cooperative Oncology Group), niewydolność nerek, obecność klasy IgA łańcucha ciężkiego immunoglobulin oraz łańcucha lekkiego lambda immunoglobulin
- B. **Histologiczne,** wśród których opisywane są plazmoblastyczny i niedojrzały typ rozrostu oraz zajęcie szpiku kostnego w postaci rozlanego nacieku, które zaobserwować można u pacjentów z zaawansowaną, nowo rozpoznaną chorobą lub często w przypadku progresji
- C. **Biochemiczne:** wysokie stężenie β -2-mikroglobuliny (β 2M) w surowicy (>3 mg/l, po uwzględnieniu niewydolności nerek); wysokie stężenie wolnych łańcuchów lekkich (sFLC); podwyższone stężenie LDH, IL6 w surowicy; stężenie CRP w surowicy >6 mg/l; duże stężenie rozpuszczalnej postaci CD56 (NCAM) w surowicy
- D. **Immunologiczne:** niska ekspresja powierzchniowych receptorów CD49e (VLA-5) i CD11a (LFA-1) komórek szpiczakowych; wysoka ekspresja antygenów CD40 i CD28 na komórkach szpiczakowych; obniżenie liczby limfocytów CD4+ oraz zwiększenie liczby subpopulacji CD8+; obecność krążących plazmocytów we krwi

Nie wszystkie z wymienionych parametrów są wykorzystywane w codziennej praktyce z uwagi na ograniczoną dostępność. Jednakże wiele z nich jest stosowanych celem oznaczenia stopnia zaawansowania klinicznego choroby.

1.6.1. Diagnostyka cytogenetyczna

Aktualnie przyjmuje się, że najważniejsze znaczenie patogenetyczne i rokownicze mają zaburzenia cytogenetyczne. W tym celu wszyscy chorzy przy rozpoznaniu choroby powinni mieć wykonane badanie metodą klasyczną oraz za pomocą badania fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ. Zmiany w kariotypie są wykrywane u blisko jednej trzeciej pacjentów za pomocą metody klasycznej, a u ponad 90% chorych za pomocą badania FISH. U chorych na szpiczaka dochodzi do zaburzeń liczbowych oraz strukturalnych dotyczących całych chromosomów, trisomii, częściowych lub całkowitych delecji i translokacji. Dość często obserwuje się złożone zaburzenia cytogenetyczne, co koreluje z niekorzystnym rokowaniem.

Typowy zestaw sond fuzyjnych lub rozdzielczych (wykorzystywanych w panelu szpiczakowym) stosowany w laboratoriach diagnostyki cytogenetycznej pozwala na określenie liczby kopii genów *TP53* i *DLEU1* oraz obecność fuzji *IGH/FGFR3*, *IGH/MAF* i *IGH/CCND1*. Najczęściej występujące translokacje chromosomowe dotyczą genu dla łańcucha ciężkiego immunoglobulin (*IGH*) na chromosomie 14q32 i dotyczą 55-70% osób. U blisko 40% pacjentów chorujących na szpiczaka plazmocytoowego znaleziono siedem onkogenów (większość niehiperdiploidalna: *CCND1* na 11q13, *MAF* na 16q23, *FGFR3/NSD2* 4p16.3, *CCND3* na 6p21, *MAFB* na 20q11, *MAFA* na 8q24 i *CCND2* na 12p13) zaangażowanych w translokacje z chromosomem 14. Pozostała grupa chorych jest w większości hiperdiploidalna z rzadko występującymi translokacjami dotyczącymi *IGH* (zazwyczaj dodatkowe chromosomy 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21) [55]. Współobecność trisomii chromosomów nieparzystych w pewnym stopniu może niwelować niekorzystne ryzyko cytogenetyczne, wynikające z obciążenia delecją *TP53* czy translokacjami: t(4;16) i t(4;20). Translokacje dotyczące *IGH* oraz hiperdiploidia wydają się być pierwotnym zjawiskiem w genezie nowotworów z komórek plazmatycznych, co wiąże się ze zwiększoną ekspresją jednego z genów cykliny D. Stworzono klasyfikację opartą na profilowaniu genetycznym ekspresji genów cykliny D w powiązaniu z nadekspresją onkogenów związanych z jedną z siedmiu translokacji *IGH*. Dzięki odkryciu tych wczesnych zjawisk patogenetycznych w szpiczaku i gammapatii monoklonalnej nie-IgM wyróżniono chorych mogących stanowić odrębne grupy wymagające zróżnicowanego podejścia terapeutycznego z uwagi na przebieg oraz rokowanie [56]. Monosomia oraz częściowa delecja chromosomu 13(13q14) może być wykryta za pomocą metody FISH nawet u połowy chorych na MM. Aberracje te występują często już na początku choroby, ale mogą pojawić się również w przypadku progresji lub nawrotu. Szczególnie dotyczy to grupy pacjentów z występowaniem t(11;14). Wśród innych opisywanych zmian genetycznych, prowadzących do autonomii guza, a występujących u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytoowym, wymienia się rearanżacje locus genu *MYC* (blisko połowa guzów plazmatycznokomórkowych). Zjawisko to może być przyczyną progresji MGUS nie-IgM oraz w późniejszych stadiach szpiczaka [57]. Podobnie mutacje aktywujące *KRAS*, *NRAS* lub *BRAF* (obecne nawet u 40% chorych) mogą być przyczyną progresji gammapatii monoklonalnej do szpiczaka. Inne powtarzalne zmiany genetyczne, będące przyczyną postępu choroby, to wtórne translokacje *IGH*, delecje lub mutacje genu *TP53* (17p13), powielenia fragmentu krótkiego ramienia chromosomu 1 (1p21) lub/i delecje fragmentu jego długiego ramienia (1q21), mutacje powodujące aktywację szlaku NF-kappa B, mutacje *FGFR3* w guzach z t(4;14), inaktywacje genów supresorowych (np. *RBI*) oraz zmiany epigenetyczne prowadzące do metylacji DNA. Udowodniono, że populacja komórek

nowotworowych może składać się z kilku klonów, mających heterogenne zmiany genetyczne, niewystępujące na wszystkich komórkach. Powyższe zjawisko ma wpływ na decyzje terapeutyczne, gdyż stosowane leki mogą oddziaływać na jeden lub kilka klonów komórkowych, pozostawiając inny, będący podłożem progresji choroby [58, 59].

Z uwagi na rozwój badań nad znaczeniem zmian genetycznych w patogenezie szpiczaka plazmocytoowego różne ośrodki badawcze rozszerzają panel badań FISH o dodatkowe aberracje, co ma szczególne zastosowanie w badaniach klinicznych nad nowymi terapiami. Dostępność tylko w wyspecjalizowanych jednostkach oraz koszty takiej diagnostyki ograniczają jej szerokie zastosowanie. IMWG określiła minimalny oraz rozszerzony panel sond, który powinien być zastosowany w diagnostyce szpiczaka plazmocytoowego (Tabela 4) [60].

Tabela 4. Konsensus rekomendacji dotyczący badań cytogenetycznych w MM wg IMWG.

Badania cytogenetyczne metodą FISH		
Panel minimum	Panel rozszerzony	Badania kliniczne
t(4;14)(p16;q32), t(14;16)(q32;q23), del(17p13)	t(11;14) (q13;q32), del13, określenie ploidalności, zaburzenia chromosomu 1	profilowanie ekspresji genów

W ślad za IMWG Polska Grupa Szpiczakowa w 2017 roku opublikowała algorytm diagnostyczny rekomendowany w polskich ośrodkach, który pozwala na szybkie wykrycie aberracji mających największy wpływ na postępowanie terapeutyczne (Suplement Rycina 9). W pierwszym etapie badania blisko połowa chorych może uzyskać końcową ocenę ryzyka cytogenetycznego, natomiast pozostali będą wymagać kolejnych analiz. Drugi etap badania pozwala określić partnera dla rearanżacji *IGH* (u ok. 20% chorych obecna jest rearanżacja *FGFR3*). W etapie trzecim należy sprecyzować grupę przypadków z rearanżacją *MAF* (ok. 5–7%). Pozostali chorzy będą w większości przynależeć do grupy o rokowaniu standardowym, u których wydaje się celowe wykonanie rozszerzonego panelu badań [2].

Wielokrotnie podkreśla się, że jakość badania zależy od prawidłowego pobrania materiału do analizy, zastosowania właściwej techniki badania FISH oraz odpowiedniej interpretacji wyników przez wyspecjalizowany personel. Międzynarodowe grupy ekspertów, w celu standaryzacji wyników, określiły kryteria dotyczące analizowanego materiału, technik badawczych oraz ustaliły wytyczne interpretacji rezultatów [2].

1.6.2. Ocena zaawansowania – klasyfikacje prognostyczne.

W celu określenia zaawansowania choroby oraz rokowania, zarówno w praktyce klinicznej, jak i w badaniach naukowych, stworzono klasyfikacje prognostyczne, opierające się na parametrach klinicznych oraz laboratoryjnych. Od 1975 roku w ocenie stopnia zaawansowania choroby stosowano klasyfikację wg Duriego i Salmona (DS), która umożliwia ocenę masy nowotworu w oparciu o stężenia hemoglobiny, wapnia, białka monoklonalnego w surowicy oraz obecność zmian osteolitycznych w kościach. Jednakże w ostatnich latach jej zastosowanie ma coraz mniejsze znaczenie. Greipp i wsp. wprowadzili prostą w użyciu Międzynarodową Klasyfikację Prognostyczną (ISS). Skala ta opiera się na ocenie 2 parametrów: stężenia β -2-mikroglobuliny i albuminy w surowicy (Tabela 5) [61].

Tabela 5. Międzynarodowa klasyfikacja prognostyczna MM (ISS) [61].

Stadium	Parametr
ISS 1	β 2M < 3,5 mg/l i albumina > 3,5 g/dl
ISS 2	β 2M < 3,5 mg/l i albumina < 3,5 g/dl lub β 2M 3,5-5,5 mg/l
ISS 3	β 2M > 5,5 mg/l

Tabela 6. Zmodyfikowana międzynarodowa klasyfikacja prognostyczna MM (R-ISS) [62].

Stadium	Parametr
R-ISS 1	β 2M < 3,5 mg/l i albumina > 3,5 g/dl + brak rearanżacji wysokiego ryzyka i LDH w normie
R-ISS 2	niespełniający kryteriów R-ISS 1 lub R-ISS 3
R-ISS 3	β 2M > 5,5 mg/l + [obecność del(17p) i/lub t(4;14) i/lub t(14;16)] lub/i LDH powyżej normy

Uwzględniając diagnostykę genetyczną w 2015 roku wprowadzono Zmodyfikowaną Międzynarodową Klasyfikację Prognostyczną (R-ISS). Poza dotychczas stosowanymi parametrami w skali ISS, uwzględnia w grupie wysokiego ryzyka obecność co najmniej jednej z 3 aberracji cytogenetycznych o niekorzystnym rokowaniu, zawartych w minimalnym rekomendowanym panelu diagnostycznym (del(17p), t(4;14) i t(14;16)) i/lub podwyższoną aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) (Tabela 6) [62]. Biorąc pod uwagę dane literaturowe, odsetek 5 letniego przeżycia w stadium 2 wg R-ISS wynosi około 62%, a w 1 i 3 odpowiednio 82% i 40%. Skala ta jest cennym narzędziem do oceny rokowania (czasu

przeżycia chorych), niezbędnym w planowaniu leczenia oraz jego intensywności. Aktualnie jest ona najczęściej używaną klasyfikacją prognostyczną u pacjentów ze szpiczakiem.

Analiza cytogenetyczna metodą FISH w plazmocytach pochodzących ze szpiku pozwala na stratyfikację pacjentów do trzech grup ryzyka cytogenetycznego [dużego (wysokie), pośredniego i małego (standardowe)] wg klasyfikacji Intergroupe Francophone du Myéloma (IFM) i Mayo Clinic (mSMART) (Tabela 7) oraz zmodyfikowanej klasyfikacji na podstawie pracy Rajkumara (Tabela 8). Za najważniejsze czynniki złego rokowania w ww. klasyfikacjach uznaje się obecność *del(17p)/TP53*, translokacji *MAF* (*t(14;16)* i *t(14;20)*), *del(1p)* [63, 64]. Z kolei IMWG zaproponowało klasyfikację molekularno-cytogenetyczną, w której wyróżniono postać hiperdiploidalną (lepiej rokująca) oraz niehiperdiploidalną, z obecnością translokacji dotyczących genu *IGH* (agresywniejszy przebieg choroby) (Tabela 9) [65].

W badaniach naukowych znajdują również zastosowanie stratyfikacje oparte na metodzie analizy profilu ekspresji genów (GEP), określające sygnatury molekularne o wysokim ryzyku. Jednym z ważniejszych składników tych wzorów molekularnych jest zwiększona ekspresja genów związanych z proliferacją. Do najsilniejszych stosowanych skali prognostycznych w grupie pacjentów ze szpiczakiem należą UAMS-70, UAMS-17 oraz EMC-92-gene signature [55].

Tabela 7. Grupy ryzyka cytogenetycznego w szpiczaku plazmocytowym wg Intergroupe Francophone du Myéloma (IFM) i Mayo Clinic (mSMART) [63].

Grupy ryzyka cytogenetycznego		
Duże ryzyko (20%)	Pośrednie ryzyko (20%)	Małe ryzyko (60%)
OS: 3 lata	OS: 4-5 lat	OS: 8-10 lat
niekorzystna sygnatura profilu ekspresji genów (GEP)	<i>del(13)</i> met. cytogenetyczną	<i>t(11;14)</i>
<i>del 17p</i>	hipodiploidia	<i>t(6;14)</i>
<i>t(14;16)</i>	<i>t(4;14)</i>	hiperdiploidia
<i>t(14;20)</i>	indeks znakowania plazmocytów	inne zmiany genetyczne
<i>del(17p)</i> , <i>t(14;16)</i> , <i>t(14;20)</i> i <i>t(4;14)</i> wykonane metodą FISH		

Tabela 8. Grupy ryzyka cytogenetycznego w szpiczaku plazmocytowym [64].

Grupy ryzyka	Zmiany cytogenetyczne
Ryzyko standardowe	trisomie t(11;14) t(6;14)
Ryzyko pośrednie	t(4;14) powielenie 1q21
Ryzyko wysokie	del(17p) t(14;16) t(14;20) del(1p)
Obecność del(17p) wskazuje na wysokie ryzyko bez względu na obecność innych odchyleń cytogenetycznych; powielenie (1q21) (bez obecności innej anomalii wysokiego ryzyka) jest rozważane, jako ryzyko pośrednie.	

Tabela 9. Klasyfikacja molekularno-cytogenetyczna szpiczaka plazmocyтового wg IMWG.

Kategoria genetyczna	% przypadków
Hiperdiploidalny	45%
Nie hiperdiploidalny	40%
translokacje z cykliną D1	18%
t(11;14)(q13;q32),	16%
t(6;14)(p25;q32),	2%
t(12;14)(p13;q32)	<1%
translokacje NSD2 (MMSET)	15%
t(4;14)(p16;q32)	
translokacje MAF	8%
t(14;16)(q32;q23),	5%
t(14;20)(q32;q11),	2%
t(8;14)(q24;q32)	1%
Niesklasyfikowane	15%

1.7. Diagnostyka obrazowa w szpiczaku plazmocytowym.

Wykonanie badań obrazowych u pacjentów z podejrzeniem szpiczaka plazmocytoowego stanowi nieodzowny element diagnostyki. Należy zastosować optymalne metody pozwalające na dokładne określenie obecności i ilości zmian osteolitycznych celem oszacowania stadium zaawansowania choroby. Wykrycie zmian kostnych nierzadko może być pierwszym objawem choroby i stanowi często wskazanie do rozpoczęcia terapii. Konwencjonalne zdjęcia rentgenowskie całego kośćca stanowią dobre narzędzie diagnostyczne do badań przesiewowych, ukazujących zmiany ubytkowe. Ich niska czułość oraz liczne ograniczenia wymusiły konieczność wykorzystania nowych technik obrazowania. Umożliwiają one prawidłowo zakwalifikować chorych z postacią objawową wg aktualnie obowiązujących kryteriów SLiM CRAB. Badania MR oraz PET-CT poza dużą wartością diagnostyczną posiadają również znaczenie prognostyczne. Pozwalają, dzięki zastosowaniu metod kontrastowania, na wykazanie aktywnych zmian chorobowych oraz ich ocenę po leczeniu. Głównym ograniczeniem ww. metod obrazowania jest brak dostępności oraz logistyka i technika wykonywania analiz. Badania trwają stosunkowo długo i wymagają współpracy pacjenta oraz podania kontrastu, co często jest trudne u chorych z dolegliwościami bólowymi oraz niewydolnością nerek [66, 67]. W ostatnim czasie popularnym badaniem diagnostycznym pozwalającym na ocenę kośćca jest niskodawkowa tomografia komputerowa pozwalająca na trójwymiarową ocenę zmian, pozwalając na planowanie biopsji, radioterapii oraz zabiegów ortopedycznych. Dodatkowymi zaletami wyżej wymienionej techniki jest krótszy czas badania, łatwość wykonania oraz brak konieczności stosowania środków kontrastujących. Niskodawkowa tomografia komputerowa jest lepszą metodą obrazowania niż konwencjonalne zdjęcia rentgenowskie przy porównywalnych poziomach narażenia na promieniowanie.

1.8. Leczenie szpiczaka plazmocytoowego.

Rokowanie w szpiczaku plazmocytowym na przestrzeni lat ulegało poprawie, co w dużej mierze zawdzięcza się nowoczesnym sposobom terapii. Pojawienie się w ostatnich latach wielu nowych leków zmieniło charakter choroby oraz pozwoliło na wydłużenie przeżycia. Zarówno światowe jak i polskie towarzystwa naukowe rekomendują rozpoczęcie leczenia u każdego chorego z objawowym szpiczakiem (stwierdzenie objawów SLiM CRAB) [2, 68]. Sposób leczenia powinno się uzależnić od stanu chorego i możliwości kwalifikacji do autologicznego przeszczepiania komórek krwiotwórczych (autoSCT). Udowodniono, że zastosowanie dużych dawek melfalanu wspomaganego podaniem autoSCT przełamuje

oporność plazmocytów oraz wydłuża przeżycie. Metoda ta powinna być aplikowana u jak największej liczby chorych, jednakże z uwagi na jej toksyczność zarezerwowana jest dla młodszych pacjentów w dobrym stanie ogólnym. W zależności od kwalifikacji chorego do autotransplantacji powinno się rozpoczynać leczenie różnymi schematami chemioterapii. Wprowadzenie leków immunomodulujących oraz inhibitorów proteasomu do terapii szpiczaka plazmocytoowego istotnie wpłynęło na przeżycie chorych. Pacjenci niekwalifikujący się do przeszczepienia szpiku powinni otrzymywać schematy oparte na małych dawkach melfalanu, talidomidzie/lenalidomidzie, bortezomibie. Z uwagi na brak refundacji lenalidomidu w pierwszej linii leczenia w Polsce, są to najczęściej schematy VMP (bortezomib, melfalan, prednizon) i MPT (melfalan, prednizon, talidomid). Alternatywnie można stosować w tej grupie chorych protokoły zarezerwowane dla młodszych pacjentów z odpowiednią redukcją dawek np. CTD (cyklofosfamid, talidomid, deksametazon), VCD (bortezomib, cyklofosfamid, deksametazon), VTD (bortezomib, talidomid, deksametazon). Dołączenie bortezomibu do melfalanu oraz prednizolonu znamienne wydłużyło czas wolny od progresji oraz przeżycie [69]. Zastosowanie lenalidomidu wraz z deksametazonem jest wygodną i skuteczną opcją dla starszych chorych, ale dostępną w Polsce jedynie dla chorych z oporną i nawrotową chorobą [70]. Chorzy, u których celem jest wykonanie autotransplantacji, powinni otrzymywać leczenie w pierwszej linii składające się z trzech leków wg jednego z następujących protokołów: VTD, PAD (bortezomib, dokсорubicyna, deksametazon), VCD lub w wyjątkowych przypadkach CTD. Dwa pierwsze uzyskały najsilniejsze rekomendacje. Schematy oparte na bortezomibie są skuteczniejsze, i jeśli jest to możliwe, powinny być leczeniem z wyboru [2]. Wybierając schemat leczenia należy, poza jego skutecznością, brać pod uwagę profil toksyczności. Dowiedziono, że schematy oparte na bortezomibie oraz talidomidzie obarczone są dużą neurotoksycznością. Powodują polineuropatię indukowaną chemioterapią, która bardzo obniża jakość życia chorych. Nie zostało dokładnie ustalone, kiedy najlepiej należy wykonywać kondycjonowanie oraz przeszczepienie komórek macierzystych. Zgodnie z rekomendacjami europejskimi i amerykańskimi, chorzy kwalifikujący się do autotransplantacji szpiku, powinni być poddani tej procedurze po otrzymaniu 4-6 cykli leczenia indukującego, niezależnie od uzyskanej odpowiedzi. Coraz częściej wyniki badań wskazują na celowość przedłużonej terapii, stosowania leczenia konsolidującego lub podtrzymującego po autoSCT. Wybór takiej terapii powinien uwzględniać jej toksyczność oraz odległe skutki. Celem leczenia są przede wszystkim zmniejszenie objawów choroby, redukcja masy nowotworu w postaci nacieku szpiku lub guza (plazmocytoz), obniżenie białka monoklonalnego w surowicy i moczu. Odpowiedź na leczenie ocenia się wg kryteriów opublikowanych w 2014 roku przez IMWG

[8]. Najtrudniejszą grupę stanowią chorzy z pierwotnie oporną chorobą, którzy powinni być w miarę możliwości poddani autotransplantacji lub leczeni w ramach prób klinicznych. Niestety, znaczna część chorych doświadcza nawrotu choroby. Podobnie jak przy rozpoznaniu, celem leczenia pozostaje poprawa jakości życia, zmniejszenie objawów oraz wydłużenie przeżycia. Istnieje kilka alternatywnych schematów leczenia a podejście powinno być zindywidualizowane. W nawrocie rekomenduje się użycie terapii opartej o nowe leki, najlepiej w układzie wielolekowym, gdyż daje to szansę na zniwelowanie negatywnego rokowania. Nieodłączną częścią terapii szpiczaka plazmocytoowego jest radioterapia, która może być stosowana w początkowych, lokalnych stadiach choroby lub jako leczenie paliatywne (objawowe) [2].

2. CELE PRACY

Cel główny:

Określenie przydatności diagnostycznej i rokowniczej wybranych elementów oceny histologicznej szpiku i markerów immunohistochemicznych w grupie chorych z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytowym oraz w grupie z nawrotem/ progresją choroby.

Cele pomocnicze:

1. Porównanie oceny histologicznej i immunohistochemicznej u pacjentów z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytowym oraz nawrotem/progresją choroby.
2. Określenie znaczenia rokowniczego wybranych elementów oceny histologicznej oraz markerów immunohistochemicznych w grupie pacjentów z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytowym w odniesieniu do czasu całkowitego przeżycia, czasu wolnego od progresji oraz uznanych czynników prognostycznych w szpiczaku plazmocytowym.
3. Analiza znaczenia wybranych elementów oceny histologicznej oraz immunohistochemicznej, jako wskaźników dla uzyskania odpowiedzi klinicznej na leczenie pierwszej linii w grupie chorych z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytowym.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Charakterystyka grupy badanej.

Wstępnej analizie poddano grupę 202 chorych z rozpoznaniem szpiczaka plazmocytoowego leczonych w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2008-2016. Ostatecznie kryteria włączenia spełniła grupa 90 chorych – 47 kobiet i 43 mężczyzn w wieku od 32 do 86 lat (mediana wieku w momencie rozpoznania wynosiła 60 lat). Analizie poddano trepanobiopaty pochodzące od chorych z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytoowym (56 chorych: 26 mężczyzn - mediana wieku 63 lata oraz 30 kobiet -mediana wieku 63,5 lat) oraz w momencie nawrotu/progresji choroby (34 chorych: 17 mężczyzn o medianie wieku 58 lat oraz 17 kobiet o medianie wieku 55 lat) (Tabela 10). Grupa była reprezentatywna pod względem klinicznym oraz demograficznym. Główną przyczynę wyłączenia z badania stanowił brak dostępności materiału do analizy histologicznej.

Tabela 10. Struktura wieku i płci w badanych grupach.

Struktura wieku i płci		Ogółem	Przy rozpoznaniu		Przy nawrocie/progresji	
			mężczyźni	kobiety	mężczyźni	kobiety
Liczba chorych (n)		90	26	30	17	17
wiek (lata)	mediana	60,0	63,0	63,5	58,0	55,0
	min	32,0	32,0	48,0	45,0	42,0
	max	86,0	81,0	86,0	68,0	77,0

3.2. Kryteria włączenia i wyłączenia do udziału w badaniu

Kryteria włączenia

- A. chorzy z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytoowym lub nawrotem/progresją choroby wg IMWG z 2014r., leczeni w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2008-2016
- B. wiek > 18 r.ż.

Kryteria wyłączenia

- A. współistnienie innej choroby nowotworowej

- B. diagnoza białaczki plazmatycznokomórkowej
- C. niedostępność materiału do oceny histopatologicznej szpiku
- D. nacieczenie szpiku w ocenie histopatologicznej <10%

3.3. Metodyka badań histologicznych i immunohistochemicznych.

Analizie poddano materiał archiwalnych trepanobiopciatów szpiku kostnego pochodzących z talerza kości biodrowej, pobranych w trakcie standardowej diagnostyki pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym. Analizowane trepanobiopciaty były reprezentatywne pod względem ilości oraz jakości pozyskanego materiału. Średnia długość analizowanych trepanobiopciatów wynosiła 14,1mm (zakres 9-28mm). Preparatyka oraz barwienia zostały wykonane w Zakładzie Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. n. med. Andrzej Marszałek).

Materiał tkankowy, bezpośrednio po pobraniu, utrwalono w 10% buforowanej formalinie o pH 7.4. Następnie tkankę umieszczono w 10% kwasie mrówkowym na 24 godziny, po których przeniesiono materiał do procesora tkankowego. Tak przygotowaną tkankę zatopiono w parafinie w temperaturze 60°C z zastosowaniem standardowych metod histopatologicznych. Z otrzymanych w ten sposób, odpowiednio oznaczonych bloczków parafinowych, skrojono na mikrotomie skrawki o grubości 4-5µm, które nałożono na szkiełka podstawowe adhezyjne i pozostawiono na 1 godzinę w temperaturze 60°C.

Preparaty powstałe ze skrawków poddano podstawowym barwieniom histologicznym hematosykliną i eozyną oraz barwieniu histochemicznemu na obecność włókien srebrochłonnych w aparacie BENCHMARK Special Stains Stainer Module firmy Ventana Medical System /Roche Diagnostics. W celu oznaczenia cykliny D1 zastosowano królicze przeciwciała firmy Roche anty-cyclina D1 (klon SP4-R). W badaniu zastosowano metodę immunohistochemiczną z użyciem systemu ultraView Universal DAB Detection Kit firmy Roche. Barwienie immunoperoksydazowe (IP) wykonano w aparacie BenchMark Ultra firmy VentanaMedical System /Roche Diagnostics. W badaniach zastosowano metodę IHC z użyciem systemu DAKO En Vision™ FLEX+. W skrawkach parafinowych odkrywano antygeny w buforze Target Retrieval Solution, High pH firmy DAKO w aparacie PT-link w temperaturze 97°C, 20 min. Markery CD56, CD138, CD117 oraz łańcuchy lekkie lambda i kappa oznaczono za pomocą przeciwciał monoklonalnych RTU i poliklonalnych firmy DAKO. W celu oznaczenia markerów użyto mysich przeciwciał: anty - CD56 (IR642), anty - CD138(IR642) oraz króliczych przeciwciał poliklonalnych stężonych przeciwko: CD117 kit (A4502), łańcuchom lekkim lambda (A0193) i łańcuchom lekkim kappa (A0191). W badaniu

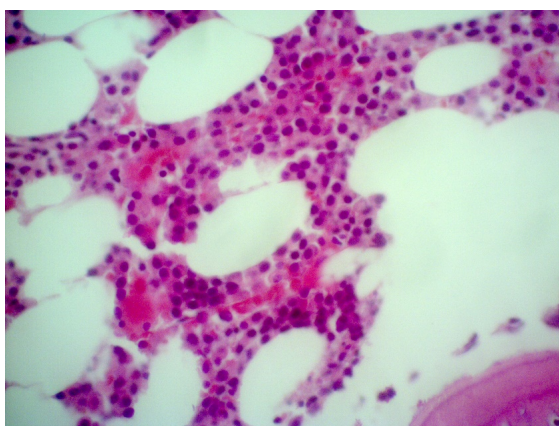
zastosowano metodę IHC z użyciem systemu DAKO En Vision™ FLEX. Barwienia IP wykonano w aparacie Autostainer Link 48 firmy DAKO. W celu oznaczenia CD20 i p53 zastosowano mysie przeciwciała monoklonalne firmy DAKO: anti-CD20 (GA604) i anti-p53 (GA616). W badaniu zastosowano metodę immunohistochemiczną z użyciem systemu DAKO En Vision™ FLEX+. Barwienie IP wykonano w aparacie OMNIS firmy DAKO.

Następnie otrzymane preparaty z trepanobiopsatów poddano ocenie zgodnie z zaleceniami International Council for Standardization in Hematology (ICSH) z 2008 roku [71]. Ocenę histologiczną oraz immunohistochemiczną wykonał każdorazowo prof. dr hab. n. med. Mieczysław Komarnicki. Do analizowanych parametrów histologicznych szpiku należały: odsetek nacieczenia szpiku na podstawie barwienia H+E (Rycina 2a) oraz barwienia immunohistochemicznego na obecność antygenu CD138 (Rycina 2b), rodzaj nacieczenia szpiku (wyróżniono 3 rodzaje nacieku: rozlany/ skupiska komórkowe/ śródmiąższowy), ocena cytomorfologiczna typu rozrostu (z wyróżnieniem plazmoblastycznego i niedojrzałego). W celu weryfikacji cytomorfologicznej każdorazowo oceniono rozmaz szpiku z BA, potwierdzając rozpoznanie MM. Nasilenia włóknienia opisano w skali czterostopniowej (M0-M3) na podstawie preparatów barwionych srebrem. W celu określenia klonalności oraz wykazania aberantnego fenotypu komórek szpiczakowych oceniono preparaty IHC następujących antygenów: CD138, CD56, CD20, CD117, cyklina D1, białko p53, łańcuchy lekkie kappa i lambda (Rycina 2c i 2d). Analizowano obecność antygenów dla dwóch wartości progowych, przy których wynik uznawano jako dodatni (oznaczano znakiem +) na podstawie danych literaturowych, omówionych we wstępie niniejszej pracy oraz wynikających z wartości średnich w analizowanej grupie (Tabela 11).

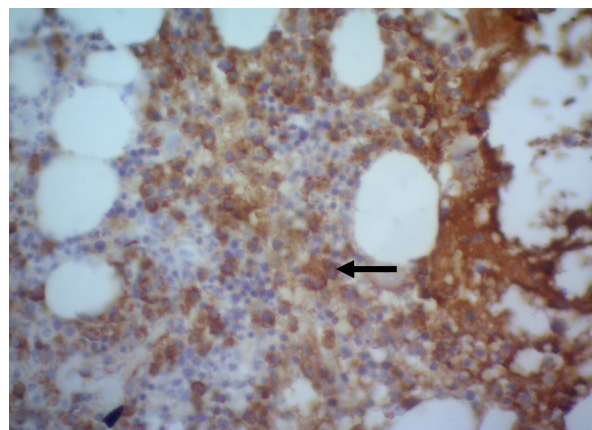
Tabela 11. Procentowe wartości progowe dla wyniku dodatniego poszczególnych antygenów ocenianych w IHC.

Antygen	% komórek dla wyniku dodatniego	
	Dane literaturowe*	Wartości średnie w badanej grupie
CD56	50	40
CD20	10	20
CD117	5	10
p53	10	>0
cyklina D1	10	30
LC kappa/lambda	proporcja komórek kappa[+]/ lambda[+] > 4:1 albo < 1:2	
CD138	10	

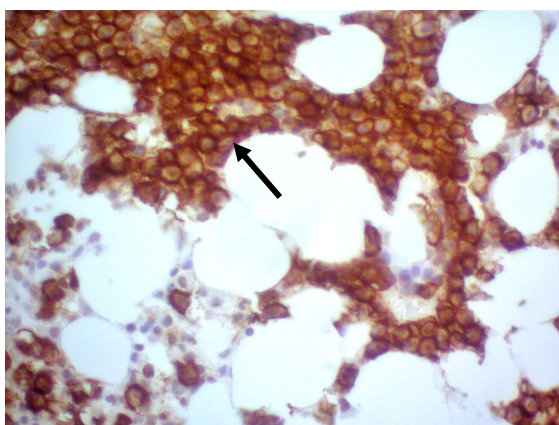
*[19-21, 27, 31, 38, 43, 44, 46, 51]



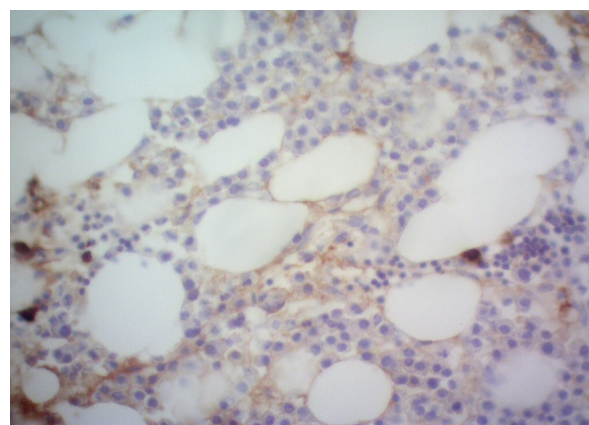
A



C



B



D

Rycina 2. Naciek plazmocytoz w barwieniu histologicznym hematoksyliną i eozyną (A), dodatnie barwienia immunohistochemiczne na obecność CD138 (B), łańcuchów lekkich kappa (C) (oznaczone strzałkami) oraz ujemna reakcja na obecność łańcuchów lambda (D) u chorego ze szpiczakiem plazmocytowym (powiększenie 400x).

3.4. Dane kliniczne i laboratoryjne

Na potrzeby powyższego badania dokonano analizy retrospektywnej dokumentacji medycznej oraz parametrów laboratoryjnych. Wśród analizowanych danych klinicznych znalazły się: data rozpoznania, rozpoczęcia terapii, progresji choroby, ostatniej obserwacji/zgonu, rodzaj zastosowanej terapii w pierwszej linii oraz odpowiedź na leczenie indukujące. Okres obserwacji pacjentów obejmował czas od daty rozpoznania choroby do daty zgonu lub ostatniej obserwacji (przyjęto umownie 30.03.2017r.). Łącznie mediana czasu obserwacji w analizowanej grupie wynosiła 49,6 (2-119,7) miesięcy. Wśród chorych z nowo rozpoznaną chorobą mediana czasu obserwacji wyniosła 37,5 (2-98,4) miesięcy, a wśród grupy analizowanej w momencie progresji mediana wyniosła 85,1 (33,5-119,7) miesięcy.

Efekty terapii zastosowanej w pierwszej linii leczenia szpiczaka plazmocytoowego oceniano za pomocą kryteriów odpowiedzi zgodnie z zaleceniami IMWG z 2014 roku, które opublikowano również w Zaleceniach Polskiej Grupy Szpiczakowej w 2017 roku (Suplement Tabela 32 i 33) [2].

Wśród analizowanych parametrów laboratoryjnych w surowicy pacjentów w momencie rozpoznania uwzględniono klasę białka monoklonalnego, typ łańcucha lekkiego immunoglobulin, stężenie albuminy, β -2-mikroglobuliny, kreatyniny oraz aktywność dehydrogenazy mleczanowej. Immunoelektroforezę białek wykonywano w Laboratorium nr 1 Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego w Poznaniu, a pozostałe badania laboratoryjne wykonywano w Laboratorium nr 2 Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego w Poznaniu.

Do analizy włączono wyniki badań cytogenetycznych wykonanych zgodnie z zaleceniami European Leukemianet w Pracowni Cytogenetycznej Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W ocenie uwzględniono badania oznaczane metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) wykrywające niekorzystnie rokujące aberracje takie jak: t(4;14), t(14;16), del(17p) (panel minimum wg IMWG wykonano u 100% chorych poddanych analizie).

Na podstawie analizy cytogenetycznej zakwalifikowano pacjentów do grup ryzyka cytogenetycznego wg klasyfikacji Intergroupe Francophone du Myéloma (IFM) i Mayo Clinic (mSMART) oraz zmodyfikowanej klasyfikacji na podstawie pracy Rajkumara.

Pacjentów objętych badaniem oceniono zgodnie z kryteriami zawartymi w klasyfikacji Durie-Salmon, ISS oraz R-ISS określając stopień zaawansowania klinicznego choroby oraz grupy ryzyka.

Znaczenia rokownicze ocenianych parametrów w trepanobiopsatach szpiku wyznaczono poprzez analizę zależności z wybranymi, uznanymi czynnikami rokowniczymi w szpiczaku plazmocytoowym, wyszczególnionymi w Tabeli 12, a także poprzez określenie czasu wolnego od progresji choroby oraz całkowitego przeżycia.

Tabela 12. Uznane czynniki rokownicze w szpiczaku plazmocytowym, w odniesieniu do których określano znaczenie parametrów histologicznych.

Czynnik prognostyczny	
Aberracje cytogenetyczne w FISH	del17p, t(14;16), t(4;14)
Grupy ryzyka cytogenetycznego	klasyfikacja mSMART oraz wg Rajkumara
Cechy histologiczne:	nasilenie włóknienia rodzaj nacieku typ histologiczny rozrostu klonalnych plazmocytów
Parametry laboratoryjne	klasa białka monoklonalnego rodzaj łańcucha lekkiego w IF surowicy ↓ stężenie albuminy ↑ stężenie β 2M ↑ stężenie kreatyniny ↑ aktywność LDH
Stopień zaawansowania	wg klasyfikacji DS, ISS, R-ISS
Dane kliniczne	wystąpienie nawrotu po 1 linii leczenia brak odpowiedzi na 1 linię leczenia

3.5. Analiza statystyczna

W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę porównawczą pacjentów w dwóch grupach, z nowo rozpoznaną chorobą oraz w momencie nawrotu/progresji, pod względem danych klinicznych, laboratoryjnych oraz badanych parametrów histologicznych. Ponadto przeprowadzono analizę zależności wybranych parametrów histologicznych oraz immunohistochemicznych w grupie chorych z nowo rozpoznaną chorobą, a uznanymi czynnikami prognostycznymi. Analizę zależności między badanymi cechami w skali nominalnej wykonano za pomocą testu niezależności chi-kwadrat Pearsona, a dla grup z małą liczebnością zastosowano dokładny test Fishera. Ocenę przeżycia oraz czasu do progresji choroby wykonano za pomocą krzywych Kaplana-Meiera, które następnie porównano z zastosowaniem testu Log-rank. Dodatkowo wyznaczono mediany czasu całkowitego przeżycia oraz czasu do progresji choroby (PFS) dla analizowanych grup. W celu wyznaczenia czynników wpływających na OS oraz PFS zastosowano model regresji proporcjonalnego hazardu Coxa. Dla uzyskanych wyników przedstawiono współczynnik ryzyka (HR) z 95% przedziałem ufności (CI). Wszystkie testy były oceniane na poziomie

istotności, który wynosił $p < 0,05$. Analiza statystyczna została wykonana za pomocą programu STATA 15.1 (StataCorp LLC). Poprawność zastosowanych testów zweryfikowano w Katedrze Zakładzie Informatyki i Statystyki UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – konsultacja z dr Michałem Michalakiem.

Projekt badania otrzymał zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (uchwała nr 54/17) (Suplement).

4. WYNIKI

4.1. Analiza porównawcza grup z uwzględnieniem czasu wykonania trepanobiopsji: w momencie rozpoznania choroby oraz przy nawrocie/progresji.

4.1.1. Analiza częstości występowania odchyleń laboratoryjnych

W badanej grupie dominowali chorzy z postacią wydzielającą szpiczaka plazmocytozy (z obecnością białka M w surowicy) odpowiednio w klasie IgG (n=44), IgA (n=24), IgM (n=1) oraz chorobą lekkiego łańcucha (n=19). Metodą immunofiksacji stwierdzono obecność łańcucha lekkiego immunoglobulin kappa u 54 chorych, a łańcuch lambda u 34 chorych. W przypadku 2 pacjentów nie stwierdzono obecności białka M wykrywanego w immunoelektroforezie białek. Nie wykazano różnic w obu grupach pod względem obecności białka monoklonalnego.

Obniżone stężenie albuminy obserwowano w momencie diagnozy u 31 (34,4%) chorych, w tym 21 w grupie z nowo rozpoznaną chorobą i 11 przy nawrocie/progresji choroby. Średnie stężenia albumin wynosiło 36,66 g/l (zakres od 24,7-50 g/l), a mediana 37,15 g/l.

Podwyższone stężenie β -2-mikroglobuliny ($>3\text{mg/l}$) stwierdzono u 38 (42,2%) chorych, w tym 27 w grupie z nowo rozpoznaną chorobą i 11 przy nawrocie/progresji. Średnie stężenie β 2M wynosiło 3,44 mg/l (zakres od 1,1-24.5 mg/l), a mediana 2,75mg/l.

Podwyższone stężenie kreatyniny w surowicy w momencie diagnozy obserwowano u 15 (16,7%) chorych. Średnie stężenie kreatyniny w badanej grupie wynosiło 84 $\mu\text{mol/l}$ (zakres od 37-530 $\mu\text{mol/l}$), mediana 104,3 $\mu\text{mol/l}$.

Zwiększoną aktywność dehydrogenazy mleczanowej ($>234\text{ U/l}$) obserwowano u 20 (20,2%) chorych, a u 3 chorych przekraczała ona dwukrotność górnej granicy normy.

Nie wykazano statystycznie znamiennych różnic w zakresie częstości występowania odchyleń laboratoryjnych w badanych grupach (Tabela 13).

Tabela 13. Analiza porównawcza częstości występowania odchyleń laboratoryjnych w grupie z nowo rozpoznanym szpiczakiem oraz z nawrotem/progresją choroby.

Parametr laboratoryjny		Razem		Przy rozpoznaniu		Przy nawrocie /progresji		
		n=90		n=56		n=34		
		n	%	n	%	n	%	p
Klasa Ig	IgG	44	48,9	24	42,9	20	58,8	0,542
	IgM	1	1,1	1	1,8	0	0	
	IgA	24	26,6	17	30,4	7	20,6	
	LCD	19	21,1	12	21,4	7	20,6	
	NW	2	2,2	2	3,6	0	0	
LC (IF)	kappa	54	60	30	53,6	24	70,6	0,265
	lambda	34	37,8	24	42,9	10	29,4	
	NW	2	2,2	2	3,6	0	0	
Albumina	<35g/l	31	34,4	21	37,5	11	32,4	0,621
β2M	>3,0mg/l	38	42,2	27	48,2	11	32,4	0,14
LDH	>ggn*	20	22,2	15	27,8	5	14,7	0,154
	>2 x ggn	3	3,3	2	3,7	1	2,9	1
Kreatynina	> 115μmol/l	15	16,7	9	16,1	6	17,7	0,846

*ggn - górna granica normy

4.1.2. Analiza stopnia zaawansowania choroby wg klasyfikacji prognostycznych (Durie-Salmon, ISS, R-ISS)

Uwzględniając klasyfikację zaawansowania choroby wg Durie i Salmon (DS) w momencie rozpoznania stwierdzono w obu analizowanych grupach dominację chorych w stopniu zaawansowania IIIA (odpowiednio IA - 20, IB - 1, IIA - 4, IIB - 3, IIIA - 56 i IIIB - 6 chorych). Nie wykazano znamiennych różnic statystycznych pomiędzy stopniem zaawansowania choroby w obu grupach. Ocena na podstawie klasyfikacji prognostycznej ISS wykazała w badanej populacji 39 chorych w stopniu 1, 36 w stopniu 2 oraz 15 w stopniu 3. Po uwzględnieniu czynników genetycznych (del17p, t(4;14) i t(14;16)) oraz aktywność dehydrogenazy mleczanowej chorych poddano rekasyfikacji wg zmodyfikowanej

klasyfikacji prognostycznej R-ISS. W grupie chorych w stopniu 1, 2 oraz 3 wg R-ISS znalazło się odpowiednio 19, 62 oraz 9 pacjentów (Tabela 14). Wśród 62 chorych w 2 stopniu zaawansowania wg R-ISS, znalazło się 20 chorych sklasyfikowanych wg ISS w stopniu 1 oraz 6 osób w stopniu 3 (nie stwierdzono u nich zmian cytogenetycznych oraz podwyższonej aktywności LDH).

Tabela 14. Analiza porównawcza stopnia zaawansowania klinicznego choroby wg klasyfikacji Durie-Salmon, ISS, R-ISS w grupie z nowo rozpoznanym szpiczakiem oraz w grupie z nawrotem/progresją choroby.

Klasyfikacje zaawansowania klinicznego		Razem		Przy rozpoznaniu		Przy nawrocie/ progresji		
		n=90		n=56		n=34		
		n	%	n	%	n	%	p
ISS	1	39	43,3	23	41,1	16	47,1	0,325
	2	36	40,0	21	37,5	15	44,1	
	3	15	16,7	12	21,4	3	8,8	
R-ISS	1	19	21,1	8	14,3	11	32,3	0,114
	2	62	68,9	41	73,2	21	61,8	
	3	9	10,0	7	12,5	2	5,9	
DS	IA	20	22,2	13	23,2	7	20,6	0,98
	IB	1	1,1	1	1,8	0	0	
	IIA	4	4,4	3	5,4	1	2,9	
	IIB	3	3,3	2	3,6	1	2,9	
	IIIA	56	62,2	33	58,9	23	67,7	
	IIIB	6	6,7	4	7,1	2	5,9	

4.1.3. Analiza występowania zmian cytogenetycznych oraz klasyfikacji ryzyka cytogenetycznego

Obecność aberracji cytogenetycznych przedstawiono w grupie badanej z uwzględnieniem podziału na pacjentów z nowo rozpoznaną oraz nawrotową chorobą. Najczęściej występującą aberracją chromosomową była obecność del17p, którą stwierdzono u 23,3% (n=21) pacjentów w tym 14 z grupy z nowo rozpoznanym szpiczakiem oraz 7 chorych poddanych analizie w chwili nawrotu/progresji. U 10% (n=9) badanych wykryto obecność t(4;14), w tym

7 chorych w momencie diagnozy. Obecność t(14;16) stwierdzono tylko u 3 chorych z nowo rozpoznanym szpiczakiem (Tabela 15). Nie wykazano znamiennych statystycznie różnic w stopniach ryzyka cytogenetycznego wg klasyfikacji mSMART i wg Rajkumara. Szczegóły przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Obecność zmian cytogenetycznych oznaczonych metodą FISH oraz podział pacjentów ze względu na grupy ryzyka cytogenetycznego.

Zmiany cytogenetyczne i grupy ryzyka cytogenetycznego	Razem		Przy rozpoznaniu		Przy nawrocie/ progresji		
	n=90		n=56		n=34		
Aberracje met. FISH	n	%	n	%	n	%	p
del17p	21	23,3	14,0	25,0	7	20,6	0,631
t(14;16)	3	3,3	3,0	5,4	0	0,0	0,287
t(4;14)	9	10,0	7,0	12,5	2	5,9	0,474
Klasyfikacja wg Rajkumara	n	%	n	%	n	%	p
standardowe	58	64,4	36,0	64,3	22	64,7	0,451
pośrednie	9	10,0	4,0	7,1	5	14,7	
wysokie	23	25,6	16,0	28,6	7	20,6	
Klasyfikacja mSMART	n	%	n	%	n	%	p
standardowe	54	60,0	30	53,6	24	70,6	0,318
pośrednie	12	13,3	9,0	16,1	3	8,8	
wysokie	24	26,7	17,0	30,4	7	20,6	

4.1.4. Analiza porównawcza występowania wybranych elementów oceny histologicznej oraz badanych markerów immunohistochemicznych.

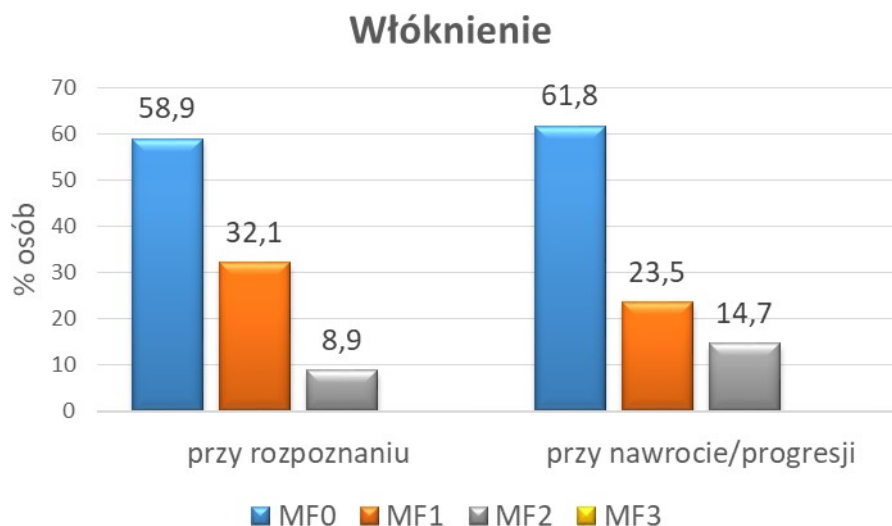
4.1.4.1. Analiza występowania nasilenia włóknienia, rodzaju nacieku, typu rozrostu oraz stopnia nacieczenia szpiku.

W ocenie histologicznej u chorych z nowo rozpoznaną chorobą dominował szpik bogatokomórkowy. Stwierdzano go u 85,7% (48/56) chorych. W pozostałych przypadkach stwierdzano szpik średniokomórkowy u 10,7% (6/56), a ubogokomórkowy u 3,6% (2/56). Podobne zależności stwierdzano w grupie chorych analizowanych w momencie nawrotu/progresji - szpik bogatokomórkowy, średniokomórkowy i ubogokomórkowy występował odpowiednio u 61,8% (21/34), 32,4% (11/34) i 5,9% (2/34) chorych (Wykres 1).



Wykres 1. Porównanie komórkowości preparatu pochodzącego od chorych w momencie diagnozy oraz przy nawrocie/progresji MM.

Włóknienie szpiku (MF0) w momencie diagnozy stwierdzano u 58,9% (33/56), a przy progresji u 61,8% (21/34) chorych. U pozostałych pacjentów stwierdzano włóknienie tylko w stopniu MF1 i MF2. W obu grupach nie zidentyfikowano chorych z najwyższym stopniem włóknienia (MF3). Nie znaleziono znamienych różnic w nasileniu włóknienia szpiku w obu grupach chorych ($p=0,547$) (Tabela 16 oraz Wykres 2).



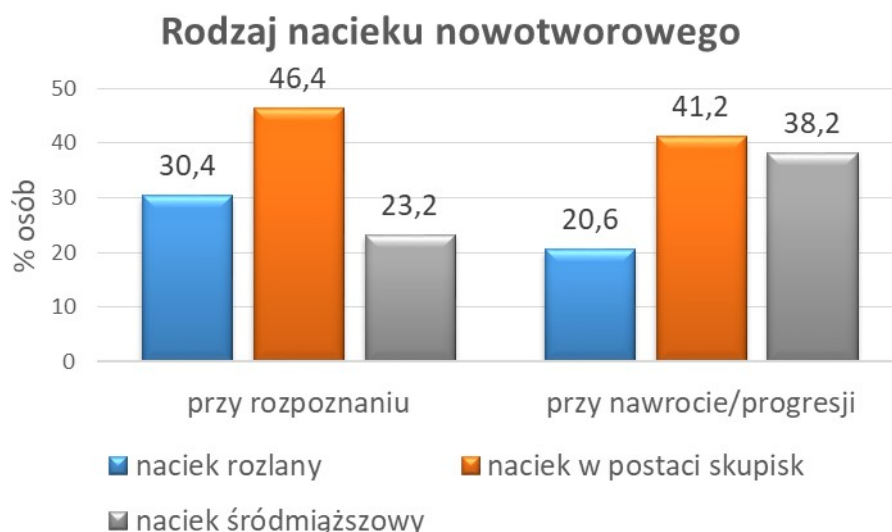
Wykres 2. Ocena występowania włóknienia określanego w materiale trepanobiopcyjnym od chorych z MM w grupie z nowo rozpoznaną chorobą oraz przy nawrocie/progresji.

Tabela 16. Ocena częstość występowania wybranych elementów oceny histologicznej szpiku w 2 grupach: w momencie diagnozy oraz przy nawrocie/progresji MM.

Parametr histologiczny	Przy rozpoznaniu		Przy nawrocie/ progresji		
	n=56		n=34		
Włóknienie	n	%	n	%	p
MF0	33	58,9	21	61,8	0,547
MF1	18	32,1	8	23,5	
MF2	5	8,9	5	14,7	
MF3	0	0,0	0	0,0	
Rodzaj nacieku					
rozlany	17	30,4	7	20,6	0,281
skupiska	26	46,4	14	41,9	
śródmiażdżowy	13	23,2	13	38,2	
Typ rozrostu					
niedojrzały, plazmoblastyczny	4	7,1	3	8,8	1
Stopień nacieczenia					
<20%	6	10,7	9	26,5	0,094
20-50%	18	32,1	12	35,3	
>50%	32	57,1	13	38,2	

Odsetek nacieczenia szpiku przez plazmocyty oceniany był w preparatach barwionych na obecność antygenu CD138. Nacieczenie >50% stwierdzono w 57,1% (32/56) przypadkach chorych z nowo rozpoznany MM, a w 38,2% (13/34) w grupie analizowanej przy nawrocie/progresji. Nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic w odsetku nacieczenia szpiku przez szpiczaka plazmocytozy w obu analizowanych grupach ($p>0,094$) (Tabela 16).

Rozlany nacieki nowotworowe częściej obserwowano w trepanobiopsatach pobranych w momencie diagnozy choroby, niż w przypadku nawrotu/progresji (30,4% vs 20,6%). Podobnie nacieki śródmiażdżowe występowały częściej przy nawrocie/progresji choroby (38,2% vs 23,2%). Różnice te jednak nie były znamienne statystycznie ($p<0,281$) (Tabela 16 oraz Wykres 3).



Wykres 3. Ocena występowania typu nacieku nowotworowego określonego w biopsatach szpiku chorych z MM w grupie z nowo rozpoznaną chorobą oraz przy nawrocie/progresji.

W obu grupach chorych, na podstawie oceny histologicznej preparatów barwionych metodą H+E, stwierdzano podobną częstość występowanie niedojrzałego lub plazmoblastycznego typu rozrostu nowotworowego (Tabela 16).

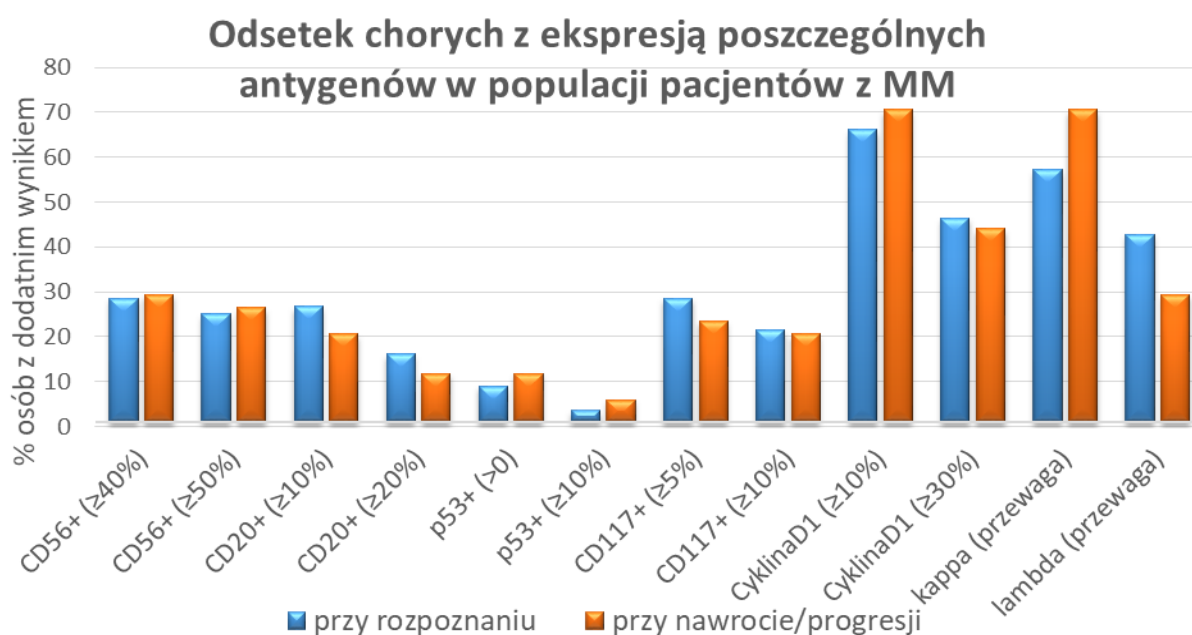
4.1.4.2. Analiza występowania markerów immunohistochemicznych.

Odsetki chorych z ekspresją poszczególnych antygenów na powierzchni plazmocytoów, analizowanych w preparatach immunohistochemicznych dla dwóch przyjętych wartości progowych (Tabela 11), nie różniły się znamienne między analizowanymi grupami (poszczególne wyniki przedstawiono w Tabeli 17 oraz na Wykresie 4). Nie zaobserwowano również znamienych różnic w odsetkach osób z współwystępowaniem wybranych antygenów immunohistochemicznych w obu analizowanych grupach pacjentów ze szpiczakiem plazmocytoowym (Tabela 18).

Tabela 17. Odsetek chorych z ekspresją poszczególnych antygenów różnicowania komórkowego oraz wybranych białek w momencie diagnozy oraz przy nawrocie/progresji choroby.

Antygen IHC (% komórek dla wyniku dodatniego)	Przy rozpoznaniu		Przy nawrocie/progresji		
	n=56		n=34		
	n	%	n	%	p
CD56+ (≥40%)	16	28,6	10	29,4	0,932
CD56+ (≥50%)	14	25,0	9	26,5	0,877
CD20+ (≥10%)	15	26,8	7	20,6	0,507
CD20+ (≥20%)	9	16,1	4	11,8	0,573
p53+ (>0)	5	8,9	4	11,8	0,725
p53+ (≥10%)	2	3,6	2	5,9	0,631
CD117+ (≥5%)	16	28,6	8	23,5	0,6
CD117+ (≥10%)	12	21,4	7	20,6	0,925
cyklina D1 (≥10%)	37	66,1	24	70,6	0,657
cyklina D1 (≥30%)	26	46,4	15	44,1	0,831
kappa (przewaga)	32	57,1	24	70,6	0,202
lambda (przewaga)	24	42,9	10	29,4	0,202

(+) - obecność danego antygeny na komórkach



Wykres 4. Odsetek chorych z ekspresją poszczególnych antygenów różnicowania komórkowego oraz wybranych białek w momencie diagnozy oraz przy nawrocie/progresji MM.

Tabela 18. Odsetek chorych z współwystępowaniem poszczególnych antygenów immunohistochemicznych w momencie diagnozy oraz przy nawrocie/progresji MM.

Współwystępowanie antygenów IHC (% komórek dla wyniku dodatniego)	Przy rozpoznaniu		Przy nawrocie/ progresji		
	n=56		n=34		
	n	%	n	%	p
CD117– (≥5%) CD56– (≥50%)	28	50,0	20	58,8	0,416
CD117– (≥10%) CD56– (≥40%)	31	55,4	20	58,8	0,748
CD56– (≥50%) p53+ (>0)	3	5,4	1	2,9	1
CD56– (≥40%) p53+ (>0)	3	5,4	1	2,9	1
CD117+ (≥5%) CD1+ (≥10%)	12	21,4	6	17,7	0,664
CD117+ (≥10%) CD1+ (≥30%)	6	10,7	4	11,8	1
CD117– (≥5%) p53+ (>0)	4	7,1	4	11,8	0,47
CD117– (≥10%) p53+ (>0)	4	7,1	4	11,8	0,47
CD117– (≥5%) lambda+	20	35,7	7	20,6	0,129
CD117– (≥10%) lambda+	20	35,7	7	20,6	0,129
CD117+ (≥5%) lambda+	4	7,1	3	8,8	1
CD117+ (≥10%) lambda+	4	7,1	3	8,8	1
CD117– (≥5%) kappa+	24	42,9	20	58,8	0,142
CD117– (≥10%) kappa+	20	35,7	19	55,9	0,061
CD117+ (≥5%) kappa+	12	21,4	5	14,7	0,43
CD117+ (≥10%) kappa+	8	14,3	4	11,8	1
CD56– (≥40%) lambda+	17	30,4	9	26,5	0,693
CD56– (≥50%) lambda+	17	30,4	9	26,5	0,693
CD56+ (≥40%) lambda+	7	12,5	1	2,9	0,25
CD56+ (≥50%) lambda+	7	12,5	1	2,9	0,25
CD56– (≥50%) kappa+	23	41,1	15	44,1	0,777
CD56– (≥40%) kappa+	25	44,6	16	47,1	0,823
CD56+ (≥50%) cyklina D1+ (≥10%)	7	12,5	7	20,6	0,305
CD56+ (≥40%) cyklina D1+ (≥30%)	6	10,7	6	17,7	0,348

(+) obecność danego antygenu na komórkach; (-) brak antygenu na komórkach

4.2. Znaczenie rokownicze wybranych elementów oceny histologicznej oraz badanych markerów immunohistochemicznych w biopsatach szpiku w grupie pacjentów z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytowym.

4.2.1. Znaczenie rokownicze w odniesieniu do uznanych czynników prognostycznych w szpiczaku plazmocytowym.

W celu określenia znaczenia rokowniczego ocenianych parametrów w trepanobiopsatach szpiku przeprowadzono jednoczynnikową analizę zależności z wybranymi, uznanymi czynnikami rokowniczymi w szpiczaku plazmocytowym (Tabela 12).

4.2.1.1. Znaczenie nasilenia włóknienia, rodzaju nacieku, typu rozrostu, stopnia nacieczenia w szpiku kostnym.

Zaobserwowano związek pomiędzy nasileniem włóknienia oraz rodzajem nacieku nowotworowego. W grupie osób z rozlanym naciekiem nowotworowym 70,6% (12/17) chorych miało włóknienie co najmniej w stopniu MF1, natomiast było ono nieobecne u wszystkich chorych z naciekiem śródmiąższowym ($p=0,001$) (Tabela 19).

Tabela 19. Nasilenie włóknienia a rodzaj nacieku nowotworowego.

Włóknienie, a rodzaj nacieku		Rodzaj nacieku						
		rozlany		skupiska		śródmiaższowy		p
		n	%	n	%	n	%	
Nasilenie włóknienia	MF0	5	29,4	15	57,7	13	100	0,001
	MF1	9	52,9	9	34,6	0	0	
	MF2	3	17,7	2	7,7	0	0	
	MF3	-	-	-	-	-	-	

Wykazano związek pomiędzy rodzajem nacieku, a stopniem zaawansowania wg klasyfikacji Durie-Salmon. Trzeci stopień zaawansowania stwierdzano u 94,1% (16/17) chorych z rozlanym naciekiem nowotworowym, w przeciwieństwie do chorych z naciekiem śródmiąższowym, gdzie dominował stopień pierwszy (53,8% pacjentów) ($p=0,006$).

W analizowanej grupie u 21,4% (3/14) chorych z del17p zaobserwowano niedojrzały i plazmoblastyczny typ rozrostu. W grupie osób bez del17p ten typ rozrostu występował tylko

u 2,3% (1/42) chorych. Stwierdzono związek między obecnością del17p w badaniu FISH a rodzajem histologicznym rozrostu w szpiku kostnym ($p=0,044$). Wśród chorych ze stwierdzoną obecnością t(4;14) u 28,6% (2/7) chorych zaobserwowano niedojrzały i plazmoblastyczny typ rozrostu, który obserwowano tylko u 4,1% (2/47) osób bez t(4;14). Potwierdzono istotną statystycznie korelację pomiędzy t(4;14) a niedojrzałym i plazmoblastycznym typem rozrostu ($p=0,049$).

Wśród chorych, u których stwierdzano $<50\%$ plazmocytów w szpiku, włóknienie nie występowało u 83,3% (20/24) chorych. Przy nacieczeniu szpiku $>50\%$ stwierdzono włóknienie w stopniu MF1 w 50% (16/32) przypadków oraz w stopniu MF2 w 9,4% (3/32). Wykazano istotną statystycznie zależność wielkości nacieku przez szpiczaka i nasileniem włóknienia ($p=0,006$). U osób z rozlanym naciekiem odsetek nacieczenia szpiku $>50\%$ stwierdzono u 94,1% (16/17) chorych. W przypadku, gdy dominował naciek śródmiąższowy, odsetek plazmocytów $<50\%$ szpiku obserwowano u 76,8% (10/13) pacjentów. Wykazano znamieny związek pomiędzy rodzajem histologicznym nacieku a odsetkiem nacieczenia przez plazmocyty ($p=0,001$) (Tabela 20).

Tabela 20. Zależność wielkości nacieku przez plazmocyty a rodzajem histologicznym nacieku i nasileniem włóknienia

Wielkość nacieku a rodzaj nacieku i nasilenie włóknienia		Odsetek nacieczenia szpiku						
		<20%		20-50%		>50%		
		n	%	n	%	n	%	p
Rodzaj nacieku	rozlany	0	0	1	5,9	16	94,1	0,001
	skupiska	3	11,5	10	38,5	13	50	
	śródmiażdżowy	3	23,1	7	53,9	3	23,1	
Nasilenie włóknienia	MF0	5	15,1	15	45,5	13	39,4	0,006
	MF1	1	5,6	1	5,6	16	88,9	
	MF2	0	0	2	40	3	60	
	MF3	-	-	-	-	-	-	

Nie wykazano korelacji pomiędzy nasileniem włóknienia, rodzajem nacieku, typem rozrostu, stopniem nacieczenia w szpiku kostnym a pozostałymi analizowanymi, uznanymi czynnikami rokowniczymi w szpiczaku plazmocytowym.

4.2.1.2. Znaczenie ekspresji markerów immunohistochemicznych (CD56, CD20, p53, CD117, cyklina D1, łańcuch lekki immunoglobulin kappa/lambda).

Analizując ekspresję antygenów powierzchniowych na plazmocytach stwierdzono związek występowania wysokiej ekspresji CD56 ($\geq 50\%$) z częstszą obecnością niekorzystnie rokującej t(4;14) ($p=0,046$). Ponadto zaobserwowano, że wśród chorych z wysoką ekspresją cykliny D1, nie występowała t(4;14) ($p=0,012$) (Tabela 21).

Tabela 21. Analiza zależności ekspresji CD56 i Cykliny D1 z obecnością niekorzystnie rokującej t(4;14) w grupie pacjentów z nowo rozpoznanym MM.

Ekspresja CD56 i cyklina D1 a t(4;14)	CD56					cyklina D1				
	dodatni ($\geq 50\%$)		ujemny ($< 50\%$)			dodatni ($\geq 30\%$)		ujemny ($< 30\%$)		
t(4;14)	n	%	n	%	p	n	%	n	%	p
dodatnia	4	28,6	3	7,1	0,046	0	0	7	23,3	0,012
ujemna	10	71,4	39	92,9		26	100	23	76,7	

Analiza ekspresji CD20 wykazała u chorych z podwyższoną obecnością tego antygenu ($\geq 20\%$) statystycznie częściej zajęcie szpiku przez rozlany naciek nowotworowy ($p=0,026$). Istotnie częściej stwierdzano u nich również włóknienie szpiku, które zaobserwowano u 88,9% (8/9 chorych) ($p=0,004$). Wszyscy chorzy z podwyższoną ekspresją antygenu CD20 mieli prawidłowe stężenie albuminy w surowicy ($p=0,019$) (Tabela 22).

Tabela 22. Analiza zależności pomiędzy ekspresją antygenu CD20 a włóknieniem, rodzajem nacieku oraz stężeniem albumin w grupie chorych z nowo rozpoznanym szpiczakiem.

Ekspresja CD20 a wybrane parametry		CD20 + ($\geq 20\%$)		CD20 – ($< 20\%$)		p
		n	%	n	%	
Włóknienie	brak	1	11,1	32	68,1	0,004
	obecne	8	88,9	15	31,9	
Rodzaj nacieku	rozlany	6	66,7	11	23,4	0,026
	skupiska/śródmiażdżowy	3	33,3	36	76,6	
Albumina	$< 35\text{g/dl}$	0	0	21	44,7	0,019
	$> 35\text{g/dl}$	9	100	26	55,3	

Ekspresja białka p53 w analizowanej populacji chorych na MM występowała u 10% (9/90) pacjentów, w tym 8,9% (5/56) z nowo rozpoznaną chorobą. Zaobserwowano związek pomiędzy ekspresją p53 i nasileniem włóknienia ($p=0,025$) (Tabela 23).

Tabela 23. Analiza zależności pomiędzy ekspresją p53 a włóknieniem w grupie chorych z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytowym.

Ekspresja p53 a włóknienie		p53 +		p53 –		p
		n	%	n	%	
Włóknienie	brak	1	20	32	62,8	0,025
	obecne	4	80	19	37,2	

Rodzaj łańcucha lekkiego immunoglobulin obecny na powierzchni klonalnych plazmocytw w analizowanej grupie korelował ze stężeniem β -2-mikroglobuliny, które było znamienne częściej podwyższone u chorych lambda dodatnich ($p=0,017$). Chorzy ci częściej nie uzyskiwali odpowiedzi na leczenie indukujące ($p=0,009$). Także częściej występował u nich nawrót po 1 linii leczenia, w porównaniu z chorymi z rozrostem kappa plazmocytw (66,7% vs 28,1%) ($p=0,006$). Chorzy z obecnością rozrostu lambda posiadali wyższy stopień zaawansowania choroby wg klasyfikacji ISS, niż chorzy kappa dodatni ($p=0,04$) (Tabela 24).

Tabela 24. Analiza zależności pomiędzy ekspresją łańcucha lekkiego na powierzchni klonalnych plazmocytw a podwyższonym stężeniem β 2M, odsetkiem odpowiedzi na leczenie indukujące, częstością nawrotu po leczeniu 1 linii oraz zaawansowaniem wg klasyfikacji ISS w grupie chorych z nowo rozpoznanym szpiczakiem.

Ekspresja łańcucha lekkiego a wybrane parametry		kappa		lambda		p
		n	%	n	%	
β 2M	>3,0mg/l	11	34,4	16	66,7	0,017
	<3,0mg/l	21	65,6	8	33,3	
Odpowiedź na 1 linię leczenia	tak	27	84,4	12	52,2	0,009
	nie	5	15,6	11	47,8	
Obecność nawrotu po 1 linii leczenia	tak	9	28,1	14	66,7	0,006
	nie	23	71,9	7	33,3	
ISS	ISS1	17	53,1	6	25	0,04
	ISS2	8	25	13	54,2	
	ISS3	7	21,9	5	20,8	

4.2.2. Czynniki wpływające na czas całkowitego przeżycia w grupie chorych z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytowym.

W grupie chorych z nowo rozpoznaną chorobą mediana czasu całkowitego przeżycia wyniosła 37,5 miesięcy (min-max: 2-98,4 miesiąca). Metodą jednowariantową wykazano statystycznie znamienne, niekorzystny wpływ na całkowite przeżycie w tej grupie dla takich parametrów jak: obniżone stężenie albumin <35g/l, podwyższone stężenie β -2-mikroglobuliny, kreatyniny, wyższy stopień zaawansowania wg klasyfikacji DS, trzeci stopień wg klasyfikacji ISS i R-ISS oraz brak odpowiedzi na zastosowane leczenie pierwszoliniowe (Tabela 25).

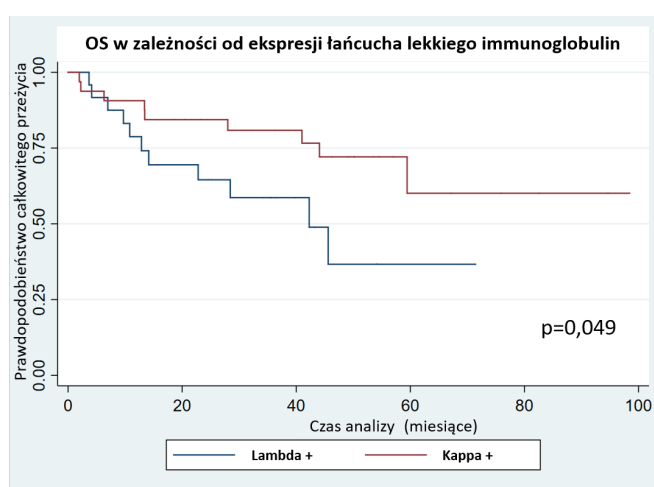
Tabela 25. Jednowariantowa analiza wpływu wybranych czynników na czas całkowitego przeżycia w grupie chorych z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytowym.

Znaczenie prognostyczne względem OS w grupie chorych z nowo rozpoznanym MM	Mediana OS (miesiące)	p
del17p tak vs nie	44,1 vs NO	0,644
t(14;16) tak vs nie	NO vs 59,4	0,285
t(4;14) tak vs nie	42,3 vs NO	0,111
ryzyko cytogenetyczne wg Rajkumara: standardowe vs pośrednie vs wysokie	NO vs 12,8 vs 44,1	0,199
Ryzyko cytogenetyczne wg mSMART: standardowe vs pośrednie vs wysokie	NO vs 45,6 vs 44,1	0,337
łańcuch lekki w IF: lambda vs kappa i NW	42,3 vs NO	0,119
albumina <35g/l vs >35g/l	42,3 vs NO	0,009
β 2M >3,0 mg/l vs <3,0mg/l	45,6 vs NO	0,004
LDH >ggn (234U/l) vs norma	59,4 vs NO	0,552
LDH >2xggn (468U/l) vs norma	2,2 vs NO	0,269
Kreatynina > 115 μ mol/l vs < 115 μ mol/l	12,8 vs NO	0,001
ISS 1 i ISS 2 vs ISS 3	NO vs 13,4	0,005
R-ISS 1 i R-ISS 2 vs R-ISS 3	NO vs 10,8	0,003
DS IA, IB, IIA vs IIB vs IIIA vs IIIB	NO vs 3,6 vs 59,4 vs 4,1	0,0001
nawrót po 1 linii leczenia: tak vs nie	44,1 vs NO	0,304
uzyskanie CR po 1 linii: tak vs nie	NO vs 59,4	0,103
odpowiedź na 1 linię: SD-CR vs PD	NO vs 42,3	0,031

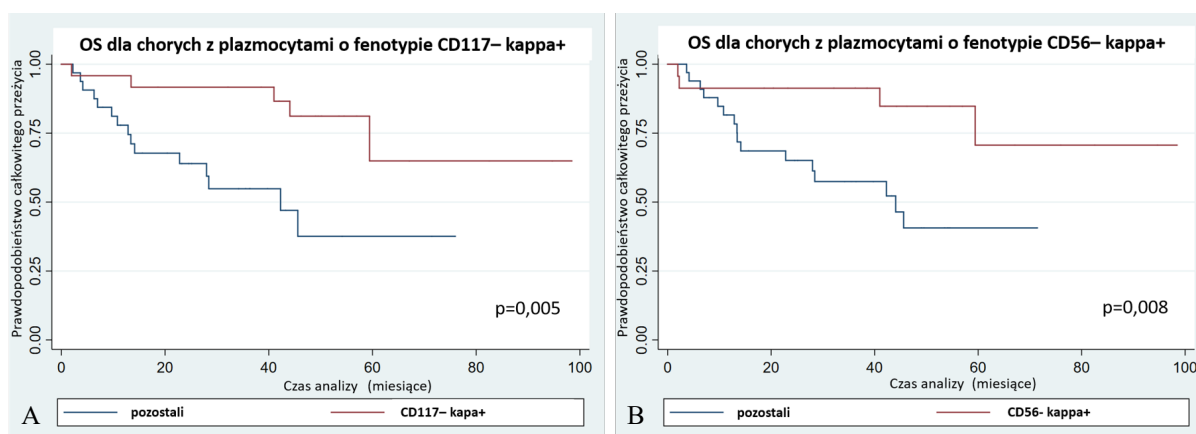
NO - mediana nieosiągnięta

W grupie z obecnością del17p oraz t(4;14), z podwyższoną aktywnością LDH osiągnięto medianę OS w przeciwieństwie do grupy osób bez tych zaburzeń. W analizowanej grupie chorych obserwowano tendencje skrócenia mediany OS wraz ze wzrostem ryzyka cytogenetycznego wg klasyfikacji mSMART oraz Rajkumara. Nie miało to jednak znamienności statystycznej

W ocenie histologicznej szpików pochodzących od chorych w momencie diagnozy MM wykazano statystycznie znamienny związek pomiędzy rodzajem łańcucha lekkiego immunoglobuliny, wykrywanego metodą IHC na powierzchni plazmocytoów, a czasem całkowitego przeżycia ($p=0,049$) (Rycina 3). Pacjenci z klonalnym rozrostem plazmocytoów kappa nie osiągnęli mediany OS, która wynosiła 42,3 miesiąca dla chorych lambda dodatnich.



Rycina 3. Analiza Kaplan–Meier czasu całkowitego przeżycia (OS) w grupie z nowo rozpoznanym MM w zależności od obecności łańcucha lekkiego immunoglobulin na plazmocytoach ($p = 0,049$).



Rycina 4. Analiza Kaplan–Meier czasu całkowitego przeżycia (OS) w grupie chorych z nowo rozpoznanym MM w zależności od obecności plazmocytoów o fenotypie CD117– kappa+ ($p = 0,005$) (A) oraz CD56– kappa+ ($p = 0,008$) (B).

Ponadto wykazano, że chorzy posiadający komórki charakteryzujące się fenotypem CD117– kappa+ (p= 0,005) oraz CD56– kappa+ (p=0,008) mieli statystycznie dłuższe okresy całkowitego przeżycia (Rycina 4). Nie wykazano związku pozostałych parametrów histologicznych i immunohistochemicznych a czasem całkowitego przeżycia (Tabela 26).

Tabela 26. Jednowariantowa analiza wpływu włóknienia, typu nacieku, rozrostu, stopnia nacieczenia oraz markerów IHC na czas całkowitego przeżycia w grupie chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym.

Znaczenie prognostyczne względem OS w grupie chorych z nowo rozpoznany MM	Mediana OS (miesiące)	p
Elementy oceny histologicznej		
włóknienie MF0 vs MF1 vs MF2	NO vs NO vs 59,4	0,587
typ nacieku rozlany vs skupiska i śródmiąższowy	44,1 vs NO	0,204
typ rozrostu: niedojrzały, plazmoblastyczny vs dojrzały i pośredni	42,3 vs NO	0,317
stopień nacieczenia >50% vs <50%	59,4 vs NO	0,086
Antygeny IHC		
CD56 ≥40% vs <40%	44,1 vs NO	0,167
CD56 ≥50% vs <50%	44,1 vs NO	0,529
CD20 ≥10% vs <10%	59,4 vs NO	0,776
CD20 ≥20% vs <10%	NO	0,897
p53 >0 vs p53-	NO vs 59,4	0,435
p53 ≥10% vs <10%	7,0 vs NO	0,308
CD117 ≥5% vs <5%	41,0 vs NO	0,29
CD117 ≥10% vs <10%	28,0 vs NO	0,125
cyklina D1 ≥10% vs <10%	NO vs 45,6	0,216
cyklina D1 ≥30% vs <30%	NO vs 59,4	0,679
lambda vs kappa	42,3 vs NO	0,049
Koekspresja wybranych antygenów IHC		
CD117– kappa+: tak vs nie	NO vs 42,3	0,005
CD56– kappa+: tak vs nie	NO vs 44,1	0,008

W celu wyznaczenia czynników ryzyka wpływających na czas całkowitego przeżycia wykonano analizę w oparciu o model regresji proporcjonalnego hazardu Coxa. Wykazano, że histologicznym czynnikiem ryzyka, znamienne wpływającym na skrócenie przeżycia

(2,4 krotnie), była obecność w preparatach histologicznych klonalnych plazmocytołów lambda. Ponadto wykazano, że stwierdzenie obecności plazmocytołów o fenotypie CD117– kappa+ oraz CD56– kappa+ było czynnikiem wpływającym na wydłużenie przeżycia. W badanej grupie potwierdzono, że stężenie albuminy <35g/l, β -2-mikroglobuliny >3,0 mg/l, kreatyniny >115 μ mol/l, trzeci stopień zaawansowania wg DS, ISS i R-ISS, brak odpowiedzi na pierwszą linię leczenia są czynnikami niekorzystnego rokowania co do przeżycia (Tabela 27).

Tabela 27. Regresja proporcjonalnego hazardu Coxa dla czasu całkowitego przeżycia w grupie chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym.

Regresja proporcjonalnego hazardu Coxa dla OS				
Czynnik	p	HR	95% CI	
albumina <35g/l	0,014	3,19	1,27	8,008
β 2M >3,0 mg/l	0,008	3,659	1,393	9,608
kreatynina >115 μ mol/l	0,0009	6,02	2,335	15,519
ISS 3	0,003	5,428	1,757	16,766
R-ISS 3	0,025	11,35	1,357	94,928
Durie-Salmon IIIA i IIIB	0,0004	9,84	1,2	7,99
Uzyskanie odpowiedzi na 1 linię leczenia	0,038	0,391	0,161	0,95
Antygeny na powierzchni plazmocytołów				
lambda	0,047	2,402	0,975	5,92
CD117– kappa+	0,01	0,254	0,089	0,717
CD56– kappa+	0,014	0,242	0,078	0,748

4.2.3. Czynniki wpływające na czas wolny od progresji choroby w grupie chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym.

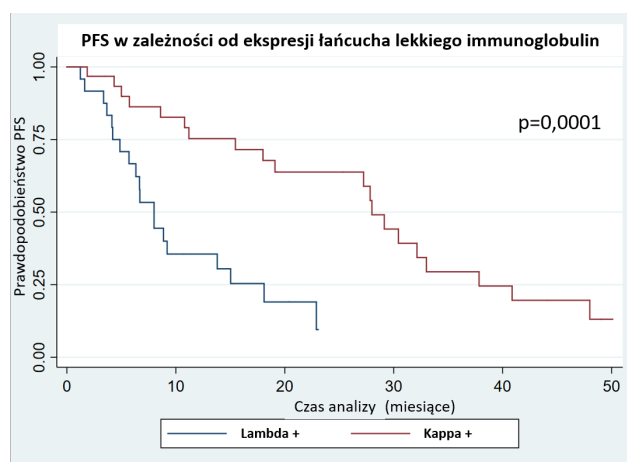
W grupie chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym wykazano, iż czynnikami wpływającymi znamienne na skrócenie czasu wolnego od progresji choroby były: obecność t(4;14), obecność łańcucha lekkiego lambda w surowicy wykrywanego metodą immunofiksacji oraz brak odpowiedzi na 1 linię leczenia. Ponadto obserwowano trend, (bez znamienności statystycznej), wskazujący na to, że obecność del17p, t(14;16), stężenie albuminy <35g/l, podwyższone stężenie β -2-mikroglobulina >3,0 mg/l, podwyższona aktywność LDH wiązały się z krótszym PFS. Zauważono również, że wraz z wyższym stopniem zaawansowania wg klasyfikacji ISS i R-ISS mediany czasu wolnego od progresji ulegały skróceniu (Tabela 28).

Tabela 28. Jednowariantowa analiza wpływu wybranych czynników na czas wolny od progresji choroby (PFS) w grupie chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym

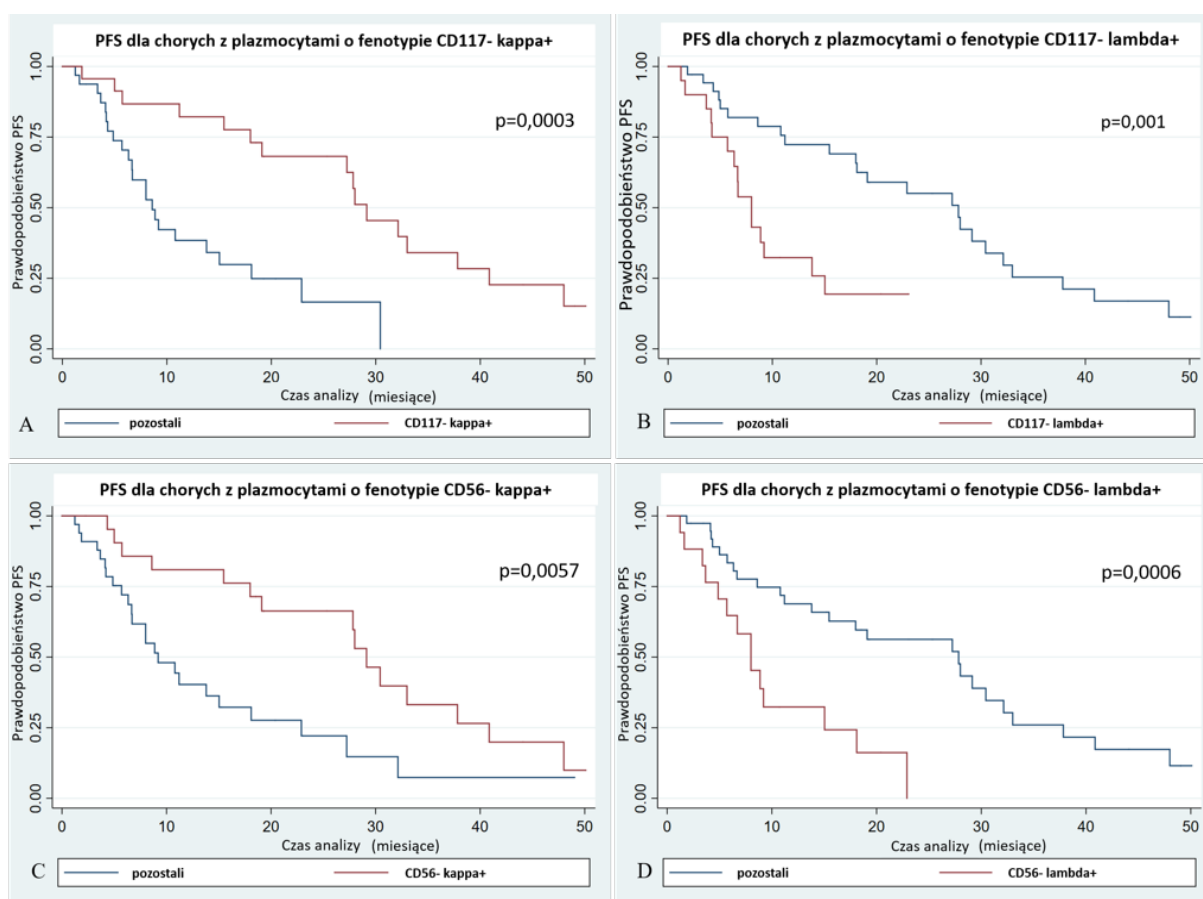
Znaczenie prognostyczne względem PFS w grupie chorych z nowo rozpoznany MM	Mediana PFS (miesiące)	p
del17p tak vs nie	15,5 vs 18	0,888
t(14;16) tak vs nie	13,8 vs 18	0,661
t(4;14) tak vs nie	6,3 vs 18,1	0,048
ryzyko cytogenetyczne wg Rajkumara: standardowe vs pośrednie vs wysokie	22,9 vs 6,3 vs 13,8	0,52
ryzyko cytogenetyczne wg mSMART: standardowe vs pośrednie vs wysokie	27,8 vs 9,2 vs 15,5	0,069
łańcuch lekki w IF: lambda vs kappa vs NW	8 vs 29,1 vs 15,5	0,0004
albumina <35g/l vs >35g/l	11,2 vs 27,8	0,149
$\beta 2M$ >3,0 mg/l vs <3,0mg/l	11,2 vs 27,2	0,076
LDH >ggn* (234U/l) vs norma	19,1 vs 18	0,619
LDH >2xggn (468U/l) vs norma	8,9 vs 18,1	0,507
Kreatynina >115 μ mol/l vs <115 μ mol/l	6,3 vs 18	0,142
ISS 1 vs ISS 2 vs ISS 3	27,8 vs 15 vs 11,2	0,105
R-ISS 1 vs R-ISS 2 vs R-ISS 3	14,9 vs 18,0 vs 11,2	0,082
DS IA vs IB i IIA vs IIB vs IIIA vs IIIB	19,1 vs NO vs 1,6 vs 18,1 vs 6,3	0,252
uzyskanie CR po 1 linii: tak vs nie	33 vs 15,4	0,244
odpowiedź na 1 linię: SD-CR vs PD	27,8 vs 5	0,0001

*ggn – górna granica normy

Analiza czasu wolnego od progresji choroby wykazała istotnie statystyczny związek pomiędzy obecnością klonalnych plazmocyto λ w preparatach immunohistochemicznych a krótszymi okresami przeżycia wolnego od progresji ($p=0,0001$) (Rycina 5). Mediana PFS dla chorych λ dodatnich wyniosła 8 miesięcy vs 28 miesięcy dla κ dodatnich. Dodatkowo wykazano, że obecność fenotypu CD117– λ (p=0,001) oraz CD56– λ (p=0,0006) wiązała się z krótszym PFS. Przeciwnie, u pacjentów z plazmocyto λ o fenotypie CD117– κ (p=0,0003) oraz CD56– κ (p=0,0057), mediany PFS były dłuższe (Rycina 6). Dla pozostałych, analizowanych koekspresji antygenów nie wykazano znamiennej statystycznej.



Rycina 5. Analiza Kaplan–Meier czasu wolnego od progresji (PFS) w grupie chorych z nowo rozpoznanym MM w zależności od łańcucha lekkiego immunoglobulin na plazmocytach ($p = 0,0001$).



Rycina 6. Analiza Kaplan–Meier czasu wolnego od progresji (PFS) w grupie chorych z nowo rozpoznanym MM w zależności od obecności plazmocytów z fenotypem: CD117– kappa+ ($p=0,0003$) (A), CD117– lambda+ ($p=0,001$) (B), CD56– kappa+ ($p=0,0057$) (C) oraz CD56– lambda+ ($p=0,0006$) (D).

Ponadto zaobserwowano tendencje do krótszego PFS u chorych z zaawansowanym włóknieniem (MF2) w porównaniu z pacjentami, u których włóknienie nie występowało lub było niewielkiego stopnia (MF1) - mediany dla PFS odpowiednio 8,9 vs 19,1 i 18 miesięcy. Mediany PFS były również krótsze w przypadku rozlanego nacieku oraz niedojrzałego i plazmoblastycznego rozrostu, jednakże różnice te nie były istotne statystycznie (Tabela 29).

Tabela 29. Jednowariantowa analiza wpływu włóknienia, typu nacieku, typu rozrostu oraz wielkości nacieku nowotworowego na czas wolny od progresji choroby w grupie chorych z nowo rozpoznanym MM.

Znaczenie prognostyczne względem PFS w grupie chorych z nowo rozpoznanym MM	Mediana PFS (miesiące)	p
Elementy oceny histologicznej		
włóknienie MF0 vs MF1 vs MF2	19,1 vs 18 vs 8,9	0,69
typ nacieku rozlany vs skupiska vs śródmiąższowy	8 vs 27,8 vs 15	0,38
typ rozrostu: niedojrzały, plazmoblastyczny vs dojrzały i pośredni	5,7 vs 18	0,258
stopień nacieczenia >50% vs 20-50% vs <20%	13,8 vs 19,1 vs 27,8	0,45
Antygeny IHC		
CD56 $\geq$ 40% vs <40%	13,8 vs 18,1	0,851
CD56 $\geq$ 50% vs <50%	13,8 vs 18,1	0,838
CD20 $\geq$ 10% vs <10%	15 vs 18	0,793
CD20 $\geq$ 20% vs <10%	22,9 vs 15,5	0,678
p53 >0 vs ujemne p53	32,1 vs 15,5	0,805
p53 $\geq$ 10% vs <10%	3,4 vs 18	0,232
CD117 $\geq$ 5% vs <5%	18,1 vs 15,5	0,325
CD117 $\geq$ 10% vs <10%	18,1 vs 18	0,296
cyklina D1 $\geq$ 10% vs <10%	18 vs 15	0,933
cyklina D1 $\geq$ 30% vs <30%	15,4 vs 18	0,826
lambda vs kappa	8 vs 28	0,0001
Koekspresja wybranych antygenów IHC		
CD117– lambda+: tak vs nie	8 vs 27,8	0,001
CD117– kappa+: tak vs nie	29,1 vs 8,6	0,0003
CD56– lambda+: tak vs nie	8 vs 27,8	0,0006
CD56– kappa+: tak vs nie	29,1 vs 8,9	0,0057

Stosując model regresji proporcjonalnego hazardu Coxa potwierdzono w grupie chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym, że t(4;14), 3 stopień wg ISS, R-ISS oraz brak odpowiedzi na 1 linię leczenia są czynnikami ryzyka, wpływającymi na czas wolny od progresji choroby. Na podstawie oceny histologicznej z IHC wykazano, że czynnikami ryzyka wpływającymi niekorzystnie na PFS w badanej grupie, są obecność klonalnego rozrostu plazmocytów lambda oraz występowanie plazmocytów o fenotypie CD117– lambda+ oraz CD56– lambda+ (Tabela 30).

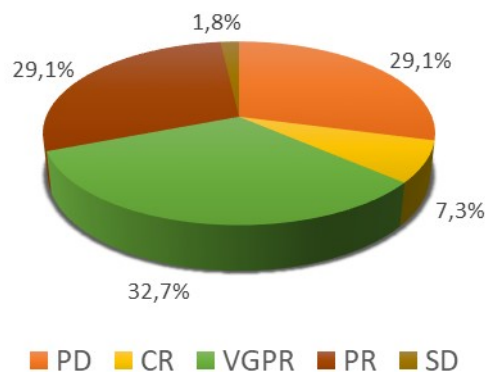
Tabela 30. Regresja proporcjonalnego hazardu Coxa dla czasu wolnego od progresji choroby w grupie chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym.

Regresja proporcjonalnego hazardu Coxa dla PFS				
czynnik	p	HR	95% CI	
t(4;14)	0,046	2,4	0,976	5,975
ISS 3	0,041	2,444	1,037	5,757
R-ISS 3	0,032	3,779	1,117	12,78
Uzyskanie odpowiedzi na 1 linię	0,0007	0,267	0,131	0,542
Antygeny na powierzchni plazmocytów				
lambda	0,0002	4,315	1,962	9,491
CD117– lambda+	0,002	3,376	1,572	7,249
CD117– kappa+	0,001	0,238	0,104	0,547
CD56– lambda+	0,001	3,442	1,629	7,273
CD56– kappa+	0,007	0,394	0,199	0,778

4.3. Analiza znaczenia wybranych elementów oceny histologicznej oraz badanych markerów immunohistochemicznych jako wskaźnika dla uzyskania odpowiedzi klinicznej na leczenie pierwszej linii.

W grupie chorych z nowo rozpoznany MM całkowity odsetek odpowiedzi na leczenie 1 linii wynosił 69,1% (38/56 chorych). Podział z uwzględnieniem rodzaju uzyskanej odpowiedzi na leczenie przedstawiono na Rycinie 7. Wykazano, że uzyskanie odpowiedzi na leczenie było czynnikiem korzystnie wpływającym na czas całkowitego przeżycia ($p=0,038$, HR 0,391 95%CI 0,161-0,95).

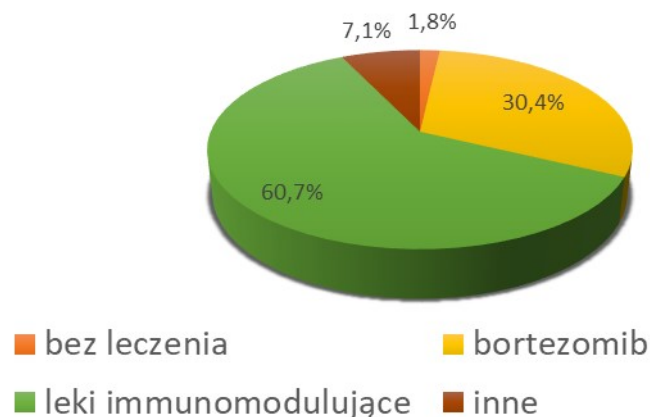
Odsetek odpowiedzi na na leczenie 1 linii w grupie chorych z noworozpoznanym szpiczakiem



Rycina 7. Odsetek odpowiedzi na 1 linię leczenia z uwzględnieniem rodzaju uzyskanej odpowiedzi.

W analizowanej grupie pacjentów z nowo rozpoznaną chorobą u 30,4% (17/56) chorych prowadzono leczenie z wykorzystaniem inhibitora proteasomu (bortezomib - B), u 60,7% (34/56) chorych leków immunomodulujących (IMiDs) (talidomid lub lenalidomid), a u 7,1% (4/56) chorych stosowano inne schematy oparte na melfalanie, glikokortykosteroidach, winkrystynie oraz doxorubicynie – MP, VAD). Jeden pacjent nie wymagał włączenia terapii (Rycina 8). W kolejnych etapach leczenia 39,2% (22/56) chorych zostało poddanych autotransplantacji szpiku kostnego.

1 linia leczenia w grupie chorych z noworozpoznanym szpiczakiem



Rycina 8. Podział z uwzględnieniem terapii zastosowanej w 1 linii leczenia w grupie chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym.

W grupie chorych leczonych bortezomibem wykazano istotną zależność pomiędzy wysoką ekspresją antygenu CD20 a brakiem odpowiedzi na leczenie indukujące (75% chorych miało progresję choroby po leczeniu pierwszej linii; $p=0,022$). W grupie chorych z rozrostem klonalnym lambda ORR na leczenie bortezomibem wynosił 70% vs 36,3% w grupie leczonych za pomocą IMiDs (Tabela 31).

Tabela 31. Odsetek całkowitych odpowiedzi na leczenie indukujące w grupie chorych z rozrostem klonalnym lambda.

ORR dla chorych lambda+				
Rodzaj leczenia	Ogółem	n	%	p
bortezomib	n=10	7	70	0,005
IMiDs	n=11	4	36,4	

Nie zaobserwowano związku pomiędzy pozostałymi parametrami w ocenie histologicznej i immunohistochemicznej szpiku a uzyskaniem odpowiedzi na leczenie bortezomibem.

Wśród pacjentów leczonych w 1 linii za pomocą leków immunomodulujących wykazano statystycznie znamienne związki odpowiedzi na leczenie z rodzajem łańcucha lekkiego na klonalnych plazmocytach. Odpowiedź na leczenie uzyskało 86,9% (20/23) chorych z dodatnim łańcuchem kappa vs 36,4% (4/11) z dodatnim łańcuchem lambda ($p=0,005$). Ponadto chorzy, u których stwierdzono obecność plazmocytów CD117– lambda+ rzadziej odpowiadali na leczenie w porównaniu z chorymi o fenotypie CD117+ lambda+, CD117– kappa+ oraz CD117+ kappa+ (ORR odpowiednio 33,3% (3/9) vs 50% (1/2) i 82,5% (16/19) i 100% (4/4); $p=0,009$). Podobnie chorzy z plazmocyтами o fenotypie CD56– lambda+ rzadziej uzyskiwali odpowiedź na leczenie w porównaniu z chorymi CD56+ lambda+, CD56– kappa+ oraz CD56+ kappa+ (ORR 28,6% (2/7) vs 50% (2/4) i 81,5% (15/17) oraz 83,3 (5/6) ; $p=0,014$). Z innych czynników mających negatywny wpływ na uzyskanie odpowiedzi na leczenie indukujące IMiDs była obecność t(4;14) (ORR 25% vs 76,7%; $p=0,033$). Zaobserwowano trend zależności występowania rozlanego nacieku oraz nacieku >50% komórek z mniejszym odsetkiem odpowiedzi na leczenie indukujące, jednak nie wykazano istotności statystycznej dla tych parametrów (ORR dla rozlanego nacieku vs śródmiaższowy i skupiska odpowiednio 45,4% vs 83% $p=0,072$; ORR dla nacieku >50% vs <50% komórek odpowiednio 57% vs 83,3% $p=0,185$).

5. DYSKUSJA

Szpiczak plazmocytowy jest chorobą z grupy dyskrazji plazmocytowych o heterogennym charakterze. Manifestacja objawów jest bardzo zróżnicowana i może dotyczyć zaburzeń w morfologii krwi, gospodarki elektrolitowej, funkcji nerek czy destrukcji kostnej. Podstawą rozpoznania pozostaje wykazanie klonalnego rozrostu plazmocytów w biopsji tkankowej lub szpiku kostnym. Ocena trepanobiopatów jest metodą o ugruntowanym znaczeniu, stosowaną od lat w diagnostyce hematologicznej. Wraz z oceną cytologiczną, cytometryczną oraz cytogenetyczną stanowi integralną część procesu diagnostycznego chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. Pomimo rozwoju nowoczesnych technik, opartych na badaniu immunofenotypowym oraz molekularnym, niejednokrotnie trepanobiopsja decyduje o rozpoznaniu choroby.

Podstawową zaletą oceny histologicznej szpiku jest unikalna możliwość określenia takich parametrów jak komórkowość, architektonika szpiku w utkaniu kostnym, nasilenie włóknienia czy angiogeneza. Parametry te są często niemożliwe do oceny przy użyciu innych technik. Ponadto w chorobach limfoproliferacyjnych, z uwagi na charakter choroby oraz rodzaj nacieku, ocena tylko za pomocą cytologii lub cytometrii przepływowej jest często niewystarczająca i wymaga potwierdzenia w badaniu biopatów. Należy wziąć pod uwagę fakt, iż w tej grupie chorób naciek nierzadko występuje w postaci skupisk, co utrudnia wiarygodną ocenę na podstawie BA. W niniejszej pracy naciek komórek szpiczakowych w postaci skupisk obserwowano u znaczącego odsetka chorych (46,4% w grupie w momencie rozpoznania oraz u 41,2% w czasie nawrotu/progresji choroby). Zjawisko to może być jedną z przyczyn dyskrepancji w uzyskiwanych wynikach odsetka nacieczenia szpiku, który w dobie aktualnie obowiązujących zaleceń pozostaje kluczowy dla rozpoznania szpiczaka plazmocytoowego. Dodatkową zaletą oceny histologicznej jest możliwość zastosowania barwień immunohistochemicznych zwiększających czułość oraz specyficzność tej techniki. Wśród innych atutów można wymienić trwałość materiału, co pozwala na archiwizowanie biopatów oraz możliwość wykonania dodatkowych analiz w razie konieczności. Dzięki rozwojowi techniki dostępne są również metody molekularne oraz cytogenetyczne, pozwalające na wykrywanie specyficznych zaburzeń genetycznych w archiwalnych biopatach, co jest aktualnie szeroko stosowane w diagnostyce chłoniaków o wysokim stopniu złośliwości.

Ocena histologiczna trepanobiopatów posiada również słabe strony, wśród których należy wymienić przede wszystkim dość długi czas do uzyskania wyników (związany z preparatyką oraz technikami barwienia). Dodatkowo jest to metoda w dużej mierze zależna

od umiejętności oraz doświadczenia oceniającego patologa, obarczona pewną subiektywnością oceny. Ponadto wartość diagnostyczna często uzależniona jest od ilości oraz jakości pobranego materiału. Czulość tej metody zwiększa się z wraz z wielkością biopsji oraz liczbą ocenianych preparatów wykonanych z jednego bloczka parafinowego. Należy również wziąć pod uwagę, że w przeciwieństwie do badania immunofenotypowego w cytometrii przepływowej, nie można metodą immunohistochemiczną określić kilku antygenów na jednej komórce. Istnieje jednak możliwość wykonania barwień podwójnych z zastosowaniem dwóch różnych przeciwciał, co znajduje zastosowanie w oznaczeniu antygeny proliferacyjnego Ki67 w komórkach nowotworowych np. w chłoniakach. Ocena taka jest możliwa tylko wtedy, gdy jeden z oznaczanych antygenów jest markerem jądrowym, a drugi występuje na powierzchni komórki. Ely i wsp. wykonali analizę znaczenia Ki67 w plazmocytach CD138+ u chorych na szpiczaka przy użyciu barwień bispecyficznych. Wykazali, że metoda ta jest przydatna w określeniu grupy wysokiego ryzyka i przewidywaniu rokowania [72]. Istnieją jednak pewne trudności z interpretacją uzyskanych obrazów, a cena wykonania takich oznaczeń jest dwukrotnie wyższa.

Ocena odsetka nacieczenia szpiku przez klonalne plazmocyty wg aktualnie obowiązujących zaleceń wg IMWG wydaje się być kluczowa dla rozpoznania objawowej choroby [1]. Od 2014 roku do rozpoznania MM wymagane jest stwierdzenie co najmniej 10% nacieku w szpiku lub klonalnego rozrostu w guzie pozaszpikowym. Ponadto występowanie powyżej 60% klonalnych plazmocytów stanowi obecnie wskazanie do rozpoczęcia terapii, pomimo braku innych objawów definiujących chorobę. Al-Quran i wsp. opublikowali pracę porównującą 3 metody oceny nacieczenia szpiku: rozmazy barwione metodą Wright-Giemsa, preparaty z trepanobiopsji barwione hematoksyliną i eozyną oraz barwienia immunohistochemiczne na obecność antygeny CD138. W większości analizowanych przypadków ocena IHC antygeny CD138 wykazała większy odsetek nacieczenia przez plazmocyty niż w rozmazach szpiku czy preparatach H+E. U 30 na 79 badanych obserwowano znaczne różnice w ocenie odsetka nacieczenia szpiku, a w 16 największe nacieczenie wykazano za pomocą barwienia immunohistochemicznego na obecność CD138 [19]. W cytowanej pracy ocena preparatów barwionych anti-CD138 ujawniała nie tylko większy odsetek plazmocytów niż dwie pozostałe metody, ale również charakteryzowała się większą zgodnością w ocenie pomiędzy patologami. Podobną obserwację potwierdzili także inni autorzy [21]. Lee i wsp. wśród 77 chorych z naciekiem <10% w biopsji aspiracyjnej szpiku wykazali nacieczenie >10% w badaniu histologicznym z barwieniem CD138 w 75% analizowanych przypadków [73]. W analizie cytometrycznej dochodzi również do

niedoszacowania odsetka plazmocytoów. Tran i wsp., w retrospektywnej analizie porównującej czułość wszystkich trzech metod wykazali, iż 10% naciek plazmocytoarny w ocenie cytomorfologicznej odpowiadał 3,5% klonalnych plazmocytoów w badaniu FC [74]. Za przyczyny dyskrepancji w otrzymywanych wynikach podaje się m.in. nieoptymalną aspirację i/lub rozcieńczenie szpiku krwią obwodową w kolejno pobieranych próbkach z biopsji aspiracyjnej. Patologiczne plazmocyty nieproporcjonalnie częściej ulegają zjawiskom hemodylucji w porównaniu z innymi komórkami szpiku jak np. blasty. Jako etiologię tego zjawiska wymienia się również fakt częstego występowanie zmian ogniskowych i nierównomiernego rozmieszczenia komórek szpiczakowych w płynnym szpiku, w porównaniu z wycinkami kostnymi. W literaturze dyskutuje się także wpływ innych właściwości fizycznych i biologicznych komórek szpiczakowych na wyniki cytometrii przepływowej [4, 9]. Przeprowadzona analiza własna potwierdza przydatność zastosowania oceny histologicznej oraz barwienia na obecność antygenu CD138 w ocenie odsetka nacieczenia szpiku. Niejednokrotnie wstępna ocena na podstawie preparatów H+E wskazywała na mniejszy stopień nacieczenia w porównaniu z barwieniem CD138. W niniejszej pracy, z uwagi na jej retrospektywny charakter, nie uwzględniono analizy cytometrycznej szpiku, gdyż została ona wykonana u niewielu chorych (rutynowe zastosowanie badania immunofenotypowego komórek szpiczakowych wprowadzono po 2015 roku).

Barwienie na obecność CD138, w przeciwieństwie do pozostałych metod, pozwala na ocenę małych skupisk komórek nowotworowych oraz guzkowego nacieku, również w przypadkach, w których odsetek nacieczenia szpiku nie jest wysoki. Jest ono szczególnie przydatne w diagnostyce pacjentów po terapii z ubogokomórkowym szpikiem oraz pozwala uniknąć błędów w ocenie rezydualnego lub nawrotowego nacieku nowotworowego [19, 75]. Własna analiza porównawcza potwierdziła, że biopaty pochodzące od chorych w momencie diagnozy charakteryzowały się wyższym odsetkiem nacieczenia szpiku, niż w grupie pacjentów w momencie nawrotu/progresji choroby (<20% plazmocytoów stwierdzano u 26,5% osób z nawrotem/progresją MM vs 10,7% chorych z nowo rozpoznanym MM). Dodatkowo oszacowanie nacieku komórek plazmatycznych w preparatach barwionych H+E oraz odróżnienie ich od innych komórek hematopoetycznych może być problematyczne, z uwagi na nierzadko występujący naciek śródmiąższowy. Częstość występowania tego rodzaju nacieku w badanej populacji wynosiła 28,9%, a w podgrupie analizowanej w momencie nawrotu/progresji choroby było to aż 38,2% chorych. W przypadkach tych ocena barwienia na obecność CD138 była szczególnie przydatna. Istnieją jednak wyjątki, kiedy barwienie IHC

na CD138 nie pozwala na lepsze oszacowanie nacieku. Tłumaczy się to brakiem typowego, dobrze widocznego barwienia błonowego i Golgie'go dla komórek plazmatycznych oraz występowaniem tzw. wzoru ziarnistego. Niedoszacowanie odsetka nacieczenia może również wynikać z obecności dużej ilości plazmoblastów, które są komórkami CD138 ujemnymi. Przypadki te wymagają analizy mikroskopowej na dużym powiększeniu oraz wykazania klonalności łańcuchów lekkich immunoglobulin κ lub λ [4].

Odsetek nacieczenia szpiku przez plazmocyty ma nie tylko znaczenie diagnostyczne, ale również jest czynnikiem prognostycznym. Rajkumar i wsp. wykazali, że chorzy z wyższym odsetkiem nacieczenia szpiku mieli statystycznie krótsze całkowite przeżycia oraz okresy wolne od progresji choroby. Autorzy podkreślają, że niezależnie od metody oznaczenia (aspirat, biopsja czy indeks znakowania plazmocytów /PCLI/), najwyższy odsetek plazmocytów w szpiku ma wartość prognostyczną, co do przeżycia oraz uzyskania odpowiedzi na leczenie [76]. W przeprowadzonym przez mnie badaniu stwierdzono związek wielkości nacieku z szeroko dyskutowanymi w literaturze niekorzystnymi histologicznie czynnikami rokowniczymi, takimi jak występowanie rozlanego nacieku oraz zaawansowanego włóknienia [18, 77]. Wykazano, że wraz ze wzrostem odsetka nacieczenia szpiku obserwowano większe nasilenie włóknienia oraz częstsze występowanie rozlanego typu rozrostu komórek nowotworowych. W badanej populacji chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym u ponad 94% pacjentów z rozlanym rodzajem rozrostu stwierdzono masywny nacieki z komórek CD138+ stanowiących >50% komórek szpiku. Biopaty z naciekiem śródmiąższowym oraz w postaci skupisk cechowały się niższym odsetkiem nacieczenia (nacieki <50% komórek stwierdzano odpowiednio u 76,7% oraz 50%). Ponadto chorzy z rozlanym rodzajem nacieku nowotworowego w szpiku częściej mieli wyższy stopień zaawansowania choroby wg klasyfikacji DS w momencie rozpoznania (94,1% osób było w III stopniu zaawansowania). Natomiast wśród chorych z naciekiem śródmiąższowym ponad połowa była w stopniu I wg DS. Analiza krzywych przeżycia Kaplana-Meiera wykazała, że chorzy z odsetkiem nacieczenia >50% oraz rozlanym naciekiem z komórek plazmatycznych osiągnęli medianę przeżycia (OS odpowiednio 59,4 i 44,1 miesięcy) w przeciwieństwie do chorych z niższym odsetkiem nacieczenia oraz pozostałymi rodzajami rozrostu nowotworowego. Jednakże regresja logistyczna dla rodzaju nacieku i odsetka nacieczenia szpiku nie potwierdziła ich niekorzystnego znaczenia rokowniczego w odniesieniu do czasu całkowitego przeżycia opisywanego w literaturze m.in. przez Lee i wsp [73].

Negatywne znaczenie plazmoblastycznego typu rozrostu jako niezależnego czynnika prognostycznego w momencie diagnozy jest znane od lat [12]. Podobnie dla chorych z pierwotnie opornym i nawrotowym szpiczakiem plazmocytowym po autotransplantacji jest on złym czynnikiem rokowniczym. Chorzy z plazmoblastycznym typem rozrostu znamiennej częściej posiadają klonalne zaburzenia cytogenetyczne (73% vs 31%), a całkowite przeżycie oraz czas wolny od progresji choroby jest u nich krótszy w porównaniu z pacjentami z pozostałymi typami histologicznymi (5 vs 24 miesiące dla OS oraz 4 vs 12 miesięcy dla PFS) [78]. W badaniach własnych również potwierdzono częstsze występowanie klonalnych, negatywnie rokujących aberracji cytogenetycznych w grupie z plazmoblastycznym typem rozrostu. W analizowanej populacji nowo zdiagnozowanych chorych u 21,4% z del17p zaobserwowano niedojrzały i plazmoblastyczny rozrost, który był obecny tylko u 2,3% osób bez del17p. Podobną zależność wykazano dla t(4;14) - u 28,57% pacjentów z tą translokacją zaobserwowano niedojrzały i plazmoblastyczny typ rozrostu w porównaniu do 4% osób bez t(4;14). Mediana OS dla chorych z niedojrzałym typem rozrostu w badanej populacji wyniosła 5,4 miesiące w porównaniu z 18 miesiącami w przypadku pozostałych chorych, jednakże z uwagi na zbyt małą liczebność grupy nie uzyskano znamienności statystycznej.

Badanie histologiczne szpiku jest jedyną techniką laboratoryjną służącą do oceny włóknienia. Parametr ten jest szeroko dyskutowany w literaturze w kontekście wielu chorób hematologicznych, ale jego kliniczne znaczenie nie jest do końca ugruntowane. Najwięcej danych literaturowych dotyczy nowotworów mieloproliferacyjnych, w tym pierwotnego zwłóknienia szpiku. Postuluje się, iż narastanie włóknienia ma związek z czasem trwania oraz nasileniem choroby, co zostało najlepiej poznane w odniesieniu do czerwienicy prawdziwej oraz nadpłytkowości samoistnej. Kryteria diagnostyczne WHO z 2016 roku tych jednostek chorobowych uwzględniają nasilenie włóknienia określone na podstawie oceny histologicznej [55]. W literaturze dyskutuje się między innymi związek liczby megakariocytów a pojawianiem się włóknienia w odpowiedzi na wydzielane przez nie cytokiny. Przykładem może być ostra białaczka megakariocytowa, w której włóknienie szpiku jest cechą charakterystyczną, występującą znacznie rzadziej w innych podtypach białaczek. Powstawanie włókien retikuliny i kolagenowych jest wynikiem nie tylko oddziaływań międzykomórkowych, ale także skomplikowanych reakcji cytokinowych zachodzących w mikrośrodowisku guza. Temat włóknienia jest również istotny w odniesieniu do chorych na szpiczaka plazmocytowego. Badania własne wykazały, że 41% osób już w momencie diagnozy miało stwierdzone włóknienie (MF1 u 32,1% oraz MF2 u 8,9% chorych). Przy nawrocie/progresji choroby było ono obecne u 38,2% pacjentów i miało większe nasilenie

(MF1 u 23,5%, MF2 u 14,7% chorych). Dane te korespondują z dostępnymi w literaturze, gdzie włóknienie stwierdzano w 20-38% przypadków. Nieproporcjonalnie często szpiczak z zaawansowanym zwłóknieniem szpiku produkuje tylko łańcuchy lekkie immunoglobulin, a choroba ma agresywniejszy przebieg. Dodatkowo pojawianie się nadmiaru włókien koreluje z występowaniem rozlanego nacieku przez plazmocyty [4, 18, 79]. Analiza własna znaczenia włóknienia w populacji pacjentów z nowo rozpoznany szpiczakiem wykazała znamieny związek z rodzajem nacieku nowotworowego. Wśród chorych z naciekiem rozlanym włóknienie występowało aż u 70,59% osób w przeciwieństwie do chorych z zajęciem śródmiąższowym, u których włóknienia nie stwierdzano. Podobnie jak w literaturze wykazano istotną korelację nasilenia włóknienia z wielkością nacieku ocenianego na podstawie obecności antygenu CD138. Wśród chorych z odsetkiem nacieczenia szpiku <50% komórek włóknienie nie występowało w 83,3%, natomiast w grupie z naciekiem >50% było ono stwierdzone w stopniu MF1 i MF2 odpowiednio w 50% i 9,4% przypadków. Hallgrímsson i wsp. udowodnili na blisko 600 przypadkach, że pacjenci, u których było włóknienie, mieli znacząco gorszy OS w porównaniu z grupą bez włóknienia (OS odpowiednio 4,4 vs 5 lat). Średnie przeżycie chorych z MF1 wynosiło 4,5 roku, natomiast w grupie z wyższym stopniem włóknienia były to 3 lata [18]. Podobne obserwacje opisali również inni autorzy [79]. Analiza przeżycia w badaniach własnych nie wykazała istotnych statystycznie różnic w grupie z nowo rozpoznany szpiczakiem w zależności od nasilenia włóknienia stwierdzanego w szpiku. Jednakże mediana całkowitego przeżycia została osiągnięta tylko wśród chorych z najbardziej nasilonym włóknieniem (w stopniu MF2) i wynosiła 59,4 miesięcy. Podobnie w tej grupie czas wolny od progresji był znamienie krótszy (8,9 miesięcy) w porównaniu z pacjentami, u których włóknienie nie występowało (19,1 miesięcy) lub było niewielkiego stopnia (MF1) (18 miesięcy).

Dotychczas większość badań określających fenotyp komórek nowotworowych oparty jest na danych pochodzących z cytometrii przepływowej, stanowiącej podstawową i integralną część procesu diagnostycznego schorzeń hematologicznych, w tym szpiczaka plazmocytowego. Pomimo, iż FC jest stosowana od lat, dopiero w ostatnich latach zyskała rekomendacje do rutynowego stosowania w MM. Badania własne nie uwzględniają oceny cytometrycznej szpiku z uwagi na wprowadzenie jej do standardowej diagnostyki szpiczaka dopiero w 2015 roku. Wieloparametrowa FC pozwala na określenie liczby i charakteru komórek nowotworowych raczej poprzez wyznaczenie aberrantnego fenotypu komórek szpiczakowych niż restrykcji łańcucha lekkiego immunoglobulin. Cechy fenotypowe komórek szpiczakowych różnią się w zależności od diagnozy, stopnia zaawansowania

choroby, ale także stosowanych terapii. Do najczęściej używanych markerów powierzchniowych pozwalających różnicować komórki zdrowe od nowotworowych plazmacytów zaliczono: CD138, CD38, CD45, CD56, CD19, cytoplazmatyczne łańcuchy lekkie immunoglobulin kappa i lambda. Wśród markerów używanych do określenia aberrantnego fenotypu, mających znaczenie w różnicowaniu komórek nowotworowych wymienia się CD20, CD117, CD27, CD28, CD81, CD200. U pacjentów poddawanych terapiom anty CD38 i CD138, w celu oznaczenia plazmacytów, badane jest zastosowanie dodatkowych markerów takich jak: CD54, CD229, CD319 i VS38c. Niestety, panele diagnostyczne wciąż różnią się pomiędzy ośrodkami, a dodatkowo heterogenność ekspresji antygenów utrudnia standaryzację tej metody w rutynowym użyciu. Nowotworowe komórki plazmatyczne w FC mają monotypową ekspresję immunoglobulin cytoplazmatycznych i zazwyczaj brak Ig powierzchniowych. Typowo posiadają ekspresję CD38 i CD138 o sygnale jaśniejszym niż normalne plazmocyty. Ekspresja CD45 oraz CD19 na komórkach szpiczaka jest w przeciwieństwie do normalnych plazmacytów ujemna (brak CD45 i CD19 stwierdza się odpowiednio u 80% i 96% chorych na MM). Z podobną częstością nie wykrywa się obecności CD27 i CD81 lub ekspresja tych antygenów jest niewysoka. W 90% przypadków na komórkach szpiczakowych pojawia się zróżnicowana ekspresja antygenów nieobecnych na normalnych plazmacytach. Należą do nich CD56 (60-80% przypadków), CD200 (60-75%), CD28 (około 40%), CD117 (20-35%), CD20 (10-20%), CD52 (8-14%), CD10 oraz antygeny mieloidalne i monocytarne (występują rzadko) [55]. W literaturze dyskutuje się rokownicze znaczenie wybranych antygenów komórkowych, ale także specyficznych wzorów ekspresji antygenów na nowotworowych plazmacytach. Przykładowo, pacjenci z ekspresją: CD19, CD28, CD200 i brakiem ekspresji CD45 i CD117 oraz chorzy z obniżoną ekspresją CD27 charakteryzowali się gorszym rokowaniem i krótszym czasem całkowitego przeżycia [80-82]. Jednakże analizy wielowariantowe nie wykazały niezależnego znaczenia rokowniczego dla żadnego z wymienionych markerów.

Niewątpliwym atutem FC jest możliwość analizy dużej liczby komórek i szansa wykrycia nawet pojedynczej komórki nowotworowej wśród 10 000 prawidłowych. Dlatego cytometria jest dobrym narzędziem do wykrywania małej populacji komórek nowotworowych oraz monitorowania choroby resztkowej (ang. Minimal Residual Disease /MRD/) [74]. Udowodniono, iż uzyskanie całkowitej remisji (w badaniu immunofenotypowym) przewiduje wydłużone przeżycie w grupie młodszych chorych poddawanych intensywnej terapii oraz w grupie osób starszych leczonych „nowymi terapiami”. Słabymi punktami rutynowego użycia FC w monitorowaniu MRD jest brak jej standaryzacji oraz potrzeba wysoko wyspecjalizowanego personelu wykonującego badanie [83]. W pracy analizującej ocenę

choroby resztkowej w ponad 30 amerykańskich ośrodkach stwierdzono, iż cechy charakteryzujące atypowe, nowotworowe plazmocyty różniły się w zależności od instytucji, a czułość metody do oceny MRD była w zakresie od 0,0005% do 0,02%. W celu identyfikacji charakteru plazmocytów opisywano zastosowanie wielu markerów powierzchniowych, a ustalenie jednego panelu przeciwciał trwało wiele lat. Dopiero w 2016 roku IMWG opublikowało metody oceny MRD oraz określiło rolę jej monitorowania w rokowaniu i terapii chorych na MM. Prace opublikowane m.in. przez Rawstron i San Miguel wskazują na negatywne znaczenie dodatniej choroby resztkowej w szpiku chorych poddanych autotransplantacji komórek krwiotwórczych. Brak MRD w 100 dobie po transplantacji korelował z dłuższym PFS i OS oraz był równie istotny, jak fakt uzyskania konwencjonalnej remisji całkowitej. Podobnie Hiszpańska Grupa Szpiczakowa potwierdziła, że MRD jest jednym z najważniejszych czynników przewidujących rezultaty terapii z zastosowaniem autotransplantacji. Najlepszym predyktorem nawrotu choroby, po uzyskaniu remisji w 100 dobie po autoSCT, była dodatnia choroba resztkowa w 4 parametrowej cytometrii przepływowej oraz wyjściowa obecność zmian cytogenetycznych złego rokowania w badaniu FISH [84, 85]. Potwierdza to ścisły związek biologii choroby i głębokości odpowiedzi na leczenie w przewidywaniu długoterminowych rezultatów oraz identyfikacji chorych narażonych na szybką wznowę i krótsze przeżycie. Podnosi się również fakt, że ujemna MRD w szpiku może znamienne wpływać na poprawę PFS w grupie nowo zdiagnozowanych chorych poddanych transplantacji, niezależnie od zmian cytogenetycznych lub uzyskania całkowitej odpowiedzi. Ponadto potwierdzono, że wczesna wznowa po uzyskaniu CR w tej grupie chorych wiąże się z bardzo złym rokowaniem [8]. Stąd istnieje potrzeba zastosowania zaawansowanych technik, pozwalających na monitorowanie MRD, jako miernika głębokości odpowiedzi na terapię.

Znaczenie oceny histologicznej znamienne wzrasta w momencie zastosowania barwień immunohistochemicznych. Rozszerzone barwienie IHC jest szczególnie przydatne w rozróżnieniu słabo zróżnicowanego szpiczaka od chłoniaka lub przerzutów nowotworowych guzów litych do szpiku, w których może być również obecna ekspresja CD138. Ekspresja tego markera w nisko zróżnicowanych nowotworach powinna być rozszerzona o równoczesną ocenę barwień na obecność łańcuchów lekkich kappa i lambda oraz innych specyficznych antygenów komórek plazmatycznych. [4].

Dotychczas powstało wiele analiz dotyczących poszczególnych markerów IHC na komórkach szpiczakowych. Jednak niewiele prac dostępnych w literaturze prezentuje tak szeroki, jak w badaniach własnych, panel oznaczeń immunohistochemicznych na materiale

pobranym podczas trepanobiopsji u chorych na szpiczaka plazmocytoowego. W celu wykazania aberrantnego fenotypu plazmocytoów oraz poszukiwania czynników prognostycznych wykonano oznaczenia na obecność CD138, CD56, CD20, p53, CD117, cykliny D1, łańcuchów lekkich kappa i lambda, które omówiono we wstępie niniejszej pracy. Obecność danego markera stwierdzano na podstawie progowego odsetka komórek z dodatnią ekspresją danego markera wg danych z literatury [27, 31, 38, 44, 51]. Na podstawie analizy badanej populacji wyznaczono dodatkowe progi procentowe dla poszczególnych antygenów będące średnimi odsetkami procentowymi (Tabela 11). W pracy określono częstość ekspresji poszczególnych antygenów oraz różnych zestawień antygenowych w dwóch grupach chorych: w momencie diagnozy oraz nawrotu/progresji. Częstość ekspresji poszczególnych antygenów na plazmocytach nie odbiegała od raportowanych w literaturze w obu grupach chorych [55]. Niezależnie od etapu choroby, w którym wykonano zabieg trepanobiopsji, biopaty szpiku nie różniły się znamiennie w zakresie ekspresji poszczególnych markerów immunohistochemicznych. Poza niezaprzeczalną wartością diagnostyczną aberrantnego fenotypu plazmocytoów dyskutuje się szeroko w literaturze rolę prognostyczną poszczególnych antygenów na powierzchni komórek. W badaniach własnych, na podstawie trepanobiopciatów szpiku w grupie chorych w momencie diagnozy MM, przeprowadzono analizę znaczenia rokowniczego poszczególnych markerów IHC w odniesieniu do uznanych czynników prognostycznych (omówionych we wstępie). W badanej grupie potwierdzono, że czynnikami niekorzystnie wpływającymi na czas całkowitego przeżycia są: stężenie albuminy $<35\text{g/l}$, β -2-mikroglobuliny $>3,0\text{ mg/l}$, kreatyniny $>115\text{ }\mu\text{mol/l}$, trzeci stopień zaawansowania wg Durie-Salmon, ISS i R-ISS, a także brak odpowiedzi na pierwszą linię leczenia są. Ponadto czynnikami wpływającymi znamiennie na skrócenie czasu wolnego od progresji choroby były: obecność t(4;14), trzeci stopień wg ISS, R-ISS oraz brak odpowiedzi na pierwszą linię leczenia.

W badaniach własnych ekspresję CD56 $\geq 50\%$ komórek posiadało 25% chorych z nowo rozpoznanym MM oraz 26,5% chorych w momencie progresji. Dane te różnią się od dostępnych w literaturze, gdzie częstość ekspresji tego antygeny określa się na 60-80% [25, 86]. Różnica ta wynika prawdopodobnie z przyjętego wysokiego progu (50% komórek CD56+) dla wyniku dodatniego (w przypadku progu $\geq 10\%$ komórek, przyjmowanego w niektórych doniesieniach, obecność CD56 stwierdzano u 52% badanych). Większość dostępnych publikacji dotyczących znaczenia tego markera opiera się na badaniach cytometrycznych, a nie immunohistochemicznych. Wykazują one, że chorzy z brakiem ekspresji CD56 w FC częściej mieli lokalizacje pozaszpikową, podwyższone białko Bence'a-

Jonesa, niewydolność nerek oraz agresywniejszy przebieg choroby, a w konsekwencji krótszy OS w porównaniu z grupą CD56 pozytywną [87]. Z kolei badanie wykonane metodami immunohistochemicznymi na skrawkach parafinowych nie wykazało znaczenia prognostycznego, pomimo podobnej częstości występowania tego antygenu, jak w cytometrii przepływowej [88].

Istnieją sprzeczne dane dotyczące związku ekspresji tego markera z genetycznymi czynnikami rokowniczymi jak t(11;14) i t(4;14) [27, 86]. Badacze podają, że równoczesny brak ekspresji CD56 oraz CD117 wiązał się z krótszym OS [89]. W pracy własnej stwierdzono związek występowania wysokiej ekspresji CD56 ($\geq 50\%$) z częstszą obecnością niekorzystnie rokującej t(4;14), jednak obecność antygenu CD56 nie była czynnikiem wpływającym na OS i PFS. Nie potwierdzono również, aby chorzy CD56– i CD117– charakteryzowali się krótszym przeżyciem. Stwierdzono natomiast, że parametrem pozytywnie wpływającym na długość całkowitego przeżycia oraz czasu wolnego od progresji była obecność rozrostu plazmacytów o fenotypie CD56– kappa+.

Obecność antygenu c-KIT (CD117) opisuje się w 20-35% przypadków szpiczaka plazmacytowego, co potwierdzają badania własne (obecny u 28,6% chorych z nowo zdiagnozowanym szpiczakiem oraz u 23,5% u chorych z nawrotem/progresją choroby). Bataille i wsp. w 2008 roku opisali ekspresję CD117 u 30% (36/122) chorych z MGUS oraz u 27% (169/617) chorych z MM. Obecność CD117 u pacjentów z MGUS była znacząco wyższa w porównaniu z obecnością tego antygenu u chorych ze szpiczakiem. Autorzy zwracają uwagę, że obecność CD117 może być jednym z markerów mających wpływ na progresję MGUS w objawowego MM. Wykazali oni bowiem, że utrata CD117 na komórkach wiązała się z progresją choroby [90]. Opisano również lepsze rokowanie wśród pacjentów ze zwiększoną ekspresją antygenu CD117 [86]. Sugeruje się, że ekspresja CD117 na monoklonalnych plazmacytach zmienia ich docelowe miejsce w szpiku kostnym i może nakierowywać je do nisz prekursorowych neutrofili, gdzie CD117 działa jako cząsteczka kotwicząca. Taka redystrybucja monoklonalnych komórek plazmatycznych w szpiku kostnym może przyczynić się do większego utrzymywania homeostatycznej roli resztkowych, prawidłowych plazmacytów i bardziej ograniczonego ich rozprzestrzeniania się w gammapatiach monoklonalnych CD117(+) [91].

W badaniach własnych nie obserwowano różnic pomiędzy grupą CD117+ a CD117– w zakresie parametrów klinicznych i laboratoryjnych, takich jak: typ białka M, stężenie albumin, $\beta 2M$, aktywność LDH, stopień zaawansowania choroby, odpowiedź na leczenie pierwszoliniowe oraz PFS i OS, co było opisywane już przez Kraj i wsp. [92]. Inne

analizy dotyczące chorych z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytowym wykazały statystycznie gorsze rokowanie oraz krótszy OS w grupie bez ekspresji zarówno CD56 oraz CD117. Niska ekspresja obu antygenów może prowadzić do rozprzestrzeniania komórek plazmatycznych, progresji choroby, większego zaawansowania klinicznego, a w konsekwencji niekorzystnego rokowania. Ponadto autorzy opisują związek pomiędzy zaburzeniami cytogenetycznymi wysokiego ryzyka a brakiem ekspresji CD117 na plazmocytach [89, 93]. Powyższych obserwacji nie potwierdzono w badaniach własnych. Wykazano natomiast, że obecność rozrostu plazmocyto $\bar{w}$ CD117 $\bar{+}$ kappa $\bar{+}$ było czynnikiem korzystnie wpływającym na OS oraz PFS w grupie chorych z nowo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytowym. Ponadto w przypadkach chorych z rozrostem CD117 $\bar{+}$ lambda $\bar{+}$ rokowanie, dotyczące czasu przeżycia wolnego od progresji choroby, było znamienne gorsze, ale nie wpływało na całkowite przeżycie.

Ekspresję antygenu CD20 opisuje się u około 20-30% chorych na szpiczaka plazmocyto $\bar{w}$ ego [11, 25, 31, 94]. W badaniach własnych, za pomocą immunohistochemii, stwierdzono obecność CD20 w $\geq 10\%$ komórek u 26,8% chorych z grupy z nowo rozpoznanym szpiczakiem oraz u 20,6% chorych w momencie nawrotu/progresji choroby.

Znaczenie CD20 u chorych na szpiczaka nie jest do końca poznane, a dane literaturowe świadczą o znacznej heterogenności tej grupy. W niniejszej pracy zaobserwowano, że u chorych z podwyższoną ekspresją CD20 ($\geq 20\%$ komórek) statystycznie częściej występował rozlany naciek nowotworowy (66,7%) oraz włóknienie szpiku (88,9%), które uznane są za niekorzystnie rokujące cechy histologiczne. Co ciekawe, wszyscy chorzy z wysoką ekspresją CD20 (w $\geq 20\%$ komórek) mieli prawidłowe stężenie albuminy w surowicy. W analizie przeżycia nie było różnicy w odniesieniu do OS oraz PFS pomiędzy grupą chorych CD20 $\bar{+}$ i CD20 $\bar{-}$ w badanej populacji. Robillard i wsp. opisali występowanie antygenu CD20 w 12/66 przypadków pacjentów z MM. Wykazali oni również, że w 83% (10/12 przypadków) ekspresja CD20 wiązała się z współwystępowaniem t(11;14), która jest uznana za korzystny lub neutralny czynnik rokowniczy. Ponadto pacjenci CD20 $\bar{+}$, w porównaniu z CD20 $\bar{-}$, częściej posiadali komórki o morfologii małych, dojrzałych plazmocyto $\bar{w}$ (58% vs 7%), których obecność jest cechą świadczącą o niskim stopniu złośliwości [11]. W analizie własnej wśród 22 chorych CD20 $\bar{+}$ w $\geq 10\%$ komórek, oznaczenie FISH w kierunku t(11;14) wykonano u 11 z nich (50%). Obecność t(11;14) stwierdzono u 27,7% chorych (3/11). Ekspresja CD20, w tych przypadkach, była obecna w $\geq 30\%$ komórek. Quinn i wsp wykazali, że chorzy na szpiczaka CD20 $\bar{+}$ stanowią heterogenną grupę. Wyróżnili w niej populację ze współistniejącą ekspresją cykliny D2, która charakteryzowała

się agresywniejszym przebiegiem, pozostającym jednak bez wpływu na OS. Autorzy zaobserwowali także, że komórki szpiczakowe CD20+ występowały najczęściej 63% w postaci rozlanego nacieku [95]. Zależność tą potwierdzono w badaniach własnych. Zwiększona obecność antygenu CD20 wraz z brakiem ekspresji CD56 jest częściej obserwowana na plazmocytach w białaczce plazmatycznokomórkowej, której rokowanie jest szczególnie niekorzystne [96]. W pracy własnej rozpoznanie białaczki plazmatycznokomórkowej stanowiło kryterium wyłączenia, dlatego przeprowadzenie takiej analizy było niemożliwe.

Antygen CD20 jest potencjalnym celem terapeutycznym, a przeciwciała monoklonalne anti-CD20 są stosowane w terapii chłoniaków od lat. Dlatego temat obecności CD20 na komórkach szpiczaka jest dyskutowany w wielu pracach. Jednak dotychczasowe dane literaturowe dotyczące immunoterapii anti-CD20 wskazują na jej ograniczoną skuteczność u chorych na szpiczaka plazmocytozy. Istnieje kilka teorii tłumaczących słaby efekt terapeutyczny (polimorfizm w receptorze FGFR3, nieadekwatne dawkowanie, zaburzona aktywność cytotoksyczna zależna od przeciwciał oraz od komplementu), a za najbardziej prawdopodobny przyjmuje się heterogenność oraz stosunkowo niską ekspresję antygenu CD20 na powierzchni komórek szpiczakowych. [30, 33]. Próbowano stosować rituximab jako leczenie podtrzymujące po autotransplantacji, jednak liczba pacjentów była zbyt niska, żeby wyciągnąć ostateczne wnioski. Dodatkowo zastosowanie tego leczenia wiązało się z nieoczekiwanym wysokim odsetkiem wczesnych nawrotów [97]. Istnieją jednak prace mówiące o znaczącej skuteczności rituximabu, jeśli był stosowany w połączeniu ze standardową chemioterapią [98]. W niniejszej pracy trzech chorych z wysoką ekspresją CD20 było leczonych za pomocą rituximabu, uzyskując dobrą, jednakże krótkotrwałą odpowiedź. Ponadto zaobserwowano, że chorzy z wysoką ekspresją CD20 nie uzyskiwali odpowiedzi na leczenie indukujące za pomocą bortezomibu (u 75% tych pacjentów stwierdzono progresję choroby po leczeniu pierwszej linii). Podobną zależność opisali już Kong i wsp. [99].

Translokacje dotyczące *IGH* na chromosomie 14 oraz hiperdiploidia są wczesnymi zdarzeniami w patogenezie nowotworów z komórek plazmatycznych i wiążą się ze zwiększoną ekspresją jednego z genów kodujących cyklinę D (*CCND1* na chromosomie 11q133, *CCND2* na 12p13 oraz *CCND3* 6p21). Na podstawie rodzaju translokacji oraz ekspresji cykliny D powstała klasyfikacja nowotworów z komórek plazmatycznych wyróżniająca grupy mające pewne wspólne cechy charakterystyczne oraz wymagające różnego podejścia terapeutycznego. Najczęściej występującą translokacją w tej populacji jest t(11;14), obecna u 15-20%, której obecność przyczynia się do nadekspresji cykliny D1.

Chorzy posiadający tę aberrację cytogenetyczną należą do grupy standardowego ryzyka wg mSMART i Rajkumara [63, 64]. Cyklinę D1 w ocenie immunohistochemicznej dotychczas opisywano u 17-50% chorych na szpiczaka plazmocytozy, a jej obecność wiązała się z korzystnym rokowaniem [100]. Różnice w opisywanym odsetku ekspresji cykliny D1 przez różnych autorów mogą wynikać z czasu wykonywanej analizy (w momencie diagnozy lub progresji/nawrotu choroby), wartości procentowego punktu odcięcia dla wyniku dodatniego, a także czułości używanych technik histologicznych. W pracy własnej ekspresję cykliny D1 w $\geq 10\%$ komórek stwierdzono u 66,1% w grupie z nowo rozpoznany szpiczakiem oraz u 70,6% w momencie progresji. Odsetki te są nieco wyższe niż w cytowanej wcześniej literaturze, jednak korespondują z badaniem Padhi i wsp. [43].

Część przeprowadzonych dotychczas badań wykazała związek ekspresji cykliny D1 z czynnikami złego rokowania (zaawansowany stopień kliniczny, histologiczny, zwiększona aktywność proliferacyjna, upośledzona funkcja nerek, podwyższone stężenie β -2-mikroglobuliny) [42, 101, 102]. Przeciwnie, inne opublikowane prace ujawniały jej bardziej korzystny wpływ na przebieg choroby, dłuższe okresy remisji oraz całkowitego przeżycia [44, 103]. Przeprowadzona przez Soverini i wsp. analiza 74 nowo zdiagnozowanych chorych wykazała, iż w grupie z t(11; 14) oraz trisomią chromosomu 11, statystycznie częściej występowała nadekspresja cykliny D1. Chorzy ci mieli dłuższe okresy remisji choroby (41 vs 26 miesięcy) oraz przeżycie wolne od zdarzeń (EFS) (33 vs 24 miesiące) [103]. W ocenianej populacji własnej nie wykazano związku ekspresji cykliny D1 z czynnikami kliniczno-patologicznymi oraz jej wpływu na OS i PFS. Podobne obserwacje raportowali inni autorzy [51]. Analizując zaburzenia cytogenetyczne zaobserwowano, że u wszystkich pacjentów z obecnością t(4;14) nie występowała ekspresja cykliny D1 w szpiku, w przeciwieństwie do chorych z t(11;14), u których w 100% była ona wysoka ($\geq 40\%$ komórek). Ocena ta jest jednak niepełna z uwagi na retrospektywny charakter pracy (t(11;14) metodą FISH została oceniona tylko u 49% chorych).

Nie wszystkie doniesienia dotyczące neutralnego lub korzystnego znaczenia prognostycznego cykliny D1 w nowotworach są jednak zgodne. Inni autorzy wykazali, że jej obecność może zmniejszać ekspresję APO-1 (CD95), prowadząc do zwiększonej oporności komórki na chemioterapeutyki, może też chronić ją przed apoptozą, a tym samym wpływać na krótszy OS oraz większą częstość przerzutów nowotworowych [104, 105]. Dlatego zasadne jest prowadzenie dalszych badań, które pozwolą na określenie znaczenia cykliny D1 u chorych na szpiczaka.

W analizowanej populacji pacjentów ekspresję białka p53 w szpiku stwierdzono u 5 chorych w momencie diagnozy (8,9%) oraz u 4 (11,8%) w momencie progresji choroby.

W obu podgrupach tylko po 2 osoby posiadały ekspresję p53 w $\geq 10\%$ komórek. Dane te są zgodne z dotychczas raportowanymi w literaturze [51, 106]. Z kolei Sheth i wsp. podaje, że w przypadkach lokalizacji choroby poza szpikiem kostnym ekspresja białka p53 jest znacznie wyższa (75% vs 8%) [107].

Akumulacja białka p53 jest wynikiem delekcji lub mutacji zachodzących w genie *TP53*, dlatego w celu określenia znaczenia tego markera histologicznego badano korelację z wynikami uzyskiwanymi za pomocą badań genetycznych. Podaje się, że ekspresja p53 w komórkach szpiku u chorych na inne nowotwory hematologiczne, w porównaniu z analizą molekularną mutacji genu *TP53*, wykazuje 96% zbieżność [108]. Podobnie wysoką zależność uzyskano porównując jądrową ekspresję białka p53 z częstością hemizygotycznej *del(17p)* (wykrywanej za pomocą metody FISH) w analizie 105 chorych z nowo rozpoznanym szpiczakiem. W pracy tej 77% chorych z *del(17p)* posiadało również ekspresję jądrową p53, a 83% przypadków z immunoreaktywnym białkiem p53 miało stwierdzoną hemizygotyczną *del(17p)*. Ponadto wykazano, że chorzy z wykrywalnym za pomocą badań IHC białkiem p53 mieli znacznie krótsze OS w porównaniu z grupą kontrolną. Dlatego autorzy twierdzą, że oznaczenie immunohistochemiczne białka p53 można uznać za czułe narzędzie diagnostyczne w wykrywaniu mutacji genu *TP53* oraz jako marker prognostyczny w szpiczaku plazmocytowym [49]. W pracy dotyczącej roli mutacji *TP53* w patogenezie przewlekłej białaczki limfocytowej autorzy podkreślają, że poza mutacjami w samym genie, istnieją alternatywne mechanizmy powodujące nadekspresję białka p53 (zmienność MDM2, mutacje *ATM*, hipermetylacja promotora genu *TP53*, polimorfizm rodziny promotorów *BCL-2*), dające fałszywie pozytywne wyniki. Dodatkowo nie każda mutacja w genie *TP53* powoduje produkcję zmienionego białka p53, a przeciwciała stosowane w immunohistochemii mogą wykryć jedynie niektóre jego izoformy [109]. W badaniach własnych zaobserwowano, że wśród chorych z obecnością białka p53 w IHC tylko u 33,3% stwierdzono *del(17p)* w badaniu FISH, a u 14,3% chorych z *del(17p)* występowała ekspresja białka p53.

Z danych dostępnych w literaturze wynika, że obecność delekcji genu *TP53* i ekspresji białka p53 wiąże się jednoznacznie z krótszym czasem przeżycia oraz agresywniejszym przebiegiem choroby [46-49]. Podobnie Neri i wsp. już w 1999 roku wykazali związek obecność mutacji *TP53* z bardziej złośliwymi postaciami szpiczaka oraz gorszym rokowaniem [110]. Częstsze występowanie *del(17p)* stwierdzono u chorych na szpiczaka z chorobą zlokalizowaną pozaszpikowo, zajęciem centralnego układu nerwowego oraz białaczką plazmatycznokomórkową, u których rokowanie jest szczególnie niekorzystne [111-113]. Wykazanie ekspresji białka p53 wiązało się ze skróceniem OS i PFS u chorych z nowo rozpoznanym MM leczonych schematami chemioterapii zawierającymi talidomid oraz u

chorych z opornym i nawrotowym MM, u których stosowano lenalidomid [106]. Dawson i wsp. opisali ekspresję p53, jako jeden z czynników negatywnie rokujących odpowiedź na leczenie bortezomibem u chorych z oporną i nawrotową chorobą, niemającym jednak wpływu na OS w tej grupie [114]. Analiza przeżycia w pracy własnej wykazała, że chorzy z nowo rozpoznaną chorobą i białkiem p53 w $\geq 10\%$ komórek mieli krótszy OS, niż pozostali chorzy (mediana OS 7 miesięcy vs nieosiągnięta). Podobną zależność zaobserwowano w tej grupie dla PFS, które było znacząco krótsze (mediana PFS 3,4 vs 18 miesięcy). Jednak z uwagi na zbyt małą liczbę chorych z ekspresją p53 wyniki te nie osiągnęły znamienności statystycznej.

W pracy własnej wykazano, że u chorych z nadekspresją białka p53 znamienne częściej obserwowano włóknienie w szpiku (80% vs 37,2% bez ekspresji p53). Nie znaleziono w literaturze danych dotyczących analizy związku włóknienia szpiku z ekspresją p53 u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym. Zależność tą badano jednak w grupie chorych na zespół mielodysplastyczny z towarzyszącym włóknieniem szpiku, gdzie nadekspresja p53 była niezależnym, negatywnie rokującym czynnikiem [115]

Monoklonalne łańcuchy lekkie immunoglobulin, wykrywane za pomocą barwień immunohistochemicznych, są obecne w cytoplazmie komórek szpiczakowych w około 85% przypadków. W około 15% nie można stwierdzić obecności żadnego z łańcuchów, co sugeruje, że immunoglobuliny nie są produkowane (szpiczak nieprodukujący). Zastosowanie metody immunoperoksydazowej w diagnostyce histopatologicznej szpiku w kierunku gammapatii monoklonalnych umożliwiło różnicowanie chorób z grupy dyskrazji plazmocytowych. W normalnym szpiku oraz w reaktywnych odczynach plazmocytowych widoczny jest wzór poliklonalnych kappa i lambda plazmocytów, z niewielką przewagą łańcucha kappa. W przypadku szpiczaka, plazmocyty posiadają monoklonalny wzór ekspresji, co wyróżnia go od pozostałych jednostek z grupy dyskrazji. Oznaczony tą techniką łańcuch lekki immunoglobulin korelował z rodzajem LC obecnego w surowicy pacjentów, a co więcej, stosunek LC kappa/lambda korelował z rozpoznaniem klinicznym. Nie wykazano związku pomiędzy stężeniem białka monoklonalnego w surowicy oraz liczby plazmocytów w szpiku kostnym, a stosunkiem łańcuchów lekkich. Najwyższy stosunek LC był obecny w szpiczaku plazmocytowym i różnił się znamienne od chorych z MGUS. Wysoki stosunek łańcuchów lekkich pozwala na różnicowanie chorych z MM, MGUS, uszkodzeniem narządowym wtórnym do gammapatii monoklonalnej w przebiegu makroglobulinemii, amyloidozy czy wtórnej do gammapatii niewydolności nerek [116].

Praca Shustik i wsp., analizująca 94 pacjentów z chorobą łańcucha lekkiego (LCD), wykazała znamienne krótsze przeżycie w grupie chorych z łańcuchem lekkim lambda

(mediana OS odpowiednio dla chorych lambda i kappa wynosiła 10 i 30 miesięcy). Niższy odsetek pacjentów z chorobą kappa-LCD (15,7%), niż pacjentów z lambda-LCD (42,2%) zmarł w ciągu pierwszych 6 miesięcy od rozpoznania. Jednak autorzy nie obserwowali, żeby krótsze przeżycie pacjentów z lambda-LCD wynikało ze zwiększonej częstości występowania innych uznanych czynników rokowniczych (np. niedokrwistość, hiperkalcemia, azotemia, hipoalbuminemia, nasilenie zmian osteolitycznych lub białkomocz), częstości występowania amyloidozy, klinicznego zaawansowania choroby w momencie rozpoznania lub odpowiedzi na leczenie [117]. Późniejsze badania potwierdziły, że obecność rozrostu z łańcuchem lekkim lambda jest niezależnym, negatywnie rokującym czynnikiem w szpiczaku plazmocytowym [2]. Udowodniono, że zaburzony stosunek łańcuchów lekkich w surowicy jest niezależnym czynnikiem ryzyka progresji SMM do pełnoobjawowego szpiczaka oraz negatywnym czynnikiem prognostycznym dla chorych z nowo zdiagnozowanym MM [118, 119]. Stwierdzenie ekspresji łańcucha lambda wiązało się z predyspozycją do pozaszpikowej lokalizacji choroby oraz gwałtownie postępującą niewydolnością nerek [120, 121]. Niewydolność nerek była również częstsza w grupie chorych ze szpiczakiem plazmocytowym lambda, u których stwierdzano szpikowe depozyty amyloidu [122]. Opisano, że u chorych ze szpiczakiem IgD (ok. 2% przypadków) współwystępuje łańcuch lekki lambda u 82%. Na podstawie wzoru elektroforezy białek zauważono podobieństwo szpiczaka plazmocyтового IgD oraz lambda-LCD. Rokowanie w obu ww. grupach jest niekorzystne [123].

Większość dostępnej literatury na temat znaczenia rodzaju łańcuchów lekkich w szpiczaku plazmocytowym opiera się na analizie immunofiksacji białek surowicy. Przeprowadzona analiza własna 56 chorych z nowo rozpoznany MM, opierająca się na ocenie immunohistochemicznej ekspresji łańcucha lekkiego, wykazała korelację rozrostu lambda z częstszym występowaniem podwyższonego stężenia β -2-mikroglobuliny, a także większym zaawansowaniem choroby w momencie rozpoznania wg klasyfikacji ISS. W porównaniu z chorymi z rozrostem kappa pacjenci z rozrostem lambda rzadziej uzyskiwali odpowiedź na leczenie pierwszej linii, a nawrót choroby występował u nich znamienne częściej. Przeprowadzona analiza krzywych Kaplan-Meier wykazała, że posiadanie rozrostu plazmocytwów lambda było czynnikiem negatywnie wpływającym na OS i PFS. Dodatkowo korelacja pozostałych antygenów plazmocytowych, których znaczenie omówiono wcześniej, z rodzajem łańcucha lekkiego pozwoliła na wyszczególnienie kolejnych czynników rokowniczych. W przypadku współwystępowania rozrostu CD117– kappa+ oraz CD56– kappa+ ryzyko progresji oraz zgonu było mniejsze, niż w przypadku chorych z pozostałymi układami ekspresji tych antygenów. Natomiast krótszy czas do progresji choroby (mediana PFS 8 vs 27,8 miesięcy) stwierdzano w grupie CD117– lambda+ oraz CD56– lambda+.

Pomimo wielu prac dotyczących znaczenia rokowniczego poszczególnych antygenów w szpiczaku plazmocytowym, według dostępnej wiedzy, znaczenie zaprezentowanych koekspresji antygenowych nie było dotychczas raportowane w piśmiennictwie.

Zarówno w literaturze jak i w badaniach własnych wykazano, że uzyskanie odpowiedzi na pierwszą linię leczenia jest korzystnym czynnikiem rokowniczym, w odniesieniu do czasu całkowitego przeżycia. Harousseau i wsp. opisali, że uzyskanie VGPR przed i po autotransplantacji szpiku wpływało pozytywnie na PFS i OS, w grupie chorych wysokiego ryzyka, leczonych w pierwszej linii za pomocą bortezomibu [124]. W badaniach własnych w grupie chorych z nowo rozpoznanym szpiczakiem ORR wyniósł 69,1%. W analizowanej grupie 30,4% badanych otrzymało w pierwszej linii schemat oparty na bortezomibie, który jest aktualnie lekiem rekomendowanym dla wszystkich chorych niezależnie czy kwalifikują się do autotransplantacji. Stosunkowo niski odsetek pacjentów leczonych B wynika z faktu, że lek ten jest w Polsce refundowany w katalogu chemioterapii dopiero od roku 2015, a grupa obejmowała pacjentów z lat 2008-2016.

Spośród analizowanych parametrów histologicznych i immunohistochemicznych zaobserwowano, że ORR znamienne różnił się w zależności od rodzaju łańcucha lekkiego na plazmocytach, w grupie chorych leczonych na bazie leków immunomodulujących. Pacjenci z rozrostem lambda mieli w tej populacji znamienne niższy odsetek odpowiedzi w porównaniu z chorymi z rozrostem kappa. Już w 1979 roku Cornell i wsp. opublikowali pracę mówiącą o różnicy w odpowiedzi na leczenie protokołami opartymi na melfalanie, prednizonie, carmustynie i testosteronie 68 chorych, w zależności od typu białka Bence'a-Jonesa w moczu. Wykazali oni, że odsetek dobrych odpowiedzi na leczenie w grupie wydzielającej w moczu białko kappa wynosił 43%, w porównaniu z 13% z białkiem typu lambda. Podobnie całkowite przeżycie chorych w grupie wydzielającej białko kappa było znamienne dłuższe (mediana OS wynosiła 31 vs 12 miesięcy) [125]. Wprowadzenie talidomidu zdecydowanie poprawiło przeżycie chorych na szpiczaka plazmocytoowego. W 2011 roku opublikowano metaanalizę na 1685 starszych, nieleczonych dotychczas chorych, porównując skuteczność schematu MP z MPT. Wykazała ona przedłużenie PFS, OS o 6,6 miesięcy oraz lepszy odsetek odpowiedzi w przypadku dołączenia talidomidu [126]. Morgan i wsp. w badaniu MRC Myeloma IX wykazali, że zastosowanie leczenia indukującego z talidomidem w schemacie CTD skutkowało wyższym odsetkiem odpowiedzi [127]. Wyższy ORR na leczenie talidomidem wiązał się między innymi z występowaniem łańcucha lekkiego kappa, co również potwierdzają badania własne [128]. Analiza współwystępowania różnych antygenów na plazmocytach wykazała, że chorzy ze

stwierdzonym rozrostem plazmocyto λ CD117 $^-$ λ oraz CD56 $^-$ λ charakteryzowali się najniższym odsetkiem odpowiedzi na leczenie lekami immunomodulującymi, w porównaniu z pacjentami posiadającymi pozostałe układy tych antygenów. Wcześniej raportowano niższe ORR oraz gorsze rokowanie u chorych bez ekspresji CD56 i CD117, jednakże nie badano znaczenia w połączeniu z rodzajem łańcucha lekkiego [89, 93]. W niniejszej pracy zaobserwowano, że zmiany cytogenetyczne wysokiego ryzyka również wiążą się z niższym odsetkiem odpowiedzi na leczenie pierwszoliniowe. Chorzy z t(4;14) leczeni na bazie leków immunomodulujących w analizowanej grupie mieli niższy ORR, niż chorzy bez tej aberracji. Różnic w odpowiedzi na leczenie, w zależności od wspomnianych parametrów, nie obserwowano w grupie chorych leczonych bortezomibem, którego wprowadzenie do terapii szpiczaka plazmocyto λ znamienne wpłynęło na rokowanie chorych, zwłaszcza tych o wysokim ryzyku cytogenetycznym. Wykazano, że zastosowanie tego leku poprawiło rokowanie w grupie chorych z t(4;14) [129, 130]. W badaniu własnym nie obserwowano różnic w odsetku odpowiedzi na leczenie bortezomibem w zależności od niekorzystnego profilu cytogenetycznego oraz rodzaju łańcucha lekkiego. Zdecydowana większość chorych w tej grupie była leczona za pomocą, rekomendowanego aktualnie, trójkowego schematu VTD (bortezomib/talidomid/deksametazon). Wykazano wyższość zastosowania schematu VTD nad TD (talidomid/deksametazon) lub VBMCP/VBAD/B (winkrystyna, BCNU, melfalan, cyklofosfamid, prednizon/winkrystyna, BCNU, doxorubicyna, deksametazon/ bortezomib) w grupie chorych na szpiczaka ≤ 65 roku życia kwalifikujących się do autotransplantacji [131]. Chorzy leczeni za pomocą VTD mieli dłuższe okresy wolne od progresji choroby w porównaniu z leczonymi za pomocą TD, jednakże pięcioletni OS nie różnił się znamienne w obu grupach. Trójkowy schemat statystycznie częściej pozwalał na uzyskanie całkowitej odpowiedzi, a jego ponowne włączenie w momencie nawrotu przynosiło także korzyść [132]. Również w grupie osób starszych, niekwalifikujących się do przeszczepienia, dołączenie bortezomibu do melfalanu i prednizonu wydłużało PFS oraz OS [69]. Uwzględniając powyższe fakty, zastosowanie bortezomibu wydaje się zasadne szczególnie w grupie pacjentów wysokiego ryzyka, w tym z rozrostem klonalnym plazmocyto λ .

Podsumowując można stwierdzić, że ocena histologiczna trepanobiopsatów szpiku u chorych na MM jest wciąż ważnym i aktualnym narzędziem diagnostycznym. Niejednokrotnie jest ona badaniem decydującym o rozpoznaniu, zwłaszcza gdy obecne są dyskrepancje pomiędzy innymi metodami służącymi do oceny szpiku. Dzięki zastosowaniu immunohistochemii stanowi również dobre narzędzie do monitorowania choroby. Dostarcza

ona wielu ważnych informacji mających przełożenie na postępowanie terapeutyczne oraz pozwala już na etapie biopsji diagnostycznej określić czynniki rokownicze. Dodatkowo jej niewątpliwym atutem jest szeroka dostępność oraz stosunkowo niewysoka cena. Mając na uwadze również ograniczenia związane z tą techniką, należy stwierdzić, że stanowi ona integralną częścią procesu diagnostycznego chorych na szpiczaka plazmocytowego.

6. WNIOSKI

1. Ocena histologiczna wraz z badaniami immunohistochemicznymi jest użytecznym narzędziem diagnostycznym i rokowniczym u chorych na szpiczaka plazmocytoowego.
2. Niezależnie od etapu choroby (nowo rozpoznana lub nawrót/progresja) ocena histologiczna biopsji szpiku nie różni się w odniesieniu do analizowanych parametrów.
3. Diagnostyczna biopsja szpiku pozwala na określenie czynników prognostycznych:
 - A. Niekorzystnym czynnikiem rokowniczym jest rozrost plazmocytów z ekspresją łańcucha lambda oraz plazmoblastyczny i niedojrzały typ rozrostu nowotworowego.
 - B. Korzystnym czynnikiem prognostycznym jest obecność plazmocytów o fenotypie CD117– kappa+ oraz CD56– kappa+.
4. Obecność rozrostu plazmocytów z ekspresją łańcucha lambda jest czynnikiem negatywnie wpływającym na uzyskanie odpowiedzi na leczenie indukujące lekami immunomodulującymi. W tej grupie chorych szczególnie korzystne jest zastosowanie bortezomibu w pierwszej linii leczenia. Występowanie ekspresji antygenu CD20 $\geq$ 20% komórek wiąże się natomiast z mniejszym odsetkiem odpowiedzi na leczenie bortezomibem.

7. STRESZCZENIE

Szpiczak plazmocytowy (ang. multiple myeloma /MM/) należy do chorób z grupy dyskracji plazmocytowych. Stanowi w Polsce trzeci pod względem liczby nowych zachorowań nowotwór układu limfoidalnego u osób dorosłych. Wg zaktualizowanych w 2014 roku kryteriów, rozpoznanie opiera się na stwierdzeniu klonalnego nacieku patologicznych plazmocytów w biopsji tkankowej lub szpiku kostnym (przynajmniej 10% komórek) oraz obecności minimum jednego z objawów definiujących szpiczaka. Do metod oceny nowotworowego charakteru plazmocytów należą badania immunohistochemiczne (IHC), immunofenotypowe i cytogenetyczne. Ocena klonalności polega na wykazaniu zaburzonej proporcji plazmocytów kappa do lambda na podstawie badania IHC trepanobiopsatów oraz wykazaniu aberrantnego fenotypu plazmocytów. Pomimo wzrostu znaczenia w ostatnich latach cytometrii przepływowej (FC), badanie histologiczne szpiku pozostaje podstawową metodą oceny odsetka nacieczenia, włóknienia oraz rodzaju nacieku nowotworowego. Zastosowanie rozszerzonego panelu przeciwciał IHC, pozawala na dokładniejszą analizę zajęcia szpiku oraz wyróżnienie czynników rokowniczych już na etapie diagnostycznej trepanobiopsji.

Celem pracy było określenie przydatności diagnostycznej wybranych elementów oceny histologicznej szpiku i markerów immunohistochemicznych w grupie chorych z nowo rozpoznanym MM oraz z nawrotem/progresją choroby, a także wyznaczenie histologicznych czynników prognostycznych w trepanobiopsatach nowo zdiagnozowanych pacjentów. Grupę badaną stanowiło 90 chorych z rozpoznaniem szpiczaka plazmocyтового leczonych w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2008-2016 (47 kobiet i 43 mężczyzn w wieku od 32 do 86 lat (mediana wieku w momencie rozpoznania wynosiła 60 lat)). Analizie poddano archiwalne trepanobiopsaty pochodzące od chorych z nowo rozpoznanym MM (56 chorych) oraz w momencie nawrotu/progresji choroby (34 chorych). Preparatyka oraz barwienia trepanobiopsatów zostały wykonane metodami standaryzowanymi w Zakładzie Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu, a następnie poddane ocenie zgodnie z zaleceniami International Council for Standardization in Hematology z 2008r. Do analizowanych parametrów histologicznych szpiku należały: odsetek, rodzaj i typ histologiczny nacieczenia oraz nasilenie włóknienia. W celu określenia klonalności oraz wykazania aberrantnego fenotypu komórek szpiczakowych oceniono preparaty IHC następujących antygenów: CD138, CD56, CD20, CD117, cyklina D1, białko p53, łańcuchy lekkie kappa i lambda. Dodatkowo w pracy uwzględniono dane kliniczne (data rozpoznania, rozpoczęcia terapii, progresji choroby, ostatniej

obserwacji/zgonu, rodzaj zastosowanej terapii w pierwszej linii oraz odpowiedź na leczenie indukujące), laboratoryjne (klasa białka monoklonalnego, typ łańcucha lekkiego immunoglobulin, stężenie albumin, aktywność dehydrogenazy mleczanowej, stężenie β -2-mikroglobuliny (β 2M), kreatyniny) oraz zaburzenia cytogenetyczne. Mediana czasu obserwacji wynosiła 49,6 (2-119,7) miesięcy. W pierwszym etapie przeprowadzono ocenę porównawczą pacjentów z nowo rozpoznaną chorobą oraz w momencie nawrotu/progresji pod względem danych klinicznych, laboratoryjnych oraz badanych parametrów histologicznych. Następnie, w celu określenia znaczenia prognostycznego, wykonano analizę statystyczną zależności cech histologicznych z uznanymi czynnikami rokowniczymi, za pomocą testu niezależności chi-kwadrat Pearsona oraz dokładnego testu Fishera. Ocenę przeżycia (OS) oraz czasu do progresji choroby (PFS) wykonano za pomocą krzywych Kaplana-Meiera, które następnie porównano z zastosowaniem testu Log-rank. Do wyznaczenia czynników wpływających na OS oraz PFS zastosowano model regresji proporcjonalnego hazardu Coxa z określeniem współczynnika ryzyka (HR) z 95% przedziałem ufności (CI). Wszystkie testy były oceniane na poziomie istotności, który wynosił $p < 0,05$.

Komórkowość szpiku była wyższa w grupie nowo zdiagnozowanych chorych niż w przypadku nawrotu lub progresji. Nie wykazano znamiennych statystycznie różnic w zakresie odsetka nacieczenia, rodzaju i typu histologicznego rozrostu, nasilenia włóknienia oraz częstości ekspresji poszczególnych markerów immunohistochemicznych ($p > 0,05$).

Analizując grupę 56 chorych z nowo zdiagnozowanym MM zaobserwowano związek pomiędzy rodzajem nacieku nowotworowego, a nasileniem włóknienia i stopniem zaawansowania wg klasyfikacji Durie-Salmon. U chorych z rozlanym naciekiem nowotworowym częściej stwierdzano włóknienie szpiku ($p = 0,001$) oraz wyższy stopień zaawansowania ($p = 0,006$). Wśród chorych z niekorzystnie rokującymi aberracjami cytogenetycznymi ($\text{del}(17p)$ i $t(4;14)$) częściej występował niedojrzały i plazmoblastyczny typ rozrostu nowotworowego. Wraz ze wzrastającym odsetkiem nacieczenia szpiku stwierdzano częstsze występowanie rozlanego rodzaju nacieku ($p = 0,001$) oraz większe nasilenie włóknienia ($p = 0,006$). Analizując znaczenie poszczególnych markerów IHC stwierdzono, że obecność wysokiej ekspresji CD56 ($\geq 50\%$ komórek) korelowała z występowaniem $t(4;14)$ ($p = 0,046$), a ekspresja CD20 ($\geq 20\%$ komórek) z rozlanym naciekiem nowotworowym ($p = 0,026$). Włóknienie szpiku było częściej stwierdzane w grupie pacjentów z obecnością antygenu CD20 ($\geq 20\%$) ($p = 0,004$) oraz białka p53 ($p = 0,025$). Występowanie łańcucha lekkiego lambda immunoglobulin na powierzchni klonalnych plazmocytów wiązało się z podwyższonym stężeniem β 2M ($p = 0,017$), wyższym stopniem zaawansowania wg

klasyfikacji ISS ($p=0,04$), brakiem odpowiedzi na leczenie indukujące ($p=0,009$), a także częstszym występowaniem nawrotu po pierwszej linii leczenia ($p=0,006$).

Histologicznym czynnikiem ryzyka wpływającym na skrócenie OS, była obecność rozrostu plazmocytw lambda (HR 2,4; 95% CI 0,96-5,92; $p=0,047$). Pacjenci lambda+ osiągnęli medianę przeżycia (42,3 miesiące) w przeciwieństwie do chorych kappa+. Stwierdzenie plazmocytw o fenotypie CD117– kappa+ oraz CD56– kappa+ wiązało się z wydłużeniem przeżycia (odpowiednio HR 0,25; 95% CI 0,09-0,72; $p=0,01$ oraz HR 0,24; 95% CI 0,08-0,75; $p=0,014$). Jako immunohistochemiczne czynniki ryzyka, niekorzystnie wpływające na PFS w badanej grupie, określono obecność klonalnego rozrostu plazmocytw lambda+ (HR 4,32; 95% CI 1,9-9,5; $p=0,0002$) oraz występowanie plazmocytw o fenotypie CD117– lambda+ (HR 3,37; 95% CI 1,57-7,24; $p=0,002$) oraz CD56– lambda+ (HR 3,44; 95% CI 1,63-7,27; $p=0,001$).

W analizowanej grupie chorych z nowo rozpoznanym MM całkowity odsetek odpowiedzi (ORR) na leczenie pierwszej linii wynosił 69,1% (38/56 chorych) i był czynnikiem korzystnie wpływającym na OS (HR 0,39; 95% CI 0,16-0,95; $p=0,038$). Ponadto wykazano, że obecność rozrostu plazmocytw z ekspresją łańcucha lambda było czynnikiem negatywnie wpływającym na uzyskanie odpowiedzi na leczenie indukujące lekami immunomodulującymi (ORR 36,4% vs 86,9% dla chorych kappa; $p=0,005$). Najniższym odsetkiem odpowiedzi na leki immunomodulujące cechowali się chorzy z rozrostem plazmocytw CD117– lambda+ ($p=0,009$) oraz CD56– lambda+ ($p=0,014$). Powyższych zależności nie obserwowano w przypadku leczenia bortezomibem (B). Wykazano natomiast, że chorzy z podwyższoną ekspresją CD20 statystycznie rzadziej uzyskują odpowiedź na leczenie B ($p=0,022$).

Na podstawie przeprowadzonych analiz, potwierdzono przydatność diagnostyczną i prognostyczną oceny histologicznej z immunohistochemią u chorych na szpiczaka plazmocytozy. Już na etapie diagnostycznej biopsji można wyróżnić czynniki rokownicze, związane z przebiegiem choroby. Do najważniejszych parametrów histologicznych niekorzystnie wpływających na czas całkowitego przeżycia oraz czas wolny od progresji choroby należy obecność rozrostu plazmocytw lambda. Dodatkowo wykazano, że w grupie chorych z rozrostem lambda szczególnie korzystne wydaje się zastosowanie bortezomibu w pierwszej linii leczenia.

8. SUMMARY

Multiple myeloma / MM / is a disease in the group of plasma cells neoplasms. It is the third cancer of the lymphoid tissue in adults in Poland according to a number of new cases. According to the criteria updated in 2014, the diagnosis is based on the presence of clonal infiltration of pathological plasma cells in a tissue biopsy or bone marrow (at least 10% of cells) and the presence of minimum one of the symptoms that defines myeloma. The methods for assessing the neoplastic character of plasma cells include immunohistochemistry (IHC), immunophenotyping and cytogenetic tests. The evaluation of clonal character is based on the presence of the disturbed proportion of kappa to lambda cells based on the IHC study of trephine biopsies and the aberrant phenotype of plasma cells. Despite the increase in the importance of flow cytometry (FC) in recent years, histological examination of the bone marrow remains the basic method to assess the percentage of infiltration, fibrosis and the pattern of neoplastic infiltration. In addition, the use of the extended panel of IHC antibodies allows a more accurate analysis of bone marrow involvement and distinguishing of prognostic factors already at the diagnostic biopsy.

The aim of the study was to determine the diagnostic usefulness of selected elements of the histological evaluation of bone marrow and immunohistochemical markers in the group of patients with a newly diagnosed and refractory/relapsed MM, as well as the determination of histological prognostic factors in trephine biopsies of a newly diagnosed patients. The evaluation included 90 patients diagnosed with multiple myeloma treated in the Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation of the Poznań University of Medical Sciences in 2008-2016 (47 women and 43 men aged 32 to 86 years (the median age at the time of diagnosis was 60 years)). An archival trephine biopsies from patients with newly diagnosed (56 patients) and refractory/relapsed (34 patients) MM were prepared and stained by standard methods in the Cancer Pathology Department of the Grand Poland Cancer Center in Poznań. The microscopic evaluation was made according to the recommendations of International Council for Standardization in Hematology from 2008. The histological parameters of the bone marrow were analyzed for the percentage of plasmocytes, distribution pattern and type of infiltration and fibrosis. The following stains were evaluated: CD138, CD56, CD20, CD117, cyclin D1, p53 protein, kappa and lambda light chains to determine the clonality and to reveal the aberrant phenotype of myeloma cells. In addition, the analysis included clinical data (date of diagnosis, initiation of therapy, disease progression, last observation/death, the type of first line therapy and response to induction therapy), laboratory (monoclonal protein class, immunoglobulin light chain type, albumin, β -2-microglobulin

(β 2M) and creatinine concentration, lactate dehydrogenase activity) and cytogenetic aberrations. The median observation time was 49.6 (2-119.7) months. In the first part, a comparative analysis of patients with a newly diagnosed and refractory/relapsed disease was performed in terms of clinical, laboratory and histological parameters. Afterwards, to determine the prognostic value, a statistical analysis of the association between histological features and well defined prognostic factors was performed using the Pearson chi-square independence test and Fisher's exact test. The assessment of survival (OS) and time to disease progression (PFS) were made using Kaplan-Meier curves, which were then compared using the Log-rank test. To determine the factors affecting the OS and PFS, the Cox proportional hazard regression model was used with the determination of the hazard ratio (HR) with a 95% confidence interval (CI). All tests were evaluated at the significance level, which was $p < 0.05$.

The bone marrow cellularity was higher in the group of newly diagnosed patients than in the cases of refractory/relapsed disease. There were no statistically significant differences in the percentage of infiltration, the distribution pattern and the histological type of infiltration, fibrosis stage and the frequency of immunohistochemical markers expression ($p > 0.05$).

Analyzing a group of 56 patients with a newly diagnosed MM, an association between the type of neoplastic infiltration and the severity of fibrosis, as well as the Durie-Salmon stage was observed. In patients with diffuse neoplastic infiltration, bone marrow fibrosis ($p = 0.001$) and the higher stage of disease were more common ($p = 0.006$). Among patients with unfavorable cytogenetic aberrations (del (17p) and t(4;14)), immature and plasmoblastic type of tumor infiltration was more frequent. With the increasing percentage of bone marrow involvement, the occurrence of diffuse pattern of infiltration ($p = 0.001$) and higher stage of fibrosis ($p = 0.006$) were observed more often. The analysis of significance of IHC markers revealed that the presence of high expression of CD56 ($\geq 50\%$ of cells) correlated with the occurrence of t(4;14) ($p = 0.046$). Moreover, CD20 expression ($\geq 20\%$ of cells) was connected with the diffuse pattern of tumor infiltration ($p = 0.026$). The bone marrow fibrosis was more frequently observed in the group of patients with expression of CD20 ($\geq 20\%$ cells) ($p = 0.004$) and p53 ($p = 0.025$). The occurrence of the lambda immunoglobulin light chain on the clonal plasmocytes was associated with an elevated β 2M concentration ($p = 0.017$), a higher ISS stage ($p = 0.04$), the lack of response to induction therapy ($p = 0.009$), and more frequent relapse after the first line of treatment ($p = 0.006$).

A histological risk factor affecting OS shortening was the presence of lambda plasmocyte infiltration (HR 2.4, 95% CI 0.96-5.92, $p = 0.047$). Lambda positive patients achieved median survival (42.3 months) in contrast to kappa positive ones. Whereas, the

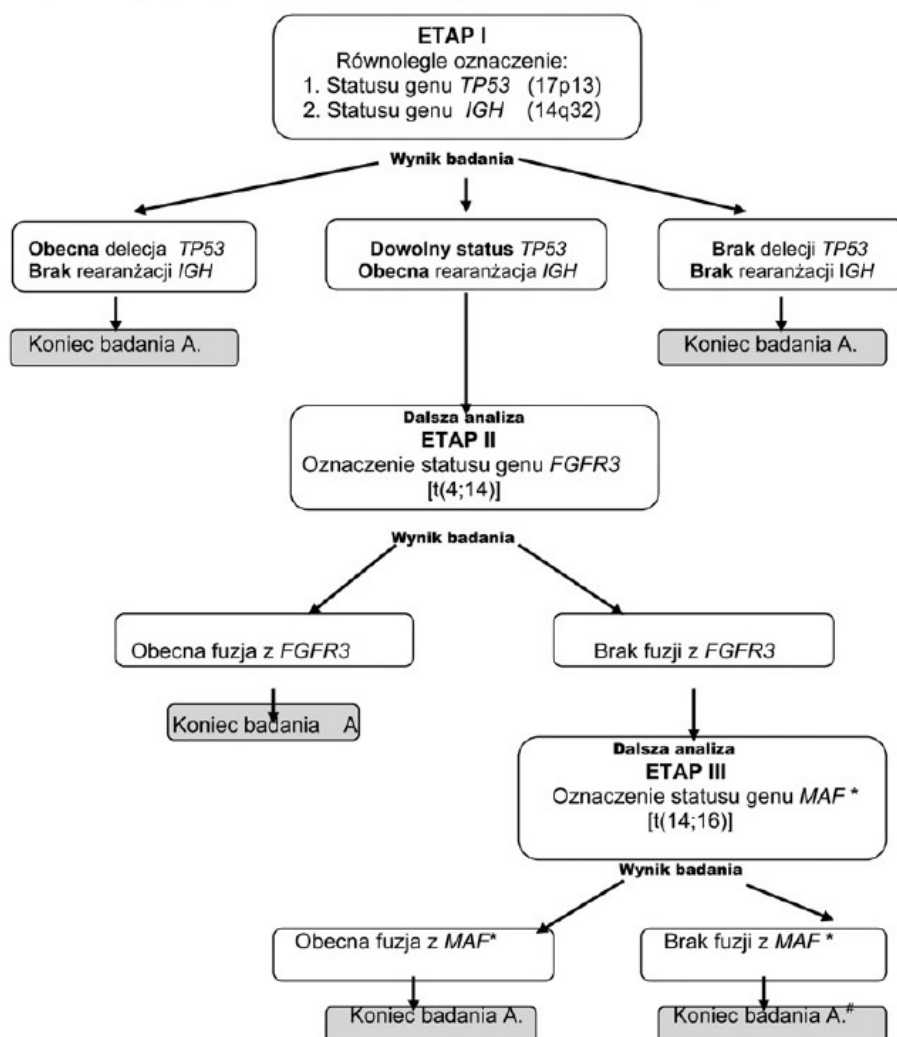
finding of plasmacytes with the CD117– kappa+ and CD56– kappa+ phenotype was associated with longer survival (HR 0.25, 95% CI 0.09-0.72, $p = 0.01$ and HR 0.24, 95% CI 0.08-0.75, $p = 0.014$, respectively). The presence of clonal lambda infiltration (HR 4.32, 95% CI 1.9-9.5, $p = 0.0002$), as well as the presence of plasmocytes with the CD117– lambda+ (HR 3.37, 95% CI 1.57-7.24, $p = 0.002$) and CD56– lambda+ phenotype (HR 3.44, 95% CI 1.63-7.27, $p = 0.001$) were determined as the immunohistochemical risk factors affecting PFS in the study group.

In the group of patients with a newly diagnosed MM, the overall response rate (ORR) to the first line treatment was 69.1% (38/56 patients), and was a factor favorably affecting OS (HR 0.39; 95% CI 0.16-0.95, $p = 0.038$). In addition, it was demonstrated that the presence of tumor cells expressing the lambda chain was a factor negatively affecting the response to induction therapy with immunomodulatory drugs (ORR 36.4% vs. 86.9% for kappa patients, $p = 0.005$). The lowest percentage of responses to immunomodulatory agents was found in patients with CD117– lambda+ ($p = 0.009$) and CD56– lambda+ ($p = 0.014$) tumor cells phenotype. The above correlations were not observed in the group treated with bortezomib (B). It has been shown, however, that patients with elevated CD20 expression receive a response to B treatment ($p = 0.022$) statistically less frequently.

Based on the performed analyzes, the diagnostic and prognostic usefulness of histological assessment with immunohistochemistry in patients with MM was confirmed. At the diagnostic biopsy, the prognostic factors related to the course of the disease can be specified. The most important histological parameter adversely affecting the overall survival and the progression free survival is the presence of lambda positive plasmocytes infiltration. Moreover, bortezomib has been shown to be particularly useful in the first line treatment in the group of patients with lambda clonal plasma cells.

9. SUPPLEMENT

A. Badanie podstawowe FISH z minimalnym zestawem sond DNA



* *MAF* – używane synonimy: *MAFC*, *c-MAF*

* w razie potrzeby możliwe wykonanie badania rozszerzonego, rozszerzonego, dla zidentyfikowania partnera *IGH* w translokacji

B. Badanie rozszerzone FISH z optymalnym zestawem sond DNA (uzupełnie: Kariotyp)

Etap I

Badanie FISH w kierunku oceny:

1. delecja *TP53* = del(17)(p13)
2. rearanżacja *IGH*
3. fuzja *IGH-FGFR3* = t(4;14)
4. fuzja *IGH-MAF* = t(14;16)
5. fuzja *IGH-MAFB* = t(14;20)
6. status 1p/1q (powielenie 1q21)
7. fuzja *IGH-CCND1* = t(11;14)
8. rearanżacja *MYC* (8q24)
9. delecja *DLEU1* = del(13)(q14)
10. liczba kopii chromosomów nieparzystych (5, 9, 15)

Etap II (opcjonalnie)

Pełna analiza KARIOTYPU z uwzględnieniem cech:

1. del(17)(p13)
2. aberracje 14q32 (różne translokacje)
3. aberracje chromosomu 1 (1p/1q)
4. delecja/monosomia chromosomu 13
5. kariotyp prawidłowy
6. trisomie chromosomów nieparzystych
7. kariotyp hypodiploidalny

Rycina 9. Algorytm diagnostyczny zaburzeń cytogenetycznych wg PGSZ [2].

Tabela 32. Kryteria odpowiedzi na leczenie wg IMWG dla postaci szpiczaka z obecnością białka monoklonalnego [2].

Remisja całkowita (CR, complete remission)	• ujemna immunofiksacja w surowicy i moczu (2x), • < 5% plazmocytów w szpiku (nie wymagane powtarzanie biopsji szpiku) • całkowite zniknięcie guzów plazmocytoma w tkankach miękkich
Rygorystyczna remisja całkowita (sCR; stringent CR)	• prawidłowy współczynnik FLC • nieobecność klonalnych komórek w szpiku badana immunofluorescencją lub immunohistochemicznie (klonalność: proporcja komórek kappa[+]/ lambda[+] > 4:1 albo < 1:2, ocena min. 100 plazmocytów)
Bardzo dobra remisja częściowa (VGPR; very good partial remission)	• białko M wykrywalne w surowicy i moczu immunofiksacją, ale niewidoczne w elektroforezie lub 90% redukcji białka M w surowicy • białko M w moczu <100 mg/24 h
Remisja częściowa (PR; partial remission)	• 50% redukcji białka M w surowicy • >90% redukcji białka M w moczu 24-h, lub poniżej <200 mg/24-h • jeżeli przy rozpoznaniu były obecne guzy plazmocytoma w tk. miękkich, dodatkowo do w/w kryteriów wymaga się > 50% redukcji ich rozmiaru
Stabilizacja choroby (SD; stable disease)	• nie spełnione kryteria CR, VGPR, PR lub progresji choroby (PD)
Progresja choroby (PD; progressive disease) – obecność przynajmniej jednego w porównaniu do najlepszej odpowiedzi:	• 25% wzrostu białka M w surowicy, pod warunkiem, że absolutny wzrost wynosi, co najmniej 0,5g/dl • jeżeli białko M nie spadło poniżej 5 g/dl, PD definiuje wzrost o > 1 g/dl • >25% wzrostu białka M w moczu dobowym pod warunkiem, że absolutny wzrost wynosi powyżej >200 mg/24 h • gdy brak mierzalnego białka M w surowicy i moczu: > 25% wzrostu różnicy stężeń pomiędzy klonalnym łańcuchem w FLC a łańcuchem nieklonalnym (wartość absolutna wzrostu minimum > 10 mg/dl) • 25% wzrostu odsetka plazmocytów w szpiku (absolutny % wzrostu > 10%) • nowe zmiany kostne lub plazmocytoma w tk. miękkich, albo udokumentowane powiększenie rozmiaru zmian kostnych lub w tk. Miękkich • hiperkalcemia (skorygowany Ca²⁺ w surowicy >11,5 mg/dl lub 2,65 mmol/l) jednoznacznie związana z proliferacją

Tabela 33. Definicje odpowiedzi na leczenie wg IMWG dla choroby łańcuchów lekkich [2].

Remisja całkowita (CR; complete remission):	• prawidłowy współczynnik FLC 0,26–1,65 • < 5% plazmocytów w szpiku (biopsja 1x) • całkowite zniknięcie guzów plazmocytoza w tkankach miękkich
Bardzo dobra remisja częściowa (VGPR; very good partial remission):	• >90% zmniejszenie różnicy stężeń pomiędzy klonalnym łańcuchem w FLC, a łańcuchem nieklonalnym • < 5% plazmocytów w szpiku (biopsja 1x) • całkowite zniknięcie guzów plazmocytoza w tkankach miękkich
Remisja częściowa (PR; partial remission):	• > 50% zmniejszenie różnicy stężeń pomiędzy klonalnym łańcuchem w FLC, a łańcuchem nieklonalnym • redukcja > 50% rozmiaru guzów plazmocytoza w tkankach miękkich

Zgoda Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 54/17

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczenia opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 9 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu

05 stycznia 2017 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu:

dr hab. n. med. Maciej Kaźmierczak

Miejsce prowadzenia badań:

**Oddział Hematologii i Transplantacji Szpiku Szpitala Klinicznego
Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz:

lek. Andrzej Szczepaniak

Członkowie zespołu

badawczego:

**prof. dr hab. n. med. Andrzej Marszałek
dr n. biol. Violetta Filas**

Temat badań:

**„Znaczenie diagnostyczno-rokownicze oceny histologicznej szpiku oraz
wybranych markerów immunohistochemicznych u pacjentów ze
szpiczakiem plazmocytowym”.**

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

10. BIBLIOGRAFIA

1. Rajkumar, S.V., M.A. Dimopoulos, A. Palumbo, J. Blade, et al., *International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma*. The Lancet Oncology, 2014. 15(12): p. e538-e548.
2. Dmoszyńska, A., L. Usnarska-Zubkiewicz, J. Walewski, E. Lech-Marańda, et al., *Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczakowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocytoowego oraz innych dyskracji plazmocytowych na rok 2017*. Acta Haematologica Polonica, 2017. 48(2): p. 55-103.
3. Nowotworów, K.R. *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2014 roku*. 2016; available from: <http://onkologia.org.pl/raporty/>.
4. Jaffe Elaine S, A.D.A., Campo Elias, Harris Nancy Lee, Quintanilla-Fend Leticia, *Hematopathology*. 2016, Elsevier. p. 474-493.
5. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2016*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016. 66(1): p. 7-30.
6. Kyle, R.A., B.G.M. Durie, S.V. Rajkumar, O. Landgren, et al., *Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management*. Leukemia, 2010. 24(6): p. 1121-1127.
7. Rawstron, A.C., A. Orfao, M. Beksac, L. Bezdicikova, et al., *Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders*. Haematologica, 2008. 93(3): p. 431-438.
8. Kumar, S., B. Paiva, K.C. Anderson, B. Durie, et al., *International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma*. Lancet Oncol, 2016. 17(8): p. e328-e346.
9. Kosei, M., M. Yuya, K. Kaoru, U. Yoshiaki, et al., *Quantification of bone marrow plasma cell infiltration in multiple myeloma: usefulness of bone marrow aspirate clot with CD138 immunohistochemistry*. Hematological Oncology, 2017. 35(3): p. 323-328.
10. FR, D., *Plasma cell myeloma and related disorders with monoclonal gammopathy*. . Laboratory hematology, 1984(New York: Churchill-Livingstone;): p. 445–81.
11. Robillard, N., H. Avet-Loiseau, R. Garand, P. Moreau, et al., *CD20 is associated with a small mature plasma cell morphology and t(11;14) in multiple myeloma*. Blood, 2003. 102(3): p. 1070-1071.

12. Greipp, P., N. Raymond, R. Kyle, and W. O'Fallon, *Multiple myeloma: significance of plasmablastic subtype in morphological classification*. Blood, 1985. 65(2): p. 305-310.
13. Chandra, S. and H. Chandra, *Comparison of bone marrow aspirate cytology, touch imprint cytology and trephine biopsy for bone marrow evaluation*. Hematol Rep, 2011. 3(3): p. e22.
14. Goyal, S., U.R. Singh, and U. Rusia, *Comparative evaluation of bone marrow aspirate with trephine biopsy in hematological disorders and determination of optimum trephine length in lymphoma infiltration*. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2014. 6(1): p. e2014002.
15. Pasqualetti, P., D. Colantonio, and R. Casale, *Prognostic value of the ratio of bone marrow plasma cells in multiple myeloma*. Minerva Med, 1990. 81(3): p. 129-33.
16. Bartl, R., *Histologic classification and staging of multiple myeloma*. Hematol Oncol, 1988. 6(2): p. 107-13.
17. Thiele, J., H. Kvasnicka, F. Facchetti, V. Franco, et al., *European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity*. Haematologica, 2005. 90(8): p. 1128-1132.
18. Porwit, A., M. Björkholm, E. Rossmann, H. Steingrimsdottir, et al., *Bone Marrow Fibrosis In Patients With Multiple Myeloma: A New Prognostic Factor For Survival?* Blood, 2013. 122(21): p. 1946-1946.
19. Al-Quran, S.Z., L. Yang, J.M. Magill, R.C. Braylan, et al., *Assessment of bone marrow plasma cell infiltrates in multiple myeloma: the added value of CD138 immunohistochemistry*. Human pathology, 2007. 38(12): p. 1779-1787.
20. Yeung, J. and H. Chang, *Genomic aberrations and immunohistochemical markers as prognostic indicators in multiple myeloma*. Journal of Clinical Pathology, 2008. 61(7): p. 832-836.
21. Ng, A., A. Wei, D. Bhurani, P. Chapple, et al., *The sensitivity of CD138 immunostaining of bone marrow trephine specimens for quantifying marrow involvement in MGUS and myeloma, including samples with a low percentage of plasma cells*. Haematologica, 2006. 91(7): p. 972-975.
22. Van Camp, B., B. Durie, C. Spier, M. De Waele, et al., *Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell- associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19)*. Blood, 1990. 76(2): p. 377-382.

23. Sahara, N. and A. Takeshita, *Prognostic Significance of Surface Markers Expressed in Multiple Myeloma: CD56 and Other Antigens*. Leukemia & Lymphoma, 2004. 45(1): p. 61-65.
24. Pellat-Deceunynck, C., S. Barillé, G. Jegou, D. Puthier, et al., *The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma*. Leukemia, 1998. 12: p. 1977.
25. Bruno, P., A. Julia, P.A. Martin, M. Gema, et al., *Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders*. Cytometry Part B: Clinical Cytometry, 2010. 78B(4): p. 239-252.
26. Harrington, A.M., P. Hari, and S.H. Kroft, *Utility of CD56 Immunohistochemical Studies in Follow-up of Plasma Cell Myeloma*. American Journal of Clinical Pathology, 2009. 132(1): p. 60-66.
27. Chang, H., S. Samiee, and Q.L. Yi, *Prognostic relevance of CD56 expression in multiple myeloma: A study including 107 cases treated with high-dose melphalan-based chemotherapy and autologous stem cell transplant*. Leukemia & Lymphoma, 2006. 47(1): p. 43-47.
28. Raja, K.R., L. Kovarova, and R. Hajek, *Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders*. Br J Haematol, 2010. 149(3): p. 334-51.
29. Tedder, T.F., M. Streuli, S.F. Schlossman, and H. Saito, *Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. 85(1): p. 208-212.
30. Prashant, K., G.P. T., M.W. G., R.S. Vincent, et al., *Anti-CD20 monoclonal antibody therapy in multiple myeloma*. British Journal of Haematology, 2008. 141(2): p. 135-148.
31. Yavasoglu, I., G. Sargin, G. Kadikoylu, F.K. Doger, et al., *Immunohistochemical evaluation of CD20 expression in patients with multiple myeloma*. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2015. 37(1): p. 34-37.
32. Li, Z., Y. Xu, G. An, H. Wang, et al., *[The characteristics of 62 cases of CD20-positive multiple myeloma]*. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2015. 36(1): p. 44-8.
33. Moreau, P., L. Voillat, L. Benboukher, C. Mathiot, et al., *Rituximab in CD20 positive multiple myeloma*. Leukemia, 2007. 21: p. 835.
34. Reilly, J.T., *Receptor tyrosine kinases in normal and malignant haematopoiesis*. Blood Reviews, 2003. 17(4): p. 241-248.

35. Ming Tay, C., C. Wee Ong, V.K. Min Lee, and B. Pang, *KIT gene mutation analysis in solid tumours: biology, clinical applications and trends in diagnostic reporting*. Pathology, 2013. 45(2): p. 127-137.
36. Hornick, J.L. and C.D.M. Fletcher, *Validating Immunohistochemical Staining for KIT (CD117)*. American Journal of Clinical Pathology, 2003. 119(3): p. 325-327.
37. Ahmadi, A., A.-A. Poorfathollah, M. Aghaiipour, M. Rezaei, et al., *Diagnostic value of CD117 in differential diagnosis of acute leukemias*. Tumor Biology, 2014. 35(7): p. 6763-6768.
38. Goto, K., T. Takai, T. Fukumoto, T. Anan, et al., *CD117 (KIT) is a useful immunohistochemical marker for differentiating porocarcinoma from squamous cell carcinoma*. J Cutan Pathol, 2016. 43(3): p. 219-26.
39. McIntyre, A., B. Summersgill, B. Grygalewicz, A.J.M. Gillis, et al., *Amplification and Overexpression of the *KIT* Gene Is Associated with Progression in the Seminoma Subtype of Testicular Germ Cell Tumors of Adolescents and Adults*. Cancer Research, 2005. 65(18): p. 8085-8089.
40. Diehl, J.A., *Cycling to Cancer with Cyclin D1*. Cancer Biology & Therapy, 2002. 1(3): p. 226-231.
41. Chen, M.H., C. Qi, D. Reece, and H. Chang, *Cyclin kinase subunit 1B nuclear expression predicts an adverse outcome for patients with relapsed/refractory multiple myeloma treated with bortezomib*. Hum Pathol, 2012. 43(6): p. 858-64.
42. Tasidou, A., M. Roussou, E. Terpos, E. Kastritis, et al., *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. 87(7): p. 734-6.
43. Padhi, S., R.G.B. Varghese, and A. Ramdas, *Cyclin D1 expression in multiple myeloma by immunohistochemistry: Case series of 14 patients and literature review*. Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology : Official Journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology, 2013. 34(4): p. 283-291.
44. Cook, J.R., E.D. Hsi, S. Worley, R.R. Tubbs, et al., *Immunohistochemical analysis identifies two cyclin D1+ subsets of plasma cell myeloma, each associated with favorable survival*. Am J Clin Pathol, 2006. 125(4): p. 615-24.
45. Lane, D.P., *p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. 358: p. 15.
46. Chng, W.J., T. Price-Troska, N. Gonzalez-Paz, S. Van Wier, et al., *Clinical significance of TP53 mutation in myeloma*. Leukemia, 2007. 21: p. 582.

47. Avet-Loiseau, H., M. Attal, P. Moreau, C. Charbonnel, et al., *Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome*. Blood, 2007. 109(8): p. 3489-3495.
48. Chang, H., C. Qi, Q.-L. Yi, D. Reece, et al., *p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation*. Blood, 2005. 105(1): p. 358-360.
49. Chang, H., J. Yeung, C. Qi, and W. Xu, *Aberrant nuclear p53 protein expression detected by immunohistochemistry is associated with hemizygous P53 deletion and poor survival for multiple myeloma*. Br J Haematol, 2007. 138(3): p. 324-9.
50. Lowe, S.W. and C.J. Sherr, *Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles*. Curr Opin Genet Dev, 2003. 13(1): p. 77-83.
51. Markovic, O., D. Marisavljevic, V. Cemerikic, N. Suvajdzic, et al., *Immunohistochemical analysis of cyclin D1 and p53 in multiple myeloma: relationship to proliferative activity and prognostic significance*. Med Oncol, 2004. 21(1): p. 73-80.
52. Katzmann, J.A., R.J. Clark, R.S. Abraham, S. Bryant, et al., *Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains*. Clin Chem, 2002. 48(9): p. 1437-44.
53. Redegeld, F.A., M.W. van der Heijden, M. Kool, B.M. Heijdra, et al., *Immunoglobulin-free light chains elicit immediate hypersensitivity-like responses*. Nature Medicine, 2002. 8: p. 694.
54. Mitsiades, C.S., D.W. McMillin, S. Klippel, T. Hideshima, et al., *The Role of the Bone Marrow Microenvironment in the Pathophysiology of Myeloma and Its Significance in the Development of More Effective Therapies*. Hematology/Oncology Clinics of North America, 2007. 21(6): p. 1007-1034.
55. Swerdlow SH, C.E., Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Revised 4th Edition ed. Vol. 2. 2017.
56. Bergsagel, P.L. and W.M. Kuehl, *Molecular Pathogenesis and a Consequent Classification of Multiple Myeloma*. Journal of Clinical Oncology, 2005. 23(26): p. 6333-6338.

57. Affer, M., M. Chesi, W.-D.G. Chen, J.J. Keats, et al., *Promiscuous Rearrangements of the MYC Locus Hijack Enhancers and Super-Enhancers to Dysregulate MYC Expression in Multiple Myeloma*. *Leukemia*, 2014. 28(8): p. 1725-1735.
58. Lohr, J.G., P. Stojanov, S.L. Carter, P. Cruz-Gordillo, et al., *Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy*. *Cancer cell*, 2014. 25(1): p. 91-101.
59. Kuehl, W.M. and P.L. Bergsagel, *Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012. 122(10): p. 3456-3463.
60. Fonseca, R., P.L. Bergsagel, J. Drach, J. Shaughnessy, et al., *International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review*. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 2009. 23(12): p. 2210-2221.
61. Greipp, P.R., J.S. Miguel, B.G.M. Durie, J.J. Crowley, et al., *International Staging System for Multiple Myeloma*. *Journal of Clinical Oncology*, 2005. 23(15): p. 3412-3420.
62. Palumbo, A., H. Avet-Loiseau, S. Oliva, H.M. Lokhorst, et al., *Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group*. *Journal of Clinical Oncology*, 2015. 33(26): p. 2863-2869.
63. Mikhael, J.R., D. Dingli, V. Roy, C.B. Reeder, et al., *Management of Newly Diagnosed Symptomatic Multiple Myeloma: Updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Guidelines 2013*. *Mayo Clinic Proceedings*, 2013. 88(4): p. 360-376.
64. Rajan, A.M. and S.V. Rajkumar, *Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice*. *Blood Cancer Journal*, 2015. 5(10): p. e365.
65. Chng, W.J., A. Dispenzieri, C.S. Chim, R. Fonseca, et al., *IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma*. *Leukemia*, 2013. 28: p. 269.
66. Cavo, M., E. Terpos, C. Nanni, P. Moreau, et al., *Role of 18F-FDG PET/CT in the diagnosis and management of multiple myeloma and other plasma cell disorders: a consensus statement by the International Myeloma Working Group*. *The Lancet Oncology*, 2017. 18(4): p. e206-e217.
67. Dimopoulos, M.A., J. Hillengass, S. Usmani, E. Zamagni, et al., *Role of Magnetic Resonance Imaging in the Management of Patients With Multiple Myeloma: A Consensus Statement*. *Journal of Clinical Oncology*, 2015. 33(6): p. 657-664.

68. Engelhardt, M., E. Terpos, M. Kleber, F. Gay, et al., *European Myeloma Network recommendations on the evaluation and treatment of newly diagnosed patients with multiple myeloma*. Haematologica, 2014. 99(2): p. 232-42.
69. San Miguel, J.F., R. Schlag, N.K. Khuageva, M.A. Dimopoulos, et al., *Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma*. N Engl J Med, 2008. 359(9): p. 906-17.
70. Palumbo, A., R. Hajek, M. Delforge, M. Kropff, et al., *Continuous lenalidomide treatment for newly diagnosed multiple myeloma*. N Engl J Med, 2012. 366(19): p. 1759-69.
71. Lee, S.H., W.N. Erber, A. Porwit, M. Tomonaga, et al., *ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports*. Int J Lab Hematol, 2008. 30(5): p. 349-64.
72. Ely, S., P. Forsberg, I. Ouansafi, A. Rossi, et al., *Cellular Proliferation by Multiplex Immunohistochemistry Identifies High-Risk Multiple Myeloma in Newly Diagnosed, Treatment-Naive Patients*. Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia. 17(12): p. 825-833.
73. Lee, N., S.Y. Moon, J.h. Lee, H.K. Park, et al., *Discrepancies between the percentage of plasma cells in bone marrow aspiration and BM biopsy: Impact on the revised IMWG diagnostic criteria of multiple myeloma*. Blood Cancer Journal, 2017. 7(2): p. e530.
74. Tran, D.N., S.A.B.C. Smith, D.A. Brown, A.J.C. Parker, et al., *Polychromatic flow cytometry is more sensitive than microscopy in detecting small monoclonal plasma cell populations*. Cytometry Part B: Clinical Cytometry, 2017. 92(2): p. 136-144.
75. Wei, A., D. Westerman, F. Feleppa, M. Trivett, et al., *Bone marrow plasma cell microaggregates detected by immunohistology predict earlier relapse in patients with minimal disease after high-dose therapy for myeloma*. Haematologica, 2005. 90(8): p. 1147-1149.
76. Vincent, R.S., F. Rafael, D. Angela, L.M. Q., et al., *Methods for estimation of bone marrow plasma cell involvement in myeloma: Predictive value for response and survival in patients undergoing autologous stem cell transplantation*. American Journal of Hematology, 2001. 68(4): p. 269-275.
77. Bartl, P.R., P.B. Frisch, P.A. Fateh-Moghadam, G. Kettner, et al., *Histologic Classification and Staging of Multiple Myeloma: A Retrospective and Prospective Study of 674 Cases*. American Journal of Clinical Pathology, 1987. 87(3): p. 342-355.

78. Rajkumar, S.V., R. Fonseca, M.Q. Lacy, T.E. Witzig, et al., *Plasmablastic Morphology Is an Independent Predictor of Poor Survival After Autologous Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma*. Journal of Clinical Oncology, 1999. 17(5): p. 1551-1551.
79. Subramanian, R., D. Basu, and T.K. Dutta, *Significance of bone marrow fibrosis in multiple myeloma*. Pathology, 2007. 39(5): p. 512-515.
80. Moreau, P., N. Robillard, G. Jigo, C. Pellat, et al., *Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome*. Br J Haematol, 2006. 132(2): p. 168-70.
81. Pellat-Deceunynck, C. and R. Bataille, *Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2004. 32(2): p. 293-301.
82. Mateo, G., M.A. Montalbán, M.-B. Vidriales, J.J. Lahuerta, et al., *Prognostic Value of Immunophenotyping in Multiple Myeloma: A Study by the PETHEMA/GEM Cooperative Study Groups on Patients Uniformly Treated With High-Dose Therapy*. Journal of Clinical Oncology, 2008. 26(16): p. 2737-2744.
83. Rawstron, A.C., J.A. Child, R.M. de Tute, F.E. Davies, et al., *Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study*. J Clin Oncol, 2013. 31(20): p. 2540-7.
84. Paiva, B., M.B. Vidriales, J. Cervero, G. Mateo, et al., *Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation*. Blood, 2008. 112(10): p. 4017-23.
85. Paiva, B., N.C. Gutiérrez, L. Rosiñol, M.-B. Vidriales, et al., *High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma*. Blood, 2012. 119(3): p. 687-691.
86. Mateo, G., M. Castellanos, A. Rasillo, N.C. Gutiérrez, et al., *Genetic Abnormalities and Patterns of Antigenic Expression in Multiple Myeloma*. Clinical Cancer Research, 2005. 11(10): p. 3661-3667.
87. Sahara, N., A. Takeshita, K. Shigeno, S. Fujisawa, et al., *Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma*. British Journal of Haematology, 2002. 117(4): p. 882-885.
88. Yeung, J., S. Samiee, Q.L. Yi, D. Pantalony, et al., *Prognostic Relevance of CD56 Expression in Patients with Multiple Myeloma Treated with High-Dose Melphalan-*

- Based Chemotherapy and Autologous Stem Cell Transplant*. Blood, 2005. 106(11): p. 5086-5086.
89. Pan, Y., H. Wang, Q. Tao, C. Zhang, et al., *Absence of both CD56 and CD117 expression on malignant plasma cells is related with a poor prognosis in patients with newly diagnosed multiple myeloma*. Leukemia Research, 2016. 40: p. 77-82.
 90. Bataille, R., C. Pellat-Deceunynck, N. Robillard, H. Avet-Loiseau, et al., *CD117 (c-kit) is aberrantly expressed in a subset of MGUS and multiple myeloma with unexpectedly good prognosis*. Leukemia research, 2008. 32(3): p. 379-382.
 91. Schmidt-Hieber, M., M. Pérez-Andrés, B. Paiva, J. Flores-Montero, et al., *CD117 expression in gammopathies is associated with an altered maturation of the myeloid and lymphoid hematopoietic cell compartments and favorable disease features*. Haematologica, 2011. 96(2): p. 328-332.
 92. Kraj, M., R. Poglod, J. Kopec-Szlezak, U. Sokolowska, et al., *C-kit receptor (CD117) expression on plasma cells in monoclonal gammopathies*. Leuk Lymphoma, 2004. 45(11): p. 2281-9.
 93. Ceran, F., M. Falay, S. Dağdaş, and G. Özet, *The Assessment of CD56 and CD117 Expressions at the Time of the Diagnosis in Multiple Myeloma Patients*. Turkish Journal of Hematology, 2017. 34(3): p. 226-232.
 94. Ngo, N.-T., C. Brodie, C. Giles, D. Horncastle, et al., *The significance of tumour cell immunophenotype in myeloma and its impact on clinical outcome*. Journal of Clinical Pathology, 2009. 62(11): p. 1009-1015.
 95. Quinn, J., L. Percy, J. Glassford, K. Somana, et al., *CD20-positive multiple myeloma – differential expression of cyclins D1 and D2 suggests a heterogeneous disease*. British Journal of Haematology, 2010. 149(1): p. 156-159.
 96. Fernandez de Larrea, C., R.A. Kyle, B.G. Durie, H. Ludwig, et al., *Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group*. Leukemia, 2013. 27(4): p. 780-91.
 97. Gemmel, C., F.W. Cremer, M. Weis, M. Witzens, et al., *Anti-CD20 antibody as consolidation therapy in a patient with primary plasma cell leukemia after high-dose therapy and autologous stem cell transplantation*. Ann Hematol, 2002. 81(2): p. 119-23.
 98. Kapoor, P., P.T. Greipp, W.G. Morice, S.V. Rajkumar, et al., *Anti-CD20 monoclonal antibody therapy in multiple myeloma*. British Journal of Haematology, 2008. 141(2): p. 135-148.

99. Kong, S.Y., W.K. Lam, K.S. Li, K.P. Yeung, et al., *Diagnostic and treatment hurdles in plasma cell myeloma with t(11;14) translocation: A case report*. Molecular and clinical oncology, 2018. 8(6): p. 757-759.
100. Denis, L., T. Xavier, and S. Brigitte, *The enigmatic role of cyclin D1 in multiple myeloma*. International Journal of Cancer, 2005. 115(2): p. 171-176.
101. Pruneri, G., S. Fabris, L. Baldini, N. Carboni, et al., *Immunohistochemical analysis of cyclin D1 shows deregulated expression in multiple myeloma with the t(11;14)*. The American journal of pathology, 2000. 156(5): p. 1505-1513.
102. Hoyer, J.D., C.A. Hanson, R. Fonseca, P.R. Greipp, et al., *The (11;14)(q13;q32) Translocation in Multiple Myeloma A Morphologic and Immunohistochemical Study*. American Journal of Clinical Pathology, 2000. 113(6): p. 831-837.
103. Soverini, S., M. Cavo, C. Cellini, C. Terragna, 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(5): p. 1588-1594.
104. Jares, P., D. Colomer, and E. Campo, *Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics*. Nature Reviews Cancer, 2007. 7: p. 750.
105. Shintani, M., A. Okazaki, T. Masuda, M. Kawada, et al., *Overexpression of cyclin D1 contributes to malignant properties of esophageal tumor cells by increasing VEGF production and decreasing Fas expression*. Anticancer Res, 2002. 22(2a): p. 639-47.
106. Chen, M.-H., C.X.Y. Qi, M.N. Saha, and H. Chang, *p53 Nuclear Expression Correlates With Hemizygous TP53 Deletion and Predicts an Adverse Outcome for Patients With Relapsed/Refractory Multiple Myeloma Treated With Lenalidomide*. American Journal of Clinical Pathology, 2012. 137(2): p. 208-212.
107. Sheth, N., J. Yeung, and H. Chang, *p53 nuclear accumulation is associated with extramedullary progression of multiple myeloma*. Leuk Res, 2009. 33(10): p. 1357-60.
108. Lepelley, P., C. Preudhomme, M. Vanrumbeke, B. Quesnel, et al., *Detection of p53 mutations in hematological malignancies: comparison between immunocytochemistry and DNA analysis*. Leukemia, 1994. 8(8): p. 1342-9.
109. Wang, C. and X. Wang, *The role of TP53 network in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia*. International journal of clinical and experimental pathology, 2013. 6(7): p. 1223-1229.
110. Neri, A., L. Baldini, D. Trecca, L. Cro, et al., *p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy*. Blood, 1993. 81(1): p. 128-135.

111. Chang, H., S. Sloan, D. Li, and A. Keith Stewart, *Multiple myeloma involving central nervous system: high frequency of chromosome 17p13.1 (p53) deletions*. Br J Haematol, 2004. 127(3): p. 280-4.
112. Jurczynszyn, A., N. Grzasko, A. Gozzetti, J. Czepiel, et al., *Central Nervous System Involvement by Multiple Myeloma: a Multi-Institutional Retrospective Study of 172 Patients in daily clinical practice*. American journal of hematology, 2016. 91(6): p. 575-580.
113. Deng, S., Y. Xu, G. An, W. Sui, et al., *Features of Extramedullary Disease of Multiple Myeloma: High Frequency of P53 Deletion and Poor Survival: A Retrospective Single-Center Study of 834 Cases*. Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia, 2015. 15(5): p. 286-291.
114. Dawson, M.A., S.S. Opat, Y. Taouk, M. Donovan, et al., *Clinical and immunohistochemical features associated with a response to bortezomib in patients with multiple myeloma*. Clin Cancer Res, 2009. 15(2): p. 714-22.
115. Loghavi, S., A. Al-Ibraheemi, Z. Zuo, G. Garcia-Manero, et al., *TP53 overexpression is an independent adverse prognostic factor in de novo myelodysplastic syndromes with fibrosis*. Br J Haematol, 2015. 171(1): p. 91-9.
116. Peterson, L.C., B.A. Brown, J.T. Crosson, and J. Mladenovic, *Application of the Immunoperoxidase Technic to Bone Marrow Trephine Biopsies in the Classification of Patients with Monoclonal Gammopathies*. American Journal of Clinical Pathology, 1986. 85(6): p. 688-693.
117. Shustik, C., D. Bergsagel, and W. Pruzanski, *Kappa and lambda light chain disease: survival rates and clinical manifestations*. Blood, 1976. 48(1): p. 41-51.
118. Dispenzieri, A., R.A. Kyle, J.A. Katzmann, T.M. Therneau, et al., *Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma*. Blood, 2008. 111(2): p. 785-9.
119. Kyrtsolis, M.-C., T.P. Vassilakopoulos, N. Kafasi, S. Sachanas, et al., *Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma*. British Journal of Haematology, 2007. 137(3): p. 240-243.
120. Modi, J., J. Kamal, A. Eter, S. El-Sayegh, et al., *Immunoglobulin D Multiple Myeloma With Rapidly Progressing Renal Failure*. Journal of clinical medicine research, 2015. 7(8): p. 653-655.
121. Shameem, M., J. Akhtar, R. Bhargava, Z. Ahmad, et al., *Lambda light chain multiple myeloma presenting as pleural mass*. Respiratory Medicine CME, 2011. 4(1): p. 12-14.

122. Kozłowski, P., S. Montgomery, R. Befeckadu, and V. Hahn-Strömberg, *The risk of renal disease is increased in lambda myeloma with bone marrow amyloid deposits*. Journal of blood medicine, 2017. 8: p. 29-34.
123. Shimamoto, Y., Y. Anami, and M. Yamaguchi, *A new risk grouping for IgD myeloma based on analysis of 165 Japanese patients*. European Journal of Haematology, 1991. 47(4): p. 262-267.
124. Harousseau, J.-L., H. Avet-Loiseau, M. Attal, G. Marit, et al., *High Complete and Very Good Partial Response Rates with Bortezomib—Dexamethasone as Induction Prior to ASCT in Newly Diagnosed Patients with High-Risk Myeloma: Results of the IFM2005-01 Phase 3 Trial*. Blood, 2009. 114(22): p. 353-353.
125. Cornell, C.J., O. McIntyre, S. Kochwa, B. Weksler, et al., *Response to therapy in IgG myeloma patients excreting lambda or kappa light chains: CALGB experience*. Blood, 1979. 54(1): p. 23-29.
126. Fayers, P.M., A. Palumbo, C. Hulin, A. Waage, et al., *Thalidomide for previously untreated elderly patients with multiple myeloma: meta-analysis of 1685 individual patient data from 6 randomized clinical trials*. Blood, 2011. 118(5): p. 1239-1247.
127. Morgan, G.J., F.E. Davies, W.M. Gregory, S.E. Bell, et al., *The Addition of Thalidomide to the Induction Treatment of Newly Presenting Myeloma Patients Increases the CR Rate Which Is Likely to Translate Into Improved PFS and OS*. Blood, 2009. 114(22): p. 352-352.
128. Agata, M., Y. Sameshima, T. Oda, T. Kondo, et al., *[Factors affecting the response of thalidomide therapy for patients with multiple myeloma]*. Rinsho Ketsueki, 2010. 51(3): p. 189-95.
129. Avet-Loiseau, H., X. Leleu, M. Roussel, P. Moreau, et al., *Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p)*. J Clin Oncol, 2010. 28(30): p. 4630-4.
130. El-Ghammaz, A.M.S. and E. Abdelwahed, *Bortezomib-based induction improves progression-free survival of myeloma patients harboring 17p deletion and/or t(4;14) and overcomes their adverse prognosis*. Annals of Hematology, 2016. 95(8): p. 1315-1321.
131. Rosiñol, L., A. Oriol, A.I. Teruel, D. Hernández, et al., *Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETHEMA/GEM study*. Blood, 2012. 120(8): p. 1589-1596.

132. Tacchetti, P., L. Pantani, V. De Stefano, E. Zamagni, et al., *Superior PFS2 with VTD Vs TD for Newly Diagnosed, Transplant Eligible, Multiple Myeloma (MM) Patients: Updated Analysis of Gimema MMY-3006 Study*. Blood, 2014. 124(21): p. 196-196.