

ULOGA EKSPRESIJE RECEPTORA NOTCH1 I LIGANADA JAGGED1 I DLL1 U KRVOTVORNIM MATIČNIM STANICAMA MIKROOKOLIŠA MULTIPLOGA MIJELOMA

Jurenc, Silvana

Doctoral thesis / Doktorski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:592012>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Silvana Jurenc

**ULOGA EKSPRESIJE RECEPTORA
NOTCH1 I LIGANADA JAGGED1 I DLL1
U KRVOTVORNIM MATIČNIM
STANICAMA MIKROOKOLIŠA
MULTIPLOGA MIJELOMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Silvana Jurenc

**THE ROLE OF NOTCH1 RECEPTOR,
JAGGED1 AND DLL1 LIGAND
EXPRESSION IN HEMATOPOIETIC
STEM CELLS OF THE
MICROENVIRONMENT IN MULTIPLE
MYELOMA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023

Doktorski rad izrađen je u sklopu projekata prof. dr. sc. Mariastefania Antica:

Hrvatska zaklada za znanost IP-2020-02-2431;

Projekt zaklade Terry Fox i Hrvatske lige protiv raka;

Projekt voditelja akademika S. Vukičevića: Znanstveni centar izvrsnosti CERRM - istraživanje novih platformi i potencijala KK01.1.1.01.0008 sufinanciran od Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Kliničkoj bolnici Merkur pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Anite Škrtić i prof. dr. sc. Mariastefanije Antica u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

ZAHVALE

Posebnu zahvalnost dugujem mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Škrtić za podršku tijekom izrade ovog rada i na savjetima koji su doveli da ovaj rad bude oblikovan na ovakav način.

Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Mariastefaniji Antica za pomoć pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem se i izv. prof. dr. sc. Mirjani Mariani Kardum Paro i mr. sc. Zoranu Šiftaru koji su pružili nesebičnu podršku i stručnu pomoć pri izradi ovoga rada.

Mome suprugu i djeci zahvaljujem na ljubavi, bezuvjetnoj potpori i neizmjerenoj vjeri u moj uspjeh.

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

**ULOGA EKSPRESIJE RECEPTORA NOTCH1 I LIGANADA JAGGED1 I DLL1 U
KRVOTVORNIM MATIČNIM STANICAMA MIKROOKOLIŠA MULTIPLOGA
MIJELOMA**

SILVANA JURENEC

Klinička bolnica Merkur

Signalni put Notch u krvotvornim matičnim stanicama (KMS) koštane srži (KS) multiplog mijeloma (MM) analiziran je kroz ekspresiju proteina NOTCH1, JAGGED1, DLL1 u KMS imunofenotipizacijom, u tumorskim plazma stanicama (TPS) imunohistokemijskim bojenjem, uz analizu citogenetičkih promjena visokog rizika (CGVR) u TPS metodom FISH te analizu histoloških promjena u koštanoj srži MM. Ekspresija JAGGED1 i DLL1 u KMS značajno je niža u MM nego u zdravih darivatelja. Prisutna je negativna korelacija između ekspresije NOTCH1 i JAGGED1 u KMS MM, a pozitivna korelacija između ekspresije NOTCH1 i liganada JAGGED1 i DLL1 u TPS. U TPS s prisutnom barem jednom CGVR i difuznim infiltratom KS značajno je veća razina ekspresije NOTCH1 i JAGGED1 i intenziteta ekspresije NOTCH1. Potvrđena je hipoteza da postoji razlika u ekspresiji JAGGED1 i DLL1 u KMS u MM i zdravoj KS, no nije dokazana povezanost ekspresije NOTCH1, JAGGED1, DLL1 u KMS i TPS u MM. Povezanost ekspresije NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u istoj vrsti stanica ukazuje na razliku u homotipnoj i heterotipnoj staničnoj signalizaciji puta Notch u MM.

(143 stranice, 24 slike, 14 tablica, 255 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski).

Ključne riječi: NOTCH1, JAGGED1, DLL1, krvotvorna matična stanica, multipli mijelom

Mentori: izv. prof. dr. sc. Anita Škrtić, prof. dr. sc. Mariastefania Antica

Ocjenjivači: naslovni doc. dr. sc. Delfa Radić-Krišto, izv. prof. dr. sc. Maja Matulić, dr. sc. Sanja Kapitanović, znan. savj. u trajnom zvanju, izv. prof. dr. sc. Petra Korać

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

**THE ROLE OF NOTCH1 RECEPTOR, JAGGED1 AND DLL1 LIGAND EXPRESSION
IN HEMATOPOIETIC STEM CELLS OF THE MICROENVIRONMENT IN
MULTIPLE MYELOMA**

SILVANA JURENEC

University Hospital Merkur

The Notch signaling pathway in hematopoietic stem cells (HSC) in the multiple myeloma (MM) bone marrow (BM) was analyzed with the NOTCH1, JAGGED1, DLL1 expression in HSC by immunophenotyping and in tumor plasma cells (TPC) by immunohistochemical staining. High risk cytogenetic changes (CGHR) using the FISH method and histological analysis of TPC in the BM MM was performed. JAGGED1 and DLL1 expression in HSC were significantly lower in MM than in healthy donors. There was a negative correlation between NOTCH1 and JAGGED1 expression in HSC MM, and a positive correlation between NOTCH1 and JAGGED1 and DLL1 in TPC, respectively. In TPC with at least one CGHR present and a BM diffuse infiltrate, the NOTCH1 and JAGGED1 expression and the intensity of NOTCH1 expression were significantly higher. The hypothesis that there is a difference in the expression of JAGGED1 and DLL1 in HSC between MM and healthy BM was confirmed, but the correlation of the NOTCH1, JAGGED1, DLL1 expression in HSC and TPC in MM was not proven. The association of NOTCH1, JAGGED1 and DLL1 expression in the same cell type indicates a difference in homotypic and heterotypic cellular signaling of the Notch pathway in MM.

(143 pages, 24 figures, 14 tables, 255 references, original in Croatian)

Keywords: NOTCH1, JAGGED1, DLL1, hematopoietic stem cell, multiple myeloma

Supervisor: Adjunct Associate Professor Anita Škrtić, PhD, Adjunct Professor Mariastefania Antica, PhD

Reviewers: Adjunct Assistant Professor Delfa Radić-Krišto, PhD, Associate Professor Maja Matulić, PhD, Scientific Adviser with Tenure Sanja Kapitanović, PhD, Associate Professor Petra Korać, PhD

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Razvoj, aktivacija i diferencijacija B limfocita u plazma stanice	4
2.2. Multipli mijelom	10
2.2.1. Patogeneza multiplog mijeloma	11
2.2.2. Citogenetičke promjene u plazmastičnim novotvorinama	12
2.2.3. Morfološka obilježja multiplog mijeloma	15
2.2.4. Dijagnoza multiplog mijeloma	16
2.2.5. Terapija multiplog mijeloma	17
2.3. Krvotvorna matična stanica.....	19
2.3.1. Mikrookoliš krvotvornih matičnih stanica	23
2.3.2. Krvotvorne matične stanice u multiplom mijelomu	25
2.4. Signalni put Notch	26
2.4.1. Građa i aktivacija receptora NOTCH	29
2.4.2. Građa i aktivacija liganda receptora NOTCH	31
2.4.3. Signalni put Notch u regulaciji krvotvornih matičnih stanica.....	31
2.4.4. Signalni put Notch u multiplom mijelomu	32
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	37
4. ISPITANICI, MATERIJALI, METODE.....	38
4.1. Uzorci krvotvornih matičnih stanica	38
4.2. Uzorci iglene biopsije aspirata košane srži	42
4.3. Imunofenotipizacija krvotvornih matičnih stanica na protočnom citometru	43

4.4.	Histološka analiza tumorskih plazma stanica u koštanoj srži multiplog mijeloma	45
4.5.	Imunohistokemijsko bojenjena parafinskim rezovima biopsije koštane srži.....	45
4.6.	Interfazna fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) na parafinskim rezovima i citološkim razmazima koštane srži	47
4.6.1.	Priprema preparata	47
4.6.2.	Analiza preparata.....	49
4.7.	Statistička analiza.....	49
5.	REZULTATI.....	50
5.1.	Analiza razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u krvotvornim matičnim stanicama.....	52
5.2.	Analiza razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama	63
5.3.	Morfološke i kliničke karakteristike tumora te citogenetičke promjene u tumorskim plazma stanicama u koštanoj srži	69
5.4.	Korelacija razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama u koštanoj srži i krvotvornim matičnim stanicama u multiplom mijelomu	73
5.5.	Usporedba intenziteta ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama u multiplom mijelomu s tipom infiltracije koštane srži multiplog mijeloma	76
5.6.	Usporedba analiziranih kategorijskih morfoloških, citogenetičkih, kliničkih i kontinuiranih morfoloških, kliničkih i laboratorijskih varijabli u multiplom mijelomu s tipom infiltracije koštane srži multiplog mijeloma	78
5.7.	Usporedba razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama i krvotvornim matičnim stanicama s citogenetičkim promjenama u tumorskim plazma stanicama	88

6. RASPRAVA.....	95
7. ZAKLJUČCI.....	108
8. LITERATURA	110
9. PRILOZI.....	138
10. ŽIVOTOPIS.....	141

1. UVOD

Brojne maligne hematološke bolesti nastaju zbog mutacija koje aktiviraju nekontroliranu proliferaciju tumorskih stanica, no najnovija istraživanja ukazuju na promjene u mikrookolišu koštane srži i posljedičnim promjenama na krvotvornim matičnim stanicama kao mogućim čimbenicima u patogenezi malignih bolesti hematopoeze. Krvotvorna matična stanica (KMS) je nediferencirana, multipotentna matična stanica koja ima sposobnost diferencijacije u usmjerene prastanice mijeloične i limfatične hematopoeze iz kojih procesima proliferacije i sazrijevanja nastaju funkcionalno zrele krvne stanice. (1) KMS su jedine stanice krvotvornog sustava koje posjeduju sposobnost diferencijacije i samoobnavljanja. Samoobnavljanje je sposobnost KMS da se podijeli na takav način da jedna ili obje stanice kćeri zadrže sve osobine majke. Diferencijacija je regulirani proces sazrijevanja i usmjeravanja KMS u jednu krvnu lozu. Samoobnavljanje, proliferaciju i diferencijaciju matičnih stanica omogućava specifičan mikrookoliš KMS u koštanoj srži koji se naziva niša. Pojam niša matičnih stanica prvo je opisan u beskralježnjaka, i to u jajnicima i testisima *Drosophila melanogaster*. (2) Do sada su poznata dva glavna mikrookoliša koja formiraju niše KMS u koštanoj srži: endostealna niša i vaskularna niša. (3) Proliferacija i diferencijacija KMS je regulirana pomoću raznih citokina, čimbenika rasta i drugih signalnih molekula koje sintetiziraju stanice u nišama koštane srži. Signalni put Notch je jedan od signalnih puteva koji sudjeluju u navedenim procesima i komunikaciji KMS kao dio mikrookoliša koštane srži. (4) Signalni put Notch se aktivira interakcijom receptora NOTCH ciljne stanice i odgovarajućeg liganda susjedne stanice ili slobodnog liganda u međustaničnom prostoru. Kombinacija različitih receptora i liganda uvjetuju različite ishode signalnog puta Notch. (5) Ciljni geni signalnog puta Notch su brojni, specifični su za određene tipove stanica, te aktivacija ovisi o interakciji Notch signalnog puta s drugim signalnim putovima, kromatinskom statusu promotora ciljnog gena te fazi staničnog ciklusa. (6) Prema istraživanju Ronchini i sur., mehanizam djelovanja receptora NOTCH1 temelji se na regulaciji staničnog ciklusa. NOTCH1 može utjecati na progresiju G1 faze staničnog ciklusa. Aktivacijom signala Notch prosječna brzina proliferacije stanica i duljina staničnog ciklusa nisu promijenjene, ali je promijenjen udio stanica u različitim fazama staničnog ciklusa. Smanjen je udio stanica u G1 fazi. (7) Signalni put Notch pomaže diferencijaciju

stanica kako bi obavljale određene funkcije u tijelu. Ona također igra ulogu u staničnom rastu i diobi, sazrijevanju, i apoptozi. Aktivacija receptora NOTCH u KMS inhibira diferencijaciju i pospješuje proces samoobnavljanja KMS *in vitro*. (8) Signalizacija i regulacija aktivnosti KMS pomoću receptora NOTCH važno je *in vivo* za kontrolu samoobnavljanja i diferencijacije KMS u nepovoljnim uvjetima za stanicu. (9) KMS koje su bile u stanju mirovanja odvajaju se od endostealne niše i migriraju prema središtu koštane srži u vaskularnu zonu gdje se ponovno odvija hematopoeza. Vaskularna niša potiče proliferaciju i diferencijaciju KMS. Signalni put Notch sudjeluje u hematopoezi, razvoju i diferencijaciji limfatične, mijeloične i eritrocitne hematopoeze. (10) Iako većina malignih hematoloških bolesti nastaje zbog mutacije koja aktivira nekontroliranu proliferaciju stanica, najnoviji podaci pokazuju da hematopoeza može biti poremećena zbog promjena koje se događaju u niši, mikrookolišu KMS i posljedičnim promjenama na samim KMS. (11) Poznata je uloga gena *NOTCH1* u razvoju akutne T- stanične limfoblastične leukemije (T-ALL). Mutacije gena *NOTCH1* su dokazane u više od 50% T-ALL. Mutacije *NOTCH1* gena nađene u T-ALL-u utječu na kritične domene odgovorne za sprječavanje spontane aktivacije receptora u odsutnosti liganda ili za prekid signalizacije Notch1 u jezgri. Time deregulacija signalnog puta Notch1 ima glavnu ulogu u etiologiji humane T-ALL. (12) Uloga signalnog puta Notch u razvoju B- staničnih neoplazmi nije u potpunosti razjašnjena. Postoje istraživanja o signalnom putu Notch koji može sudjelovati u patogenezi multiplog mijeloma. (13-17) Tumorske plazma stanice imaju povećanu ekspresiju proteina NOTCH1/2 i liganda JAGGED1/2. (13, 14) U normalnim plazma stanicama nema ekspresije istih fenotipskih markera (NOTCH1,2, JAGGED1,2) ili tek pojedinačne stanice pokazuju slabi intenzitet. (13, 14) Postoje kontroverze o učinku aberantne ekspresije navedenih proteina na ponašanje tumorskih stanica. Prema nekim istraživanjima, inhibicija apoptoze i indukcija proliferacije su osnovne uloge Notch signalnog puta u patogenezi MM. (13, 14) Prema drugim istraživanjima, signalni put Notch inhibira proliferaciju i/ili inducira apoptozu u tumorskim plazma stanicama (TPS). (15-17) S obzirom da stanice MM mogu eksprimirati više od jednog liganda receptora NOTCH i/ili receptora NOTCH, priroda signalnog puta Notch ovisi o ukupnom profilu svih liganda receptora NOTCH i receptora NOTCH, tipu stanice, specifičnim citokinima/ faktorima rasta u mikrookolišu i količini signala Notch. (18) Činjenica je da TPS u koštanoj srži moduliraju ekspresiju citokina na stromalnim stanicama što dovodi do promjene mikrookoliša koji pruža potporu rastu tumorskih stanica. (19) Isto tako je moguće da TPS svojim utjecajem na

mikrookoliš u koštanoj srži utječu i na samu KMS mijenjajući ekspresiju pojedinih proteina, receptora na njenoj površini. Jedan od tih proteina receptora bi mogao biti NOTCH1 koji inhibira diferencijaciju i pospješuje proces samoobnavljanja KMS. Mogućnost da TPS mogu utjecati na mikrookoliš, na stanice niše u koštanoj srži, pa tako i na KMS koje se nalaze u njihovom mikrookolišu na način da mijenjaju ekspresiju pojedinih proteina na KMS predstavlja izazov za nove dijagnostičke i terapijske mogućnosti za bolesnike s hematološkim malignim bolestima.

Istraživanje se temelji na pretpostavci da postoji značajna razlika u ekspresiji proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u krvotvornim matičnim stanicama koštane srži infiltrirane tumorskim plazma stanicama i krvotvornim matičnim stanicama u zdravoj koštanoj srži kao i razlika u razini ekspresije i intenzitetu ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS koštane srži s različitim tipom infiltracije i diferencijacije tumorskih plazma stanica. Naime, pretpostavlja se da KMS u koštanoj srži difuzno infiltriranoj slabo diferenciranim tumorskim plazma stanicama imaju veću ekspresiju proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u odnosu na nedifuzno infiltriranu koštanu srž dobro diferenciranim tumorskim stanicama. Razlike u ekspresiji proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS mogle bi utjecati na diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu tumorskih plazma stanica. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati razine ekspresije proteina signalnog puta Notch, NOTCH1, JAGGED1 i DLL1, u uzorcima krvotvornih matičnih stanica bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma, kao i ekspresija istih proteina na tumorskim plazma stanicama pri čemu se analizirala povezanost KMS i tumorskih plazma stanica putem signalnog puta Notch uzimajući u obzir morfološka obilježja i citogenetičke promjene tumorskih plazma stanica. Spoznaja da bi ekspresija proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS u multiplom mijelomu mogla utjecati na diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu tumorskih plazma stanica, predstavlja izazov za nove dijagnostičke, terapijske mogućnosti za bolesnike s hematološkim bolestima. Mjerenje ekspresije tih proteina u KMS mogla bi pomoći i u predviđanju prognoze bolesti.

2. LITERATURNI PREGLED

2. 1. Razvoj, aktivacija i diferencijacija B limfocita u plazma stanice

Razvoj B limfocita započinje u koštanoj srži, nastavlja se u sekundarnim limfatičnim organima gdje se događa i aktivacija te terminalna diferencijacija B limfocita u plazma stanice. B limfociti, T limfociti i NK stanice potječu od zajednične limfatične progenitorske stanice. Ista potječe od multipotentne hematopoetske matične stanice, stanice iz koje potječu sve krvne stanice. Razvoj iz multipotentne hematopoetske matične stanice u usmjerene stanice razvoja B i T limfocita temeljno je načelo stanične diferencijacije. Postupno se stječu svojstva bitna za funkcioniranje zrele stanice, uz gubitak svojstava nezrelih stanica. Hematopoetske matične stanice se diferenciraju u multipotentne progenitorske stanice. Multipotentne progenitorske stanice mogu proizvoditi i limfatične i mijeloične stanice, ali su izgubile sposobnost samoobnavljanja. Multipotentne progenitorske stanice pomoću signalnih molekula mikrookoliša, kao što je FLT3, diferenciraju se u zajedničke limfatične progenitorske stanice. To su prve usmjerene progenitorske limfatične stanice iz kojih nastaje najranije usmjereni B limfocit, pro-B limfocit. (20) U razvoju B limfocita neovisno o antigenu u koštanoj srži postoje sljedeći razvojni stadiji: rani pro-B limfocit, kasni pro-B limfocit, veliki pre-B limfocit, mali pre-B limfocit i nezreli limfocit. U svakom slijedu razvoja preuređuje se samo jedan genski lokus. Prva preuredba čime nastaje pro-B limfocit uključuje preuredbu gena D, gena, te nastavlja preslagivanjem s genima V i J za teški lanac imunoglobulina (μ) IgM. Transkripcijski faktori E2A i EBF te RAG-1 i RAG-2 V(D)J rekombinaze odgovorni su za provedbu i kontrolu pruredbe gena. Nepravilnosti koje se javljaju tijekom rekombinacije gena V, D, J temelj su raznolikosti u repertoaru antitijela, ali isto tako rezultira i mnogim neuspješnim preuredbama gena. Zato pro-B limfociti trebaju mehanizam provjere da je proizveden potencijalno adekvatni funkcionalni teški lanac imunoglobulina. To čine ugradnjom funkcionalnog teškog lanca u receptor koji može signalizirati njegovu uspješnu sintezu. Ovaj test se odvija u odsutnosti lakih lanaca jer nije još došlo do preslagivanja gena za lake lance. Umjesto toga, pro-B stanice stvaraju dva nepromjenjiva 'surogat' proteina koji zajedno imaju strukturnu sličnost kao laki lanac i može se upariti s teškim lancem μ kako bi se formirao pre-B-stanični receptor (pre-BCR, engl. *pre-B cell receptor*). „Surogat“ laki lanci su kodirani genima čiju ekspresiju reguliraju E2A i EBE: $\lambda 5$ zbog strukturne sličnosti s C domenom

λ lakog lanca; i VpreB što nalikuje V domeni lakog lanca, ali ima dodatnu domenu na N-terminalnom kraju. Stvaranje pre-B-staničnog receptora važna je kontrolna točka koja posreduje prijelazu između pro-B stanica i pre-B stanica. Pre-B stanični receptor, koji se najvećim dijelom nalazi u citoplazmi dok se tek u manjoj mjeri nalazi na površini stanice, služi kao signal za daljnju fazu razvoja limfocita, preslagivanje gena za laki lanac imunoglobulina. Sintezom kapa i lambda lakih lanaca imunoglobulina završava se uspješna preuredba gena koja dovodi do sinteze cjelovitih kompletnih monomernih molekula IgM, čime prestaje navedena preuredba, a stanica postaje nezreli B limfocit. Pro-B limfociti koje ne uspiju sintetizirati cijelu molekulu IgM propadaju i u ovoj fazi se gubi minimalno 45% pro-B limfocita. Kako B limfociti sazrijevaju, migriraju unutar koštane srži, ostajući u kontaktu sa stromalnim stanicama, kreću se prema središnjem sinusu koštane srži. Završne faze razvoja nezrelih B limfocita u zrele B limfocite odvija se u perifernim limfatičnim organima kao što su limfni čvorovi ili slezena. (21,22) B limfociti prenose se krvlju u periferne limfatične organe koji imaju visoko organiziranu arhitekturu, s različitim područjima B limfocita i T limfocita određena interakcijama između limfocita i ostalih vrsta stanica koje čine periferne limfatične organe. Recirkulacija B limfocita putem limfe i krvi u periferne limfatične organe događa se neprekidno sve dok B limfocit ne dođe u kontakt s antigenom ili dok limfocit ne umre. Kada se susretne s antigenom, B limfocit prestaje recirkulaciju, proliferira i diferencira se, a ako limfocit umre, njegovo mjesto zauzima novi limfocit što omogućuje promjenu repertoara BCR i osigurava da broj limfocita ostane konstantan. (23) B limfociti koji dolaze iz koštane srži još uvijek su funkcionalno nezreli s visokom ekspresijom sIgM (površinski IgM), a niskom ekspresijom sIgD (površinski IgD), dok zreli B limfociti ekspimiraju niske razine IgM i visoke razine IgD. Većina nezrelih B limfocita se ne razvije u potpuno zrele B limfocite i čine tek 5-10% ukupne populacije B limfocita u perifernim limfatičnim organima. Većina perifernih zrelih B limfocita je dugovječna, a samo 1-2% njih umre svaki dan. Ovakva razlika posljedica je različitih regulatornih mehanizama kao posljedica natjecanja između perifernih B stanica za pristup folikulima u perifernim limfatičnim organima. Zbog ograničenog broja limfatičnih folikula koji ne mogu primiti sve B limfocite koje se stvaraju svaki dan postoji stalna konkurencija za ulazak u folikule. Prednost imaju zreli B limfociti koji su relativno dugovječni i stabilni periferni rezervoar B limfocita. Zreli B limfociti su prošli fenotipske promjene koje mogu olakšati njihov pristup folikulima, ekspimiraju CXCR5, receptor za CXCL13 (CXCL13 je ekspimiran na folikularnim dendritičkim stanicama),

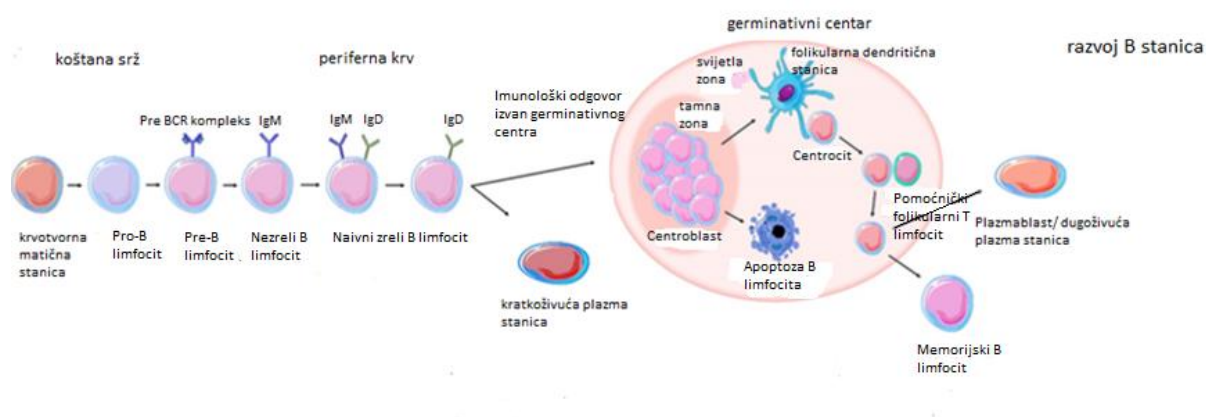
imaju povećanu ekspresiju CD21 čime je pojačana sposobnost signalizacije B limfocita. Za preživljavanje B limfocita potrebno je kontinuirana ekspresija BCR. (24) Aktivacija naivnih zrelih B limfocita pomoću antigena pokreće humoralni imunološki odgovor u kojem B limfociti proizvode antitijela. U humoralnom imunološkom odgovoru obično sudjeluju i pomoćnički T limfociti. Događa se tzv. gensko prekapčanje te se na površini izražavaju i drugi razredi imunoglobulina umjesto IgM. Aktivirani B limfociti diferenciraju se u plazma stanice koje izlučuju antitijela i u memorijske B limfocite. Nakon primarnog humoralnog imunološkog odgovora unutar primarnog mjesta aktivacije B limfocita dio proliferirajućih B limfocita diferencira se u plazmablaste koji sintetiziraju antitijela. Molekula antitijela građena je od dva teška i dva laka polipeptidna lanca. Vrsta određenog razreda antitijela ovisi o vrsti teških lanaca (α , γ , δ , μ , ϵ). Lanci su međusobno povezani disulfidnim mostovima kao četiri jedinice molekule. Trodimenzionalno molekula imunoglobulina čini oblik slova Y, građena od dva različita strukturna i funkcijska dijela. Domena Fab, obavlja funkciju prepoznavanja epitopa na antigenu, a domena Fc ima efektorsku funkciju tako što pokreće i određuje biološka svojstva imunološke reakcije. Dio tih B limfocita mogu migrirati u limfatični folikul i tamo se dalje diferencirati u plazma stanice. Plazmablasti su stanice koje su počele lučiti protutijela, ali se još uvijek mogu dijeliti te ekspimiraju brojne proteine slično aktiviranim B limfocitima pa time i plazmablasti mogu biti regulirani T limfocitima. Nakon nekoliko dana, plazmablasti u primarnom mjestu aktivacije B limfocita prestaju se dijeliti, i nakon toga ili umiru ili odlaze u terminalnu diferencijaciju u plazma stanice. Neke od plazma stanica ostaju u limfatičnim organima, gdje kratko žive, dok druge migriraju u koštanu srž i tamo nastavljaju proizvodnju antitijela. B limfociti se diferenciraju u memorijske B limfocite ili u plazma stanice koje izlučuju antitijela višeg afiniteta i promijenjenog izotipa imunoglobuliran tijekom drugog dijela primarnog imunološkog odgovora. Diferencijacija B limfocita u plazma stanice prate i brojne morfološke promjene stanica. Plazmablasti i plazma stanice imaju istaknuti perinuklearni Golgijev aparat i veliki hrapavi endoplazmatski retikulum koji je bogat imunoglobulinskim lancima koji se tamo sintetiziraju. Plazmablasti još uvijek ekspimiraju kostimulatorne molekule B7 i molekule MHC klase II, dok tih molekula nema više u krajnje diferenciranim plazma stanicama. Bez obzira na navedeno, T limfociti i dalje mogu slati važne signale za diferencijaciju i preživljavanje plazma stanica, putem IL-6 i liganda CD40. Plazmablasti također ekspimiraju relativno velik broj BCR na površini stanice, dok ih plazma stanice imaju mnogo manje. Ove niske razine površinskog

imunoglobulina mogu, međutim, biti fiziološki važne, jer se čini da je preživljavanje plazma stanica djelomično određeno njihovom sposobnošću da nastave vezati antigen. Plazma stanice mogu živjeti različito dugo, od samo nekoliko dana ili nekoliko tjedana nakon krajnje diferencijacije B limfocita, dok druge mogu živjeti vrlo dugo i odgovorne su za postojani humoralni imunološki odgovor. (25,26) Aktivirani B limfociti s pripadajućim T limfocitima migriraju u primarni limfatični folikul, gdje se nastavlja proliferacija i formacija germinativnog centra, odnosno stvara se sekundarni limfatični folikul. Germinativni centri sastoje se uglavnom od proliferirajućih B limfocita, a T limfociti koji su neophodni B limfocitima u humoralnom odgovoru čine oko 10% limfocita germinalnog centra. Proliferirajući B limfociti germinativnog središta istiskuju B stanice u mirovanju prema periferiji folikula, tvoreći stanice plaštene zone oko dva različita područja germinativnog centra aktiviranih B limfocita, svjetle i tamne zone. Događaji u primarnom mjestu aktivacije dovode do brzog izlučivanja specifičnih antitijela, uglavnom izotipa IgM, koja odmah štite zaraženu osobu. Nasuprot tome, reakcija germinativnog centra osigurava učinkovitiji kasniji humoralni odgovor, ako se radi o kroničnoj infekciji ili reinfekciji. B limfociti prolaze kroz nekoliko važnih modifikacija u germinativnom centru što rezultira učinkovitijim humoralnim odgovorom. Somatska hipermutacija koja mijenja gene V regije imunoglobulinskih lanaca je temelj procesa koji se naziva sazrijevanje afiniteta stanica pri čemu preživljavaju mutirani B limfociti različite specifičnosti i afiniteta za antigen. Osim toga, promjena izotipa antitijela omogućuje odabranim B limfocitima izražaj različite učinkovitosti stanica u obliku izlučivanja različitih izotipova antitijela. (27) B limfociti u germinativnom centru proliferiraju, u početku brzo, kao centroblasti, eksprimiraju kemokinske receptore CXCR4 i CXCR5, ali značajno smanjuju ekspresiju površinskog imunoglobulina, osobito IgD. Centroblasti proliferiraju u tamnoj zoni germinativnog centra. Stromalne stanice u tamnoj zoni proizvode CXCL12 (SDF-1), ligand za kemokin CXCR4 koji služi da centroblasti budu fizički zadržani u germinativnom centru. Vremenom, pojedini centroblasti usporavaju dijeljenje i ulaze u fazu rasta, dok u G1 fazi staničnog ciklusa prestaju eksprimirati CXCR4 i počinju proizvoditi više razine površinskog imunoglobulina. Takvi B limfociti nazivaju se centrociti. Gubitak CXCR4 omogućuje centrocitima da se pomaknu u svjetlu zonu, manje gusto zbijeno područje rahlije raspoređenih stanica. I dalje proliferiraju, ali ne tako kao u tamnoj zoni, a svjetla zona sadrži i obilje folikularnih dendritičkih stanica (FDC) koje proizvode kemokin CXCL13, ligand za CXCR5. (28,29) Široki repertoar ekspresije gena imunoglobulinskih lanaca BCR kao

posljedica somatske hipermutacije temelji se na točkastim mutacijama čime se mijenja jedna ili samo nekoliko aminokiselina u krajnjem produktu lanca imunoglobulina, stvarajući blisko povezane klonove B limfocita koji se suptilno razlikuju jedni od drugih u svojoj specifičnosti i afinitetu prema antigenu. Stopa mutacije gena koji su podvrgnuti somatskoj hipermutaciji je najveća u genima V-regije imunoglobulina gdje se mutacije događaju brzinom oko jedne promjene para baza na 10^3 parova baza po diobi stanice. Do hipermutacije dolazi djelovanjem enzima AID (aktivacija inducirana citidin deaminazom, engl. *activation induced cytidine deaminase*) koji uzrokuje točkaste mutacije u sekvenci imunoglobulina. Svaki od izraženih gena V-regije teškog i lakog lanca kodiran je s oko 360 parova baza, a otprilike tri od svake četiri promjene baza rezultiraju promijenjenom aminokiselinom u proteinskom lancu. To znači da postoji oko 50% šanse da će pri svakoj staničnoj diobi doći do mutacije BCR. Točkaste mutacije gena se nakupljaju postupno prilikom svake diobe jednog B limfocita u germinativnom centru kako bi se stvorili novi klonovi B limfocita. Promijenjeni BCR može utjecati na sposobnost vezivanja B limfocita za antigen i tako utjecati na sudbinu B limfocita u germinativnom centru.

(30) Većina točkastih mutacija ima negativan učinak na sposobnost vezivanja BCR za antigen tako što ne dolazi do ispravne promjene konformacije molekule imunoglobulina ili ne dolazi do ekspresije regije BCR koja služi kao komplementarni dio receptora na koji se veže antigen. S obzirom da više ne mogu stvarati funkcionalni BCR ili se ne mogu natjecati sa srodnim B limfocitima koji se jače vežu za antigen, takvi limfociti eliminiraju se apoptozom. Rjeđe, točkaste mutacije poboljšavaju afinitet BCR za antigen. Stanice koje sadrže te mutacije preživljavaju pa se time njihov broj povećava, uglavnom kao posljedica blokade apoptoze, manje kao povećanje proliferacije stanica. Smatra se da se somatska hipermutacija događa u centroblastima, a u centrocitima se povećava broj BCR na površini stanica i time postaju učinkovite u aktivaciji antigenom pomoću folikularnih dendritičnih stanica. Svakom diobom pojavljuju se novi, klonski srodni centrociti koji nose različite mutacije, pa time i izražaj novog BCR. (31) B stanični receptor koji može vezati antigen aktivirat će signalni put stimulacije centrocita prema novim ciklusima diobe kada ponovno eksprimiraju CXCR4 i ponovno postaju centroblasti. B limfocit tako ponovno ulazi u tamnu zonu gdje se proces mutacije i selekcije ponavlja. Ovaj široko prihvaćeni model dinamike migracije B limfocita unutar germinativnog centra poznat je kao model cikličkog kretanja limfocita. Centrociti koji ne uđu ponovno u tamnu zonu germinativnog centra ili ne napuste germinativni centar unutar nekoliko sati ulaze u

apoptozu. Tim procesom razvoja specifično pozitivno odabranih B limfocita se kontinuirano poboljšava prosječni afinitet populacije B limfocita na antigen u germinativnom centru. Proces selekcije može biti prilično strog i posljedica je i pozitivne i negativne selekcije B limfocita. B limfociti koji sintetiziraju antijela koja imaju veći afinitet za antigen prolaze kroz pozitivnu selekciju i preživljavaju. Suprotno tomu, B limfociti koji sintetiziraju nefunkcionalno antitijelo ili antitijelo sa smanjenim afinitetom za antigen, a kojih je mnogo više od onih koje uspiju sintetizirati antigen s većim afinitetom, prolaze kroz negativnu selekciju i konačno apoptozu. Time se sprječava brza proliferacija B limfocita do broja koji bi prerastao ostale stanice u limfatičnom tkivu. Pozitivna selekcija temelji se u nakupljanju brojnih zamjena aminokiselina u regijama koje određuju komplementarnost prema antigenu, a koje određuju specifičnost i afinitet antitijela. (32,33,34) Razvoj tumora plazma stanica je složen proces koji uključuje brojne heterogene promjene u B limfocitima. (35) Citogenetičke promjene, translokacije, aneuploidija, mutacije gena i epigenetičke promjene bitne su za početak i razvoj bolesti. Lomovi dvolančane DNA i spajanje s drugim nasumičnim lomovima DNA utječu na pojavu različitih numeričkih i strukturalnih abnormalnih citogenetičkih promjena koje mogu dovesti do razvoja limfoproliferativnih bolesti terminalno diferenciranih B limfocita, klonске proliferacije tumorskih plazma stanica. Smatra se da se početni događaji pojavljuju u germinativnom centru perifernog limfatičnog tkiva tijekom izotipske preuredbe imunoglobulina i somatske hipermutacije. (35) (Slika 1)



Slika 1. Shematski prikaz razvoja B limfocita. Preuzeto i prilagođeno prema Patel i sur (2021)

2.2. Multipli mijelom

Plazmastične neoplazme predstavljaju klonsku proliferaciju terminalnih, nedovoljno diferenciranih B-limfocita odnosno plazma stanica koje sintetiziraju monoklonski imunoglobulin (M protein). (36) Tumorske plazma stanice nastaju kao posljedica somatske hipermutacije gena za varijabilni dio teškog lanca imunoglobulina (*IGH*) i izotipskog prekapčanja imunoglobulinskog lanca u B-stanicama tijekom klonalne ekspanzije aktiviranih B- limfocita unutar germinativnog centra limfnog čvora.(37,38,39)

Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije multipli mijelom predstavlja plazmastičnu neoplazmu unutar heterogene skupine koju čine:

1. Ne- IgM monoklonska gamopatija neodređenog značenja (MGUS)
2. Multipli mijelom
 - 2.a. Asimptomatski (šuljajući) multipli mijelom
 - 2.b. Nesekretorni mijelom
 - 2.c. Plazmastična leukemija
3. Plazmacitom
 - 3.a. Solitarni plazmacitom kosti
 - 3.b. Ekstraosealni (ekstramedularni) plazmacitom
4. Bolest odlaganja monoklonalnih imunoglobulina
 - 4.a. Primarna amiloidoza
 - 4.b. Bolest odlaganja lakih i teških lanaca
5. Plazmastična neoplazma s pridruženim paraneoplastičnim sindromom
 - 5.a. POEMS sindrom (polineuropatija, organomegalija, endokrinopatija, M protein, kožne promjene)
 - 5.b. TEMPI sindrom (teleangiektazije, povišen eritropoetin i eritrocitoza, monoklonalna gamopatija, perinefritičko nakupljanje tekućine, intrapulmonalni „šantovi“)

MM čini oko 1% svih malignih tumora odnosno oko 10-15% svih hematoloških, limfoproliferativnih bolesti. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo njegova

učestalost (stopa incidencije na 100000 stanovnika) u Hrvatskoj iznosi 6,4 na 100.000 stanovnika godišnje. (40) Većinom obolijevaju starije osobe. Srednja dob pri postavljanju dijagnoze je 65 do 74 godine. Samo 10% bolesnika je mlađe od 50 godina. MM je nešto češći u muškaraca nego u žena, približno 1,4: 1. (41,42) Multipli mijelom (MM) je maligna hematološka bolest B-limfocita. Karakterizirana je klonskom proliferacijom tumorskih plazma stanica u koštanoj srži koje proizvode monoklonski imunoglobulin (M-protein) s posljedicama oštećenja tkiva/organa (CRAB, engl. *increased plasma calcium level, renal insufficiency, anemia, and bone lesions*). Anemija nastaje zbog infiltracije koštane srži klonalnim plazma stanicama. Razaranje koštanog tkiva nastaje kao posljedica širenja klonalnih plazma stanica u koštanom tkivu ili učinka citokina koje klonalne stanice izlučuju i kojima potiču osteoklaste na razgradnju kosti. Povećana koncentracija kalcija u serumu nastaje zbog razgradnje koštanog tkiva. Oštećenje tkiva i funkcije bubrega nastaje zbog prekomjernog taloženja slobodnih klonskih lakih lanaca imunoglobulina u bubrežnim tubulima, i zbog stvaranja proteinskih cilindara koji zatvaraju lumen tubula što posljedično dovodi do smanjene glomerularne filtracije i gubitka funkcije bubrega. Zatajenju bubrega pogoduje i povećana koncentracija kalcija u serumu koji doprinosi stvaranju proteinskih cilindara u tubulima bubrega. U 97% slučajeva multiplog mijeloma M protein se nalazi u serumu i / ili mokraći. Tek u oko 3% MM ne nalazi se M protein u serumu ili mokraći što predstavlja nesekretorni tip MM. U 50% slučajeva izotip imunoglobulina u MM je IgG, u 20% IgA, u 20% su to kappa (κ) ili lambda (λ) slobodni laki lanci imunoglobulina. Tek u manje od 10% slučajeva MM radi se o IgD i IgE izotipu imunoglobulina. (43)

2.2.1. Patogeneza multiplog mijeloma

U razvoju multiplog mijeloma moguća su četiri oblika bolesti:

Monoklonska gamopatija neodređenog značenja (MGUS, engl. *monoclonal gammopathy of unknown significance*), indolentna, asimptomatska, premaligna faza bolesti koju karakterizira klonska populacija malog broja tumorskih plazma stanica unutar koštane srži (<10% stanica). U serumu je prisutan M protein u koncentraciji <3 g/dL. MGUS se pojavljuje u 3% populacije starije od 50 godina. Prevalencija progresije MGUS-a u MM je 1% godišnje.

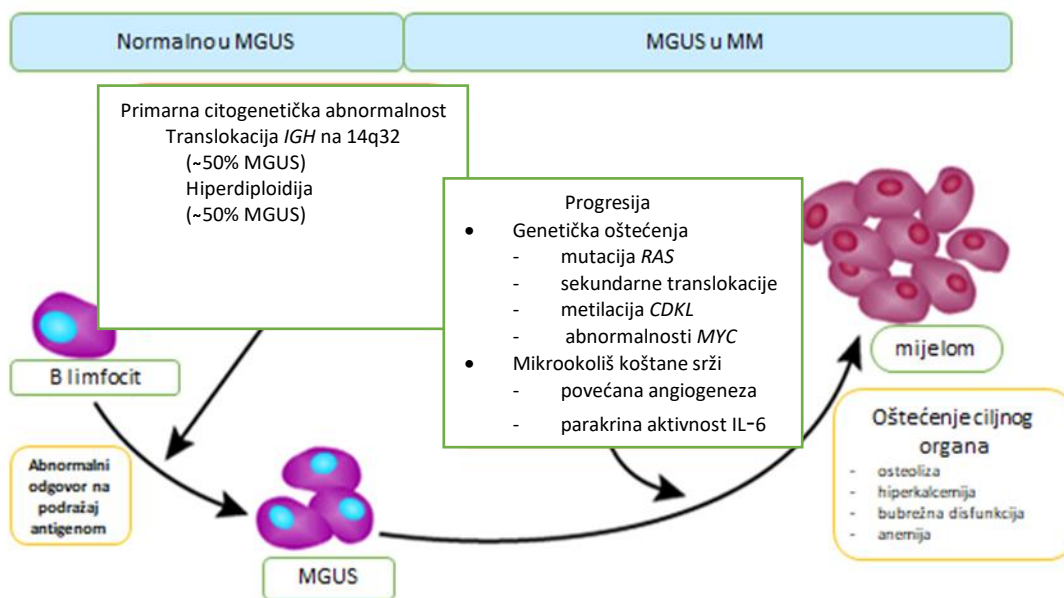
Šaljajući multipli mijelom (SMM, engl. *smoldering multiple myeloma*), asimptomatski oblik MM. Koncentracija serumskog M proteina je >3 g/dL. U koštanoj srži ima $>10\%$ tumorskih plazma stanica. Prevalencija progresije SMM u MM iznosi 10% godišnje. (43,44).

Multipli mijelom je karakteriziran serumskim monoklonskim (M) proteinom kojeg proizvode i izlučuju TPS. U koštanoj srži se nalazi više od 10% klonskih tumorskih plazma stanica uz prisutnost barem jednog od četiri znaka oštećenja organa ili tkiva (povišena razina kalcija u serumu, povišena razina kreatinina u serumu kao znak oslabljene funkcije bubrega, anemija, osteolitičke lezije kosti) ili je u koštanoj srži $\geq 60\%$ TPS ili je omjer slobodnih lakih lanaca u serumu ≥ 100 ili je prisutna više od jedna osteolitička lezija. Prevalencija progresije u plazmastičnu leukemiju iznosi $0,5$ do 4% godišnje. (45)

Plazmastična leukemija (PCL, engl. *plasma cell leukemia*), plazmastična neoplazma s minimalno 5% TPS u perifernoj krvi. PCL je brzo progresivna i smrtonosna bolest koja se može pojaviti kao progresija MM-a (sekundarna PCL) ili kao primarna PCL ako se pojavljuje *de novo*. (45,46) Unatoč velikom napretku u razumijevanju patogeneze multiplog mijeloma, još uvijek je u velikoj mjeri nemoguće predvidjeti kako i kada će doći do progresije MGUS-a u multipli mijelom i zašto se samo vrlo mali udio MM može razviti u vrlo agresivnu PCL. (47,48)

2.2.2. Citogenetičke promjene u plazmastičnim novotvorinama

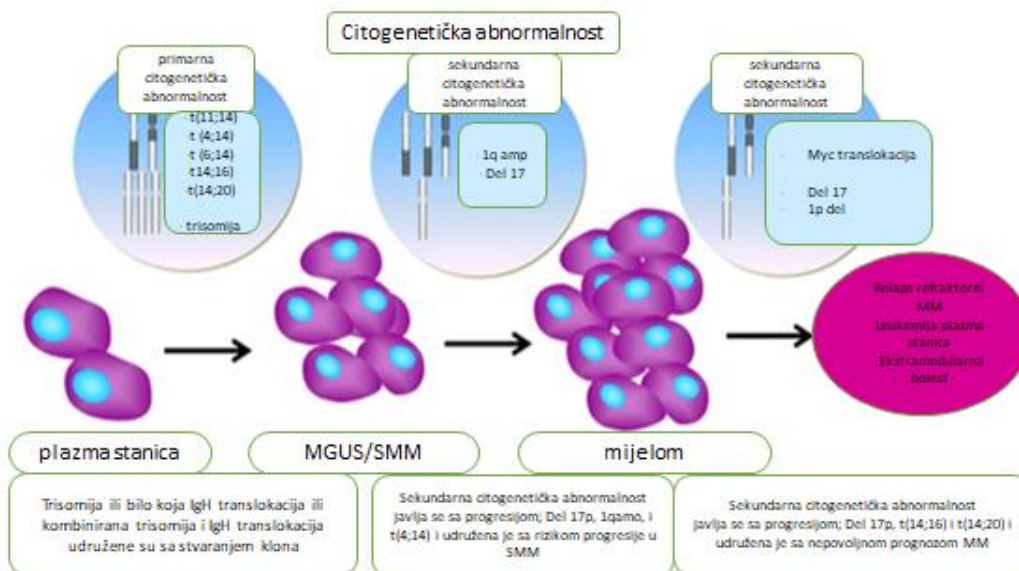
Citogenetičke promjene u tumorskim plazma stanicama pojavljuju se već u MGUS-u. Smatraju se odgovornima za atipični odgovor tumorskih plazma stanica na antigenu stimulaciju s posljedičnom klonskom proliferacijom plazma stanica. Početak ograničene klonske proliferacije plazma stanica u MGUS-u je posljedica kumulativnog oštećenja stanice, potaknuta abnormalnim odgovorom na antigenu stimulaciju, utjecaja vanjskih čimbenika i tipičnih primarnih citogenetičkih aberacija, hiperdiploidije ili translokacija gena *IGH*. Razvoj ili progresija MGUS-a u MM posljedica je dodatnih citogenetičkih i molekularnih promjena u tumorskim plazma stanicama, te promjena u samom mikrookolišu koštane srži. (49) (Slika 2)



Slika 2. Patogeneza progresije monoklonske gamopatije neodređenog značaja u multipli mijelom. Preuzeto i prilagođeno prema Rajkumar (2009)

MM je citogenetički i molekularno heterogena bolest s brojnim citogenetičkim i molekularnim promjenama od kojih su neke specifične i mogu se povezati s kliničkim znakovima i prognozom bolesti. (50) Citogenetičke abnormalnosti koje se pojavljuju u fazi transformacije normalnih plazma stanica u klonske plazma stanice, što uključuje i MGUS, nazivaju se primarnim abnormalnostima, a one koje se događaju kasnije u razvoju bolesti, te u progresiji bolesti koja može biti rezistentna na terapiju nazivaju se sekundarnim citogenetičkim abnormalnostima. (51,52,53) (Slika 3) Dvije glavne skupine primarnih citogenetičkih abnormalnosti u MM su „hiperdiploidna“ i „nehiperdiploidna“ skupina. Hiperdiploidna skupina je karakterizirana dodatnom kopijom jednog ili više neparnih kromosoma (kromosomi 3, 5, 7, 9, 11, 15, 17). U „nehiperdiploidnoj“ skupini nalazi se visoka prevalencija translokacija gena *IGH* (>85 %) i delecija regije 13q34. Najčešće primarne translokacije gena *IGH* su $t(11;14)(q13;q32)$, $t(4;14)(p16;q32)$, $t(6;14)(p21;q32)$, $t(14;16)(q32;q23)$ i $t(14;20)(q32;q11)$. (54) Translokacije *IGH* gena su prisutne u 35 - 50% MGUS-a, te u 50 – 70% MM. U malom broju slučajeva multiplog mijeloma nalaze se istovremeno i numeričke i strukturne citogenetičke promjene (trisomije i translokacije), ali se općenito smatra da se primarne citogenetičke grupe ne

preklapaju. Za razliku od primarnih citogenetičkih abnormalnosti, sekundarne citogenetičke promjene se preklapaju i u istom multiplom mijelomu mogu se pojaviti različite sekundarne citogenetičke abnormalnosti. (55)



Slika. 3. Citogenetičke abnormalnosti u multiplom mijelomu. Preuzeto i prilagođeno prema Rajan, Rajkumar (2015)

Jedna od najranijih primarnih citogenetičkih abnormalnosti je monosomija 13 ili del (13q34). (56) Monosomija 13/del(13q34) rani je događaj u patogenezi MM-a i pojavljuje se i do 50% u MGUS-u. (57) Delecija kromosoma 17 tipično se pojavljuje kasnije u tijeku bolesti. Nalaz delecija regije 17p13.1 ili monosomija 17 u SMM-u ukazuje na visok rizik za progresiju bolesti u MM. (57,58) Druge sekundarne citogenetičke abnormalnosti koje utječu na biologiju bolesti su translokacija *C-MYC* gena i del(1p). Obje su povezane s nepovoljnom prognozom MM. (59,60, 61) Citogenetičke abnormalnosti imaju utjecaj na rizik progresije SMM u MM. (56) Postojeće citogenetičke abnormalnosti mogu imati potpuno drugačije značenje ovisno o kliničkom obliku bolesti. Trisomije su povezane s većim rizikom transformacije SMM u MM, ali s nižim rizikom progresije od pojave MM do krajnjeg stadija bolesti. (57,58) Otkrivanje i tumačenje citogenetičkih abnormalnosti u MM je od presudne važnosti za biologiju i prognozu MM. Loši prognostički čimbenici multiplog mijeloma, citogenetičke promjene visokog rizika su: $t(4;14)(p16;q32)$, $t(14;16)(q32;q23)$, $t(14;20)(q32;q11)$, del(13q34), del(17p13.1) i trisomija 1q.

Citogenetičke promjene standardnog rizika uključuju trisomije, t(11;14)(q13;q32) i t(6;14)(p21;q32). (62)

Adekvatni dijagnostički i terapijski pristup MM temelji se na poznavanju patogeneze multiplog mijeloma, a koja obuhvaća citogenetičke i molekularne promjene, te posljedično promjene brojnih staničnih signalnih puteva.

2.2.3. Morfološka obilježja multiplog mijeloma

Primarno sjelo tumorskih plazma stanica je koštana srž. Tumorske plazma stanice mogu infiltrirati koštanu srž intersticijski, nodularno i difuzno. Tip infiltracije ovisi o stadiju bolesti. U slučaju infiltracije koštane srži tumorskim stanicama, stanice hematopoeze koštane srži su reducirane, a stupanj gubitka stanica hematopoeze ovisi o tipu infiltrata i količini tumorskog tkiva u koštanoj srži. (63) Intersticijski i nodularni tip infiltracije se uočava u stadiju kada je hematopoeza još uvijek očuvana kao i arhitektura koštane srži. Kod difuzne infiltracije hematopoeza je potisnuta, a arhitektura koštane srži nije održana. Tijekom progresije bolesti može doći i do pojave difuznog infiltrata u koštanoj srži koja je prethodno bila zahvaćena intersticijskim ili nodularnim tipom infiltrata TPS. Citološka obilježja TPS ukazuju na stupanj diferencijacije tumorskih stanica, te mogu biti dobro, umjereno i slabo diferencirane. Dobro diferencirane stanice niskog stupnja malignosti vrlo su slične poliklonskim, normalnim plazma stanicama. Umjereno diferencirane TPS umjerenog stupnja malignosti pokazuju umjerenu polimorfiju, vidljivu jezgricu, a TPS visokog stupnja malignosti su slabo diferencirane stanice koje karakterizira visoki omjer jezgre i citoplazme, nepravilne konture jezgre s istaknutom jezgrićom. Imunohistokemijskim bojenjem biljega CD138 i CD38 izraženih u TPS omogućuje se bolja vizualizacija udjela i distribucije TPS u MM u koštanoj srži, a biljezima kappa i lambda potvrđuje se klonska proliferacija plazma stanica u koštanoj srži. Imunofenotipizacijom TPS metodom protočne citometrije prikazuje se prisutnost osnovnih antigena na površini plazma stanica CD38 i CD138. Aberantni antigeni koji nisu prisutni na normalnim plazma stanicama, a prisutni su u gotovo u 90% slučajeva malignih plazma stanica su CD56, CD200, CD28, CD117, CD20, CD52. Ekspresija CD19, CD28 i CD200, nedostatak ekspresije CD45 ili CD117, te slaba ekspresija CD27 su udruženi s agresivnijom biologijom bolesti. (64)

2.2.4. Dijagnoza multiplog mijeloma

Dijagnoza multiplog mijeloma temelji se na kliničkim, morfološkim, imunološkim i radiološkim obilježjima. Internacionalna radna skupina za multipli mijelom (*The International Myeloma Working Group*- IMWG) predstavila je kriterije za dijagnozu multiplog mijeloma: Prisutnost >10% klonskih TPS ili biopsijom dokazan multipli mijelom u koštanoj srži uz prisutnost jednog ili više obilježja multiplog mijeloma. Obilježja multiplog mijeloma uključuju prisutnost barem jednog od znakova oštećenja organa ili tkiva, CRAB kriteriji ili prisutnost jednog ili više biomarkera zloćudnosti. Znakovi oštećenja organa ili tkiva su sljedeći: kalcij u serumu je minimalno za 0,25 mmol/L (>1 mg/dL) veći od gornje granice referentne vrijednosti kalcija ili je vrijednost kalcija u serumu veća od 2,75 mmol/L (>11 mg/dL), klirens kreatinina <40 mL/min ili je serumski kreatinin >177 μmol/L (>2 mg/dL), vrijednost hemoglobina je minimalno za 20 g/L manja od donje granice normalne vrijednosti ili je vrijednost hemoglobina manja od 100 g/L, prisutnost barem jedne osteolitičke lezije promjera ≥5 mm vidljive na rendgenskoj snimci skeleta ili drugim radiološki osjetljivijim metodama. Biomarkeri zloćudnosti su: prisutnost više od 60% klonalnih tumorskih stanica u koštanoj srži, omjer uključenih/neuključenih lakih lanaca u sintezu M-proteina ≥100, prisutnost više od jedne osteolitičke lezije promjera ≥5 mm vidljive u nalazu magnetske rezonance. Klonalnost se utvrđuje omjerom kappa / lambda lakih lanaca. Normalan omjer u serumu je 0,26 do 1,65, a u MM kappa / lambda omjer je ≤1/16 ili ≥16 ovisno o tipu lakog lanca u MM. Klonalnost se dokazuje se jednom od metoda, imunofenotipizacijom protočnom citometrijom, imunohistokemijskom ili imunofluorescentnom metodom.

Osim postavljanja dijagnoze, MM se klasificira i prema stadiju bolesti, jer klasifikacija ima i prognostičko značenje. Koriste se dvije osnovne klasifikacije: klasifikacija međunarodnog sustava (ISS) i Durie-Salmon klasifikacija, te dodatno revidirana klasifikacija međunarodnog sustava (R-ISS). (65, 66)

ISS klasifikacija stadija MM temelji se na kriterijima:

1. Stadij I - β_2 mikroglobulin <3,5 mg/L i serumski albumin ≥3,5 g/dL
2. Stadij II - vrijednosti parametara između stadija I i stadija III
3. Stadij III - β_2 mikroglobulin >5,5 mg/L

Revidirana klasifikacija međunarodnog sustava (R-ISS) uključuje sve čimbenike uključene u ISS klasifikaciju uz dodatak kriterija vrijednosti serumske laktat dehidrogenaze (LDH) i prisustva visoko rizičnih citogenetičkih promjena:

1. Stadij I - β_2 mikroglobulin $<3,5$ mg/L i serumski albumin $\geq 3,5$ g/dL i normalne vrijednosti LDH i bez prisutnosti del(17p13.1), t(4;14)(p16;q32) ili t(14;16)(q32;q23)
2. Stadij II - vrijednosti parametara između stadija I i stadija III
3. Stadij III - β_2 mikroglobulin $>5,5$ mg/L i LDH iznad normalnih vrijednosti i/ili prisutnost bar jedne od navedenih kromosomskih poremećaja: del(17p13.1), t(4;14)(p16;q32) ili t(14;16)(q32;q23).

Durie-Salmon sustav klasifikacija stadija MM:

1. Stadij I – Hemoglobin >10 g / dl; serumski kalcij normalan ili $<12,5$ mg / dL; bez osteolitičkih lezija ili solitarna lezija; IgG <5 g/dL, IgA <3 g/dL, laki lanci u urinu <4 g/24h
2. Stadij II - Vrijednosti parametara između stadija I i stadija III
3. Stadij III - Hemoglobin $<8,5$ g / dl ili serumski kalcij $>12,5$ mg / dL ili više od 3 osteolitičke lezije ili IgG >7 g/dL, IgA >5 g/dL ili laki lanci u urinu >12 g/24h.

Podtip A: vrijednost kreatinina <2 mg/dL; Podtip B: vrijednost kreatinina ≥ 2 mg/dL

2.2.5. Terapija multiplog mijeloma

Prema dosadašnjim podacima i smjernicama u liječenju MM, radi se o neizlječivoj bolesti. Cilj terapije je postići kompletnu remisiju bolesti ili što je više moguće smanjiti tumorsku masu i postići što dulje preživljenje. Kompletna remisija znači nedetektabilan M protein u serumu i urinu metodom imunofiksacije, nepostojanje tumorskih stanica u bilo kojem mekom tkivu organizma i manje od 5% tumorskih stanica u patohistološkom nalazu aspirata koštane srži. (67) Izbor liječenja ovisi o tome da li je bolesnik s multiplim mijelom kandidat za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica (KMS) ili nije. U liječenju bolesnika koji su kandidati za transplantaciju KMS koristi se klasična kemoterapija ili novi lijekovi kao što je bortezomib. Bortezomib je inhibitor proteasoma. Novosintetizirani proteini, monoklonski lanci imunoglobulina se u endoplazmatskom retikulumu (ER) savijaju u odgovarajuću konformaciju. Pogrešno savijeni odlaze u citosol gdje ih razgrađuju proteasomi. Inhibicija proteasoma potiskuje

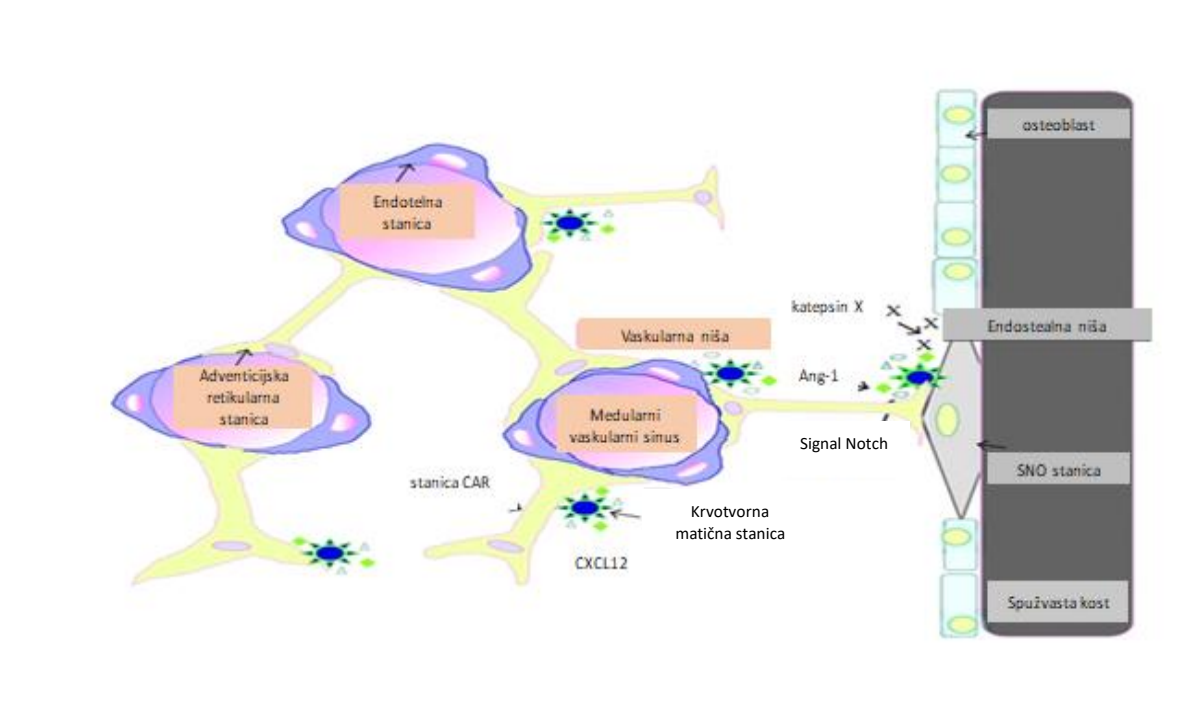
razgradnju i recikliranje proteina i aminokiselina iz pogrešno savijenih proteina, uzrokujući nakupljanje ovih pogrešno savijenih proteina u ER-u što dovodi do preopterećenja ER-a, stvaranja viška kisika i funkcionalnog poremećaja unutarstaničnih proteina, što na kraju dovodi do apoptoze i stanične smrti. Bortezomib sprječava razgradnju inhibitora NF- κ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) čime se stabilizira proteinski kompleks NF- κ B i njegovog inhibitora, I κ B α , i time spriječava njegova translokacija u jezgru čime su inaktivirani višestruki signalni putevi bitni u razvoju MM, a promjenom mikrookoliša koštane srži smanjuje se adhezija TPS na stanice mikrookoliša što još dodatno povećava osjetljivost TPS na apoptozu. Bortezomib ometa i parakrini rast stanica multiplog mijeloma u mikrookolišu koštane srži putem supresije molekula stanične adhezije, kao što je VLA-4 (engl. *very late antigen-4*) u tumorskim plazma stanicama i inhibicije izlučivanja IL-6 (interleukin-6), VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*), IGF-1 (engl. *insulin-like growth factor-1*) iz stromalnih stanica koštane srži čime se smanjuje interakcija tumorskih plazma stanica sa stanicama mikrookoliša. (69,70,71,72) Talidomid ima antiangiogenu i imunomodulatornu aktivnost i direktan utjecaj na TPS. Imunomodulatorno djelovanje temelji se na njegovoj sposobnosti da mijenja i smanjuje izlučivanje citokina endotelnih stanica i monocita. Smanjuje ekspresiju ICAM1 (unutarstaničnih adhezijskih molekula, engl. *intercellular adhesion molecule 1*), VCAM (vaskularnih staničnih adhezijskih molekula, engl. *vascular cell adhesion molecule 1*) i selektina na endotelnim stanicama koji posreduju u udomljavanju TPS u koštanu srž, a uključene su i u rast i preživljavanje TPS. (73) Imunomodulacijski lijekovi pokazuju antitumorsku aktivnost u MM kroz izravnu inhibiciju rasta tumorskih plazma stanica u mikrookolišu koštane srži i promicanje funkcije stanica imunološkog odgovora. Talidomid i njegovi derivati induciraju proteasomsku degradaciju transkripcijskih faktora porodice Ikaros i Aiolos. Ikaros i Aiolos su anti-apoptotički čimbenici transkripcije u tumorskim plazma stanicama. Njihova degradacija dovodi do smanjene proliferacije i apoptoze tumorskih plazma stanica te povećanog antitumorskog imunološkog odgovora. Smanjenje ekspresije transkripcijskih čimbenika porodice Ikarosa i Aiologa dovodi do smanjenja regulacije *MYC* (*MYCC*) i interferonskog regulatornog faktora 4 (*IRF4*), dva onkogeni koji su odgovorni za rast i preživljavanje tumorskih plazma stanica. Navedeni su najvažniji mehanizmi antiproliferativnog i proapoptotskog djelovanja posredovanog imunomodulatornim lijekovima. Ciklofosfamid je alkilirajući lijek koji sprječava sintezu DNA i stvaranje RNA te posljedično inhibira sintezu

proteina. Učinak indukcijske terapije se procjenjuje nakon 2-4 ciklusa terapije a cilj je postići najmanje vrlo dobru parcijalnu remisiju (VDPR) prema kriterijima Internacionalne radne skupine za multipli mijelom. (74) Postupak prikupljanja perifernih KMS za transplantaciju (leukaferaza) provodi se nakon primjene visokih doza ciklofosfamida, uz primjenu čimbenika koji stimulira rast granulocitne loze (*G-CSF*, engl. *granulocyte colony stimulating factor*). Cilj leukaferaze je prikupiti dovoljan broj KMS za dvije transplantacije (optimalno dva puta po $\geq 3,5 \times 10^6$ CD 34+/kg tjelesne težine; minimalno dva puta po 2×10^6 CD34+/kg tjelesne težine). Kondicioniranje se provodi melfalanom u ukupnoj dozi od 200 mg/m² (140 mg/m² za starije od 65 godina te one s oštećenjem bubrežne funkcije) primijenjenoj kroz dva dana. Nakon dva dana od primijenjene kemoterapije slijedi reinfuzija autolognih KMS u bolesnika. Specifično kretanje ili migracija KMS iz periferne krvi kroz endotelne stanice vaskularnih sinusa u ekstravaskularne hematopoetske tračke koštane srži zove se udomljavanje. Daljnji postupak liječenja nakon transplantacije KMS ovisi o prisutnosti visokorizičnih citogenetičkih promjena i ostvarivaju kompletne remisije. (68)

2.3. Krvotvorna matična stanica

Krvotvorne matične stanice (KMS) su primitivne multipotentne stanice koje imaju mogućnost samoobnavljanja i diferencijacije u sve vrste krvnih stanica, uključujući stanice mijeloične i limfocitne loze. (75) Primarno se nalaze u koštanoj srži, ali ih se može naći i u perifernoj krvi, te u krvi pupkovine. Krvne stanice su mezodermalnog podrijetla. Hematopoeza se odvija u tri različite faze na različitim mjestima tijekom embrionalnog razvoja. Tijekom ranog embrionalnog razvoja, prva faza, primitivna hematopoeza započinje u žumanjčanoj vreći. (76) Primarna funkcija primitivne hematopoeze je stvaranje privremenih nezrelih eritroblasta koji su potrebni embriju za oksigenaciju, zatim embrionalnih makrofaga koji su potrebni za imunološki odgovor, te primitivnih megakariocita koji su potrebni za održavanje homeostaze u cirkulaciji. (77,78,79) U ovoj fazi primitivna hematopoeza je kratka i privremena te se brzo zamjenjuje definitivnom hematopoezom zrelog tipa. Druga faza hematopoeze odvija se također u žumanjčanoj vreći, kada se stvaraju eritroblastne, mijeloične i limfatične nezrele stanice koje se diferenciraju u krvne stanice s osobinama i funkcijama zrelih krvnih stanica. (79,80) U trećoj fazi hematopoeze, u fetalnoj fazi razvoja, dolazi do stvaranja KMS u fetalnom retroperitoneju, naboru tkiva uz fetalnu

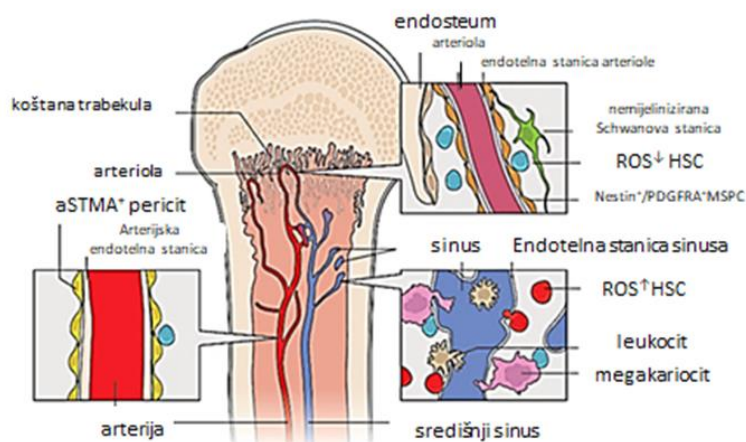
aortu naziva aorta-gonada-mezonefros jer daje osnovu i za razvoj drugih organa, a odakle stanice koje okružuju fetalnu aortu pupaju u njen lumen i postaju KMS. (81,82) Nakon toga, KMS migriraju u jetru i slezenu fetusa, a nakon rođenja u koštanu srž. (83) KMS također mogu migrirati izvan koštane srži u uvjetima kada hematopoeza u koštanoj srži nije dostatna za proizvodnju krvnih stanica bilo zbog infiltracije koštane srži tumorskim stanicama ili fibroznim tkivom ili u stanju teške hipoksije. Udomljavaju se u jetri i slezeni, u onim organima gdje je hematopoeza i bila prije prisutna. U zdrave, odrasle osobe, dnevno nastane oko 10^{12} novih, zrelih krvnih stanica u koštanoj srži. (84) U procesu hematopoeze, KMS se diferencira u usmjerene matične stanice mijeloične i limfatične loze. (1) Iz mijeloičnih matičnih stanica nastaju nezreli i prijelazni oblici granulocita i monocita/makrofaga te megakarioblasti i eritroblasti. (85) Iz limfatičnih matičnih stanica nastaju nezreli T limfociti i NK stanice (NK, engl. *natural killer*), te nezreli B-limfociti i dendritične stanice. Iz nezrelih krvnih stanica diferencijacijom nastaju eritrociti, granulociti (neutrofilni, eozinofilni, bazofilni), trombociti, B i T limfociti te NK stanice. (86) KMS izražava biljeg CD34 na staničnoj površini. Molekula CD34 je transmembranski protein. (87) KMS čine samo 0,003% stanica koštane srži, dok je u perifernoj krvi njihov broj još manji, 0,11% u odnosu na ukupan broj leukocita. (88) Osim CD34 pozitivnih KMS koje su odgovorne za glavninu hematopoetske aktivnosti u koštanoj srži i u obnavljanju hematopoeze u imunokompromitiranog i subletalno ozračenog primatelja, istraživanja su pokazala da postoji i populacija stanica koja ne eksprimira CD34, a koja ima aktivnost matičnih stanica te iz njih mogu nastati CD34 pozitivne stanice. (89) Moguće je da fenotip KMS varira sa stupnjem njihove aktivacije te da je CD34 antigen reverzibilno izražen na KMS. Moguće je da je biljeg CD34 izražen na aktiviranim matičnim stanicama koje se samoobnavljaju ili diferenciraju, dok stanice u mirovanju ponovno preuzimaju CD34 negativni fenotip. (90,91) KMS su smještene u niši koštane srži koja predstavlja njihov mikrookoliš. Ona igra temeljnu ulogu u njihovom održavanju i diferencijaciji. Iz mikrookoliša KMS dobivaju različite podražaje koji određuju njihovu sudbinu. (92) Višestruki čimbenici kao što su stanice niše, citokini, signali, izvanstanični matriks i gradijent koncentracije kisika reguliraju aktivnosti KMS, izravno ili neizravno. (93) U tome prednjače endotelne stanice, mezenhimske matične stanice i mezenhimske progenitorne stanice koje izražavaju CXCL12 (CXC kemokinski ligand 12), ligand za CXC kemokinski receptor tip 4 (CXCR4) i proizvode angiopoetin i čimbenik rasta matičnih stanica (*SCF*, engl. *stem cell stimulating factor*). (94) (Slika 4)



Slika 4. Niše krvotvornih matičnih stanica u koštanoj srži. Preuzeto i prilagođeno prema Nagasawa , Omatsu, Sugiyama (2011)

Niše koštane srži u kojima su KMS u blizini osteoblasta nazivaju se endostealne niše, a one u kojima se KMS nalaze u blizini endotelnih stanica nazivaju se perivaskularne niše. KMS su u kontaktu sa SNO stanicama (vretenasti osteoblasti koji ekspimiraju N kaderin), osteoblastima koji oblažu kosti, unutar endostealne niše. Osteoblasti proizvode nekoliko signalnih molekula kao što su ligandi receptora Notch, angiopoetin-1 (Ang-1), CXCL12 i katepsin X koji posreduju u kontroli i održavanju KMS. Većina KMS se nalazi u sinusoidima, prijanjaju uz CAR stanice (retikularne stanice koje proizvode CXCL12). koje okružuju sinusoidne endotelne stanice (retikularna niša). CAR stanice proizvode CXCL12 u suradnji s CXCR4 signalizacijom koja je osnovna za održavanje KMS. KMS koje se nalaze u endostealnoj niši borave u uvjetima relativne hipoksije, miruju i imaju mogućnost samoobnavljanja što je važno dugoročno za hematopoezu i dugoročno skladištenje KMS. (96) To su LT- KMS (LT, engl. *long term*). KMS koje borave u vaskularnoj niši zovu se ST- KMS (ST, engl. *short term*). One imaju sposobnost diferenciranja u mijeloičnu i limfatičnu lozu stanica koje zatim odlaze u perifernu cirkulaciju. Obje niše djeluju zajedno u održavanju homeostaze hematopoeze. KMS koje su bile u stanju

mirovanja mogu se u uvjetima stresa ili ozljede izdvojiti iz endostealne niše i migrirati prema središtu koštane srži u vaskularnu nišu koja potiče proliferaciju i diferencijaciju KMS. KMS mogu napustiti koštanu srž i ući u cirkulaciju. Taj proces se zove mobilizacija KMS. Mobilizaciju KMS u cirkulaciju može potaknuti nekoliko hematopoetskih citokina, npr. G-CSF, čimbenik rasta granulocitne loze (engl. *granulocyte colony-stimulating factor*), GM-CSF, čimbenik rasta granulocitno- monocitne loze (engl. *granulocyte-monocyte colony stimulating factor*) i trombopoetin. (97) Vraćanje KMS u koštanu srž predstavlja ponovno udomljavanje. (98) Osim činjenice da se mirujuće KMS-e nalaze u endostealnim nišama, uočeno je da se one u koštanoj srži nalaze bliže arteriolama nego sinusoidama. (99) Različite krvne žile su izgrađene od različitih tipova endotelnih stanica i okružene različitim perivaskularnim stanicama kao što su živčane stanice, mezenhimske nezrele stanice i megakariociti što utječe na održavanje KMS. (100,101,102,103) Upravo prostori između krvnih žila i okolnih stanica čine različite niše u kojima KMS miruju ili postaju aktivne u smislu proliferacije i diferencijacije. Uočeno je da postoji razlika u metaboličkoj aktivnosti KMS koja ovisi o poziciji KMS, ali i o količini slobodnih radikala kisika (ROS) koji se nalaze u mikrookolišu KMS. KMS koje se nalaze uz male arteriole proksimalno od endostalnih zona imaju nisku razinu ROS-a i uglavnom miruju, slabije su metabolički aktivne. KMS koje se nalaze uz sinusoide imaju visoku razinu ROS-a, metabolički su aktivnije u smislu proliferacije i diferencijacije. (104) (Slika 5)



Slika 5. Niše koštane srži u kojima borave KMS s prikazom količine slobodnih radikala kisika (ROS) u njihovom mikrookolišu. Preuzeto i prilagođeno prema Zhao , Li (2016)

Stijenke sinusoida su puno propusnije od arterija i malih arteriola što olakšava izlazak KMS u cirkulaciju. Izlaganje KMS perifernoj krvi povećava razinu ROS-a što potiče diferencijaciju KMS, a umanjuje njezinu sposobnost dugotrajnog samoobnavljanja. (104) Slijedom ovih saznanja, Itkin i sur. su predložili način na koji bi poboljšali kvalitetu KMS-a koje se koriste u kliničke svrhe za transplantaciju kod malignih hematoloških bolesti. KMS koje se koriste za transplantaciju najčešće se prikupljaju iz periferne krvi postupkom leukaferenze pri čemu periferna krv prolazi kroz stanični separator, centrifugira se, pri čemu se, zbog djelovanja centrifugalne sile, krvne stanice zbog svoje različite specifične težine razdvajaju u različite slojeve u krvnoj struji. Međutim, na temelju prethodnih saznanja, izloženost plazmi iz periferne krvi dovodi do povećanja razine ROS-a u KMS što može značajno ugroziti njihov potencijal dugoročne samoobnove. (106) Zato bi trebalo u kliničkoj praksi razmotriti vremensko ograničenje izloženosti KMS u perifernoj krvi ili korištenje antioksidansa (ROS čistača), N-acetil-L-cisteina za zaštitu mobiliziranih KMS kako bi one što duže zadržale svoje svojstvo dugoročnog samoobnavljanja.

2.3.1. Mikrookoliš krvotvornih matičnih stanica

Mikrookoliš (niša) u kojoj se nalaze KMS sadrži brojne stanice i molekule koje imaju različite uloge i na različite načine doprinose održavanju KMS:

- Uloga osteoblasta

Dokazano je, *in vivo*, da osteoblasti reguliraju broj i funkciju KMS. Uočeno je da se broj osteoblasta povećava uslijed aktivacije paratireoidnog hormona, a time se povećava broj KMS *in vivo*. (107) U istraživanju Chitteti i sur. je utvrđeno da Notch signalizacija potiče hematopoezu pomoću osteoblasta koji eksprimira ne samo ligand JAGGED1, već i ligande JAGGED2, DLL1, DLL4, te ciljne gene *HES1 i 5 i DELTEX*. (108)

- Uloga endotelne stanice

Endotelne stanice oblažu unutarnju stijenku svih krvnih žila. Ligandi receptora NOTCH 1, osobito JAGGED1 koji je izražen na endotelnim stanicama potiču proliferaciju KMS *in vitro* i *in vivo*. (109,110) Unutar vaskularne niše endotelne stanice igraju važnu ulogu u kontroli

proliferacije i diferencijacije KMS. (111) Ravnoteža između samoobnavljanja i diferencijacije KMS u nišama koštane srži se održava pomoću više različitih signalnih putova.

- Signalni put Notch

Notch signalizacija igra ključnu ulogu u nekoliko temeljnih funkcija, uključujući proliferaciju, diferencijaciju KMS. (112,113) Također doprinosi morfološkom razvoju različitih vrsta arterija i omogućuje komunikaciju između stanica niša ekspresijom receptora NOTCH i liganda za receptor NOTCH. (114) Istraživanja Stiera i sur. su pokazala da NOTCH1 sudjeluje u regulaciji KMS na način da potiče više samoobnavljanje nego diferencijaciju KMS, a s druge strane da potiče više diferencijaciju limfatične nego mijeloične loze. (115) Suprotno navedenom, istraživanja Maillarda i sur isključuju bitnu fiziološku ulogu signala Notch u održavanju i samoobnavljanju KMS. (116) Prema istraživanju Mancinija i sur., inaktivacija NOTCH1 i JAGGED1 u progenitornim stanicama i / ili stromalnim stanicama koštane srži ne utječe bitno na proces samoobnavljanja ili diferencijacije KMS u zrele stanice hematopoze. (117) E3 ubiquitin-protein ligaza, MIB1 (engl. *e3 ubiquitin protein ligase, mind bomb 1*) je enzim koji regulira proces apoptoze. Inaktivacija *MIB1*, koji u koštanoj srži regulira endocitozu i aktivaciju liganda receptora NOTCH, u istraživanju na miševima, uzrokovala je razvoj mijeloproliferativne bolesti. Transplantacija koštane srži stanicama s divljim tipom gena *MIB1* u mikrookoliš s inaktiviranim *MIB1*, rezultirala je ponovnim nastankom mijeloproliferativne bolesti. Razvoj bolesti je zaustavljen uvođenjem aktivne unutarstanične domene NOTCH1 u mikrookoliš s inaktiviranim genom *MIB1*, što pokazuje da je aktivna ekspresija NOTCH1 u stanicama mikrookoliša potisnula progresiju bolesti. (118) NOTCH kao protein na membrani KMS je važan tijekom razvoja organizma i gubitak signala Notch dovodi s vremenom do iscrpljivanja i nestanka KMS. (119) Normalna hematopoeza zahtijeva aktivaciju signalnog puta Notch kroz interakciju liganda i receptora. Starenje hematopoetskog sustava povezano je sa slabljenjem imunološke funkcije, povećanim rizikom od infekcija, razvojem mijeloproliferativnih bolesti i anemije. (120,121) Starenje KMS djelomično doprinosi oštećenju ostarjelog hematopoetskog sustava. Starije KMS su višeg proliferativnog indeksa te se njihov broj povećava u ostarjeloj koštanoj srži. (122, 123) Iako se broj KMS povećava starenjem organizma, one ne mogu nadoknaditi deficit koštane srži koji je posljedica starenja. Imaju veći potencijal mijeloične, a smanjen potencijal limfatične diferencijacije. Iako im je broj viši, sposobnost migriranja starijih KMS u koštanu srž i njihov regenerativni potencijal su smanjeni u usporedbi s mladim KMS.

(123) Starenje KMS je posljedica unutarstaničnih mehanizama, oštećenja gena, uključujući oštećenje DNA, ali i starosti niše KMS. Oštećenje DNA uzrokovano je skraćivanjem telomera, genetička promjena koja se događa tijekom starenja. (124) Starenje je odgovorno za smanjenje funkcionalnosti KMS kao i za povećani rizik od hematoloških malignih bolesti. Abnormalna klonska hematopoeza koja se često javlja u KMS starijih osoba uzrokovana je mutacijom određenih gena i skraćivanjem telomera. (124) Sa starenjem KMS pokazuju sklonost proliferaciji, smanjenu sposobnost udomljavanja, regeneracije. Učinci starenja KMS na koštanoj srži uključuju promjenu vaskulature, povećanje adipogeneze, smanjenje osteogeneze kao i smanjenje adhezije između KMS i stromalnih stanica . (125, 126)

2.3.2. Krvotvorne matične stanice u multiplom mijelomu

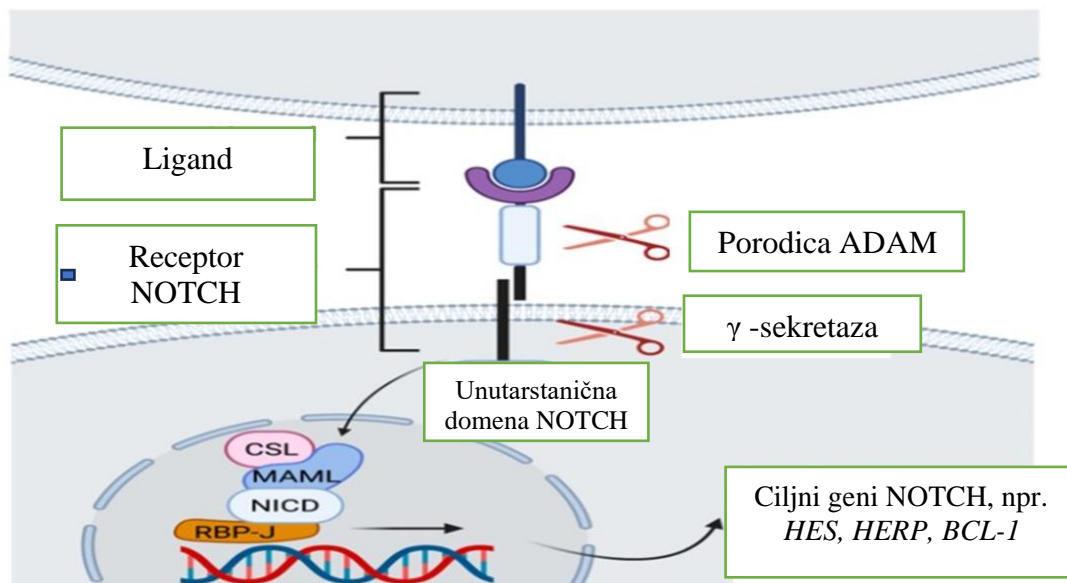
U koštanoj srži multiplog mijeloma pronađeno je značajno smanjenje broja KMS, posebno megakariocitno-eritrocitnih prekursora, koji su funkcionalno oštećeni u pogledu klonske i dugotrajne sposobnosti samoobnavljanja, kao i proliferativne aktivnosti. Gubitak KMS u koštanoj srži multiplog mijeloma nije samo posljedica čistog fizičkog istiskivanja KMS tumorskim stanicama, već je također rezultat funkcionalnog oštećenja koje nastaje zbog prekomjernog otpuštanja TGF β (engl. *transforming growth factor β*) od strane tumorskih plazma stanica i mezenhimskih stanica koštane srži, a time i prekomjerne aktivacije signalnog puta TGF β u koštanoj srži. Aktivacija TGF β signalizacije potiskuje eritropoezu putem inhibicije staničnog ciklusa eritroidnih prekursora i ima snažan antiproliferativni učinak na KMS što dovodi do smanjenog stvaranja kolonija i dugotrajnog samoobnavljanja. (127, 128) Ovakav učinak aktivacije signalizacije TGF β na KMS u suprotnosti je s njenim učinkom na tumorske matične stanice u nekim drugim solidnim tumorima gdje aktivacija signalizacije TGF β potiče samoobnavljanje, invaziju i metastaze. Unatoč zapanjujućim sličnostima tumorskih matičnih stanica i nemalighnih matičnih stanica, ova razlika u ponašanju matičnih stanica pod utjecajem TGF β , mogla bi biti posljedica imunofenotipa KMS u koštanoj srži multiplog mijeloma. (129,130) Talidomid, lijek s inhibitornim učinkom na signalizaciju TGF β i visokom učinkovitošću u liječenju MM, doveo je do značajnog povećanja koncentracije hemoglobina u bolesnika s MM i MDS-om. Porast koncentracije hemoglobina je povezan s padom razine TGF β u serumu. (131,129,132) Povećana razina TNF α , α čimbenika nekroze tumora, (eng. *tumor*

necrosis factor alpha) je još jedan potencijalni razlog mijelosupresije u MM bolesnika. TNF α djeluje kao inhibitor normalne aktivnosti KMS, na način da aktivacijom NF- κ B signalnog puta inhibira stvaranje eritroidnih kolonija. (133, 134) Istraživanje Brunsa i sur. je pokazalo da je transplantacija KMS iz koštane srži infiltrirane stanicama multiplog mijeloma u zdrave miševe dovela čak do pojačanog kapaciteta udomljavanja i do normalne diferencijacije KMS, što pokazuje da je funkcionalno oštećenje KMS u smislu supresije hematopoeze ovisno o mikrookolišu multiplog mijeloma i reverzibilno. (130) Na KMS u multiplom mijelomu, kao i na drugim B-stanicama limfopoeze identificirane su promjene u smislu značajnog povišenja razine proteina NOTCH1 kao i razine proteina MMSET (engl. *multiple myeloma SET domain*), MYD88, CD243 i CD47, CD52, a iste se mogu vidjeti čak i u MGUS-u. (135)

2.4. Signalni put Notch

Signalni put Notch je dio visoko konzerviranih staničnih mehanizama bitnih u diferencijaciji različitih tkiva. Radi se o vrlo važnom signalnom putu koji je evolucijski prisutan u većine višestaničnim organizama. (136) John S. Dexter je 1914. godine primijetio ureze na krilima vinske mušice *Drosophila melanogaster* (engl. *notch*), a već 1917. američki evolucijski biolog Thomas Hunt Morgan identificirao je alele gena *NOTCH* za opisani fenomen. Od tada su receptori NOTCH i signalni put Notch područje istraživanja koje je zanimljivo i danas. (137) Signalni put Notch je primjer jukstakrine komunikacije u kojoj je potreban kontakt između stanica koje izražavaju na svojoj površini agonističke ligande receptora NOTCH (DLL1, DLL4, JAGGED1 ili JAGGED2) i stanica koje izražavaju receptore NOTCH (NOTCH1-4). (138) Receptori NOTCH su heterodimerni proteini, vrsta proteina koji su građeni od dva različita monomera spojeni nekovalentnim vezama heterodimernom domenom proteina. Receptori NOTCH se sastoje od dva peptida: jednog izvanstaničnog (izvanstanična domena (ECD) i jednog unutarstaničnog peptida, pri čemu unutarstanični peptid sadrži transmembransku domenu (TD) i unutarstaničnu domenu (ICD). (139) Interakcijom s ligandom mijenja se konformacija heterodimernog receptora te slijedi regulirana intramembranska proteoliza u kojoj metaloproteinaza iz porodice ADAM (engl. *a disintegrin and metalloprotease*) cijepa receptor NOTCH na jukstamembranskom izvanstaničnom mjestu (drugo cijepanje- S2). (140,141) Odvaja se TD-ICD domena (transmembranska-intracelularna domena) od ostatka receptora. TD-ICD

domena je osjetljiva na daljnje cijepanje unutar membranskog dijela pomoću γ -sekretaze, multiproteinskog enzimskog kompleksa (treće cijepanje- S3). (142) Inhibitori γ -sekretaze mogu inhibirati signalni put Notch što je potaknulo otkriće lijekova koji izravno utječu na modulaciju signalnog puta Notch, a koji su primijenjeni u liječenju različitih zloćudnih oboljenja. (143) Cijepanjem TD-ICD pomoću γ -sekretaze oslobađa se unutarstanični dio receptora NOTCH [unutarstanična domena (ICD)] u citoplazmu, ulazi u jezgru kako bi prenijela signal Notch. U jezgri postaje sastavni dio transkripcijskog aktivacijskog kompleksa koji se sastoji od CSL, transkripcijskog faktora koji veže DNA i koaktivatorskog proteina porodice Mastermind (MAM) u vinske mušice i sisavca ili Lag-3 u *Caenorhabditis elegans*. Vezanjem ICD u transkripcijski aktivacijski kompleks dovodi do transkripcije ciljnih gena. Aktivacija transkripcije promotorom na kojem je vezan CSL ovisi i o regrutiranju dodatnih koaktivatora kao što je p300. (144,145,146) Veliki je broj ciljnih gena signalnog puta Notch od kojih su najpoznatiji članovi porodice *HES* (eng. *hairy enhancer of split*), *HERP* (eng. *hairy enhancer of split related repressor protein*). (147) (Slika 6)



Slika 6. Signalni put Notch. Preuzeto i prilagođeno prema Gallenstein, Tichy, Weigand, Schenz (2023)

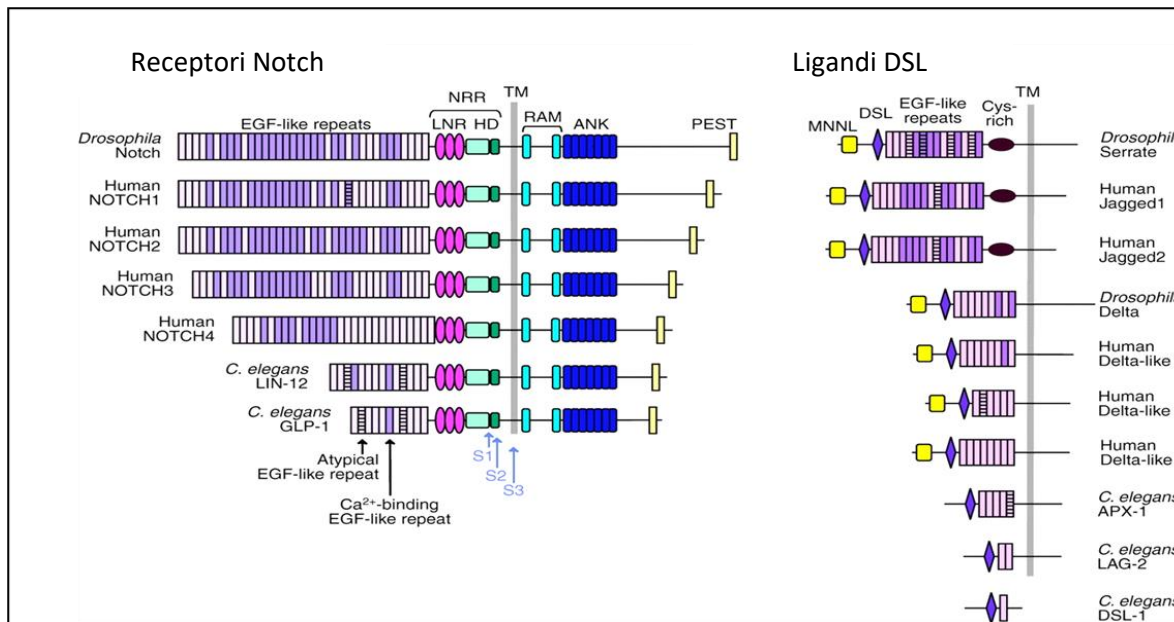
Signalni put Notch regulira staničnu diferencijaciju, apoptozu, proliferaciju, morfogenezu višestaničnih organizama, a važan je i za njihov embrionalni razvoj. (149) Kod sisavaca regulira različite procese kao što su hematopoeza, vaskulogeneza, miogeneza, gliogeneza, neurogeneza. (140) Signalizacija Notch ima ključnu ulogu u embrionalnom razvoju te u homeostazi dobro diferenciranih, zrelih tkiva u čovjeka potičući samoobnavljanje matičnih stanica. (150) Notch ima važnu ulogu i u regulaciji ekspresije transkripcijskog čimbenika PU.1, koji sudjeluje u usmjeravanju diferencijacije stanica matice prema mijeloičnoj, odnosno limfatičnoj lozi. (151) Poremećaji reguliranja, intenziteta i trajanja signala Notch su povezani s nastankom anomalija u razvoju i pojavom malignih oboljenja. (152,153) Alagilleov sindrom je autosomno dominantan poremećaj koji je uzrokovan heterozigotnim mutacijama u jednom od dva gena koji su temeljne komponente signalnog puta Notch, *JAGGED1* i *NOTCH2* Alagilleov sindrom je karakteriziran suženjem ili atrezijom žučnih vodova, srčanim defektima, anomalijama kostura i oka, poremećajem funkcije bubrega i gušterače te intrakranijalnim krvarenjem. (154) Sudjelovanje signalizacije Notch u regulaciji navedenih važnih staničnih procesa može objasniti pojavu deregulacije receptora NOTCH ili njegovih liganda u nekoliko vrsta solidnih tumora kao što su karcinom dojke, debelog crijeva, gušterače, melanom, glioblastom i hematoloških malignih oboljenja kao što su T stanična akutna limfatična leukemija (T-ALL), B- stanična akutna limfatična leukemija (B-ALL), akutna mijeloična leukemija (AML), B- kronična limfocitna leukemija (B-KLL) i multipli mijelom (MM). (155,156,157,158,139) Ponašanje Notch1 kao onkoproteina najbolje je proučeno u T-ALL, gdje je otkriveno da Notch signalizacija potiče proliferaciju i inhibira apoptozu stanica T-ALL zbog konstitutivne ekspresije Notcha kao posljedica točkaste zamjenske mutacije i male delecije unutar okvira čitanja prijepisa ili se radi o mutaciji u sklopu domene PEST na C-kraju proteina NOTCH. Mutacije gena *NOTCH1* su otkrivene u više od 50% bolesnika oboljelih od T-ALL. (159) Otkriveno je i da 5-15 % bolesnika oboljelih od B-KLL također imaju mutacije *NOTCH1* koje bi mogle biti jedan od razloga za aktivaciju Notch signalizacije u ovoj bolesti, najčešće se radi o mutaciji u sklopu domene PEST na C-kraju proteina NOTCH. Mutacija domene PEST predstavlja onokogeni događaj u razvoju leukemija i limfoma (160) Prevalencija mutacija se povećava do 20% kod pacijenata koji su refraktorni na terapiju i 30% kod razvoja Richterovog sindroma u kojem dolazi do transformacije B-KLL u agresivni limfom, difuzni B-velikostanični non-Hodgkinov limfom. (161) Međutim, postoji i istraživanje provedeno na razini glasničke RNA koje pokazuje da Notch signalizacija

nije prekomjerno aktivirana u B-KLL. (162) Suprotno navedenom istraživanju Hajdu i sur., Rosati i suradnici pokazali su u B-KLL pojačanu ekspresiju receptora Notch1 i Notch2 u signalnom putu Notch te posljedično povišenu aktivnosti NF- κ B i ekspresiju inhibitora apoptoze c-IAP koji su odgovorni za inhibiciju apoptoze u stanicama B-KLL. (163) Produkt gena *NOTCH1* ima različite funkcije pa se gen može smatrati i onkogenom i tumor supresor genom. Onkogeni imaju potencijal da uzrokuju transformaciju normalnih stanica u tumorske stanice. Nasuprot tome, tumor supresor geni kontroliraju rast i prebrzo nekontrolirano dijeljenje stanice. Prema istraživanju Ronchini i sur., mehanizam djelovanja NOTCH1 temelji se na regulaciji staničnog ciklusa utječući na ekspresiju gena *CCND1* i *MYC* te aktivnosti proteina CDK2. Tako NOTCH1 može utjecati na progresiju G1 faze staničnog ciklusa. Aktivacijom signala NOTCH1 prosječna brzina proliferacije stanica i duljina staničnog ciklusa nisu promijenjene, međutim promijenjen je udio stanica u različitim fazama staničnog ciklusa. Smanjen je udio stanica u G1 fazi. (7)

2.4.1. Građa i aktivacija receptora NOTCH

U sisavaca porodicu Notch čine četiri člana receptora NOTCH (NOTCH 1-4) i pet strukturno srodnih, kanonskih jednostrukih membranskih liganada receptora NOTCH kojima je zajedničko pristupstvo domene DELTA-SERRATE-LAG (DSL), a radi se o porodici liganada JAGGED (JAGGED1 i JAGGED2) i DELTA-LIKE (DELTA- LIKE1, 3, i 4). (164) Receptori NOTCH su tip I transmembranski proteini. Receptor NOTCH je građen od dva peptida: jednog velikog izvanstaničnog dijela koji je potreban za vezanje liganda (izvanstanična domena (ECD)) i jednog unutarstaničnog dijela (sadrži transmembransku domenu (TD) i unutarstaničnu domenu (ICD)) koji je odgovoran za signalizaciju unutar stanice. Prekursor Notch nastaje u endoplazmatskom retikulumu kao pojedinačni aminokiselinski lanac, zatim se fukozilira i prenosi u Golgijev aparat, gdje furin proteaza razdvaja ECD od TD-ICD (prvo cijepanje- S1). ECD blokira NOTCH aktivaciju, osim ako ne veže ligande NOTCH izražene na susjednoj stanici. (139) Izvanstanični dio receptora NOTCH koji je odgovoran za vezanje liganda sastoji se iz ponavljajućeg niza domena sličnih epidermalnom čimbeniku rasta (EGF, od engl. *epidermal growth factor-like*). Smatra se da promjena fleksibilnosti domena lanca kojeg čini niz domena sličnih EGF-u određuje sklonost vezanju receptora za različite ligande. Negativna regulatorna regija (NRR)

receptora Notch, koja je smještena između domena koje vežu ligand i transmembranskih domena, sadrži tri ponavljanja regije Lin-12-Notch koje su bogate cisteinom (LNR, engl. *Lin12/Notch repeats*) i domenu heterodimerizacije (HD) koja se nalazi uz membranu i sadrži mjesta cijepanja S1 (cijepanje furinom) i S2 (cijepanje metaloproteinazom). (Slika 7) NRR je ključna za održavanje otpornosti na cijepanje metaloproteinazom u odsutnosti liganda kao i za aktivaciju receptora. Receptori NOTCH koji nemaju ponavljanja domena sličnih EGF-u su funkcionalno inaktivni. (165,166,167,168) Većina točkastih mutacija gena *NOTCH1* koje se nalaze u bolesnika s T-ALL smještena je unutar NRR-a i to u visoko očuvanoj hidrofobnoj unutrašnjosti HD. (169) Mutacije dovode do povećanja signalizacije neovisno o ligandima, što olakšava cijepanje neovisno o ligandu (S2) i kasniju aktivaciju receptora. Najčešće mutacije rezultiraju supstitucijom jedne aminokiseline i male delecije i insercije u HD, pronađene i u N i u C terminalnim regijama HD. S obzirom na njihov utjecaj na stabilnost HD, mutacije se mogu podijeliti u dvije skupine: mutacije koje destabiliziraju HD i one koje ne uzrokuju destabilizaciju HD, već uz mjesto cijepanja S2 djeluju tako što poboljšavaju pristup metaloproteaza mjestu S2 i omogućavaju cijepanje bez vezanja liganda. (170) Jedna od terapijskih mogućnosti kojom bi se aktivirao ili inhibirao receptor NOTCH je antitijelo usmjereno na NRR regiju receptora NOTCH. (171)



Slika 7. Shematski prikaz organizacije domena receptora Notch i liganda Delta-Serrate-Lag (DSL). Preuzeto i prilagođeno prema Gordon , Arnett , Blacklow (2008)

2.4.2. Građa i aktivacija liganda receptora NOTCH

Ligandi receptora NOTCH su transmembranski proteini za koje je karakteristično prisustvo domene Delta-Serrate-Lag (DSL). (173) Razlikujemo pet kanonskih liganada DSL. Dva liganda DSL koji su slični molekuli Serrate vinske mušice, JAGGED1 i 2. Preostala tri DSL liganda su slični molekuli Delta, DLL1, DLL3, DLL4. Ligandi DSL se sastoje iz tri glavne domene: unutarstanične, transmembranske i izvanstanične domene.

U izvanstaničnom dijelu liganada koji je neophodan za pravilno funkcioniranje proteina nalazi se skupina MNLN (od engl. *module at the N-terminus of Notch ligands*), signalni peptid koji se sastoji od 21 aminokiseline, domene DSL koja se sastoji od 40 aminokiselina i ponavljajućeg niza EGF-a čiji broj može varirati ovisno o ligandu. Ligand JAGGED sadrži i cisteinom bogatu domenu koja se veže na transmembranski dio, a koja nedostaje u ligandu DELTA. (172) (Slika 7) Signalni peptid je odgovoran za aktivaciju receptora na staničnoj površini, a domena DSL je potrebna za vezanje na receptore Notch. Ponavljajući niz domena sličnih epidermalnom čimbeniku rasta, EGF, osobito domena 1 i 2, važan je za povećanje afiniteta liganda prema receptoru NOTCH. Svaka domena slična EGF-u sadrži 6 cisteinskih ostataka, koji tvore disulfidne mostove, a koji olakšavaju stabilizaciju proteina. (174) Iznimka je ligand DLL3 koji ne veže receptor NOTCH *in trans* te time ne aktivira signalni receptor NOTCH. DLL3 je antagonist receptora NOTCH, uglavnom se nalazi u Golgijevom aparatu, a na površini stanice jedva prisutan. (175,176)

2.4.3. Signalni put Notch u regulaciji krvotvornih matičnih stanica

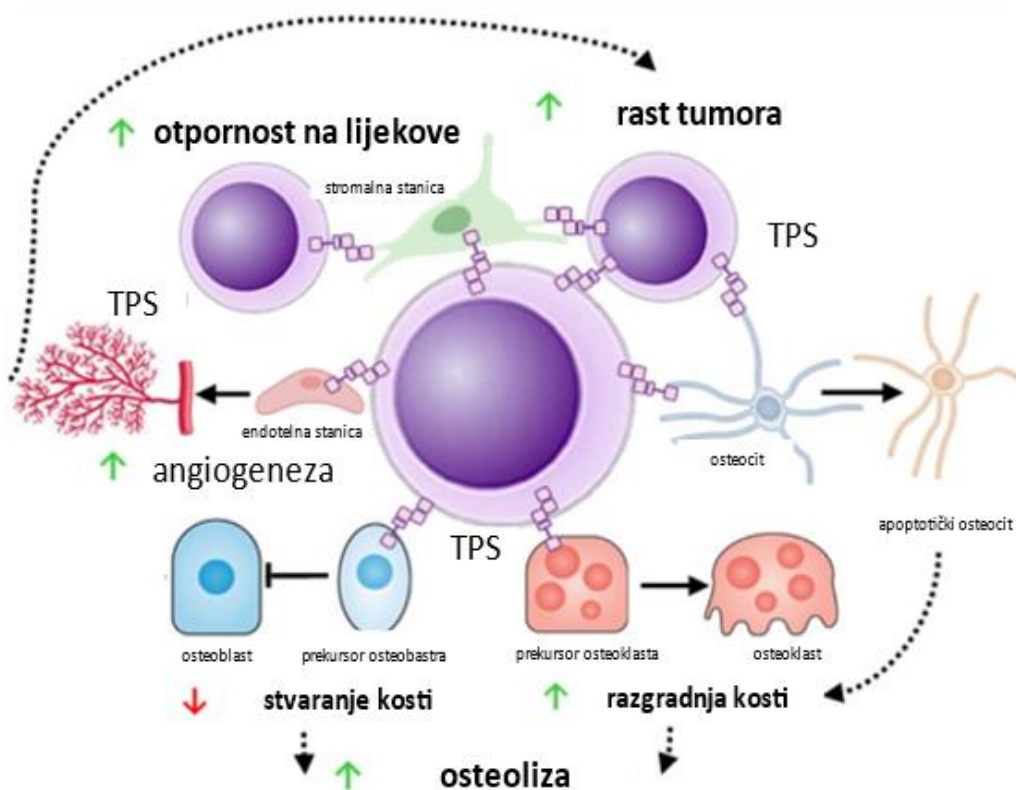
Signalni put Notch regulira održavanje KMS, sudjeluje u hematopoezi, razvoju i diferencijaciji limfatične, mijeloične te eritroblastne prekursorske populacije stanica. (177) Signalizacija i regulacija aktivnosti KMS pomoću receptora Notch važna je *in vivo* za kontrolu samoobnavljanja i diferencijacije KMS i u nepovoljnim uvjetima za stanicu. (178) Receptori i ligandi receptora Notch su dokazani u stanicama niše koštane srži (endotelne stanice, osteoblasti i mezenhimske stromalne stanice) i krvotvornim matičnim stanicama. (179) Signalizacija Notch je prisutna između različitih stanica niše koštane srži, liganda receptora NOTCH na endotelnim stanicama niše koštane srži i receptora NOTCH KMS, kao i između istovjetnih stanica niše koštane srži,

liganda receptora NOTCH i receptora endotelnih stanica niše koštane srži, ili i između liganda receptora NOTCH i receptora KMS. (179) Istraživanje Batlera i sur. pokazuje važnost vaskularne niše te je, tijekom hematopoetskog oporavka, ekspresija liganda receptora NOTCH na endotelnim stanicama i njegova komunikacija s KMS i ostalim stanicama niše neophodna za uspostavljanje ravnoteže u hematopoezi. (180) Fernandez i sur. su pokazali da različita ekspresija liganda i intenzitet signala Notch mogu rezultirati različitim stupnjevima samoobnavljanja KMS. Nadalje, proupalni citokini uzrokovali su povećanje ekspresije JAGGED2 na endotelnim stanicama i receptora NOTCH1 i NOTCH2 na hematopoetskim prekursorima *in vivo*. (181) Istraživanjem Koppa i sur. dokazano je da aktivacija signalnog puta Notch putem izlaganja primitivnih hematopoetskih stanica ligandima NOTCH *in vitro*, kao što su ligand JAGGED1 i izvanstanični ligand DLL1, potiče samoobnavljanje matičnih stanica i inhibira diferencijaciju istih. (182,6) Rezultati istraživanja Butlera i sur. su potvrdili da je signalizacija Notch između endotelnih stanica odgovorna za oporavak hematopoeze nakon oštećenja koštane srži. (180) Istraživanje Nandagopala i sur. je pokazalo da mogu postojati razlike u signalnom potencijalu pri spajanju specifičnih parova liganda i receptora. Tako Dll1/Notch1 signalizacija inducira pulsirajuću aktivaciju signalnog puta Notch, dok Dll4/Notch1 signalizacija rezultira trajnom aktivacijom signalnog puta Notch tijekom miogeneze. Još se ne zna da li aktivacija specifičnih parova liganda i receptora ima utjecaja na krvotvorni sustav. (183) Ligandi receptora NOTCH aktiviraju različite ciljne gene vezanjem na isti receptor NOTCH razlikujući se dinamikom, odnosno brzinom i načinom prenošenja signala koja može biti pulsirajuća ili ujednačena, dinamika aktivacije. U istraživanju je metoda analiziranja, odnosno mjerenja aktivnosti signalnog puta bila fluorescencija. Pokazano je da ligand DLL4 aktivira stanice s ekspresijom receptora NOTCH1 na kontinuiran način, dok ligand DLL1 aktivira stanice s ekspresijom receptora NOTCH1 na pulsirajući način. (183)

2.4.4. Signalni put Notch u multiplom mijelomu

U multiplom mijelomu vrlo važnu ulogu u razvoju i napredovanju bolesti ima mikrookoliš tumorskih plazma stanica (TPS). Komunikacija između TPS i stanica mikrookoliša dovodi do dramatičnih promjena u mikrookolišu TPS od kojih je najočitija osteolitička destrukcija kosti, širenje TPS krvlju i naseljavanje na druga mjesta u koštanom tkivu, inhibicija osteoblastogeneze

i supresija imunološkog sustava. (12, 85,186) U multiplom mijelomu receptori NOTCH i njihovi ligandi igraju ključnu ulogu u odašiljanju i primanju signala između TPS i njihovog mikrookoliša. (Slika 8)



Slika 8. Uloga signalnog puta Notch u multiplom mijelomu. Preuzeto i prilagođeno prema Sabol HM, Delgado-Calle J (2021) (187)

Tumorske plazma stanice (TPS) pokazuju pojačanu ekspresiju komponenti Notch koje im pomažu da primaju i prenose signale od i na susjedne stanice. Signalni put Notch se u multiplom mijelomu može aktivirati na dva različita načina. Homotipska aktivacija se događa između iste vrste stanica gdje se receptori NOTCH 1, 2, 3 TPS vežu za ligande receptora NOTCH koji se nalaze na susjednim TPS (JAGGED 1,2). Heterotipska aktivacija signalnog puta Notch se događa između različitih vrsta stanica gdje se receptori NOTCH TPS vežu za ligande receptora NOTCH na susjednim stromalnim stanicama koštane srži (ligandi JAGGED ili DELTA- like).

(139) Homotipska komunikacija Notch između TPS povećava proliferaciju tumorskih stanica. Rast tumora dodatno podržavaju signali Notch koje primaju stromalne stanice i osteociti. Osim toga, TPS potiču angiogenezu slanjem proangiogenih signala Notch endotelnim stanicama, stromalnim stanicama i osteocitima, a angiogeneza zauzvrat pomaže rast tumora opskrbom tumora hranjivim tvarima. I homotipski i heterotipski (iz stromalnih stanica) signali Notch omogućuju otpornost tumora na lijekove i potiču preživljavanje TPS. Signali Notch doprinose i napredovanju osteolitičkih lezija u MM. (186) TPS izražavaju receptore NOTCH1 i 2, ligande JAGGED1 i JAGGED2 i to na način da su JAGGED2 ligandi jače izraženi u ranijoj fazi bolesti, u MGUS-u, dok se JAGGED1 javlja samo u TPS u multiplom mijelomu. (12,187) Istraživanje Jundt i sur. je pokazalo da je Notch signalna regulacija u MM karakterizirana prekomjernom ekspresijom i receptora NOTCH i liganda receptora NOTCH. Imunohistokemijska analiza je pokazala jaku ekspresiju NOTCH1, NOTCH2 I JAGGED1 u TPS u usporedbi sa njihovom slabom, nezamjetnom ekspresijom kod ne- malignih stanica. (187) Zabilježen je porast ekspresije i intenziteta bojenja NOTCH1 i JAGGED1 u MM u odnosu na stanice MGUS-a, što bi moglo ukazivati na razvoj bolesti iz premaligne lezije MGUS u MM (190). Isto tako, uočeno je da se citotoksičnim lijekovima na tumorske plazma stanice multiplog mijeloma aktivira signalni put Notch koji inhibira apoptozu čime se TPS štite od djelovanja citotoksičnih lijekova u kemoterapiji MM, za razliku od drugih B-staničnih limfoproliferativnih bolesti, kao što je B-ALL gdje aktivacija puta Notch može djelovati negativno na rast i biologiju tumora. (14,157,189,191) Supresija signalnog puta Notch u MM uzrokuje apoptozu TPS MM, smanjuje stopu umnažanja stanica i dovodi do porasta osjetljivosti MM stanica na standardnu kemoterapiju kao što su doksorubicin i melfalan, *in vitro* i *in vivo* te se na taj način sprječava razvoj otpornosti MM na lijekove. (189) Ligand DLL1 je pronađen u stromalnim stanicama koštane srži zdravih donora i bolesnika oboljelih od MM. On može aktivirati signalizaciju Notch u stanicama MM u koštanoj srži (uključujući i Notch1 i Notch2), što rezultira klonskim rastom i samoobnavljanjem TPS. (191) Kako je prema literaturi ligand DLL1 izražen na stromalnim stanicama koštane srži, a ne na TPS, signalizacija Notch se, posredovanjem DLL1, može aktivirati kada su TPS i stromalne stanice koštane srži u uskom kontaktu. Značajnu ulogu signalizacija Notch u MM ima u sljedećim aktivnostima:

- Adhezija, migracija i udomljavanje TPS u koštanoj srži.

Aktivacija Notch signalnog puta olakšava udomljavanje TPS iz krvotoka u koštanu srž pri prijanjanju na VCAM-1 izražen na endotelnim stanicama u koštanoj srži pri čemu dolazi do transendotelne migracije TPS. (192) Kontrolira i smještaj TPS u koštanoj srži, povezana je s lošom prognozom i progresijom bolesti. (193,194,195) TPS iz cirkulacije konstantno infiltriraju nova mjesta u koštanoj srži. Porast signalizacijske aktivnosti Notch tijekom progresije MM može kontinuirano poticati migraciju TPS s početno infiltriranog mjesta u koštanoj srži u druga udaljena mjesta u kosti, što rezultira stvaranjem višestrukih koštanih lezija. (196) U stromalnim stanicama i TPS mikrookoliša koštane srži multiplog mijeloma signalizacija Notch je pojačana, jer TPS mogu potaknuti aktivaciju signalnog puta Notch u stromalnim stanicama koštane srži, što rezultira proizvodnjom čimbenika rasta, kao što su IL-6, VEGF i IGF-1. S druge strane, stromalne stanice aktiviraju signalni put Notch u TPS ligandima JAGGED1 i DLL1, što može rezultirati izražavanjem adhezijskih molekula, čime se potiče udomljavanje dodatnih tumorskih stanica i olakšava preživljavanje tumora.

- Samoobnavljanje KMS u multiplom mijelomu

Bitna uloga signalizacije Notch je u samoobnavljanju KMS u multiplom mijelomu. (197) Uloga signalizacije Notch u KMS u multiplom mijelomu je istražena na kulturama humanih tumorskih plazma stanica. (191,198) U istraživanju Xu i sur. pokazano je da aktivacija DLL1/NOTCH potiče rast tumora (MM) i ubrzava razvoj bolesti potičući samoobnavljanje matičnih stanica MM. (192)

- Utjecaj signalnog puta Notch tumorskih plazma stanica na nezrelost KMS MM

Aktivirani signalni put Notch inhibira diferencijaciju KMS MM koje se samoobnavljaju. Također aktivirani signalni put Notch u TPS MM rezultira pojačanom sintezom čimbenika rasta IL-6 i VEGF koji mogu utjecati na rast i samoobnavljanje na KMS u niši MM. (12) Ono što ostaje nepoznato, a što želimo istražiti, postoji li posljedična pojačana ekspresija receptora NOTCH i liganda receptora NOTCH u KMS u bolesnika s MM.

- Signalni put Notch regulira neoangiogenezu u MM potičući rast, gustoću i propusnost mikrovaskulature u koštanoj srži MM regulirajući različite signalne puteve i lučeći čimbenike rasta što u konačnici dovodi do kaotične tumorske neoangiogeneze (12,199)
- Regulira otpornost TPS MM na kemoterapiju putem aktiviranja receptora NOTCH1 i NOTCH2 na TPS direktnim kontaktom s ligandima JAGGED1, DLL1 na stromalnim stanicama niše koštane srži čime se povećava otpornost TPS na apoptozu uzrokovanu citostaticima.

Aktivacija CYP1A1 (citokrom P450 1A1) pridonosi razvoju otpornosti na liječenje bortezomibom. Toj otpornosti doprinose i same TPS MM potičući stromalne stanice na izlučivanje čimbenika rasta, IL-6, VEGF i IGF-1 (12, 200, 201)

- Potiče osteolitičku aktivnost TPS MM koja je višeznačno poremećena signalnim putem Notch, čime je onemogućena ravnoteža između aktivnosti osteoblasta i osteoklasta te diferencijacija osteoblasta. (202)
- Potiče izbjegavanje TPS imunološkom nadzoru gdje Notch sudjeluje u pretvorbi protuupalnih Th1 stanica u supresorske T regulatorne stanice te potencira inhibitori učinak T regulatornih stanica povećanjem broja njihovih TGF- β receptora II. (203,204)

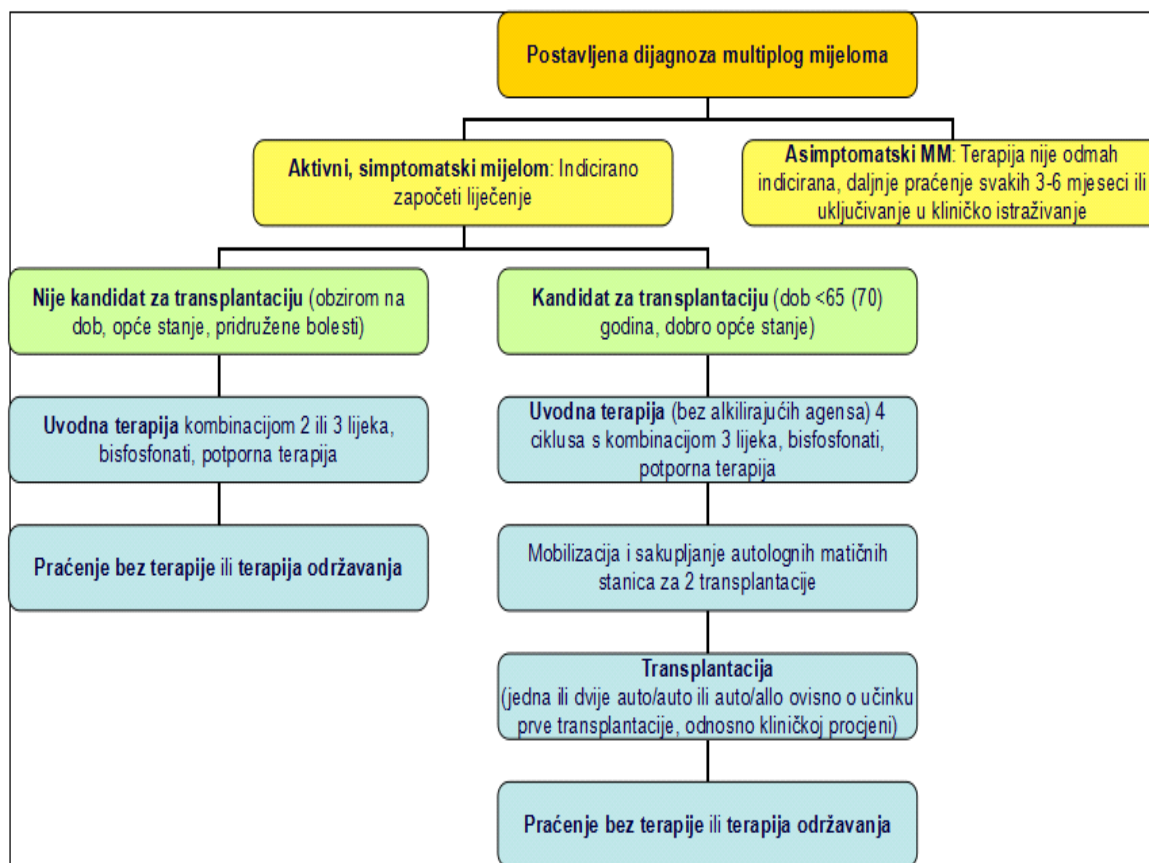
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. U multiplom mijelomu odrediti razinu ekspresije i intenzitet ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS
2. U zdravoj koštanoj srži odrediti razinu ekspresije i intenzitet ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS
3. U tumorskim plazma stanicama koštane srži odrediti razinu ekspresije i intenzitet ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1
4. Odrediti morfološke karakteristike tumora u koštanoj srži, tip infiltracije i stupanj diferencijacije tumorskih plazma stanica
5. U tumorskim plazma stanicama koštane srži odrediti citogenetičke promjene visokog rizika $t(4;14)(p16;q32)$; $t(14;16)(q32;q23)$; $del(13q34)$ i $del(17p13.1)$; te standardnog rizika $t(11;14)(q13;q32)$
6. Usporediti razliku u razini ekspresije i intenzitetu ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS koštane srži infiltrirane tumorskim plazma stanicama i KMS zdrave koštane srži
7. Usporediti razliku u razini ekspresije i intenzitetu ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS u multiplom mijelomu i tumorskim plazma stanicama u koštanoj srži
8. Usporediti razliku u razini ekspresije i intenzitetu ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS u multiplom mijelomu i tipu infiltracije koštane srži multiplog mijeloma
9. Usporediti razliku u razini ekspresije i intenzitetu ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS multiplog mijeloma i tumorskim plazma stanicama s citogenetičkim promjenama visokog rizika $t(4;14)(p16;q32)$; $t(14;16)(q32;q23)$; $del(13q34)$ i $del(17p13.1)$; te standardnog rizika $t(11;14)(q13;q32)$ u tumorskim plazma stanicama

4. ISPITANICI, MATERIJALI, METODE

4.1. Uzorci krvotvornih matičnih stanica

U ovom istraživanju skupinu ispitanika činilo je 36 bolesnika s potvrđenom dijagnozom multiplog mijeloma prema dijagnostičkim kriterijima međunarodne radne skupine za multipli mijelom te 9 zdravih darivatelja čiji su uzorci prikupljeni u Kliničkoj bolnici Merkur u vremenskom periodu od 2006. do 2015.godine. (229) Istraživanje KMS je provedeno u bolesnika koji su bili kandidati za transplantaciju KMS te su transplantirani prema terapijskim smjernicama za takve bolesnike. Bolesnici su bili mlađi od 70 godina, bez značajnih komorbiditeta, primili su indukcijsku terapiju, kombinaciju lijekova (kombinacija bortezomiba, talidomida ili ciklofosfamida i deksametazona) tri do četiri mjeseca prije prikupljanja KMS kako bi se smanjio broj tumorskih stanica u koštanoj srži i perifernoj krvi, umanjili simptomi i ublažilo oštećenje krajnjih organa. (Slika 9)



Slika 9. Hrvatske smjernice za liječenje multiplog mijeloma. Preuzeto i prilagođeno prema Bašić-Kinda, Batinić, Pulanić, Valković, Radić-Krišto, Mandac Rogulj i sur. (2017)

Analizirali su se uzorci krvotvornih matičnih stanica (KMS) 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma i 9 zdravih darivatelja prikupljenih metodom leukaferoze. U skupini ispitanika analizirani su i arhivirani uzorci iglenih biopsija koštanih srži navedenih bolesnika koji su oboljeli od multiplog mijeloma. Uzorci iglenih biopsija su dekalificirani i uklopljeni u parafin. Uzimani su u trenutku postavljanja dijagnoze i prije početka liječenja. Svi ispitanici, bolesnici oboljeli od multiplog mijeloma i zdravi darivatelji su prije postupka leukaferoze potpisali informirani pristanak, obrazac OB-01/01 „ Informirani pristanak na leukaferozu i pohranu autolognih krvotvornih matičnih stanica“ i obrazac OB-02/01 „Informirani pristanak na leukaferozu i pohranu alogenih krvotvornih matičnih stanica“ čime su dali suglasnost za korištenje njihovih KMS za etički odobreno istraživanje, edukaciju ili razvoj novih metoda liječenja kada prestane potreba za daljnjim čuvanjem matičnih stanica. Istraživanje i obrada podataka provodilo se prema načelima medicinske etike prihvaćenim u Helsinškoj deklaraciji Svjetske zdravstvene organizacije 1964. godine. Identitet bolesnika i zdravih darivatelja je bio zaštićen sukladno Zakonu o zaštiti osobnih podataka. Za identifikaciju su se koristiti identifikacijski brojevi uzoraka krvotvornih matičnih stanica koji su bili upareni s brojevima protokola iglene biopsije koštane srži. Pristup osobnim podacima bolesnika i zdravih darivatelja imali su pristupnik i mentori. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Merkur i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci KMS dobiveni su postupkom leukaferoze u vremenskom periodu od 01.01.2006. do 31.12.2015. godine. Prije postupka leukaferoze bolesnici su liječeni uvodnom terapijom (kemoterapija/imunoterapija/inhibitori proteasoma). Uvodnom terapijom se postiže ukupno smanjenje tumorske mase. U ispitanika je postignuta vrlo dobra parcijalna remisija prema kriterijima Internacionalne radne skupine za multipli mijelom. Mobilizacija KMS u svih bolesnika je učinjena kombinacijom kemoterapije (ciklofosfamid) i čimbenika rasta granulocitne loze, G-CSF, glikoproteina koji djeluje u koštanoj srži pojačavajući proizvodnju neutrofilnih granulocita, u dozi od 5 µg/kg/dan od dana kada leukociti postanu manji od $1 \times 10^9 /L$ (leukopenija kao posljedica kemoterapije ciklofosfamidom) do dana kada broj KMS u perifernoj krvi određen metodom imunofenotipizacije na protočnom citometru bude veći ili jednak $10 \times 10^6 /L$ što je dovoljan broj za početak prikupljanja KMS. G-CSF se bolesnicima aplicira potkožno kroz 4 do 5 dana. Analiza broja KMS u perifernoj krvi imunofenotipizacijom na protočnom citometru se provodila svakodnevno od dana kada broj leukocita u perifernoj krvi postane veći ili jednak od $1 \times 10^9 /L$.

Mobilizacija KMS u zdravih darivatelja je učinjena samo čimbenicima rasta granulocitne loze G-CSF kojeg su kroz četiri dana u dozi 10 µg/kg/dan dobivali potkožnom primjenom. Peti dan je izvršeno prikupljanje KMS. Na dan prikupljanja KMS bolesnicima i darivateljima je postavljen venski put kroz koji će krv prolaziti do staničnog separatora i nazad. Kod bolesnika je to centralni venski kateter koji je postavljen u natkoljenu venu, a darivateljima, koji imaju veći promjer perifernih krvnih žila, u kubitalnu venu. KMS, i od bolesnika i od darivatelja, su dobivene postupkom leukaferoze, postupkom prikupljanja KMS iz periferne krvi pomoću staničnog separatora (Cobe Spectra, Gambro BCT, USA, model 6.0.). Prikupljanje KMS je izvršeno prema „Mononuclear cell“ proceduri. Princip rada staničnog separatora *Cobe Spectra* je razdvajanje pojedinih komponenata krvi prema njihovoj gustoći u postupku centrifugiranja krvi. Nakon uvodne pripreme staničnog separatora, linije katetera bolesnika ili perifernog venskog puta darivatelja se spoje sa sterilnim setom za leukaferozu (COBE Spectra White Blood Cell Set-Functionally Closed, Terumo BCT Europe N.V., Belgium). Periferna krv na taj način dolazi do aparata u kojem se centrifugira velikom brzinom i razdvaja na komponente prema njihovoj gustoći. KMS su veličine limfocita pa se u postupku leukaferoze iz periferne krvi izdvajaju KMS koje se nalaze u sloju limfocita i monocita i odvajaju se u posebnu vrećicu koja je sastavni dio seta za prikupljanje KMS, a sve ostale krvne stanice se vraćaju bolesniku ili pacijentu u cirkulaciju. Da bi se spriječilo zgrušavanje krvi pri prolazu kroz separator, punoj krvi se dodaje antikoagulacijska otopina, ACD-A (*Acid Citrate Dextrose Formula-A*, Haemonetics, SAD). Vrijednost ukupnog volumena obrađene krvi za svakog bolesnika/zdravog darivatelja je izračunata prema algoritmu programa staničnog separatora koji u obzir uzima spol, visinu i tjelesnu masu bolesnika/zdravog darivatelja. Brzina ulaznog protoka krvi u separator određen je automatski ovisno o visini i tjelesnoj masi bolesnika/zdravog darivatelja. Brzina infuzije antikoagulantne otopine bila je 0,8 mL/minuti po litri ukupnog volumena krvi odraslog bolesnika/zdravog darivatelja. Brzina prikupljanja KMS i kod bolesnika i kod darivatelja je iznosila 1 mL/min. Volumen pripravka KMS koji je prikupljen ovisi o volumenu obrađene krvi, maksimalnog volumena do 300 ml. Na kraju leukaferoze svakog ispitanika u vrećicu za plazmu, koja je sastavni dio seta za prikupljanje KMS, prikuplja se unaprijed zadani volumen plazme, najčešće do 100 ml, što ovisi o broju KMS u perifernoj krvi i broju pripravaka KMS koji se želi pohraniti u kriospremnik. Plazma ispitanika dobivena pomoću staničnog separatora na kraju postupka leukaferoze korištena je u krioprezervaciji, postupku pohranjivanja uzoraka

zamrzavanjem u kriospremniku. Oba uzorka svakog ispitanika, primarni pripravak KMS i plazma, su pohranjeni u hladnjak na $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ do sljedećeg dana (maksimalno 16 sati) kada je nastavljen postupak krioprezervacije. Primarni pripravak KMS je podvrgnut postupku odstranjivanja suvišne plazme centrifugiranjem kako bi se dobio sekundarni pripravak KMS. Primarni pripravak KMS centrifugirao se u centrifugi (Cryofuge 6000i, Thermo Fisher Scientific Inc, USA) na 3000 okretaja /30 min, program ubrzanja 9, program kočenja 0. Krioprezervacija je izvršena prema standardnom protokolu za krioprezervaciju i pohranjivanje krvotvornih matičnih stanica Banke krvotvornih matičnih stanica Kliničke bolnice Merkur, „SOP-INT HEM KMS-2, Pohranjivanje krvotvornih matičnih stanica“ (Prilog 2), u sterilnim uvjetima u kabinetu s laminarnim strujanjem zraka. Uzorku plazme je dodan medij za zamrzavanje stanica, dimetil sulfoksid (CryoSure-DMSO, >99,9% DMSO, WAK- Chemie Medical GmbH) u volumnom omjeru plazma : DMSO= 4 :1, a koji ima ulogu krioprotektora. DMSO onemogućuje nastajanje unutarstaničnih i izvanstaničnih kristala, a time i razaranje stanica za vrijeme krioprezervacije i pohrane KMS. Nakon dodavanja DMSO-a, smjesa plazme i DMSO-a je bila pohranjena najmanje 15 min u hladnjak na $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Iz sekundarnog pripravka KMS je uzet uzorak za mikrobiološku analizu prema gore navedenom standardnom protokolu, u kojem se ispituju sljedeći mikroorganizmi: aerobne i anaerobne bakterije i gljive. Za mikrobiološku analizu se uzima 1 - 2 ml uzorka koji se stavlja u bujone, hranjive podloge za aerobne i anaerobne mikroorganizme. U sekundarni pripravak KMS je dodana smjesa plazme i DMSO u volumnom omjeru 1:1. Udio DMSO-a u tako dobivenom završnom pripravku KMS je 10%. Iz završnog pripravka KMS je u PVC epruvetu s čepom odvojen uzorak od 2 ml koji je zamrznut i pohranjen na isti način kao i završni pripravak KMS. Završni pripravak KMS i uzorak završnog pripravka KMS od 2 ml su postupno zamrzavani kroz 70 min do -150°C u uređaju za postupno i kontrolirano zamrzavanje (Planer Kryo 560-16, Planer, UK). Nakon toga su pohranjeni u kriospremnik s tekućim dušikom i čuvani na temperaturi od -150°C do -196°C (Consarctic BSF 350 i Consarctic BSF 110, Labexchange - Die Laborgerätebörse GmbH, Germany). Na ovaj način pohranjene uzorke KMS koštane srži u bolesnika i uzorke KMS zdravih darivatelja kao kontrolne skupine smo koristili kako bismo metodom imunofenotipizacije na protočnom citometru odrediti razinu ekspresije i intenzitet ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS.

4.2. Uzorci iglene biopsije aspirata koštane srži

Svakom bolesniku u ispitivanoj skupini učinjena je biopsija i aspiracija koštane srži u vrijeme dijagnostičkog postupka u sklopu postavljanja dijagnoze, a prije početka liječenja. Uzimanje uzorka, iglene biopsije koštane srži proveden je jednokratno, jednostrano sa stražnjeg dijela grebena zdjelične kosti, na način da se nakon primjene lokalne anestezije ubodom biopsijske igle i isisavanjem koštane srži štrcaljkom kroz biopsijsku iglu dobije bioptički uzorak koštane srži, cilindar tkiva kosti optimalne duljine 20 mm. Iglena biopsija koštane srži je bila fiksirana u 10 % otopini puferiranog neutralnog formaldehida (FORMALDEHYDE; Cat. No. FNB10-X**; Biognost, Zagreb, Croatia) 24 sata. Postupak dekalcinacije iglene biopsije koštane srži vršila se u otopini EDTA (OSTEOSOFT®, Cat. No. 101728; Merck KGaA, Darmstadt, Germany; EMD Millipore Corporation, Millipore SAS and Sigma-Aldrich Co LLC), prema uputama proizvođača. Nakon dekalcinacije uzorka biopsije koštane srži vršilo se procesiranje tkiva u automatskom tkivom procesoru (Tissue-Tek VIP ® 6 AI Tissue Processor - Sakura Finetek, USA) prema uputama proizvođača. Procesiranje tkiva obuhvaća proces dehidracije tkiva (prožimanje tkiva otopinama uzlaznog slijeda postotka alkohola (70%, 96%, 100% otopine alkohola; HISTANOL; , Cat. No. H70-X**, H96-X**, H100 EP-X**, Biognost, Zagreb, Croatia), proces prožimanja tkiva otopinom ksilena (BIOCLEAR, Cat. No. BC-X**, Biognost, Zagreb, Croatia) i proces prožimanja tkiva otopljenim parafinom (BIOWAX 52/54; Cat. No. BW52/54-X**, Biognost, Zagreb, Croatia). Cilj dehidracije tkiva je postepeno izuzimanje vode iz tkiva, te uz bistrenje u ksilenu prožimanje tkiva parafinom. U bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma u kojih smo analizirali KMS, analizirani su i odgovarajući igleni bioptički uzorci koštane srži. Opisanim postupkom dobiveni uzorak koštane srži koristio se za patohistološku i imunohistološku analizu, kao i za citogenetičku analizu metodom FISH (fluorescentna *in situ* hibridizacija). U citogenetičkoj analizi metodom FISH numeričke promjene gena analizirale su se na neobojenim citološkim razmazima aspirata koštane srži, a strukturne promjene gena analizirale su se na bioptičkim uzorcima koštane srži.

4.3. Imunofenotipizacija krvotvornih matičnih stanica na protočnom citometru

Imunofenotipizacija je metoda razlikovanja vrsta pojedinačnih stanica u supenziji stanica koja se temelji na reakciji specifičnih protutijela na različite stanične molekule tzv. CD biljege (engl. *cluster of differentiation*). Protutijela su visoko specifična i vežu se samo na točno određene stanične biljege, a obilježena su fluorescentnim bojama (fluorokromima). Fluorokromi obasjani laserskom svjetlošću se pobuđuju, prelaze više energetske stanje, vraćaju natrag u svoje osnovno stanje pri čemu višak energije oslobađaju u obliku emisije svjetlosti veće valne duljine (fluorescencija) od ulazne svjetlosti što će citometar putem posebnih osjetnika i zabilježiti. Stanice je moguće razvrstati i razlikovati prema samom izražaju (pozitivno/negativno) i jačini izražaja (intenziteta) izmjerene fluorescencije. Ovim načinom, ovisno o vrsti uređaja, moguće je razvrstati stanice na temelju prisutnosti više različitih biljega istovremeno. Uzorci pripravaka KMS su neposredno prije analize na protočnom citometru otapani u vodenoj kupelji na 37⁰ C. Postupak pripreme stanica za analizu na protočnom citometru obuhvaća sljedeći navedeni postupnik predanalitičkog dijela pretrage. Nakon odmrzavanja uzoraka KMS, u uzorcima je određivan ukupan broj leukocita na hematološkom brojaču u analitičkom modu „*whole blood*“ (Sysmex SN2000, Sysmex, Japan). U postupak je odvojen dio volumena uzorka iz originalnog spremnika (epruvete) u kojem je broj leukocita bio do 30 x 10⁹/L. Da bi se odstranio krioprotektiv DMSO koji djeluje citotoksično na sobnoj temperaturi, uzorci su isprani fosfatnim puferom za pranje (PBS pH7,2 + goveđi serum albumin 2% + Na-Azid + K4EDTA) nakon čega su centrifugirani (300 g, 5 minuta) u centrifugi (Rotofix 32A, Hettich, Germany) nakon čega je uklonjen nadtalog. Postupak obilježavanja stanica specifičnim protutijelima. U talog stanica u epruveti su dodana monoklonska protutijela na površinske biljege:

- a. Notch 1-BD Horizon BB515, BD, 564781, u količini od 2,5 µL
- b. CD339 (Jagged1)-APC, BioLegend, 399105, u količini od 5 µL
- c. Delta-like protein 1 (DLL1)-PE, BioLegend, 346404, u količini od 5 µL
- d. CD34-PerCP/Cyanine5.5, BioLegend, 343522, u količini od 5 µL
- e. CD45-APC-H7, BD, 641399, u količini od 5 µL
- f. CD19-PC7, Beckman Coulter, IM3628, u količini od 2,5 µL
- g. CD33-Supernova V428, Beckman Coulter, C76819, u količini od 5 µL

Uzorak KMS s reagensima je inkubiran kroz 20 minuta na sobnoj temperaturi u mraku.

Uklanjanje eritrocita koji svojom brojnošću interferiraju analizi, postupkom razgradnje, liziranja eritrocita, u uzorcima KMS izvršeno je radnom otopinom lizatora (1:10 razrijeđen BD Pharm Lyse Lysing Buffer, BD, 555899) koja je dodana uzorcima u količini od 2 ml. Uzorci su stajali 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku nakon čega je izvršeno centrifugiranje (300 g, 5 minuta) i uklonjen je nadtalog. Otklanjanje suviška nevezanih protutijela je izvršeno pranjem sa 2 mL fosfatnim puferom (PBS pH7,2 + goveđi serum albumin 2% + Na-Azid + K₄EDTA), nakon čega su centrifugirani (300 g, 5 minuta), i uklonjen je nadtalog. Postupak je ponovljen još jednom. Na kraju je napravljena resuspenzija taloga u 1 ml fosfatnog pufera (PBS pH7,2 + goveđi serum albumin 2% + K₄EDTA). Slijedilo je mjerenje uzoraka na protočnom citometru u prilagođenom protokolu prema Sutherland i sur. (207,208) Ovaj protokol čini osnovu kliničkih smjernica za određivanje broja CD34+ krvotvornih matičnih stanica, i 1996. godine je priznat i objavljen pod imenom ISHAGE (eng. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering*, ISHAGE) protokol za jednostavno određivanje relativnog udjela CD34+ krvotvornih matičnih stanica protočnom citometrijom. Protokol se sastoji od kombinacije četiri parametra: veličina stanice (svjetlost koja se raspršila pod malim kutom od 0,5-10°, FSC - engl. *forward scatter*) i unutarnje složenosti /zrnatosti stanica (svjetlost raspršena pod pravim kutom - SSC, engl. *side scatter*), te intenziteta izražaja biljega CD34 i CD45. Jedinstveno za ovaj protokol je upotreba sukcesivnog ograđivanja, zajedno sa analizom populacije od interesa koja je pogodna za različite izvore CD34+ krvotvornih matičnih stanica. Uz postojeća protutijela na biljege CD45 i CD34, dodana su i protutijela na biljege od interesa (NOTCH1, JAGGED1 i DLL1) čiji se izražaj pratio na matičnim stanicama. U svakom je pokusu propušteno minimalno 5×10^5 stanica. Rezultat je izražen u postotku pozitivnih matičnih stanica na tražene biljege. Intenzitet nije prikazan u radu zbog niskog broja biljega, signala, koji su dobiveni analizom stanica imunofenotipizacijom. U istraživanju je korišten instrument za protočnu citometriju: digitalni protočni razvrstavač (Navios, BeckmanCoulter, B47905, USA) opremljen sa 3 lasera i mogućnosti detekcije 10 biljega istovremeno. Tijekom razvrstavanja stanica korišten je integralni računalni program za prikupljanje podataka i analizu Navios, Beckman Coulter (Beckman Coulter, USA), a sama analiza snimljenih izmjerenih podataka odrađena je u komercijalnom programu za analizu podataka dobivenih protočnom citometrijom Kaluza Analysis Software, version 2,1, Beckman Coulter, A82959 (Beckman Coulter, USA).

4.4. Histološka analiza tumorskih plazma stanica u koštanoj srži multiplog mijeloma

Biopsija koštane srži obrađena je rutinski. Obojana je histokemijskom metodom hemalaun – eozinom i upotrijebljena je za morfološku analizu tipa infiltrata koštane srži tumorskim plazma stanicama. (189) Citološki razmazi aspirata koštane srži na standardnim i silaniziranim predmetnim staklima bojani May-Grünwald Giemskom upotrijebljeni su za morfološku analizu tumorskih stanica, određivanje stupnja diferencijacije tumorskih plazma stanica. (189)

Intersticijski tip infiltrata koštane srži odgovarao je infiltraciji koštane srži tumorskim plazma stanicama uz očuvanu intetrabekularnu arhitekturu koštane srži. Nodularni tip infiltrata koštane srži odgovarao je nakupinama tumorskih plazma stanica unutar intertrabekularnih prostora. Difuzni tip infiltrata koštane srži odgovarao je u potpunosti infiltriranim intertrabekularnim prostorima tumorskim plazma stanicama uz potisnute stanice hemocitopoeze.

Tri stupnja diferencijacije tumorskih plazma stanica, dobro, umjereno i slabo diferencirane TPS određene su citološkim obilježjima. (36) Dobro diferencirane stanice (G1), niskog stupnja malignosti pokazuju citološka obilježja: jednolične stanice, pravilnih malih jezgara grubog granuliranog kromatina bez vidljive jezgrice, jezgra ekscentrično položena u umjereno obilnoj citoplazmi stanice. Umjereno diferencirane TPS (G2), niskog stupnja malignosti pokazuju citološka obilježja: umjerena pleomorfija stanica, različite veličine jezgara rahlije granuliranog kromatina, tek pojedine uz vidljivu jezgricu. Slabo diferencirane TPS (G3) visokog stupnja malignosti, pokazuju citološka obilježja: jaka pleomorfija stanica, nepravilne konture jezgara rahlije granuliranog kromatin s istaknutom jezgricom te visoki omjer jezgre i citoplazme. (36)

4.5. Imunohistokemijsko bojenje na parafinskim rezovima biopsije koštane srži

Na serijskim rezovima biopsije koštane srži bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma u svrhu postavljanja dijagnoze učinjeno je imunohistokemijsko bojenje protutijelima CD138 (Novocastra; UK, 5F7, monoklonalno mišje, razrjeđenje 1:25) i CD38 (Labvision; 38C03, monoklonalno mišje, razrjeđenje 1:50), koristeći LSAB HRP set za vizualizaciju ekspresije navedenih proteina, primarno (karakteristično/specifično) membranski i citoplazmatski, te pozitivne kontrole prema uputama proizvođača.

U istraživanju korištena su sljedeća protutijela za imunohistokemijsko bojenje biopsije koštane srži:

- NOTCH1 (Santa Cruz Biotechnology; sc-6014, poliklonalno kozje, razrjeđenje 1:400)

obilježava epitope na C-terminalnom kraju receptora (aminokiseline 2415-2453)

- JAGGED1 (Santa Cruz Biotechnology; sc-6011, poliklonalno kozje, razrjeđenje 1:150)

obilježava C-terminalni kraj liganda; (aminokiseline 1110-1218)

-DLL1 (Abcam 10554, poliklonalno zečje, razrjeđenje 1:1000), obilježava C-terminalni kraj liganda, 1 DSL domena, 8 EGF-like domena (aminokiseline 155-173).

Postupci demaskiranja proteina NOTCH1, JAGGED1, DLL1 bili su: postupak deparafinacije, rehidracije i demaskiranja proteina u uređaju PT Link, Pre-Treatment Module for Tissue Specimens na temperaturi 85 °C/20 min (PT 10027, programska podrška Dako v120; Agilent Dako Technologies, USA) koristeći pufer Dako Wash Buffer 10x (Code S3006) i otopinu za demaskiranje proteina (Target Retrieval Solution, High pH (Link) (K800421-2; Agilent Dako Technologies, USA) ili Target Retrieval Solution, Low pH (Link) (K800521-2; Agilent Dako Technologies, USA) prema preporukama proizvođača.

Vizualizacija ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 provedena je korištenjem streptavidin- biotin plus set (LSAB HRP+) uz blokirajući protein (Agilent Dako Technologies, USA). Ekspresija proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 primarno je membranska i citoplazmatska te su uspoređivani s ekspresijom istih u rezovima tkiva koji su korišteni kao pozitivne kontrole prema preporuci proizvođača protutijela. Za negativnu kontrolu korišteni su imunohistokemijski bojani rezovi analiziranog proteina bez primarnog protutijela. Ekspresija proteina NOTCH1, JAGGED1, DLL1 smatrana je pozitivnom ako je utvrđena u više od 30% tumorskih stanica u odnosu na ukupni broj tumorskih stanica u koštanoj srži. Prag ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1, DLL1 imunohistokemijskim bojenjem određen je s ekspresijom analiziranih proteina u više od 30% tumorskih plazma stanica određen srednjom vrijednosti postotka pozitivnih stanica -2 SD u svih 36 bolesnika (NOTCH1 X -2 SD=26%; JAGGED1 X -2 SD=21%; DLL1 X -2 SD=4%) kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati te imunohistokemijsko bojenje fenotipski normalnih, poliklonalnih plazma stanica. Simultano dvostruko imunohistokemijsko bojenje (engl. *double labelling*) CD138 i NOTCH1 ili JAGGED1 ili DLL1 nije učinjeno, već je učinjena usporedba ekspresije navedenih biljega na serijskim rezovima biopsije koštane srži u tumorskim plazma stanicama čime je analiza ekspresije

proteina NOTCH1, JAGGED1, DLL1 bila jednako vrijedna. Imunohistokemijsko bojenje proteina NOTCH1, JAGGED1, DLL1 analizirano je informatičkim programom “AnalySIS” (Olympus, Soft Imaging system GmbH, Germany). Analizirano je onoliko reprezentativnih vidnih polja povećanja 40x10, površine 144436,18 μm^2 , u kojima je brojano minimalno 500 tumorskih stanica. Ukupan broj tumorskih plazma stanica uspoređivan je s brojem CD138 i CD38 imunohistokemijski pozitivnih plazma stanica. Usporedbom se nije našlo razlike u broju tumorskih stanica. Pri brojanju stanica koristila se mrežica “AnalySIS” programa koja je površinu cijelog vidnog polja podijelila u deset podpolja, visine i širine od 50 μm . Unutar ukupno izbrojanih tumorskih stanica brojane su tumorske stanice koje su ekspimirale NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 uz računanje omjera pozitivno obilježenih stanica u odnosu na ukupan broj tumorskih stanica. Određivan je intenzitet ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 semikvantitativnom metodom. Rezultati intenziteta ekspresije proteina bili su podijeljeni u četiri skupine: 0 = negativno; 1 = slabi intenzitet; 2= srednji intenzitet; 3 = jaki intenzitet. Slabim intenzitetom se smatrala vizualizacija pozitivno obojenih stanica tek u vidnom polju povećanja 400x, srednjim intenzitetom vizualizacija pozitivno obojenih stanica u vidnom polju povećanja 200x, a jakim intenzitetom vizualizacija pozitivno obojenih stanica u vidnom polju povećanja 100x. (209)

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

4.6.1. Priprema preparata

Strukturne promjene gena t(11;14)(q13;q32); t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23) analizirane interfaznom metodom FISH provedene su na serijskim rezovima cilindara biopsije koštane srži uklopljenih u parafin, debljine 4 μm te fiksiranim na silaniziranim predmetnim staklima (Agilent Dako Technologies, USA). Numeričke promjene gena, delecija regije 13q34 i regije 17p13.1 analizirane interfaznom metodom FISH provedene su na neobojanim citološkim razmazima aspirata koštane srži na standardnim ili silaniziranim predmetnim staklima (Agilent Dako Technologies, USA). Analiza delecije pojedine regije ili cijelog kromosoma provodila se na citološkim razmazima kako bi se izbjeglo preklapanje jezgara i analiza samo dijelova jezgre što

se može pojaviti u parafinskim rezovima, a što može biti uzrok lažno pozitivnih ili negativnih rezultata. Postupak deparafinizacije, rehidracije i kuhanja provedeni su u uređaju PT Link, Pre-Treatment Module for Tissue Specimens na temperaturi 85 °C/4 min (PT 10027, programska podrška Dako v120; Agilent Dako Technologies, USA), nakon čega slijedi tretiranje pepsinom 0,1 g/mL (Sigma, Germany) na +37 °C, 20 minuta, kako bi se uklonili proteini, te postupak dehidracije i sušenja na zraku na sobnoj temperaturi prije stavljanja probe. Citološki razmazi aspirata koštane srži od uzorkovanja do provedbe citogenetičke analize bili su pohranjeni u ledenici na -20 °C. Prije fiksacije razmazi su izvađeni iz ledenice te odloženi pola sata na sobnoj temperaturi. Fiksacija preparata provedena je u tri svježe pripremljene otopine octene kiseline i metanola (50 : 50), zatim su preparati sušeni na zraku te je slijedio postupak dehidracije i ponovo sušenje na zraku na sobnoj temperaturi. Rezovi biopsije i citološki razmazi aspirata koštane srži s direktno obilježenim probama prema uputama proizvođača uloženi su u aparat za hibridizaciju, Hybridizer (Agilent Dako Technologies, USA), gdje se provodi proces denaturacije pet minuta te hibridizacije preko noći na temperaturama prema protokolu za parafinske rezove biopsije i citološke razmaze. Nakon hibridizacije rezovi su bili isprani tri puta slijedom pufera: 0,0003% Tween/0,4xSSC; 34 0,0001% Tween/2xSSC; 2xSSC. Za kontrastiranje DNA upotrijebljeno je 10 µL otopine Vectashield (Vector Laboratories Inc., USA) koja sadržava 10-5 g/L fluorescentne boje 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Probe koje su korištene u citogenetičkoj analizi tumorskih plazma stanica u koštanoj srži interfaznom metodom FISH bile su:

- Vysis LSI IGH/CCND1 DF FISH Probe Kit (CE) (Vysis Inc, Abbott Molecular, US) proba je dizajnirana za detekciju jukstapozicije lokusa teškog lanca imunoglobulina i sekvence CCND1 gena uključenih u t(11;14)(q13;q32). Sadržava dvije probe: LSI IGH probe obilježene SpectrumGreen i LSI CCND1 probe obilježene SpectrumOrange (210)

- Vysis LSI IGH/FGFR3 DF FISH Probe Kit (CE) (Vysis Inc, Abbott Molecular, US) proba je dizajnirana za detekciju jukstapozicije IGH lokusa i sekvence FGFR3 gena uključenih u t(4;14)(p16;q32). Proba je dizajnirana od dva dijela: LSI IGH probu obilježene SpectrumGreen i LSI FGFR3 probu obilježene SpectrumOrange (211)

- Vysis LSI IGH/MAF DF FISH Probe Kit (CE) (Vysis Inc, Abbott Molecular, US) proba je dizajnirana za jukstapoziciju IGH lokusa i sekvence MAF gena uključene u t(14;16)(q32;q23). Sadržava dvije probe: probe LSI IGH i LSI MAF. LSI IGH proba je obilježena SpecrumGreen. LSI MAF proba sadržava dvije probe obilježene SpectrumOrange (212)

- Vysis LSI D13s319/13q34 FISH Probe Kit (CE) (Vysis Inc, Abbott Molecular, US) proba omogućuje detekciju gubitka regije 13q14 kromosoma 13 (213)
- Vysis LSI TP53 (17p13.1) SpectrumOrange Probe (CE) (Vysis Inc, Abbott Molecular, US) proba omogućuje detekciju gubitka regije 17p13.1 kromosoma 17 (214)

4.6.2. Analiza preparata

Pri citogenetičkoj analizi uzoraka preparata metodom FISH korišten je fluorescentni mikroskop Olympus BX51. U svakom uzorku analizirano je 200 morfološki očuvanih tumorskih plazma stanica. Pozitivnim rezultatom smatrana je prisutnost karakterističnih promjena signala u više od 10% jezgara tumorskih plazma stanica, što odgovara vrijednosti pozitivnog praga. (215,216) Vrijednost pozitivnog praga određena je kao srednja vrijednost +3 SD frekvencije karakterističnih promjena interfaznih FISH signala u 500 stanica koštane srži bolesnika s MM.

4.7. Statistička analiza

Podaci su prikazani tablično i grafički. Analizom snage testa za Mann-Whitney U test i pretpostavljeni učinak veličine od $d=1,0$, uz razinu značajnosti $\alpha=0,05$ i snagu testa od 80% u istraživanje je bilo potrebno uključiti najmanje 36 uzoraka/ispitanika. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela svih kontinuiranih vrijednosti te su se razlike između skupina analizirale Mann-Whitney U testom s obzirom na neparametrijsku raspodjelu. Kontinuirane vrijednosti prikazane su kroz apsolutne raspone, medijane i pripadajuće interkvartilne raspone, dok su kategorijske vrijednosti prikazane kroz apsolutne frekvencije i pripadajuće udjele. Kao mjere povezanosti izračunati su korelacijski koeficijenti između pojedinih varijabli shodno postavljenim ciljevima i hipotezama gdje su se koristili Spearmanovi koeficijenti korelacije rho. Razlike u kategorijskim varijablama između ispitivanih skupina su analizirane Fisherovim egzaktnim testom, odnosno Fisher-Freeman-Haltonovim testom u slučajevima kada je struktura tablica bila veća od formata 2x2. Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 29.0.1.

5. REZULTATI

U istraživanju su analizirani uzorci krvotvornih matičnih stanica (KMS) (CD34+ stanice) i aspirata/iglenih biopsija koštane srži 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma (MM) i uzorci KMS koštane srži 9 zdravih darivatelja. Uzorci KMS su dobiveni postupkom leukaferoze, a uzorci biopsije i aspiracije koštane srži jednokratnim ubodom igle i isisavanjem koštane srži štrcaljkom kroz biopsijsku iglu. Broj KMS je neposredno nakon prikupljanja (pri zamrzavanju) i nakon odmrzavanja analiziran na protočnom citometru. Ukupan broj leukocita u uzorku KMS je, nakon odmrzavanja, određivan na hematološkom brojaču. Između bolesnika i zdravih darivatelja KMS je uspoređivana dob ispitanika u trenutku postavljanja dijagnoze, broj KMS (CD34+stanica) koje su prikupljene u postupku leukaferoze (pri zamrzavanju), ukupan broj leukocita u uzorku KMS koji je prikupljen u postupku leukaferoze i analiziran nakon odmrzavanja, broj KMS (CD34+) nakon odmrzavanja. Taj broj je izražen kao udio CD34+ stanica (%) u odnosu na ukupan broj leukocita (CD45+ stanica) i kao broj CD34+ stanica u jedinici volumena.

U Tablici 1A su prikazane i analizirane varijable: dob ispitanika u trenutku prikupljanja KMS, broj KMS (CD34 pozitivnih stanica) koje su prikupljene u postupku leukaferoze, pri zamrzavanju (10^6 /L), broj leukocita u uzorcima KMS (10^9 /L), te udio CD34 pozitivnih KMS (%) i broj CD34 pozitivnih KMS (10^6 /L) nakon odmrzavanja. Analiza je rađena na uzorcima KMS 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma (MM) te uzorcima KMS 9 zdravih darivatelja koji su dobiveni postupkom leukaferoze. U Tablici 1B je prikazana usporedba varijabli iz tablice 1A između skupina multiplog mijeloma i zdrave koštane srži primjenom Mann-Whitney U testa.

Tablica 1A. Prikaz i analiza dobi ispitanika, broja CD34 pozitivnih stanica u uzorcima krvotvornih matičnih stanica 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma i 9 zdravih darivatelja krvotvornih matičnih stanica dobivenih postupkom leukaferoze i analiziranih neposredno nakon prikupljanja (pri zamrzavanju) i nakon odmrzavanja metodom imunofenotipizacije na protočnom citometru, ukupnog broja leukocita u istim uzorcima krvotvornih matičnih stanica nakon odmrzavanja analiziran na hematološkom brojaču.

Skupina		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Dob(godine)	Multipli mijelom	36	22,00	71,00	52,00	59,00	62,00
	Zdrava koštana srž	9	27,00	67,00	27,50	57,00	60,50
Broj CD34 pri zamrzavanju (10^6 /L)	Multipli mijelom	36	961,60	8716,70	2338,63	3444,95	6491,30
	Zdrava koštana srž	9	570,50	4636,50	653,65	947,44	2226,55
Ukupni broj leukocita (10^9 /L)	Multipli mijelom	36	16,07	360,10	99,02	144,87	172,05
	Zdrava koštana srž	9	168,80	490,03	191,75	244,74	318,87
Broj CD34 pri odmrzavanju (%)	Multipli mijelom	36	0,13	9,69	0,76	2,02	4,19
	Zdrava koštana srž	9	0,01	0,15	0,01	0,01	0,03
Broj CD34 pri odmrzavanju (10^6 /L)	Multipli mijelom	36	215,30	9100,60	1114,28	3164,15	4598,95
	Zdrava koštana srž	9	18,50	367,10	23,55	32,70	84,15

*Broj CD34 pri zamrzavanju (10^6 /L)- broj krvotvornih matičnih stanica koje ekspimiraju biljeg CD34 u uzorku analiziran pri zamrzavanju stanica i izražen kao apsolutni broj (10^6 /L); Ukupni broj leukocita (10^9 /L) - ukupni broj leukocita u uzorku krvotvornih matičnih stanica analiziran nakon odmrzavanja stanica, određivan na hematološkom brojaču; Broj CD34 pri odmrzavanju (%) i (10^6)- broj krvotvornih matičnih stanica koje ekspimiraju biljeg CD34 u uzorku analiziran nakon odmrzavanju stanica i izražen kao udio (%) i apsolutni broj (10^6 /L);

Medijan dobi u skupini bolesnika bio je 59 godina, a u kontrolnoj skupini 57 godina. U bolesnika s multiplim mijelom utvrđen je veći broj CD34 pri zamrzavanju (medijan 3444,95 x 10^9 /L) u odnosu na kontrolu (medijan 947,44 x 10^9 /L), kao i broj i udio CD34+ stanica nakon odmrzavanja (medijan 3164,15 x 10^6 /L; median 2,02%) u odnosu na kontrolnu skupinu (medijan 32,70x 10^6 /L; median 0,01%), dok su imali značajno manji ukupni broj leukocita (medijan 144,87 x 10^9 /L) u odnosu na kontrolnu skupinu (medijan 244,74 x 10^9 /L).

Tablica 1B. Usporedba dobi ispitanika te broja CD34 pozitivnih stanica u uzorcima krvotvornih matičnih stanica dobivenih neposredno nakon prikupljanja (pri zamrzavanju) i nakon odmrzavanja kao i ukupnog broja leukocita u uzorcima krvotvornih matičnih stanica nakon odmrzavanja u 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma i uzorcima krvotvornih matičnih stanica koštane srži 9 zdravih darivatelja dobivenih postupkom leukaferoze primjenom Mann-Whitney U testa.

	Mann-Whitney U	Z	P
Dob (godine)	116,500	-1,293	0,196
Broj CD34 pri zamrzavanju (10^6 /L)	42,000	-3,405	0,001
Ukupni broj leukocita (10^9 /L)	37,000	-3,547	<0,001
Broj CD34 pri odmrzavanju (%)	1,000	-4,570	<0,001
Broj CD34 pri odmrzavanju (10^6 /L)	5,000	-4,455	<0,001

*Broj CD34 pri zamrzavanju (10^6 /L)- broj krvotvornih matičnih stanica koje ekspimiraju biljeg CD34 u uzorku analiziran pri zamrzavanju stanica i izražen kao apsolutni broj (10^6 /L); Ukupni broj leukocita (10^9 /L) - ukupni broj leukocita u uzorku krvotvornih matičnih stanica analiziran nakon odmrzavanja stanica, određivan na hematološkom brojaču; Broj CD34 pri odmrzavanju (%) i (10^6)- broj krvotvornih matičnih stanica koje ekspimiraju biljeg CD34 u uzorku analiziran nakon odmrzavanja stanica i izražen kao udio (%) i apsolutni broj (10^6 /L); P- značajnost testa;

Skupina s multiplim mijelomom imala je značajno veći broj CD34 pozitivnih krvotvornih matičnih stanica pri zamrzavanju (P=0,001) kao i broj i udio CD34 pozitivnih krvotvornih matičnih stanica nakon odmrzavanja (P<0,001) dok su imali značajno manji ukupni broj leukocita (P<0,001) u odnosu na zdrave darivatelje što je u Tablici 1B obilježeno crvenom bojom. Nije bilo značajne razlike u dobi između dvije skupine ispitanika (Tablica 1B).

5.1. Analiza razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u krvotvornim matičnim stanicama

U uzorcima KMS koštane srži nakon odmrzavanja u 36 bolesnika i 9 zdravih darivatelja je metodom imunofenotipizacije na protočnom citometru određena razina ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1. Rezultat je izražen u postotku pozitivnih KMS na tražene biljege. U Tablici 2A i 2B i na Slikama 10 do 12 je prikazana analiza i usporedba razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u uzorcima KMS koštane srži nakon odmrzavanja u 36 bolesnika i 9 zdravih darivatelja metodom imunofenotipizacije na protočnom citometru. Rezultat je izražen u postotku pozitivnih KMS za analizirane biljege.

Tablica 2A. Prikaz i analiza razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u CD34 pozitivnim krvotvornim matičnim stanicama koštane srži nakon odmrzavanja u 36 bolesnika i 9 zdravih darivatelja metodom imunofenotipizacije na protočnom citometru, izražene u postocima.

Skupina		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
NOTCH1 u KMS (%)	Multipli mijelom	36	1,27	56,36	11,11	19,40	36,56
	Zdrava koštana srž	9	6,56	56,10	10,07	15,58	27,83
JAGGED1 u KMS (%)	Multipli mijelom	36	0,00	4,92	0,04	0,58	1,42
	Zdrava koštana srž	9	0,00	16,13	1,53	4,65	11,26
DLL1 u KMS (%)	Multipli mijelom	36	0,00	3,02	0,08	0,16	0,53
	Zdrava koštana srž	9	0,00	41,36	0,80	3,23	12,70

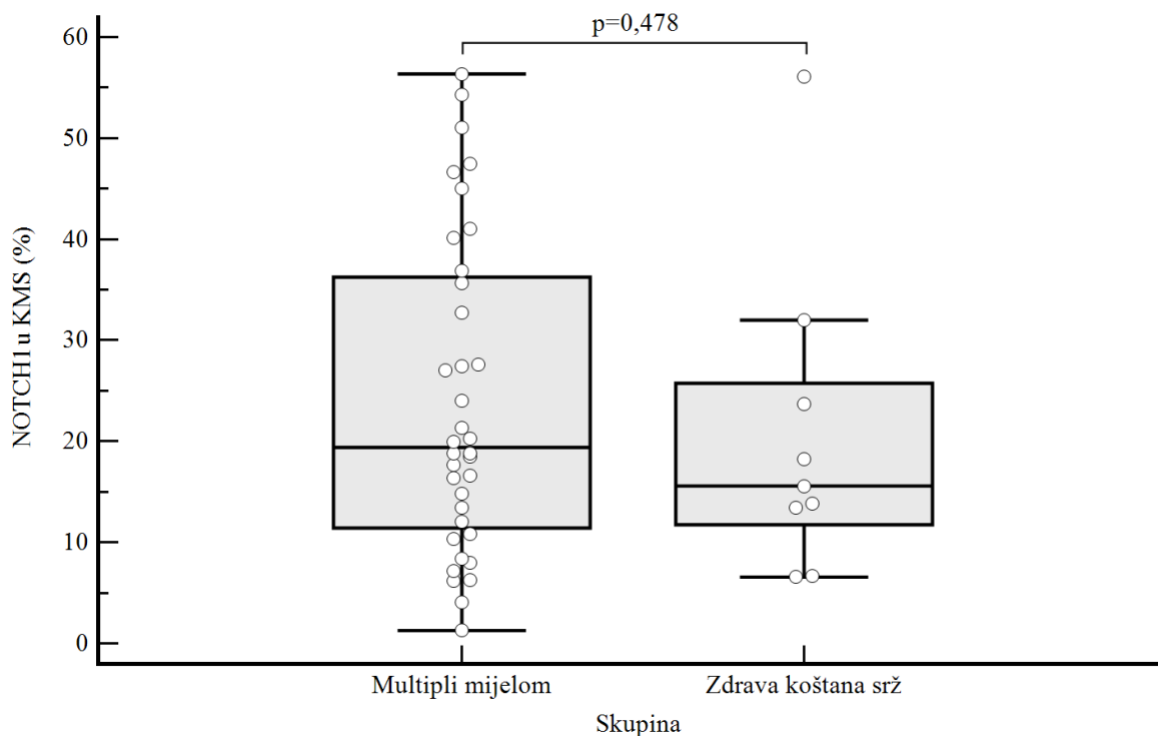
*KMS- CD34 pozitivne krvotvorne matične stanice; Multipli mijelom- uzorci krvotvornih matičnih stanica koštane srži bolesnika s multiplim mijelomom; Zdrava koštana srž – uzorci krvotvornih matičnih stanica zdravih darivatelja; NOTCH1 u KMS (%) - udio CD34 pozitivnih krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u KMS (%) - udio CD34 pozitivnih krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u KMS (%) - udio CD34 pozitivnih krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina DLL1; N- broj uzoraka; Min- najmanja vrijednost ekspresije; Max- najveća vrijednost ekspresije;

Razina ekspresije proteina NOTCH1 u KMS multiplog mijeloma bila je 19,40%, a u KMS zdrave koštane srži 15,58%. Razina ekspresije proteina JAGGED1 bila je veća u skupini KMS zdrave koštane srži (4,65%) u odnosu na KMS multiplog mijeloma (0,58%). Ekspresija proteina DLL1 bila je veća u skupini KMS zdrave koštane srži (3,23%) u odnosu na KMS multiplog mijeloma (0,16%).

Tablica 2B. Usporedba razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u CD34 pozitivnim krvotvornim matičnim stanicama koštane srži nakon odmrzavanja u 36 bolesnika i 9 zdravih darivatelja kao kontrolna skupina metodom imunofenotipizacije na protočnom citometru primjenom Mann-Whitney U testa

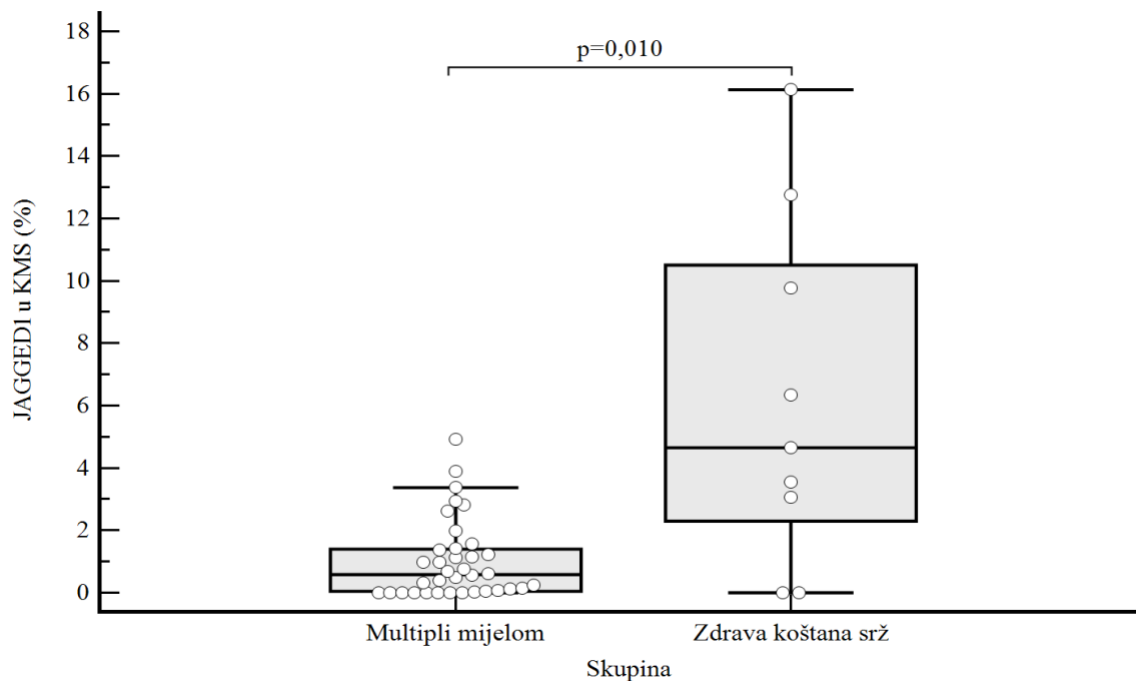
	Mann-Whitney U	Z	P
NOTCH1 u KMS (%)	137,000	-0,709	0,478
JAGGED1 u KMS (%)	72,000	-2,561	0,010
DLL1 u KMS (%)	20,000	-4,031	<0,001

*NOTCH1 u KMS (%) - udio CD34 pozitivnih krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u KMS (%) - udio CD34 pozitivnih krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u KMS (%) - udio CD34 pozitivnih krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina DLL1; P- značajnost testa;



*KMS – krvotvorne matične stanice; NOTCH1 u KMS (%) - udio CD34 pozitivnih krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina NOTCH1;

Slika10. Analiza razine ekspresije proteina NOTCH1 u CD34 pozitivnim krvotvornim matičnim stanicama koštane srži nakon odmrzavanja u 36 bolesnika i 9 zdravih darivatelja metodom imunofenotipizacije na protočnom citometru, prikazana grafički i analizirana Mann-Whitney U testom



*KMS – krvotvorne matične stanice; JAGGED1 u KMS (%) - udio CD34 pozitivnih krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina JAGGED1;

Slika 11. Analiza razine ekspresije proteina JAGGED1 u CD34 pozitivnim krvotvornim matičnim stanicama koštane srži nakon odmrzavanja u 36 bolesnika i 9 zdravih darivatelja metodom imunofenotipizacije na protočnom citometru, prikazana grafički i analizirana Mann-Whitney U testom

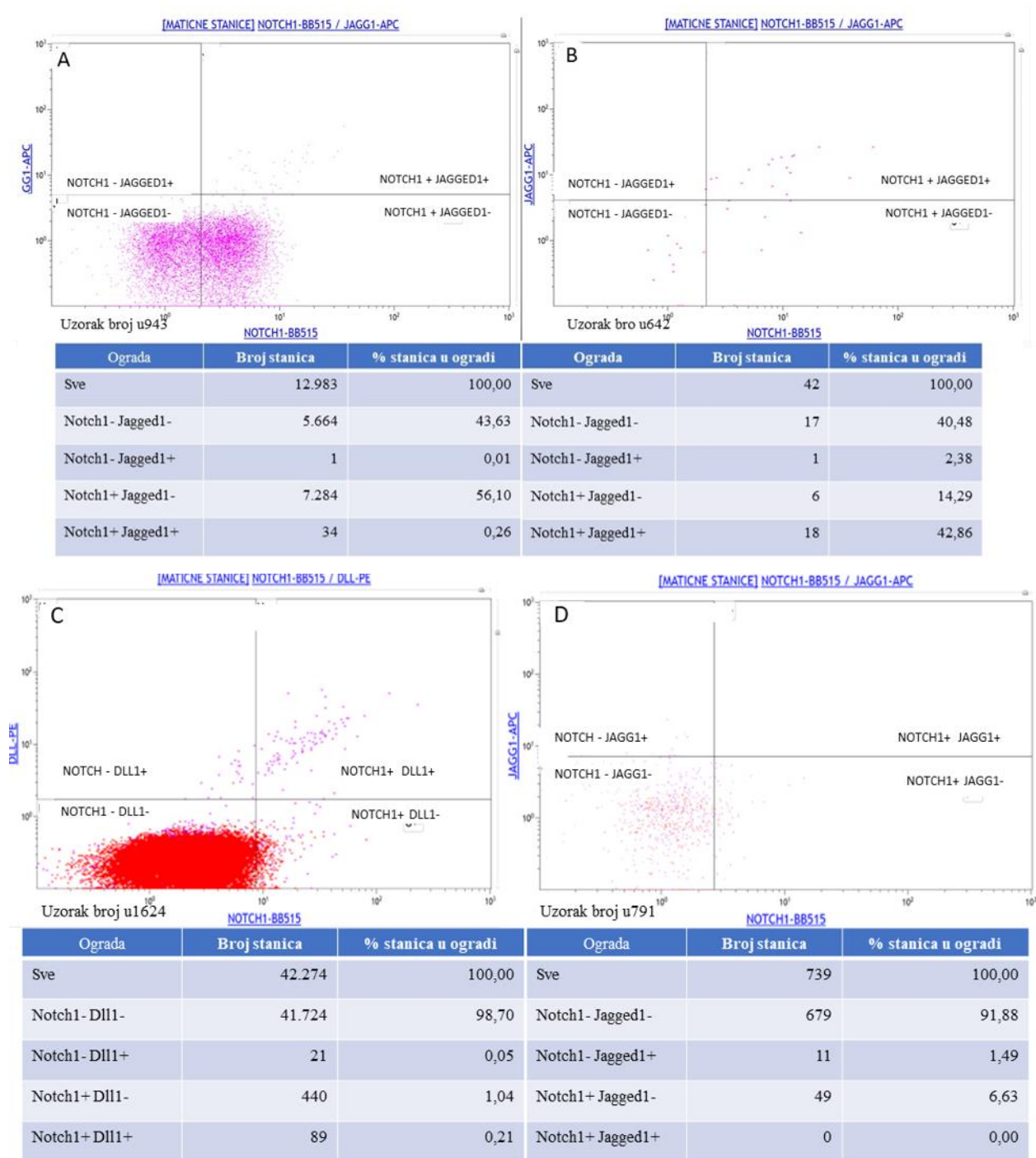


*KMS – krvotvorne matične stanice; DLL1 u KMS (%) - udio CD34 pozitivnih krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina DLL1;

Slika 12. Analiza razine ekspresije proteina DLL1 u CD34 pozitivnim krvotvornim matičnim stanicama koštane srži nakon odmrzavanja u 36 bolesnika i 9 zdravih darivatelja kao kontrolna skupina metodom imunofenotipizacije na protočnom citometru , prikazana grafički i analizirana Mann-Whitney U testom

U Tablici 2A su prikazane i analizirane razine ekspresija proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u krvotvornim matičnim stanicama multiplog mijeloma i zdrave koštane srži. Usporedba razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS multiplog mijeloma i zdrave koštane srži prikazane su u Tablici 2B i na Slikama 10 do 12. Razina ekspresije proteina JAGGED1 bila je značajno veća u skupini KMS zdrave koštane srži u odnosu na KMS multiplog mijeloma, što je u tablici 2B. obilježeno crvenom bojom (medijan 4,65 uz interkvartilni raspon (IQR) 1,53-11,26 naprema medijan 0,58 uz IQR (0,04-1,42); $P=0,010$, Slika 11). Ekspresija proteina DLL1 bila je značajno veća u skupini KMS zdrave koštane srži u odnosu na KMS multiplog mijeloma, što je u tablici 2B obilježeno crvenom bojom (medijan 3,23 uz IQR (0,80-12,70) naprema medijan 0,16 uz IQR (0,08-0,53); $P<0,001$, Slika 12). U ekspresiji proteina NOTCH1 između dvije skupine ispitanika nije bilo značajnih razlika ($P=0,478$). S obzirom na nisku razinu ekspresije biljega na stanicama nije bilo moguće odrediti intenzitet signala već samo razinu ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS. U Slikama 13 do 15 prikazani su

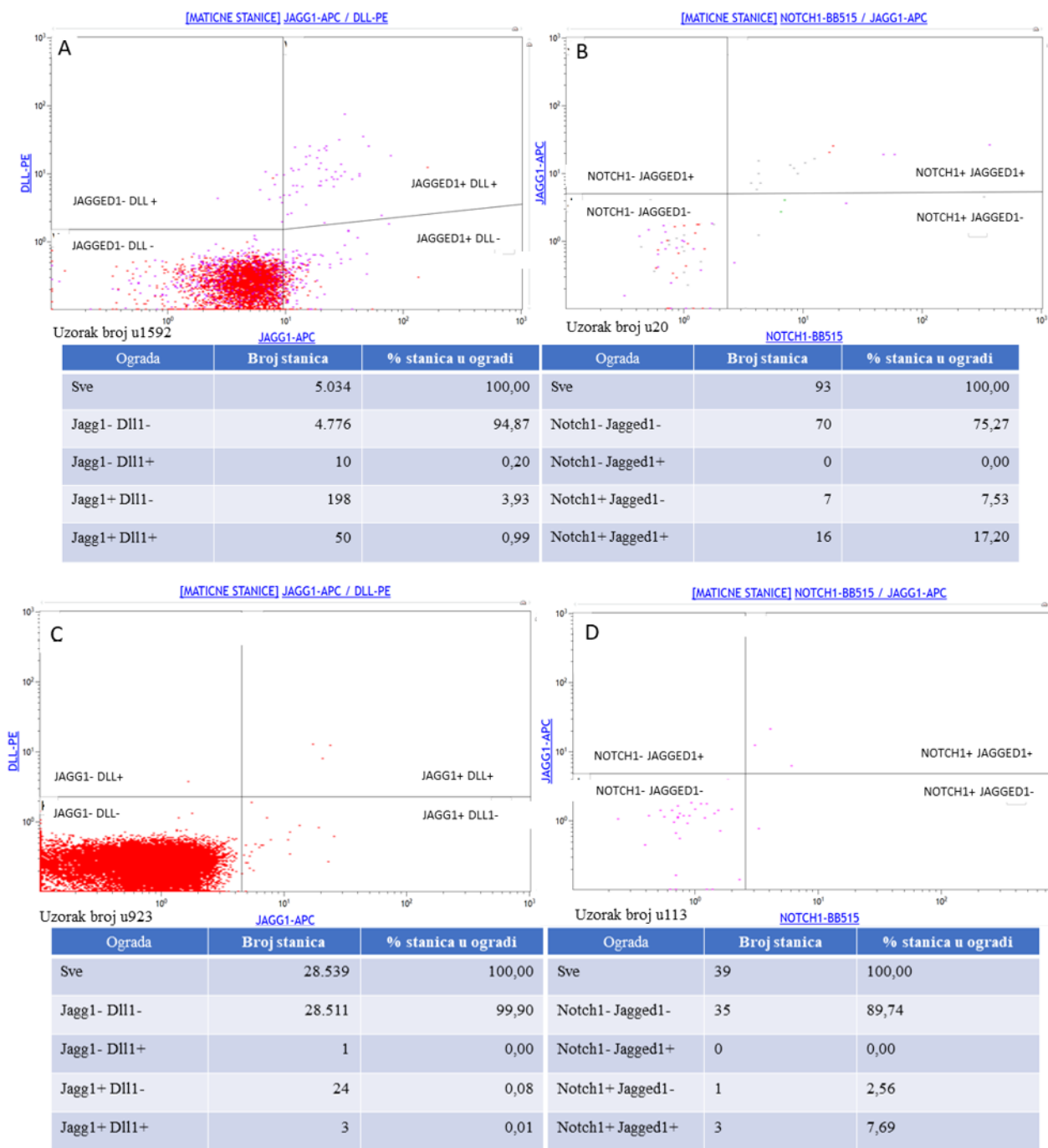
primjeri dvoparametrijskih prikaza visokih i niskih ekspresija receptora NOTCH1, JAGGED1, DLL1 u CD34 pozitivnim krvotvornim matičnim stanicama bolesnika i krvotvornim matičnim stanicama zdravih darivatelja analiziranih metodom protočne citometrije.



*NOTCH- BB515- naziv monoklonskog protutijela na biljeg NOTCH1; JAGG1-APC- naziv monoklonskog protutijela na biljeg JAGGED1; DLL-PE- naziv monoklonskog protutijela na biljeg DLL1

Slika 13. Ilustrativni prikazi visoke (A, B) i niske (C, D) ekspresije receptora NOTCH1 u CD34 pozitivnim krvotvornim matičnim stanicama bolesnika (A,C) i krvotvornim matičnim stanicama zdravih darivatelja (B, D) analizirane metodom protočne citometrije

- A. Visoka ekspresija NOTCH1 receptora u krvotvornim matičnim stanicama bolesnika identifikacijskog broja u943. NOTCH1 receptor je ekspimiran u 56,36% krvotvornih matičnih stanica.
- B. Visoka ekspresija NOTCH1 receptora u krvotvornim matičnim stanicama zdravog darivatelja identifikacijskog broja u642. NOTCH1 receptor je ekspimiran u 57,15% krvotvornih matičnih stanica.
- C. Niska ekspresija NOTCH1 receptora u krvotvornim matičnim stanicama bolesnika identifikacijskog broja u1624. NOTCH1 receptor je ekspimiran u 1,25% krvotvornih matičnih stanica.
- D. Niska ekspresija NOTCH1 receptora u krvotvornim matičnim stanicama zdravog darivatelja identifikacijskog broja u791. NOTCH1 receptor je ekspimiran u 6,63% krvotvornih matičnih stanica.



*NOTCH- BB515- naziv monoklonskog protutijela na biljeg NOTCH1; JAGG1-APC- naziv monoklonskog protutijela na biljeg JAGGED1; DLL-PE- naziv monoklonskog protutijela na biljeg DLL1

Slika 14. Ilustrativni prikazi visoke (A, B) i niske (C, D) ekspresije receptora JAGGED1u CD34 pozitivnim krvotvornim matičnim stanicama bolesnika (A, C) i u krvotvornim matičnim stanicama zdravih darivatelja (B, D) analizirane metodom protočne citometrije

- A. Visoka ekspresija JAGGED1 liganda u krvotvornim matičnim stanicama bolesnika identifikacijskog broja u1592. JAGGED1 receptor je ekspimiran u 4,92% krvotvornih matičnih stanica.
- B. Visoka ekspresija JAGGED1 liganda u krvotvornim matičnim stanicama zdravog darivatelja identifikacijskog broja u20. JAGGED1 receptor je ekspimiran u 17,2% krvotvornih matičnih stanica.
- C. Niska ekspresija JAGGED1 liganda u krvotvornim matičnim stanicama bolesnika identifikacijskog broja u923. JAGGED1 receptor je ekspimiran u 0,09% krvotvornih matičnih stanica .
- D. Niska ekspresija JAGGED1 liganda u krvotvornim matičnim stanicama zdravog darivatelja identifikacijskog broja u113. JAGGED1 receptor je ekspimiran u 7,69% krvotvornih matičnih stanica .



*NOTCH- BB515- naziv monoklonskog protutijela na biljeg NOTCH1; JAGG1-APC- naziv monoklonskog protutijela na biljeg JAGGED1; DLL-PE- naziv monoklonskog protutijela na biljeg DLL1

Slika 15. . Ilustrativni prikazi visoke (A, B) i niske (C, D) ekspresije receptora DLL1 u CD34 pozitivnim krvotvornim matičnim stanicama bolesnika (A, C) i u krvotvornim matičnim stanicama zdravih darivatelja (B, D) analizirane metodom protočne citometrije

A. Visoka ekspresija DLL1 liganda u krvotvornim matičnim stanicama bolesnika identifikacijskog broja u1745. DLL1 receptor je ekspimiran u 2,52% krvotvornih matičnih stanica .

B. Visoka ekspresija DLL1 liganda u krvotvornim matičnim stanicama zdravog darivatelja identifikacijskog broja u108. DLL1 receptor je ekspimiran u 3,48% krvotvornih matičnih stanica .

C. Niska ekspresija DLL1 liganda u krvotvornim matičnim stanicama bolesnika identifikacijskog broja u957. DLL1 receptor je ekspimiran u 0% krvotvornih matičnih stanica.

D. Niska ekspresija DLL1 liganda u krvotvornim matičnim stanicama zdravog darivatelja identifikacijskog broja u113. DLL1 receptor je ekspimiran u 0% krvotvornih matičnih stanica .

5.2. Analiza razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama

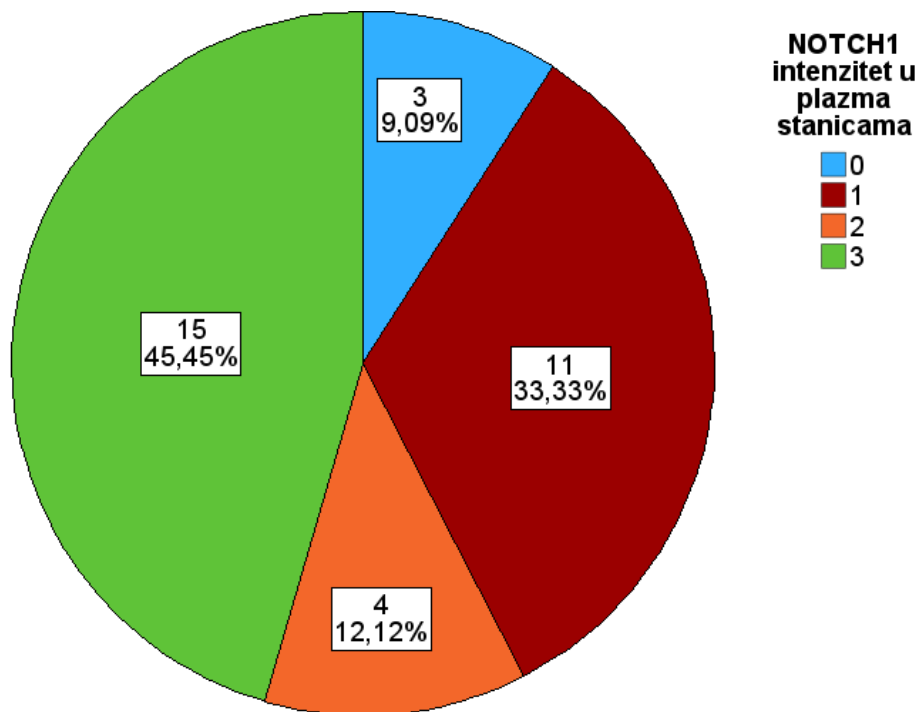
U iglenim biopičkim uzorcima koštane srži 36 bolesnika, u kojih su analizirane KMS protočnim citometrom, učinjeno je imunohistokemijsko bojenje protutijelima NOTCH1, JAGGED1 i DLL1. Ekspresija proteina NOTCH1, JAGGED1, DLL1 smatrana je pozitivnom ako je utvrđena u više od 30% tumorskih stanica u odnosu na ukupni broj tumorskih stanica u koštanoj srži. Određivan je intenzitet ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 semikvantitativnom metodom. Rezultati intenziteta ekspresije proteina bili su podijeljeni u četiri skupine: 0 = negativno; 1 = slabi intenzitet; 2 = srednji intenzitet; 3= jaki intenzitet;. Zbog neadekvatne predanalitičke obrade ili suboptimalne kvalitete uzorka, razinu ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama nije bilo moguće odrediti u jednom uzorku, a intenzitet ekspresije proteina nije bilo moguće odrediti u tri uzorka. U Tablici 3 je prikazana analiza razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama koštane srži izražena u postotku u 35 uzoraka iglenih biopsija koštane srži bolesnika s multiplim mijelomom. Analiza tumorskih plazma stanica je određena imunohistokemijskim bojenjem protutijelima NOTCH1, JAGGED1, DLL1. Imunohistokemijsko bojenje proteina NOTCH1, JAGGED1, DLL1 analizirano je korištenjem svjetlosnog mikroskopa i korištenjem informatičkog programa “AnalySIS” (Olympus, Soft Imaging system GmbH, Germany).

Tablica 3. Analiza razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanica-ma koštane srži izražena u postotcima u 35 uzoraka iglenih biopsija koštane srži, određena imunohistokemijskim bojenjem protutijelima NOTCH1, JAGGED1, DLL1 koje je analizirano korištenjem svjetlosnog mikroskopa i informatičkog programa “AnalySIS” (Olympus, Soft Imaging system GmbH, Germany).

	Min	Max	Centile		
			25.	Medijan	75.
NOTCH1 u plazma stanicama (%)	0,00	95,00	40,00	60,00	80,00
JAGGED1 u plazma stanicama (%)	0,00	90,00	30,00	40,00	80,00
DLL1 u plazma stanicama (%)	0,00	80,00	0,00	20,00	40,00

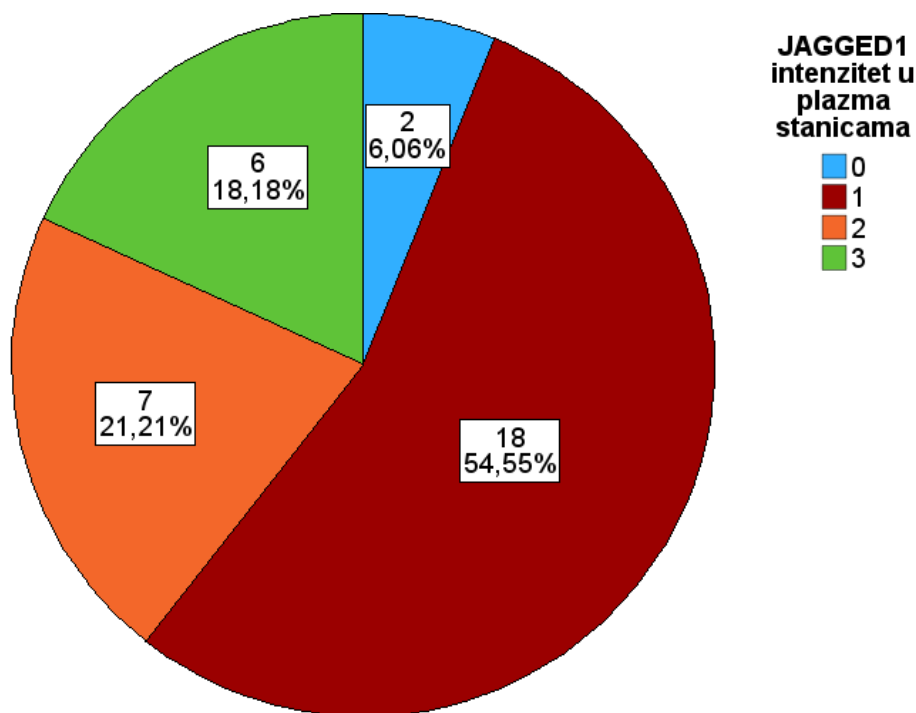
*NOTCH1 u plazma stanicama (%)- udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u plazma stanicama (%)- udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u plazma stanicama (%)- (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina DLL1; Min- najmanja vrijednost ekspresije; Max- najveća vrijednost ekspresije;

Intenzitet ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama koštane srži prikazan je shematski u Slikama 16 do 18.



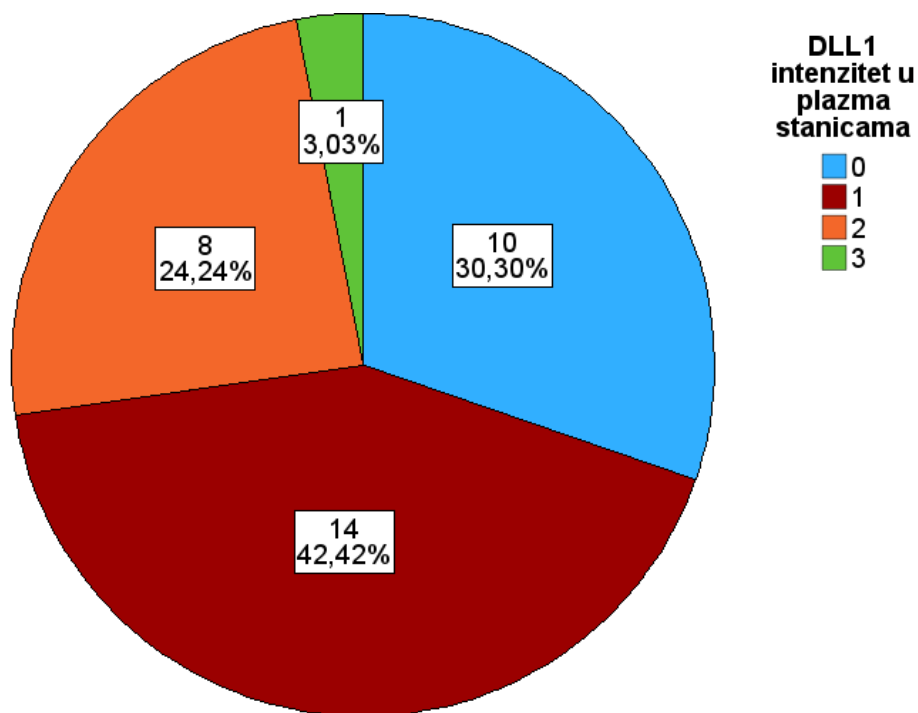
Slika 16. Intenzitet ekspresije proteina NOTCH1 u tumorskim plazma stanicama koštane srži.

Prikazan je apsolutni broj i udio različitih intenziteta ekspresije NOCTH1 u tumorskm plazma stanicama u uzrocima iglene biopsije koštane srži. U najvećem broju uzoraka (45,45%) utvrđen je jaki intenzitet ekspresije proteina NOTCH1. U 33,33% uzoraka utvrđen je slabi intenzitet ekspresije, a u 12,12% uzoraka srednji intenzitet ekspresije NOTCH1. U 9,09% uzoraka tumorske stanice nisu ekspimirale protein NOTCH1.



Slika 17. Intenzitet ekspresije proteina JAGGED1 u tumorskim plazma stanicama koštane srži.

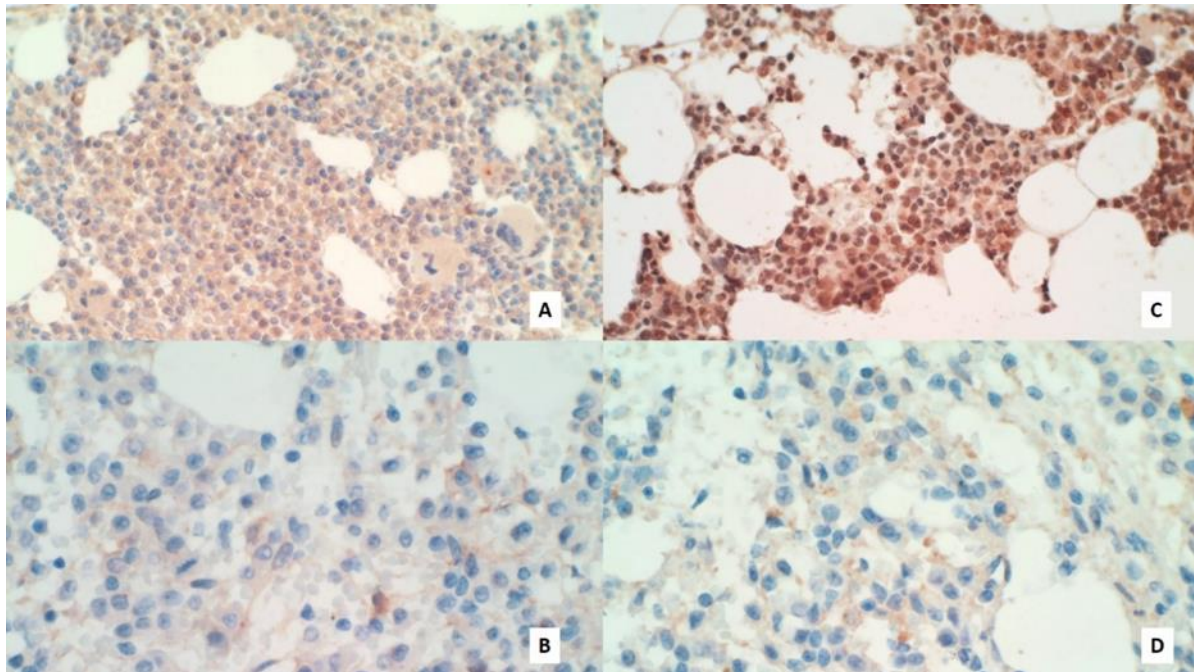
Prikazan je apsolutni broj i udio različitih intenziteta ekspresije JAGGED1 u tumorskim plazma stanicama u uzrocima iglene biopsije koštane srži. U najvećem broju uzoraka (54,55%) utvrđen je slabi intenzitet ekspresije proteina JAGGED1. U 21,21% uzoraka utvrđen je srednji intenzitet ekspresije, a u 18,18% uzoraka jaki intenzitet ekspresije JAGGED1. U 6,06% uzoraka tumorske stanice nisu ekspimirale protein JAGGED1.



Slika 18 . Intenzitet ekspresije proteina DLL1 u tumorskim plazma stanicama koštane srži.

Prikazan je apsolutni broj i udio različitih intenziteta ekspresije DLL1 u tumorskim plazma stanicama u uzrocima iglene biopsije koštane srži. U najvećem broju uzoraka (42,42%) utvrđen je slabi intenzitet ekspresije proteina DLL1. U 24,24% uzoraka utvrđen je srednji intenzitet ekspresije, a u 3,03% uzoraka jaki intenzitet ekspresije DLL1. U 30,3% uzoraka tumorske stanice nisu ekspimirale protein DLL1.

U Slikama 19 i 20 prikazani su primjeri različitih intenziteta ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1, DLL1 u tumorskim plazma stanicama multiplog mijeloma te primjeri različitog tipa infiltracije koštane srži tumorskim plazma stanicama analiziranih svjetlosnim mikroskopom korištenjem informatičkog programa “AnalySIS” (Olympus, Soft Imaging system GmbH, Germany).



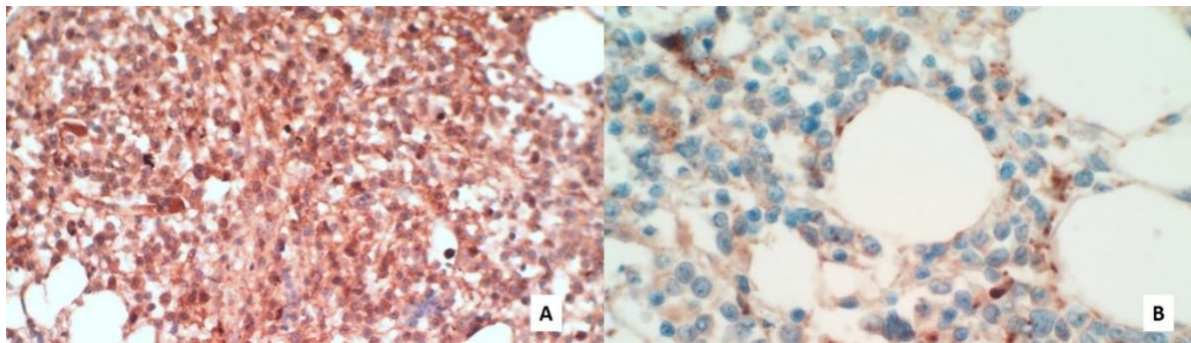
Slika. 19. Ilustrativni prikaz intenziteta imunohistokemijskog bojenja proteina JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama multiplog mijeloma

A. Uzorak br. 7783/16 JAGGED1 - jaki intenzitet bojenja; difuzni tip infiltrata tumorskih plazma stanica (povećanje 200x)

B. Uzorak br. 7748/15 JAGGED1 - slabi intenzitet bojenja; intersticijski tip infiltrata tumorskih plazma stanica (povećanje 400x)

C. Uzorak br. 324/15 DLL1 jaki intenzitet bojenja; intersticijski tip infiltrata tumorskih plazma stanica (povećanje 200x)

D. Uzorak br. 7748/15 DLL1 - slabi intenzitet bojenja; intersticijski tip infiltrata tumorskih plazma stanica (povećanje 400x)



Slika. 20. Ilustrativni prikaz intenziteta imunohistokemijskog bojenja proteina NOTCH1 u tumorskim plazma stanicama multiplog mijeloma

A. Uzorak br. 4856/15 NOTCH1 - jaki intenzitet bojenja; difuzni tip infiltrata tumorskih plazma stanica (povećanje 200x)

B. Uzorak br. 9685/15 NOTCH1 - slabi intenzitet bojenja; intersticijski tip infiltrata tumorskih plazma stanica (povećanje 400x)

5.3. Morfološke i kliničke karakteristike tumora te citogenetičke promjene u tumorskim plazma stanicama u koštanoj srži

U iglenim bioptičkim uzorcima i citološkim razmazima aspirata koštane srži 36 bolesnika, u kojih su analizirane KMS protočnim citometrom, učinjena je patohistološka analiza koštane srži. Analizirane su morfološke karakteristike tumora u koštanoj srži: stupanj diferencijacije tumorskih plazma stanica, tip infiltracije koštane srži i udio tumorskih plazma stanica u koštanoj srži. Zbog suboptimalne kvalitete uzorka iglene biopsije, tip infiltracije koštane srži tumorskim plazma stanicama u jednom uzorku nije bilo moguće odrediti. Prikupljeni su sljedeći podaci u vrijeme postavljanja dijagnoze multiplog mijeloma: spol, dob, klasifikacija bolesti prema Durie Salmon rISS (revised International staging sistem) klasifikaciji, broj osteolitičkih lezija, izotip monoklonskog imunoglobulina, vrijednost serumskog kalcija, hemoglobina, laktat dehidrogenaze (LDH), serumskog kreatinina, β 2 mikroglobulina, koncentracije M proteina, ukupnih proteina u serumu, albumina u serumu, gama globulina u serumu. Praćeno je i ukupno preživljenje u mjesecima te smrtni ishod bolesnika do 31.12.2022. godine. Podaci su prikupljeni uvidom u bolnički informatički sustav KB Merkura.

Strukturne promjene gena, t(11;14)(q13;q32); t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23) analizirane interfaznom metodom FISH provedene su na serijskim rezovima cilindara biopsije koštane srži

Numeričke promjene gena, delecija regije 13q34 i regije 17p13.1 analizirane interfaznom metodom FISH provedene su na neobojanim citološkim razmazima aspirata koštane srži

Analizu strukturnih i numeričkih citogenetičkih promjena metodom FISH nije bilo moguće učiniti u jednom uzorku zbog neadekvatne odnosno suboptimalne kvalitete iglenih biopsija i citoloških razmaza aspirata koštane srži. Kliničke, morfološke, citogenetičke i laboratorijske karakteristike tumora u koštanoj srži i prikupljeni podaci pri dijagnozi prikazani su kao kategorijske i kontinuirane varijable.

U Tablici 4 prikazana je analiza morfoloških karakteristika tumora u koštanoj srži, i to stupnja diferencijacije i malignosti tumorskih plazma stanica i tipa infiltracije koštane srži u 36 odnosno 35 bioptičkih uzoraka koštane srži. Prikazana je i analiza strukturnih i numeričkih citogenetičkih promjena metodom FISH na 35 uzoraka iglenih biopsija i citoloških razmaza aspirata koštane srži. Prikazana je i analiza po spolu te kliničkim karakteristikama tumora kao što su klasifikacija bolesti prema Durie Salmon i rISS sustavu klasificiranja, broj osteolitičkih lezija, izotip monoklonskog imunoglobulina, smrtni ishod u 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma. Sve ove karakteristike su u Tablici 4 prikazane kroz kategorijske varijable.

Tablica 4. Analiza morfoloških karakteristika tumora, tip infiltracije i stupanj diferencijacije tumorskih plazma stanica, strukturnih i numeričkih citogenetičkih promjena metodom FISH u uzorcima iglenih biopsija i citoloških razmaza aspirata koštane srži te analiza spola te kliničkih obilježja tumora (klasifikacija bolesti, broj osteolitičkih lezija i izotip monoklonskog imunoglobulina), smrtni ishod u 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma, prikazanih kroz kategorijske varijable.

		N	%
Spol	Muški	23	63,9%
	Ženski	13	36,1%
Tip infiltracije	Difuzni	21	60,0%
	Nodularni	7	20,0%
	Intersticijski	7	20,0%
Stupanj diferencijacije plazma stanica	G1	13	36,1%
	G2	10	27,8%
	G3	13	36,1%
Stupanj malignosti plazma stanica	Niski	23	66,7%
	Visoki	13	33,3%
Osteolitičke lezije	Nema lezija	16	44,4%
	<3	2	5,6%
	>=3	18	50,0%
Durie Salmon klasifikacija	1a	11	30,6%
	2a	18	50,0%
	3a	6	16,7%
	3b	1	2,8%
rISS klasifikacija	1	15	41,7%
	2	14	38,9%
	3	7	19,4%
Izotip imunoglobulina	IgG kappa	14	38,9%
	IgG lambda	9	25,0%
	IgA kappa	5	13,9%
	IgA lambda	4	11,1%
	Laki lanci	4	11,1%
FISH t(11;14)(q13;q32)	Nije prisutna	32	91,4%
	Prisutna	3	8,6%
FISH citogenetika visokog rizika	Nije prisutna	23	65,7%
	Prisutna	12	34,3%
Smrtni ishod	Ne	23	63,9%
	Da	13	36,1%

*N- broj uzoraka; G1, G2, G3- morfološki stupanj diferencijacije malignih plazma stanica u koštanoj srži (G1 i G2 su stanice niskog gradusa malignosti, G3 su stanice visokog gradusa malignosti); Durie Salmon klasifikacija-klasifikacija stadija multiplog mijeloma; rISS klasifikacija – revidirana međunarodna klasifikacija multiplog mijeloma; FISH citogenetika visokog rizika- citogenetičke promjene visokog rizika u multiplom mijelomu t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23); del(13q34) i del(17p13.1) analizirane metodom FISH; FISH t(11;14)(q13;q32) - t(11;14)(q13;q32) u multiplom mijelomu analizirana metodom FISH;

Morfološke i kliničke karakteristike tumora u koštanoj srži prikazane su kroz kategorijske varijable u Tablici 4. Bolesnici su bili češće muškog spola (63,9%) te su imali difuzni tip infiltracije (60,0%) i niski stupanj malignosti tumorskih plazma stanica (66,7%). Osteolitičke lezije bile su prisutne u 55,6% ispitanika, u 8,6% uzoraka bila je prisutna t(11;14)(q13;q32) dok su citogenetičke promjene visokog analizirane metodom FISH bile prisutne u 34,3% uzoraka multiplog mijeloma. Umrlo je 13 bolesnika (36,1%) .

U Tablici 5 prikazana je analiza udjela plazma stanica u koštanoj srži kao morfološke karakteristike tumora u 36 bioptičkih uzoraka koštane srži, dob bolesnika pri postavljanju dijagnoze te laboratorijskih vrijednosti (serumski kalcij, hemoglobin, laktat dehidrogenaza (LDH), serumski kreatinin

Tablica 5. Analiza morfoloških i kliničkih obilježja tumora prikazanih kroz kontinuirane varijable (dob bolesnika pri postavljanju dijagnoze, udio plazma stanica u koštanoj srži u bioptičkim uzorcima koštane srži, laboratorijske vrijednosti (serumski kalcij, hemoglobin, laktat dehidrogenaza, serumski kreatinin, β 2 mikroglobulin, koncentracija M proteina, ukupni proteini u serumu, albumini u serumu, gama globulini u serumu), ukupno preživljenje u mjesecima do 31.12.2022. godine) u 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma

	Min	Max	Centile		
			25.	Medijan	75.
Dob (godine)	22,00	71,00	52,00	59,00	62,00
Udio plazma stanica u koštanoj srži (%)	10,00	99,00	32,50	55,00	90,00
Serumski kalcij (mmol/L)	2,03	3,57	2,25	2,34	2,51
Hemoglobin (g/L)	74,00	158,00	101,00	115,00	128,75
LDH (U/L)	77,00	345,00	130,50	188,50	233,50
Serumski kreatinin (mikromol/L)	48,00	622,00	67,50	81,50	126,50
β 2 mikroglobulin (mg/L)	1,30	9,40	2,15	3,35	4,93
M protein	4,80	79,50	15,78	33,85	54,25
Ukupni proteini u serumu (g/L)	54,40	146,50	74,08	86,55	98,88
Albumini u serumu (g/L)	29,50	56,80	38,73	43,35	47,63
Gama globulini u serumu (%)	2,00	64,80	11,15	23,55	40,55
Gama globulini u serumu (g/L)	1,88	84,90	7,18	18,93	35,90
Ukupno preživljenje u mjesecima	11,00	101,00	32,25	49,50	79,00

*LDH- laktat dehidrogenaza; M protein- monoklonalni imunoglobulin; Min- najmanja vrijednost; Max- najveća vrijednost;

Morfološke i kliničke karakteristike tumora u koštanoj srži prikazane kroz kontinuirane varijable prikazane su u Tablici 5. Prosječna dob bolesnika bila je 59 godina. Prosječni udio plazma stanica u koštanoj srži bio je 55%. Prosječne vrijednosti laboratorijskih nalaza bili su: serumski kalcij (2,34 mmol/L), hemoglobin (115 g/L), laktat dehidrogenaza (188,50 U/L), serumski kreatinin (81,50 mikromol/L), β 2 mikroglobulin (3,35 mg/L), koncentracija M proteina (33,5%), ukupni proteini u serumu (86,55 g/L), albumini u serumu (43,35 g/L), gama globulini u serumu (18,93 g/L). Ukupno preživljenje bolesnika bilo je 49,5 mjeseci. Klinička i laboratorijska obilježja bila su sukladna kriterijima za liječenje bolesnika transplantacijom KMS.

5.4. Korelacija razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama u koštanoj srži i krvotvornim matičnim stanicama u multiplom mijelomu

U Tablici 6 i na Slici 21 je prikazana korelacija razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama u 35 uzoraka iglenih biopsija koštane srži, određena imunohistokemijskim bojenjem protutijelima NOTCH1, JAGGED1, DLL1 i krvotvornim matičnim stanicama dobivenih postupkom leukaferoze u 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma, određena metodom imunofenotipizacije. Uzorci iglene biopsije koštane srži i KMS su od istih bolesnika.

Tablica 6. Korelacija razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama u 35 uzoraka iglenih biopsija koštane srži, određena imunohistokemijskim bojenjem protutijelima NOTCH1, JAGGED1, DLL1 i krvotvornim matičnim stanicama dobivenih postupkom leukaferoze u 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma, određena metodom imunofenotipizacije na protočnom citometru. Kao mjere povezanosti izračunati su korelacijski koeficijenti između pojedinih varijabli pri čemu smo koristili Spearmanove koeficijente korelacije rho

		NOTCH 1 u KMS (%)	JAGGED1 u KMS (%)	DLL1 u KMS (%)	NOTCH1 u plazma stanicama (%)	JAGGED1 u plazma stanicama (%)	DLL1 u plazma stanicama (%)
NOTCH 1 u KMS (%)	Rho	1,000	-0,596	-0,305	0,103	0,072	0,119
	P		<0,001	0,070	0,556	0,682	0,494
JAGGED1 u KMS (%)	Rho	-0,596	1,000	0,216	0,196	0,187	0,099
	P	<0,001		0,205	0,260	0,283	0,572
DLL1 u KMS (%)	Rho	-0,305	0,216	1,000	0,051	0,112	-0,064
	P	0,070	0,205		0,771	0,520	0,716
NOTCH1 u plazma stanicama (%)	Rho	0,103	0,196	0,051	1,000	0,752	0,294
	P	0,556	0,260	0,771		<0,001	0,086
JAGGED1 u plazma stanicama (%)	Rho	0,072	0,187	0,112	0,752	1,000	0,523
	P	0,682	0,283	0,520	<0,001		0,001
DLL1 u plazma stanicama (%)	Rho	0,119	0,099	-0,064	0,294	0,523	1,000
	P	0,494	0,572	0,716	0,086	0,001	

*KMS – krvotvorne matične stanice; NOTCH1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina DLL1; NOTCH1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina DLL1; P- značajnost testa;

1.0 -1.0

JAGGED1 u plazma stanicama (%)	1	0,752 P<0,0001 n=35	0,523 P=0,0013 n=35	0,112 P=0,5205 n=35	0,187 P=0,2828 n=35	0,072 P=0,6816 n=35
NOTCH1 u plazma stanicama (%)	0,752 P<0,0001 n=35	1	0,294 P=0,0863 n=35	0,051 P=0,7706 n=35	0,196 P=0,2601 n=35	0,103 P=0,5561 n=35
DLL1 u plazma stanicama (%)	0,523 P=0,0013 n=35	0,294 P=0,0863 n=35	1	-0,064 P=0,7162 n=35	0,099 P=0,5718 n=35	0,119 P=0,4943 n=35
DLL1 u KMS (%)	0,112 P=0,5205 n=35	0,051 P=0,7706 n=35	-0,064 P=0,7162 n=35	1	0,216 P=0,2049 n=36	-0,305 P=0,0703 n=36
JAGGED1 u KMS (%)	0,187 P=0,2828 n=35	0,196 P=0,2601 n=35	0,099 P=0,5718 n=35	0,216 P=0,2049 n=36	1	-0,596 P=0,0001 n=36
NOTCH 1 u KMS (%)	0,072 P=0,6816 n=35	0,103 P=0,5561 n=35	0,119 P=0,4943 n=35	-0,305 P=0,0703 n=36	-0,596 P=0,0001 n=36	1
	JAGGED1 u plazma stanicama (%)	NOTCH1 u plazma stanicama (%)	DLL1 u plazma stanicama (%)	DLL1 u KMS (%)	JAGGED1 u KMS (%)	NOTCH 1 u KMS (%)

Spearman rank correlation coefficient

*KMS – krvotvorne matične stanice; NOTCH1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina DLL1; NOTCH1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina DLL1; P- značajnost testa;

Slika 21. Korelogram ekspresije NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 proteina u tumorskim plazma stanicama u koštanoj srži i krvotvornim matičnim stanicama u multiplom mijelomu

Razina ekspresije NOTCH1 u KMS značajno negativno korelira s razinom ekspresije JAGGED1 u KMS ($\rho=-0,596$, $P<0,001$) što je u Tablici 6 prikazano žutom bojom. Visoki udio ekspresije NOTCH1 (medijan 19,4%) u KMS povezan je s niskim udjelom ekspresije JAGGED1 (medijan 0,58%) u KMS multiplog mijeloma. Uočena je i značajna pozitivna korelacija ekspresije JAGGED1 u tumorskim plazma stanicama s ekspresijom NOTCH1 u tumorskim plazma stanicama ($\rho=0,752$, $P<0,001$) i ekspresijom DLL1 u tumorskim plazma stanicama

(rho=0,523, P<0,001) što je u Tablici 6 prikazano žutom bojom. Visoki udio ekspresije JAGGED1 (medijan 40,0 %) u tumorskim plazma stanicama povezana je s visokim udjelom ekspresije NOTCH1 (medijan 60 %) i visokim udjelom ekspresije DLL1 (medijan 20 %) u tumorskim plazma stanicama multiplog mijeloma. Nema značajnih korelacija u udjelu ekspresije ovih proteina u KMS i tumorskim plazma stanicama u koštanoj srži.

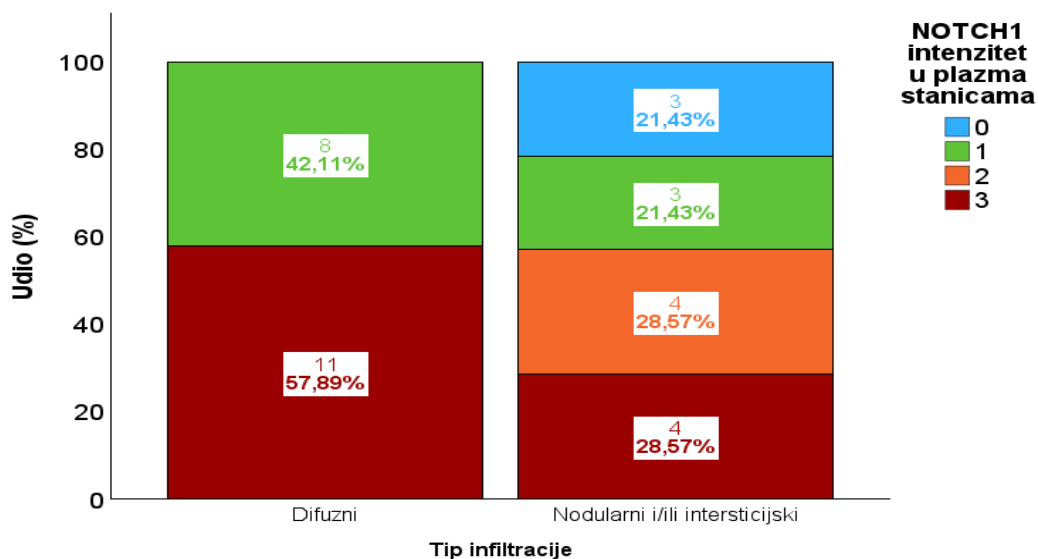
5.5. Usporedba intenziteta ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama u multiplom mijelomu s tipom infiltracije koštane srži multiplog mijeloma

U iglenim biopsijskim uzorcima koštane srži 36 bolesnika, u kojih su analizirane KMS protočnim citometrom, učinjena je usporedba analize intenziteta ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama imunohistokemijskim bojenjem i patohistološke analize tipa infiltracije TPS koštane srži multiplog mijeloma (intersticijski, nodularni ili difuzni tip infiltrata). Zbog neadekvatne predanalitičke obrade ili suboptimalne kvalitete uzorka, intenzitet ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama nije bilo moguće odrediti u tri uzorka. U Tablici 7 je prikazana usporedba intenziteta ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama i tipa infiltracije koštane srži tumorskim plazma stanicama u 36 uzoraka iglene biopsije koštane srži multiplog mijeloma primjenom Fisher-Freeman-Haltonovog egzaktnog testa. Na Slici 22 je prikazana razlika intenziteta ekspresije proteina NOTCH1 u tumorskim plazma stanicama u odnosu na tip infiltracije koštane srži tumorskim plazma stanicama u 36 uzoraka iglene biopsije koštane srži multiplog mijeloma.

Tablica 7. Prikaz usporedbe intenziteta ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama i tipa infiltracije koštane srži tumorskim plazma stanicama u 36 uzoraka iglene biopsije koštane srži multiplog mijeloma: Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

		Tip infiltracije				P
		Difuzni		Nodularni i/ili intersticijski		
		N	%	N	%	
NOTCH1 intenzitet u plazma stanicama	0	0	0,0%	3	21,4%	0,006
	1	8	42,1%	3	21,4%	
	2	0	0,0%	4	28,6%	
	3	11	57,9%	4	28,6%	
JAGGED1 intenzitet u plazma stanicama	0	0	0,0%	2	14,3%	0,182
	1	10	52,6%	8	57,1%	
	2	6	31,6%	1	7,1%	
	3	3	15,8%	3	21,4%	
DLL1 intenzitet u plazma stanicama	0	6	31,6%	4	28,6%	0,407
	1	6	31,6%	8	57,1%	
	2	6	31,6%	2	14,3%	
	3	1	5,3%	0	0,0%	

*NOTCH1 intenzitet u plazma stanicama- intenzitet ekspresije proteina NOTCH1 u plazma stanicama; JAGGED1 intenzitet u plazma stanicama- intenzitet ekspresije proteina JAGGED1 u plazma stanicama; DLL1 intenzitet u plazma stanicama- intenzitet ekspresije proteina DLL1 u plazma stanicama; N – broj uzoraka; P – značajnost testa;



Slika 22. Razlike intenziteta ekspresije proteina NOTCH1 u tumorskim plazma stanicama u odnosu na tip infiltracije koštane srži tumorskim plazma stanicama u 36 uzoraka iglene biopsije koštane srži multiplog mijeloma

Značajna povezanost uočena je između intenziteta ekspresije proteina NOTCH1 u TPS i difuznog tipa infiltrata TPS u koštanoj srži. Veća učestalost jakog intenziteta ekspresije NOTCH1 bila je u TPS s difuznim tipom infiltracije koštane srži (11 uzoraka, 57,89%), dok su 6 uzoraka (42,86%) imala slabi intenzitet ekspresije NOTCH1 ili TPS nisu ekspimirale NOTCH1 u intersticijskom tipu infiltrata ($P=0,006$), što je u Tablici 7. obilježeno crvenom bojom. Nije uočena značajna povezanost intenziteta ekspresije proteina JAGGED1 ($P=0,182$) i DLL1 ($P=0,407$) u TPS s tipom infiltrata TPS u koštanoj srži.

5.6. Usporedba analiziranih kategorijskih morfoloških, citogenetičkih, kliničkih i kontinuiranih morfoloških, kliničkih i laboratorijskih varijabli u multiplom mijelomu s tipom infiltracije koštane srži multiplog mijeloma

U skupini 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma, prikupljene kliničke, laboratorijske podatke, morfološke karakteristike tumora i citogenetičke promjene kao i razinu ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1, DLL1 u KMS i TPS u multiplom mijelomu usporedili smo s tipom infiltracije koštane srži TPS multiplog mijeloma. Zbog suboptimalne kvalitete uzorka iglene biopsije, tip infiltracije koštane srži tumorskim plazma stanicama nije bilo moguće

odrediti u jednom uzorku iglene biopsije koštane srži mutiplog mijeloma. Tip infiltracije koštane srži TPS određen je histokemijskom metodom.

U Tablici 8 je prikazana usporedba tipa infiltracije koštane srži TPS multiplog mijeloma s kategorijskim varijablama. Stupanj diferencijacije tumorskih plazma stanica odnosi se na dobro, umjereno i slabo diferencirane TPS. Dobro i umjereno diferencirane stanice (G1, G2) su niskog stupnja malignosti, a tumorske plazma stanice koje su slabo diferencirane (G3) su visokog stupnja malignosti.

Broj osteolitičkih lezija pri postavljanju dijagnoze podijeljen je u tri kategorije, nema osteolitičkih lezija, manje od tri osteolitičke lezije te tri i više osteolitičke lezije. Broj osteolitičkih lezija bitan je i za Durie- Salmon klasifikaciju bolesti. Analiziran je i izotip monoklonskog imunoglobulina. Ovi podaci su prikupljeni uvidom u bolnički informatički sustav KB Merkura.

Strukturne promjene gena $t(11;14)(q13;q32)$; $t(4;14)(p16;q32)$; $t(14;16)(q32;q23)$ analizirane su interfaznom metodom FISH na serijskim rezovima iglene biopsije koštane srži uklopljenih u parafin, debljine 4 μm . Numeričke promjene gena, delecija regije 13q34 i regije 17p13.1 analizirane interfaznom metodom FISH provedene su na nebojanim citološkim razmazima aspirata koštane srži. Analizu strukturnih i numeričkih citogenetičkih promjena metodom FISH nije bilo moguće učiniti u jednom uzorku zbog neadekvatne odnosno suboptimalne kvalitete iglene biopsije i citološkog razmaza aspirata koštane srži.

Tablica 8. Prikaz i analiza usporedbe tipa infiltracije koštane srži multiplog mijeloma određenog u 35 uzoraka iglene biopsije koštane srži i kategorijskih kliničkih varijabli dobivenih uvidom u bolnički informatički sustav KB Merkura (klasifikacija bolesti, broj osteolitičkih lezija i izotip monoklonskog imunoglobulina), citogenetičkih promjena gena (t(11;14)(q13;q32); t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23); delecija regije 13q34 i regije 17p13.1) analizom 36 iglenih bioptičkih uzoraka koštane srži i 35 citoloških razmaza aspirata koštane srži analizirane interfaznom metodom FISH i stupnja diferencijacije i malignosti tumorskih plazma stanica u 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma primjenom Fisher-Freeman-Haltonovog egzaktnog testa

		Tip infiltracije				P
		Difuzni		Nodularni i/ili intersticijski		
		N	%	N	%	
Stupanj diferencijacije	G1	9	42,9%	4	28,6%	0,389
	G2	4	19,0%	6	42,9%	
	G3	8	38,1%	4	28,6%	
Stupanj malignosti	Niski	13	61,9%	10	78,6%	0,461
	Visoki	8	38,1%	4	21,4%	
Osteolitičke lezije	Nema lezija	9	42,9%	7	50,0%	0,866
	<3	1	4,8%	1	7,1%	
	>=3	11	52,4%	6	42,9%	
Durie Salmon klasifikacija	1a	7	33,3%	4	28,6%	0,369
	2a	9	42,9%	8	57,1%	
	3a	5	23,8%	1	7,1%	
	3b	0	0,0%	1	7,1%	
rISS klasifikacija	1	7	33,3%	8	57,1%	0,444
	2	9	42,9%	4	28,6%	
	3	5	23,8%	2	14,3%	
Izotip imunoglobulina	IgG kappa	8	38,1%	6	42,9%	0,683
	IgG lambda	7	33,3%	2	14,3%	
	IgA kappa	3	14,3%	2	14,3%	
	IgA lambda	1	4,8%	2	14,3%	
	Laki lanci	2	9,5%	2	14,3%	
FISH t(11;14)(q13;q32)	Nije prisutna	17	85,0%	14	100,0%	0,251
	Prisutna	3	15,0%	0	0,0%	
FISH citogenetika visokog rizika	Nije prisutna	13	65,0%	10	71,4%	0,729
	Prisutna	7	35,0%	4	28,6%	
Smrtni ishod	Ne	14	66,7%	9	64,3%	1,000
	Da	7	33,3%	5	35,7%	

*Durie Salmon klasifikacija- klasifikacija stadija multiplog mijeloma; rISS klasifikacija – revidirana međunarodna klasifikacija multiplog mijeloma; FISH citogenetika visokog rizika- citogenetičke promjene visokog rizika u multiplom mijelomu t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23); del(13q34) i del(17p13.1) analizirane metodom FISH; FISH t(11;14)(q13;q32) u multiplom mijelomu analizirana metodom FISH; G1, G2, G3- stupnjevi diferencijacije malignih plazma stanica u koštanoj srži (morfologija); N – broj uzoraka; P – značajnost testa;

Razlike u kategorijskim kliničkim varijablama u multiplom mijelomu u odnosu na tip infiltracije koštane srži multiplog mijeloma prikazane su u Tablici 8. Nije bilo značajne povezanosti tipa infiltracije koštane srži multiplog mijeloma tumorskim plazma stanicama i navedenih kategorijskih varijabli. Iako je nešto veći broj ispitanika imao TPS visokog stupnja malignosti (G3) koje su difuzno infiltrirale koštanu srž (38,1% ispitanika) nego intersticijski i/ili nodularno (21,4% ispitanika), stupanj diferenciranosti TPS nije bio značajno povezan s tipom infiltrata koštane srži. Broj osteolitičkih lezija, DS ili rISS klasifikacija MM, izotip imunoglobulina, translokacija t(11;14)(q13;q32), citogenetičke promjene visokog rizika u MM kao niti vrijeme praćenja, nisu imali značajnu povezanost s tipom infiltracije koštane srži.

U Tablici 9. je prikazana usporedba tipa infiltracije koštane srži TPS multiplog mijeloma s kontinuiranim varijablama, a u Tablici 10 je ista usporedba prikazana primjenom Mann-Whitney U testa. Broj CD34 pozitivnih krvotvornih matičnih stanica analiziran je metodom imunofenotipizacije protočnim citometrom pri zamrzavanju i nakon odmrzavanja u 36 uzoraka koji su prikupljeni u postupku leukaferoze. Ukupni broj leukocita u uzorku koji je prikupljen u postupku leukaferoze analiziran je na hematološkom brojaču nakon odmrzavanja. Razina ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 analizirana je metodom imunofenotipizacije na protočnom citometru u 36 uzoraka krvotvornih matičnih stanica bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma dobivenih postupkom leukaferoze. Razina ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama analizirana je imunohistokemijskom metodom u 35 uzoraka dobivenih iglenom biopsijom koštane srži multiplog mijeloma. Zbog suboptimalne kvalitete uzorka iglene biopsije i predanalitičke obrade, određivanje razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama nije bilo moguće učiniti u jednom uzorku. Udio tumorskih plazma stanica u 36 uzoraka iglene biopsije koštane srži analiziran je histokemijskom metodom. Dob bolesnika pri dijagnozi je dobivena uvidom u bolnički informatički sustav KB Merkura.

Tablica 9. Usporedba tipa infiltracije tumorskim plazma stanicama koštane srži i kontinuiranih varijabli u multiplom mijelomu (broj CD34 pozitivnih krvotvornih matičnih stanica prikupljene u postupku leukaferoze analiziran metodom imunofenotipizacije protočnim citometrom pri i nakon odmrzavanja; ukupni broj leukocita u uzroku prikupljen u postupku leukaferoze analiziran na hematološkom brojaču nakon odmrzavanja; razina ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u krvotvornim matičnih stanica bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma dobivenih postupkom leukaferoze i analizirana metodom imunofenotipizacije na protočnom citometru te ekspresija istih u tumorskim plazma stanicama u iglenoj biopsiji koštane srži analizirana imunohistokemijskom metodom; udio tumorskih plazma stanica u iglenoj biopsiji koštane srži analiziran histokemijskom metodom; dob bolesnika pri dijagnozi).

		Tip infiltracije					
		N	Min	Max	25. centila	Medijan	75. centila
Dob (godine)	Difuzni	21	22,00	71,00	53,00	59,00	62,00
	Nodularni i/ili intersticijski	14	42,00	70,00	50,00	58,00	61,00
Broj CD34 x 10 ⁶ /L pri zamrzavanju	Difuzni	21	961,60	7984,20	2259,00	3810,50	6155,30
	Nodularni i/ili intersticijski	14	1796,00	8716,70	2543,80	3444,95	6891,00
Ukupni broj leukocita (10 ⁹ /L)	Difuzni	21	80,85	360,10	110,21	146,76	173,23
	Nodularni i/ili intersticijski	14	16,07	336,55	93,89	142,77	168,50
Broj CD34 nakon odmrzavanja (%)	Difuzni	21	0,17	9,69	0,83	1,74	2,93
	Nodularni i/ili intersticijski	14	0,13	6,74	0,73	2,51	4,28
Broj CD34 x 10 ⁶ /L nakon odmrzavanja	Difuzni	21	243,00	9100,60	1314,50	2944,90	4572,70
	Nodularni i/ili intersticijski	14	215,30	7932,20	753,70	3458,40	5390,10
NOTCH1 u KMS (%)	Difuzni	21	4,07	56,36	10,80	20,28	40,17
	Nodularni i/ili intersticijski	14	1,27	47,46	13,44	18,10	32,74
JAGGED1 u KMS (%)	Difuzni	21	0,00	3,37	0,07	0,56	1,37
	Nodularni i/ili intersticijski	14	0,00	4,92	0,03	0,55	1,43
DLL1 u KMS (%)	Difuzni	21	0,00	3,02	0,13	0,23	0,55
	Nodularni i/ili intersticijski	14	0,02	2,97	0,06	0,12	0,45
NOTCH1 u plazma stanicama (%)	Difuzni	21	10,00	95,00	40,00	60,00	80,00
	Nodularni i/ili intersticijski	14	0,00	90,00	20,00	50,00	80,00
JAGGED1 u plazma stanicama (%)	Difuzni	21	5,00	90,00	40,00	50,00	80,00
	Nodularni i/ili intersticijski	14	0,00	90,00	20,00	35,00	60,00
DLL1 u plazma stanicama (%)	Difuzni	21	0,00	80,00	0,00	25,00	40,00
	Nodularni i/ili intersticijski	14	0,00	80,00	0,00	20,00	40,00
Udio plazma stanica u koštanoj srži (%)	Difuzni	21	10,00	99,00	40,00	80,00	90,00
	Nodularni i/ili intersticijski	14	20,00	95,00	30,00	50,00	80,00

Tablica 9. *KMS – krvotvorne matične stanice; N- broj uzoraka; Min- najmanja vrijednost varijable; Max- najveća vrijednost varijable; Broj CD34 x 10⁶/L pri zamrzavanju- broj krvotvornih matičnih stanica koje ekspimiraju biljeg CD34 u uzorku analiziran pri zamrzavanju izražen kao broj x 10⁶ u jedinici volumena; Ukupni broj leukocita- ukupni broj leukocita u uzorku krvotvornih matičnih stanica, nakon odmrzavanja, određivan na hematološkom brojaču; Broj CD34 nakon odmrzavanja- broj krvotvornih matičnih stanica koje ekspimiraju biljeg CD34 u uzorku analiziran nakon odmrzavanja; NOTCH1 u KMS (%)- udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u KMS (%)- udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u KMS (%)- udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina DLL1; NOTCH1 u plazma stanicama (%)- udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u plazma stanicama (%)- udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u plazma stanicama (%)- udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina DLL1;

Tablica 10. Usporedba kontinuiranih varijabli u multiplom mijelomu s tipom infiltracije koštane srži multiplog mijeloma primjenom Mann-Whitney U testa

	Mann-Whitney U	Z	P
Dob (godine)	129,500	-0,590	0,555
Broj CD34 x 10 ⁶ /L pri zamrzavanju	126,000	-0,707	0,480
Ukupni broj leukocita (10 ⁹ /L)	140,000	-0,236	0,814
Broj CD34 nakon odmrzavanja (%)	130,500	-0,556	0,578
Broj CD34 nakon odmrzavanja (10 ⁶ /L)	139,000	-0,269	0,788
NOTCH 1 u KMS (%)	130,000	-0,572	0,567
JAGGED1 u KMS (%)	144,500	-0,084	0,933
DLL1 u KMS (%)	117,500	-0,994	0,320
NOTCH1 u plazma stanicama (%)	113,000	-1,156	0,248
JAGGED1 u plazma stanicama (%)	108,500	-1,309	0,190
DLL1 u plazma stanicama (%)	136,500	-0,359	0,720
Udio plazma stanica u koštanoj srži (%)	120,000	-0,914	0,361

*KMS – krvotvorne matične stanice; Broj CD34 x 10⁶/L pri zamrzavanju- broj krvotvornih matičnih stanica koje ekspresiraju biljeg CD34 u uzorku analiziran pri zamrzavanju izražen kao broj x 10⁶ u jedinici volumena

Ukupni broj leukocita- ukupni broj leukocita u uzorku krvotvornih matičnih stanica, nakon odmrzavanja, određivan na hematološkom brojaču; Broj CD34 nakon odmrzavanja- broj krvotvornih matičnih stanica koje ekspresiraju biljeg CD34 u uzorku analiziran nakon odmrzavanja; NOTCH1 u KMS (%)- udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u KMS (%)- udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u KMS (%)- udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina DLL1; NOTCH1 u plazma stanicama (%)- udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u plazma stanicama (%)- udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u plazma stanicama (%)- udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina DLL1; P – značajnost testa;

Usporedba kontinuiranih varijabli u multiplom mijelomu s tipom infiltracije koštane srži multiplog mijeloma prikazane su u Tablicama 9 i 10. Nije bilo značajne povezanosti između tipa infiltracije koštane srži TPS multiplog mijeloma i navedenih kontinuiranih varijabli: dobi, ukupnog broja limfocita, broja CD34 pozitivnih KMS, pojave ekspresije NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS i TPS multiplog mijeloma.

U Tablici 11. je prikazana usporedba kontinuiranih laboratorijskih varijabli s tipom infiltracije koštane srži multiplog mijeloma određen u 35 uzoraka iglene biopsije koštane srži, a u Tablici 12 je ista usporedba prikazana primjenom Mann-Whitney U testa. Vrijednosti serumskog kalcija, hemoglobina, laktat dehidrogenaze, serumskog kreatinina, β 2 mikroglobulina, koncentracije M proteina, ukupnih proteina u serumu, albumina u serumu, gama globulina u serumu, ukupno preživljenje u mjesecima do 31.12.2022. godine u 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma dobivene su uvidom u bolnički informatički sustav KB Merkura

Tablica 11. Usporedba kontinuiranih laboratorijskih varijabli (serumski kalcij, hemoglobin, laktat dehidrogenaza, serumski kreatinin, β 2 mikroglobulin, koncentracija M proteina, ukupnih proteina u serumu, albumina u serumu, gama globulina u serumu), ukupnog preživljenja u mjesecima do 31.12.2022. godine u 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma dobivenih uvidom u bolnički informatički sustav KB Merkura s tipom infiltracije koštane srži multiplog mijeloma određen u 35 uzoraka iglene biopsije koštane srži.

		Tip infiltracije						
		N	Min	Max	25. centila	Medijan	75. centila	
Serumski Ca (mmol/L)	Difuzni	21	2,03	3,57	2,20	2,27	2,37	
	Nodularni i/ili intersticijski	14	2,15	3,37	2,29	2,40	2,64	
Hemoglobin (g/L)	Difuzni	21	74,00	158,00	99,00	112,00	123,00	
	Nodularni i/ili intersticijski	14	89,00	155,00	113,00	124,00	132,00	
LDH(U/L)	Difuzni	21	92,00	345,00	163,00	201,00	242,00	
	Nodularni i/ili intersticijski	14	77,00	250,00	124,00	148,50	199,00	
Serumski kreatinin (umol/L)	Difuzni	21	63,00	173,00	73,00	88,00	131,00	
	Nodularni i/ili intersticijski	14	48,00	622,00	63,00	73,00	116,00	
β 2 mikroglobulin (mg/L)	Difuzni	21	1,40	9,40	2,70	3,83	5,50	
	Nodularni i/ili intersticijski	14	1,30	9,40	1,90	2,39	3,60	
M protein	Difuzni	21	4,80	79,50	15,50	35,90	59,00	
	Nodularni i/ili intersticijski	14	5,80	54,40	15,35	28,45	42,40	
Ukupni proteini u serumu (g/L)	Difuzni	21	54,40	146,50	74,00	90,10	104,00	
	Nodularni i/ili intersticijski	14	59,00	106,50	74,30	87,65	98,50	
Albumini u serumu (g/L)	Difuzni	21	29,50	56,80	37,60	42,00	45,10	
	Nodularni i/ili intersticijski	14	33,90	50,10	43,20	45,60	48,20	
Gama globulini u serumu (%)	Difuzni	21	8,20	64,80	20,20	30,80	45,40	
	Nodularni i/ili intersticijski	14	2,00	44,40	9,30	18,15	32,00	
Gama globulini u serumu (g/L)	Difuzni	21	5,40	84,90	11,60	24,60	46,90	
	Nodularni i/ili intersticijski	14	1,88	47,30	7,02	13,75	29,50	
Ukupno preživljenje u mjesecima	Difuzni	21	13,00	101,00	34,00	50,00	79,00	
	Nodularni i/ili intersticijski	14	11,00	100,00	21,00	50,00	84,00	

*Ca- kalcij; LDH- laktat dehidrogenaza; M protein- monoklonski imunoglobulin; Gama globulini u serumu (%)- udio gama globulina u ukupnim proteinima u serumu; N – broj uzoraka; Min- najmanja vrijednost varijable; Max- najveća vrijednost varijable;

Tablica 12. Usporedba kontinuiranih varijabli, laboratorijskih nalaza i ukupnog preživljenja 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma dobivenih uvidom u bolnički informatički sustav KB Merkura u odnosu na tip infiltracije koštane srži multiplog mijeloma uvrđen u 35 uzoraka iglene biopsije koštane srži primjenom Mann-Whitney U testa

	Mann-Whitney U	Z	P
Serumski Ca (mmol/L)	92,500	-1,836	0,066
Hemoglobin (g/L)	92,500	-1,836	0,066
LDH(U/L)	88,000	-1,987	0,047
Serumski kreatinin (umol/L)	105,500	-1,398	0,162
β2 microglobulin (mg/L)	90,500	-1,903	0,057
M protein	89,500	-0,994	0,320
Ukupni proteini u serumu (g/L)	131,500	-0,522	0,602
Albumini u serumu (g/L)	93,000	-1,819	0,069
Gama globulini u serumu (%)	86,000	-2,054	0,040
Gama globulini u serumu (g/L)	100,000	-1,583	0,114
Ukupno preživljenje u mjesecima	139,000	-0,270	0,787

*Ca- kalcij; LDH- laktat dehidrogenaza; M protein- monoklonski imunoglobulin; Gama globulini u serumu (%)- udio gama globulina u ukupnim proteinima u serumu; P – značajnost testa

Usporedba kontinuiranih varijabli, laboratorijskih nalaza i ukupnog preživljenja bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma s tipom infiltracije koštane srži multiplog mijeloma prikazane su u Tablicama 11 i 12. Uočena je značajna povezanost između tipa infiltrata u koštanoj srži multiplog mijeloma i serumskih vrijednosti LDH (P=0,047) te udjela gama globulina u serumu (P=0,040) što je obilježeno crvenom bojom u Tablici 11. i 12. Više razine laktat dehidrogenaze u serumu značajno češće su povezane su s difuznim tipom infiltracije koštane srži (medijan 201 U/L), dok su niže razine laktat dehidrogenaze u serumu češće povezane s nodularnim i/ili intersticijskim tipom infiltracije koštane srži (medijan 148,5 U/L). Viši udio gama globulina u serumu je značajno češće povezan s difuznim tipom infiltracije koštane srži (medijan 30,8 U/L), dok je niži udio gama globulina u serumu povezan s nodularnim i/ili intersticijskim tipom infiltracije koštane srži (medijan 18,5 U/L).

5.7. Usporedba razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama i krvotvornim matičnim stanicama s citogenetičkim promjenama u tumorskim plazma stanicama

U uzorcima KMS koštane srži 36 bolesnika dobivenih postupkom leukaferoze je metodom imunofenotipizacije na protočnom citometru određena razina ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1. U iglenim biopsijskim uzorcima koštane srži istih bolesnika učinjeno je imunohistokemijsko bojenje protutijelima NOTCH1, JAGGED1 i DLL1. Ekspresija proteina NOTCH1, JAGGED1, DLL1 smatrana je pozitivnom ako je utvrđena u više od 30% tumorskih stanica u odnosu na ukupni broj tumorskih stanica u koštanoj srži. Zbog neadekvatne predanalitičke obrade ili suboptimalne kvalitete uzorka, razinu ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama nije bilo moguće odrediti u jednom uzorku. Analize strukturnih promjena gena, t(11;14)(q13;q32); t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23) provedene su na serijskim rezovima cilindara biopsije koštane srži, a numeričke promjene gena, delecija regije 13q34 i regije 17p13.1 provedene su na neobojanim citološkim razmazima aspirata koštane srži interfaznom metodom FISH. Analizu strukturnih i numeričkih citogenetičkih promjena metodom FISH nije bilo moguće učiniti u jednom uzorku zbog neadekvatne odnosno suboptimalne kvalitete iglenih biopsija i citoloških razmaza aspirata koštane srži.

U Tablicama 13A i 13B je prikazana je usporeba citogenetičke promjene standardnog rizika, t(11;14)(q13;q32) u TPS analizirane interfaznom metodom FISH na serijskim rezovima cilindara biopsije koštane srži multiplog mijeloma i razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama u iglenoj biopsiji koštane srži multiplog mijeloma metodom imunohistokemijskog bojenja i krvotvornim matičnim stanicama u uzorcima krvotvornih matičnih stanica dobivenih postupkom leukaferoze i analiziranih metodom imunofenotipizacije protočnim citometrom.

Tablica 13A. Prikaz i analiza razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama iglene biopsije koštane srži multiplog mijeloma metodom imunohistokemijskog bojenja i krvotvornim matičnim stanicama u uzorcima krvotvornih matičnih stanica postupkom leukaferenze i analiziranih metodom imunofenotipizacije protočnim citometrom s citogenetičkom promjenom standardnog rizika u tumorskim plazma stanicama t(11;14)(q13;q32) koja je analizirana interfaznom metodom FISH na serijskim rezovima cilindara biopsije koštane srži u 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma.

		FISH t(11;14)(q13;q32)					
		N	Minimum	Maximum	25. centila	Medijan	75. centila
NOTCH1 u KMS (%)	Nije prisutna	32	1,27	54,32	12,12	20,12	36,25
	Prisutna	3	12,04	56,36	12,04	18,80	56,36
JAGGED1 u KMS (%)	Nije prisutna	32	0,00	4,92	0,02	0,53	1,40
	Prisutna	3	0,07	1,23	0,07	0,97	1,23
DLL1 u KMS (%)	Nije prisutna	32	0,00	3,02	0,07	0,13	0,39
	Prisutna	3	0,17	0,56	0,17	0,34	0,56
NOTCH1 u plazma stanicama (%)	Nije prisutna	32	0,00	90,00	35,00	60,00	80,00
	Prisutna	3	40,00	95,00	40,00	80,00	95,00
JAGGED1 u plazma stanicama (%)	Nije prisutna	32	0,00	90,00	20,00	40,00	80,00
	Prisutna	3	40,00	90,00	40,00	40,00	90,00
DLL1 u plazma stanicama (%)	Nije prisutna	32	0,00	80,00	0,00	20,00	40,00
	Prisutna	3	25,00	80,00	25,00	40,00	80,00

*KMS – krvotvorne matične stanice; FISH t(11;14)(q13;q32) - t(11;14)(q13;q32) u multiplom mijelomu analizirana metodom FISH; NOTCH1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina DLL1; NOTCH1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina DLL1; N – broj uzoraka; Minimum- najmanja vrijednost varijable; Maximum- najveća vrijednost varijable;

Tablica 13B. Usporedba razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama iglene biopsije koštane srži multiplog mijeloma metodom imunohistokemijskog bojenja i krvotvornim matičnim stanicama u uzorcima krvotvornih matičnih stanica postupkom leukaferoze i analiziranih metodom imunofenotipizacije protočnim citometrom s citogenetičkom promjenom standardnog rizika u tumorskim plazma stanicama t(11;14)(q13;q32) koja je analizirana interfaznom metodom FISH na serijskim rezovima cilindara biopsije koštane srži u 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma primjenom Mann-Whitney U testa

	Mann-Whitney U	Z	P
NOTCH1 u KMS (%)	42,000	-0,354	0,724
JAGGED1 u KMS (%)	43,000	-0,295	0,768
DLL1 u KMS (%)	27,000	-1,239	0,215
NOTCH1 u plazma stanicama (%)	29,000	-1,073	0,283
JAGGED1 u plazma stanicama (%)	35,500	-0,675	0,500
DLL1 u plazma stanicama (%)	22,500	-1,476	0,140

*KMS – krvotvorne matične stanice; NOTCH1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina DLL1; NOTCH1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina DLL1; P – značajnost testa;

Usporedba razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama i krvotvornim matičnim stanicama s t(11;14)(q13;q32), citogenetičkom promjenom standardnog rizika, u multiplom mijelomu prikazana je u Tablici 13A i 13B. Tek u 3 bolesnika uočena je prisutnost citogenetičke promjene standardnog rizika t(11;14)(q13;q32) u TPS multiplog mijeloma. Nije se našla značajna povezanost razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama i krvotvornim matičnim stanicama s citogenetičkom promjenom standardnog rizika multiplog mijeloma t(11;14)(q13;q32) u TPS.

U Tablicama 14A i 14B i na Slikama 23 i 24 je prikazana analiza razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama u 35 uzoraka iglene biopsije koštane srži multiplog mijeloma metodom imunohistokemijskog bojenja i krvotvornim matičnim stanicama u 36 uzoraka krvotvornih matičnih stanica postupkom leukaferoze i analiziranih metodom imunofenotipizacije protočnim citometrom u odnosu na pojavnost minimalno jedne

citogenetičke promjene visokog rizika u TPS u multiplom mijelomu. Citogenetičke promjene visokog rizika, t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23); del(13q34) i del(17p13.1), analizirane su interfaznom metodom FISH na serijskim rezovima cilindara biopsije koštane srži i citološkim razmazima aspirata koštane srži 35 bolesnika.

Tablica 14A. Prikaz i analiza razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama u 35 uzoraka iglene biopsije koštane srži multiplog mijeloma metodom imunohistokemijskog bojenja i krvotvornim matičnim stanicama u 36 uzoraka krvotvornih matičnih stanica postupkom leukaferenze i analiziranih metodom imunofenotipizacije protočnim citometrom u odnosu na pojavnost minimalno jedne citogenetičke promjene visokog rizika u multiplom mijelomu, t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23); del(13q34) i del(17p13.1), koje su analizirane interfaznom metodom FISH na serijskim rezovima cilindara biopsije koštane srži i nebojanim citološkim razmazima aspirata koštane srži 35 bolesnika.

		FISH citogenetika visokog rizika					
		N	Minimum	Maximum	25. centila	Medijan	75. centila
NOTCH1 u KMS (%)	Nije prisutna	23	1,27	56,36	13,44	19,95	35,62
	Prisutna	12	4,07	54,32	10,01	20,05	38,97
JAGGED1 u KMS (%)	Nije prisutna	23	0,00	4,92	0,00	0,39	1,43
	Prisutna	12	0,01	3,89	0,08	0,87	1,19
DLL1 u KMS (%)	Nije prisutna	23	0,00	3,02	0,06	0,13	0,34
	Prisutna	12	0,03	2,97	0,12	0,18	0,56
NOTCH1 u plazma stanicama (%)	Nije prisutna	23	0,00	90,00	25,00	50,00	80,00
	Prisutna	12	40,00	95,00	50,00	80,00	90,00
JAGGED1 u plazma stanicama (%)	Nije prisutna	23	0,00	80,00	20,00	40,00	60,00
	Prisutna	12	20,00	90,00	40,00	80,00	90,00
DLL1 u plazma stanicama (%)	Nije prisutna	23	0,00	80,00	0,00	20,00	40,00
	Prisutna	12	0,00	80,00	0,00	40,00	60,00

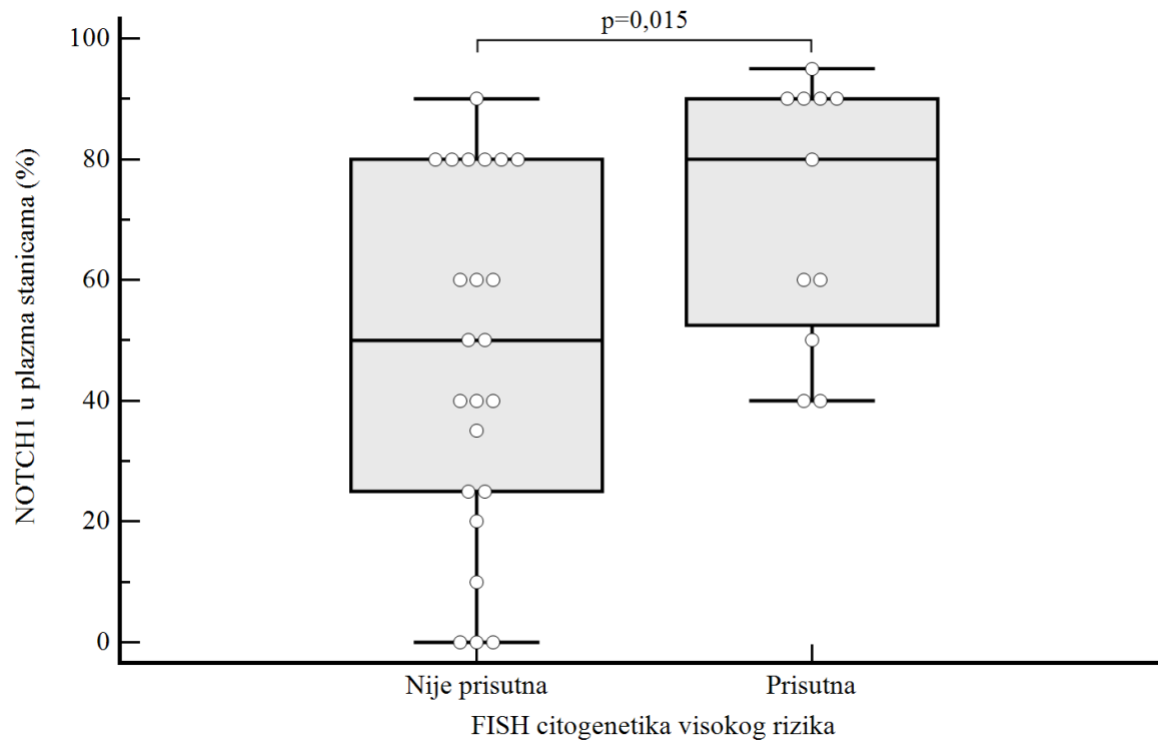
*FISH citogenetika visokog rizika- citogenetičke promjene visokog rizika u multiplom mijelomu t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23); del(13q34) i del(17p13.1) analizirane metodom FISH; NOTCH1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina DLL1; NOTCH1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina DLL1; N – broj uzoraka; Minimum- najmanja vrijednost varijable; Maximum- najveća vrijednost varijable;

Tablica 14B. Usporedba razine ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama u 35 uzoraka iglene biopsije koštane srži multiplog mijeloma metodom imunohistokemijskog bojenja i krvotvornim matičnim stanicama u 36 uzoraka krvotvornih matičnih stanica postupkom leukaferenze i analiziranih metodom imunofenotipizacije protočnim citometrom u odnosu na pojavnost minimalno jedne citogenetičke promjene visokog rizika u multiplom mijelomu, t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23); del(13q34) i del(17p13.1), koje su analizirane interfaznom metodom FISH na serijskim rezovima cilindara biopsije koštane srži i neobojanim citološkim razmazima aspirata koštane srži 35 bolesnika primjenom Mann-Whitney U testa

	Mann-Whitney U	Z	P
NOTCH1 u KMS (%)	136,000	-0,070	0,945
JAGGED1 u KMS (%)	116,000	-0,766	0,443
DLL1 u KMS (%)	111,000	-0,939	0,348
NOTCH1 u plazma stanicama (%)	61,000	-2,435	0,015
JAGGED1 u plazma stanicama (%)	46,500	-2,977	0,003
DLL1 u plazma stanicama (%)	91,000	-1,324	0,185

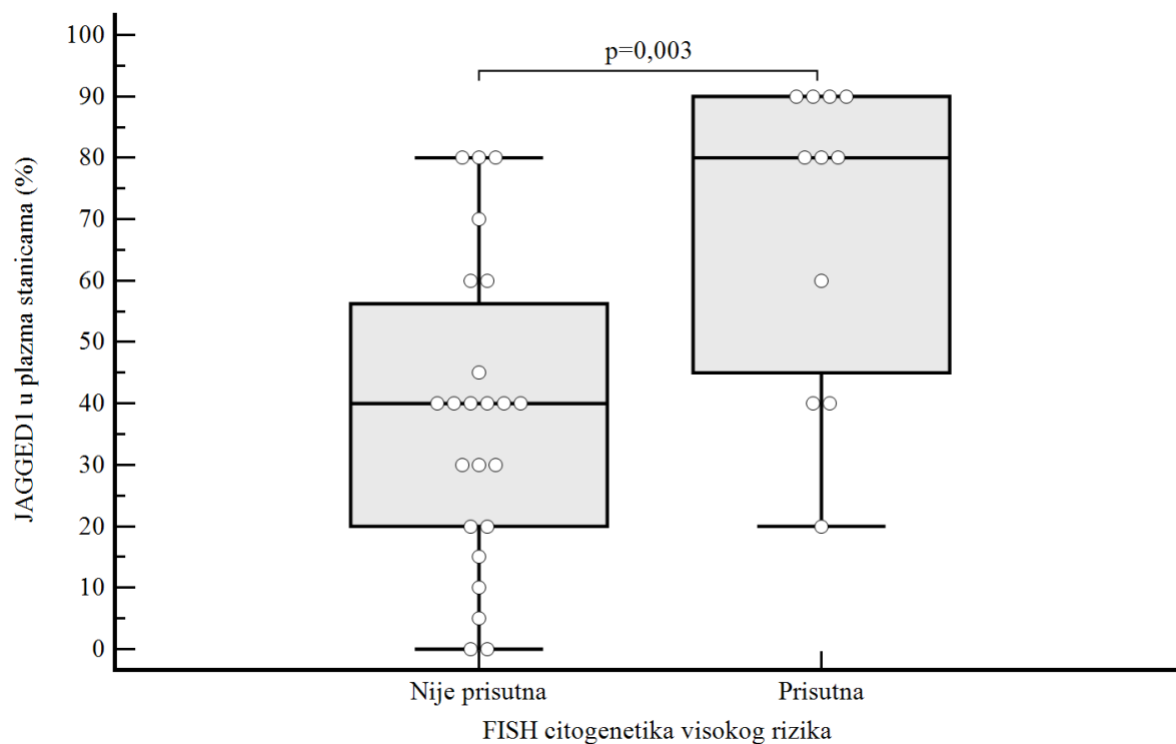
NOTCH1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u KMS (%) - udio krvotvornih matičnih stanica s ekspresijom proteina DLL1; NOTCH1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina NOTCH1; JAGGED1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina JAGGED1; DLL1 u plazma stanicama (%) - udio tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina DLL1; P – značajnost testa;

Značajna povezanost uočena je između razine ekspresije proteina NOTCH1 i JAGGED1 u tumorskim plazma stanicama i prisutnosti citogenetičkih promjena visokog rizika u tumorskim plazma stanicama (P=0,015 i P=0,003) što je u Tablici 14B obilježeno crvenom bojom. Veći udio tumorskih plazma stanica koje su ekspimirale proteine NOTCH1 i JAGGED1 imale su češće citogenetičke promjene visokog rizika (Slika 23 i 24).



*FISH citogenetika visokog rizika- citogenetičke promjene visokog rizika u multiplom mijelomu t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23); del(13q34) i del(17p13.1) analizirane metodom FISH

Slika 23. Usporedba ekspresije proteina NOTCH1 u tumorskim plazma stanicama i citogenetičkih promjena visokog rizika u multiplom mijelomu



*FISH citogenetika visokog rizika- citogenetičke promjene visokog rizika u multiplom mijelomu t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23); del(13q34) i del(17p13.1) analizirane metodom FISH

Slika 24. Usporedba ekspresije proteina JAGGED1 u tumorskim plazma i citogenetičkih promjena visokog rizika u multiplom mijelomu

6. RASPRAVA

Činjenica je da TPS u koštanoj srži multiplog mijeloma moduliraju ekspresiju citokina na stromalnim stanicama što dovodi do promjene mikrookoliša koji pruža potporu rastu tumorskih stanica. (19) U ovom radu se pokušalo odgovoriti na pitanje da li TPS svojim utjecajem na mikrookoliš u koštanoj srži mogu utjecati i na samu KMS mijenjajući ekspresiju pojedinih proteina, receptora na njenoj površini. Mogućnost da TPS mogu utjecati na mikrookoliš, na stanice niše u koštanoj srži, pa tako i na KMS koje se nalaze u njihovom mikrookolišu na način da mijenjaju ekspresiju pojedinih proteina na KMS predstavlja izazov za nove dijagnostičke i terapijske mogućnosti za bolesnike s hematološkim malignim bolestima. Odgovor na postavljeno pitanje smo pokušali odgovoriti kroz analizu ekspresije proteina signalnog puta Notch, NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma, uspoređujući ju s ekspresijom tih istih proteina u KMS zdravih ispitanika kao kontrolne skupine. Analizirana je i ekspresija proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u TPS u uzorcima iglene biopsije koštane srži u bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma. Analizirana je i povezanost KMS te tumorskih plazma stanica s ekspresijom proteina signalnog puta Notch uzimajući u obzir morfološka obilježja i citogenetičke promjene tumorskih plazma stanica.

Istraživanje se temeljilo na pretpostavci da postoji značajna razlika u ekspresiji proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS koštane srži infiltrirane tumorskim plazma stanicama u odnosu na KMS zdrave koštane srži kao i razlika u razini ekspresije i intenzitetu ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS koštane srži u odnosu na različiti tip infiltracije i diferencijacije tumorskih plazma stanica. Naime, pretpostavili smo da bi KMS u koštanoj srži difuzno infiltriranoj slabo diferenciranim tumorskim plazma stanicama imale veću ekspresiju proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u odnosu na KMS u nedifuzno infiltriranoj koštanoj srži dobro diferenciranim tumorskim stanicama. Spoznaja da bi ekspresija proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS u multiplom mijelomu mogla utjecati na diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu tumorskih plazma stanica, predstavljala bi izazov za nove dijagnostičke, terapijske mogućnosti za bolesnike s hematološkim bolestima. Mjerenje ekspresije tih proteina na KMS mogla bi pomoći i u predviđanju prognoze bolesti. Ekspresija liganada JAGGED1 i DLL1 u KMS u multiplom mijelomu određena imunofenotipizacijom protočnim citometrom značajno je niža u odnosu na ekspresiju u KMS zdravih osoba. Ne nalazi se razlika u ekspresiji receptora

NOTCH1 u KMS multiplog mijeloma i zdravih osoba. Homeostaza krvotvornih matičnih stanica tkiva je složen i vrlo reguliran proces koji uravnotežuje dugotrajnu mogućnost samoobnavljanja i diferencijacije. Kao i druge vrste matičnih stanica tkiva, KMS se održavaju u niši matičnih stanica, specijaliziranom mikrookolišu koje daje nužne signale za podršku aktivnosti KMS. (217,218,2) Signalni put Notch predstavlja dio složenog sustava homeostaze KMS. Receptori i ligandi signalnog puta Notch dokazani su u stanicama mikrookoliša zdrave koštane srži, i endostealne i vaskularne niše, te u samim krvotvornim matičnim stanicama. (179,219,220) Osteoblasti reguliraju broj i funkciju KMS na način da pod utjecajem paratireoidnog hormona povećavaju broj KMS *in vivo*. (107) Potiču hematopoezu pomoću liganada JAGGED1, JAGGED2, DLL1 i DLL4 koji su izraženi u osteoblastima. (108) Endotelne stanice igraju važnu ulogu u kontroli proliferacije i diferencijacije KMS. (111) Ligandi receptora NOTCH, osobito JAGGED1 koji je izražen na endotelnim stanicama potiču proliferaciju KMS *in vitro* i *in vivo*. (109,110) Istraživanja Stiera i sur. su pokazala da NOTCH1 sudjeluje u regulaciji KMS na način da potiču više samoobnavljanje nego diferencijaciju KMS, a s druge strane da potiču više diferencijaciju limfatične nego mijeloične loze. (115) Suprotno navedenom, istraživanja Maillarda i sur. isključuju bitnu fiziološku ulogu signala Notch u održavanju i samoobnavljanju KMS. (116) U animalnom modelu transgeničnih miševa, analizirana je supresija transkripcijske aktivacije signalnog puta Notch pomoću DNMA1-a, moćnog i specifičnog inhibitora signalnog puta Notch *in vivo*. Analizom aktivnosti receptora NOTCH u LT-KMS isključen je učinak signalnog puta Notch u homeostazi KMS u zdravoj koštanoj srži u fiziološkim uvjetima. Zaključeno je da je aktivnost signalnog puta Notch u primitivnim hematopoetskim progenitorima vrlo niska u fiziološkim uvjetima. (116) Prema istraživanju Mancinija i sur., inaktivacija NOTCH1 i JAGGED1 u progenitornim stanicama i / ili stromalnim stanicama koštane srži ne utječe bitno na proces samoobnavljanja ili diferencijacije KMS u zrele stanice hematopoeze. (117) Uvođenje vanjskih čimbenika kao što je djelovanje G-CSF, moglo bi utjecati na homeostazu samoobnavljanja i diferencijacije KMS u zdravoj koštanoj srži čime bi se mogla poremetiti aktivnost signalnog puta Notch na način da se poveća ekspresija liganada JAGGED1 i DLL1 u KMS. Jedan od mogućih mehanizama mogao bi biti put kojim E3 ubikvitin-protein ligaza negativno regulira granulocitnu diferencijaciju na način da razgrađuje receptor za G-CSF u fiziološkim uvjetima. (221) Ovaj enzim utječe na stabilnost i aktivnost liganda receptora NOTCH. (118) Kod sisavaca postoje dva homologa Neura, Neur1 i Neur2, koji oba mogu

djelovati s ligandima Notch, DLL1, DLL4, i JAGGED kao što je prikazano u istraživanju Rullinkov G i sur, tijekom embrionalnog razvoja mozga i postnatalno. (222) E3 ubikvitin-protein ligaza (MIB1) također regulira proces apoptoze. Inaktivacija MIB1, koji u koštanoj srži regulira endocitozu i aktivaciju liganda receptora NOTCH, u istraživanju na miševima uzrokovala je razvoj mijeloproliferativne bolesti. Transplantacija divljeg tipa koštane srži u okoliš s inaktiviranim MIB1 rezultirala je ponovno nastankom mijeloproliferativne bolesti. Razvoj bolesti je zaustavljen je uvođenjem aktivne unutarstanične domene Notch1 u mikrookoliš (118) U istraživanju Wanga i sur., na animalnom modelu, *in vivo*, gubitkom regije O-fukozilglukana receptora NOTCH na KMS koja je važna za vezanje liganda receptora NOTCH (domena slična EGF), dolazi do poremećene sposobnosti liganda receptora NOTCH da se veže na KMS, pa takve KMS pokazuju pojačanu mobilizaciju, odnosno izlazak iz koštane srži i smanjenu adheziju KMS na stromalne stanice koje izražavaju ligande receptora NOTCH i osteoblastične stanice u niši KMS. S druge strane, KMS divljeg tipa prijanjaju na osteoblastične ili stromalne stanice koje izražavaju ligand receptora NOTCH što inhibira mobilizaciju KMS, odnosno izlazak iz koštane srži. Nadalje, antitijela usmjerena na ligande receptora NOTCH induciraju izlazak KMS, odnosno pojačavaju mobilizaciju KMS. Stoga se zaključuje da angažman receptora NOTCH i njegovih liganda kontrolira mirovanje KMS i zadržavanje u niši koštane srži. U postupku mobilizacije KMS koji prethodi prikupljanju KMS koje se koriste za transplantaciju, važnu ulogu igra G-CSF. G-CSF izaziva prekid interakcija između kemokinskog faktora 1 stromalnih stanica (SDF-1) ili kemokina CXCL12 na stromalnim stanicama koštane srži i njegovog receptora (CXCR4) na KMS koje su nužne za održavanje KMS u niši koštane srži. Postupna razgradnja međustaničnih veza od strane neutrofilne elastaze dovodi do oslobađanja KMS i izlaska iz niše, odnosno mobilizacije KMS. Moguće je da G-CSF kojeg su dobivali svi ispitanici u ovom istraživanju s ciljem poticanja mobilizacije KMS u perifernu krv, osim što djeluje na kemokine CXCL12, ima utjecaj i na ekspresiju receptora NOTCH i njegovih liganada što bi se moglo odraziti na razliku u njihovoj ekspresiji u KMS koštane srži multiplog mijeloma i zdrave koštane srži.

Ne smijemo zaboraviti i fiziološki proces, starenje hematopoetskog sustava koji je povezan sa slabljenjem imunološke funkcije, povećanim rizikom od infekcija, razvojem limfoproliferativnih i mijeloproliferativnih bolesti i anemije. (120,121) Starenje KMS djelomično doprinosi oštećenju ostarjelog hematopoetskog sustava. Starije KMS su višeg proliferativnog indeksa te se njihov

broj povećava u ostarjeloj koštanoj srži. (122,123) Iako se broj KMS povećava starenjem organizma, one ne mogu nadoknaditi deficit koštane srži koji je posljedica starenja. Treba imati na umu da je multipli mijelom bolest starije dobi u kojoj je, i neovisno o multiplom mijelomu, prisutan proces starenja hematopoetskog sustava. Nasuprot tome, u multiplom mijelomu značajno je smanjen broj KMS, posebno megakariocitno-eritrocitnih prekursora, koji su funkcionalno oštećeni u pogledu klonalne i dugotrajne sposobnosti samoobnavljanja, kao i proliferativne aktivnosti. Gubitak KMS u koštanoj srži multiplog mijeloma nije samo posljedica fizičkog istiskivanja KMS tumorskim stanicama, već je također rezultat funkcionalnog oštećenja koje nastaje zbog prekomjernog otpuštanja TGF β i prekomjerne aktivacije signalnog puta TGF β od strane tumorskih plazma stanica i mezenhimskih stanica koštane srži. Aktivacija TGF β signalizacije ima snažan antiproliferativni učinak na KMS što dovodi do smanjenog stvaranja kolonija i dugotrajnog samoobnavljanja. (127, 128). Još jedan od mogućih mehanizama koji uključuje signalni put TGF β je izbjegavanje imunološkog nadzora u multiplom mijelomu gdje Notch sudjeluje u pretvorbi proupalnih Th1 stanica u supresorske T regulatorne stanice te potencira supresivni učinak T regulatornih stanica povećavanjem broja njihovih TGF- β receptora II. (203,204). Također, signalni put Notch u tumorskim plazma stanicama utječe na nezrelost KMS u koštanoj srži na način da aktivirani signalni put Notch u tumorskim plazma stanicama inhibira diferencijaciju KMS koje se samoobnavljaju. Također aktivirani signalni put Notch u TPS MM rezultira pojačanom sintezom čimbenika rasta IL-6 and VEGF koji mogu utjecati na rast i samoobnavljanje na KMS u niži MM (12). Za razliku od naših rezultata, istraživanje Jakubikove i sur. pokazalo je da su u KMS koštane srži multiplog mijeloma, kao i na drugim B stanicama limfopoeze identificirane promjene u smislu značajnog povišenja razine Notch 1. (135)

U koštanoj srži multiplog mijeloma postoji korelacija u ekspresiji receptora NOTCH1 i liganda JAGGED1 i DLL1 samo u istoj vrsti stanica, dok se ne nalazi značajna povezanost u ekspresiji ovih proteina između različitih vrsta stanica, KMS koštane srži multiplog mijeloma i tumorskim plazma stanicama. U KMS koštane srži multiplog mijeloma postoji negativna korelacija između ekspresije receptora NOTCH1 i liganda JAGGED1, određena imunofenotipizacijom protočnim citometrom. Nije se uočila korelacija između ekspresije receptora NOTCH1 i liganda DLL1 u KMS koštane srži multiplog mijeloma. U TPS postoji pozitivna korelacija između ekspresije receptora NOTCH1 i liganda JAGGED1 i DLL1, određena imunohistokemijskim bojenjem.

Nema značajnih korelacija ekspresija ovih proteina između KMS koštane srži multiplog mijeloma i tumorskih plazma stanica uspoređujući rezultate dobivenih imunofenotipizacijom protočnim citometrom u KMS i imunohistokemijskim bojenjem u TPS. Receptori NOTCH i njihovi ligandi igraju ključnu ulogu u multiplom mijelomu kao dio složene mreže signalnih putova, odašiljanju i primanju signala između tumorskih plazma stanica i njihovog mikrookoliša. (186) Mikrookoliš tumorskih plazma stanica ima važnu ulogu u razvoju i napredovanju bolesti. Dvosmjerna komunikacija između TPS i stanica mikrookoliša dovodi do dramatičnih promjena i u samom mikrookolišu kao što je osteoliza kosti, širenje TPS krvlju i naseljavanje na druga mjesta u koštanom tkivu, inhibicija osteoblastogeneze i supresija imunološkog sustava. (12,185) Signalni put Notch se u multiplom mijelomu može aktivirati na dva različita načina. Homotipskom aktivacijom koja se događa između iste vrste stanica gdje se receptori NOTCH 1, 2, 3 TPS vežu za ligande receptora NOTCH koji se nalaze na susjednim TPS (Jagged 1,2). Time možemo objasniti pozitivnu korelaciju između ekspresije receptora NOTCH1 i liganda JAGGED1 i DLL1 u TPS u ovom istraživanju. U ovom istraživanju nije se uočilo korelacija između ekspresije receptora NOTCH1 i liganda DLL1 u KMS koštane srži multiplog mijeloma što bi moglo ukazivati da ligand JAGGED1 ima veći značaj u patogenezi multiplog mijeloma. Time možemo objasniti i negativnu korelaciju između ekspresije receptora NOTCH1 i liganda JAGGED1 u KMS multiplog mijeloma koja bi mogla biti povezana s niskom ekspresijom liganda JAGGED1 u KMS multiplog mijeloma u odnosu na KMS zdravih darivatelja. Drugi put aktivacije signalnog puta Notch je heterotipska aktivacija u kojoj se receptori NOTCH TPS vežu za ligande receptora NOTCH na susjednim stromalnim stanicama koštane srži koje ne uključuju KMS. (139) Tumorske plazma stanice (TPS) pokazuju pojačanu ekspresiju komponenti NOTCH koje im pomažu da primaju i prenose signale od i na susjedne stanice. Poznato je da TPS izražavaju receptore NOTCH1 i 2, ligande JAGGED1 i 2 i to na način da je ligand JAGGED2 jače izražen u ranijoj fazi bolesti, u MGUS-u, dok se JAGGED1 javlja samo u TPS u multiplom mijelomu. (13,187)

Pri analizi rezultata koji su dobiveni u ovom istraživanju treba uzeti u obzir korištenje različitih metoda analize proteina u ciljanim stanicama. Ekspresija receptora NOTCH1 i liganda JAGGED1 i DLL1 analizirana je u različitim vrstama stanica različitim metodama. Metode imaju različite granice osjetljivosti i specifičnosti. Imunofenotipizacijom protočnim citometrom istovremeno su analizirani svi proteini u KMS, dok su proteini u tumorskim plazma stanicama

analizirani imunohistokemijskim bojenjem na serijskim rezovima biopsija koštane srži, gdje smo za prag pozitivnog rezultata odredili udio $> 30\%$ pozitivnih stanica u odnosu na ukupni broj plazma stanica kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati te imunohistokemijsko bojenje fenotipski normalnih, poliklonskih plazma stanica, dok u analizi KMS imunofenotipizacijom protočnim citometrom nije određen prag pozitiviteta, već su analizirani svi signali stanice koje je uređaj mogao detektirati. S ograntom mogućeg ograničenja u analizi ovih rezultata, možemo ipak pretpostaviti da je heterotipska aktivacija signalnog puta Notch u multiplom mijelomu ovisna o stanicama mikrookoliša koje ne moraju uključivati i KMS u smislu da KMS putem signalnog puta Notch utječu na proliferaciju TPS i progresiju multiplog mijeloma, već KMS možda sudjeluju u homotipskoj aktivaciji signalnog puta Notch u KMS koje su dio mikrookoliša multiplog mijeloma.

Veći intenzitet ekspresije proteina NOTCH1 u TPS bio je prisutan u difuznom tipu infiltracije u odnosu na nodularni i/ili intersticijski tip infiltracije multiplog mijeloma u koštanoj srži. Nije se uočila razlika u intenzitetu ekspresije proteina JAGGED1 i DLL1 u TPS u odnosu na tip infiltracije multiplog mijeloma u koštanoj srži, te nije uočena razlika ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS u multiplom mijelomu u odnosu na tip infiltracije TPS multiplog mijeloma u koštanoj srži. Prema literaturi, signalizacija Notch je uključena u patogenezu multiplog mijeloma koji izražava visoku razinu aktivnih proteina Notch, NOTCH1 i JAGGED1 u tumorskim plazma stanicama. Ligand DLL1 je pronađen u stromalnim stanicama koštane srži u zdravih darivatelja te bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma. DLL1 može aktivirati signalni put Notch u TPS u koštanoj srži (uključujući i NOTCH1 i NOTCH2), kako bi se omogućila klonska proliferacija TPS. (191) Kako je prema literaturi ligand DLL1 izražen na stromalnim stanicama koštane srži, a ne na MM stanicama, signalizacija Notch se, posredovanjem DLL1, može aktivirati tek kad su TPS i stromalne stanice koštane srži u uskom kontaktu. Ovo pokazuje da ekspresija DLL1 na TPS, a vjerojatno i na KMS ne igra značajnu ulogu u aktivaciji signalnog puta Notch u koštanoj srži MM, a time i u klonskoj proliferaciji TPS, nego je za aktivaciju signalnog puta Notch u koštanoj srži MM vjerojatno važnija njegova ekspresija na stromalnim stanicama koštane srži MM, pa je za daljnju raspravu i da li bi ekspresija DLL1 u stromalnim stanicama koštane srži mogla utjecati na tip infiltracije koštane srži multiplog mijeloma. Jundt i sur. su pokazali da je signalni put Notch u MM aktiviran i karakteriziran jakom ekspresijom proteina NOTCH1, NOTCH2 i JAGGED1 u tumorskim

plazma stanicama u odnosu na njihovu slabu, minimalnu izražajnost u zdravim plazma stanicama, analizirano imunohistokemijskim bojenjem. (203) U istraživanju Škrtić i sur. imunohistokemijskom analizom također je pokazana razlika u ekspresiji proteina NOTCH1 i JAGGED1u multiplom mijelomu u odnosu na MGUS, što bi moglo ukazivati na progresiju i patogenezu bolesti, razvoj multiplog mijeloma iz premaligne lezije MGUS. U navedenom istraživanju uočena je značajna povezanost između jakog intenziteta bojenja NOTCH1 proteina u tumorskim plazma stanicama s morfološkim karakteristikama istih, odnosno, veća učestalost jakog intenziteta bojenja NOTCH1 bila je u morfološki slabo diferenciranim plazma stanicama multiplog mijeloma i povezana s difuznim tipom infiltrata tumorskih plazma stanica u biopsiji koštane srži. (204) Suprotno navedenom istraživanju, u našem istraživanju nije nađena značajna povezanost između ekspresije liganada JAGGED1, ali i DLL1 u TPS, kao niti u KMS i morfoloških karakteristika multiplog mijeloma u koštanoj srži što možemo objasniti malim brojem ispitanika u odnosu na broj ispitanika po grupi u istraživanju Škrtić i sur. (204)

Ekspresija proteina NOTCH1 i JAGGED1 u tumorskim plazma stanicama bila je značajno veća u multiplom mijelomu s barem jednom citogenetičkom promjenom visokog rizika, $t(4;14)(p16;q32)$; $t(14;16)(q32;q23)$; $del(13q34)$ i $del(17p13.1)$ određena metodom FISH. Nije se uočila povezanost ekspresije NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 proteina u KMS koštane srži multiplog mijeloma s barem jednom citogenetičkom promjenom visokog rizika određena metodom FISH. Nije se uočila povezanost ekspresije NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 proteina u tumorskim plazma stanicama i KMS koštane srži s $t(11;14)(q13;q32)$ u multiplom mijelomu analizirana metodom FISH. Signalni put Notch ima ključnu ulogu u progresiji i razvoju multiplog mijeloma. Promjena signalnog puta Notch može biti posljedica i citogenetičkih te molekularnih promjena u tumorskim plazma stanicama multiplog mijeloma. (63) Pojačana regulacija signalnog puta Notch opisana je kao posljedica translokacije $t(14;20)(q32;q11)$ i $t(14;16)(q32;q23)$. Aktivacija transkripcijskih čimbenika MAFB i c-MAF inducira ekspresiju NOTCH2 i posljedičnu regulaciju njegovih ciljnih gena *HES1/5/7* i onda kada se ne radi o mutaciji gena za proteine signalnog puta Notch. (224) Aktivacija signalnog puta Notch izražena kao prekomjerna ekspresija proteina NOTCH1 i JAGGED1, opisana je tijekom razvoja MM iz MGUS-a, ali molekularni mehanizmi odgovorni za ovu deregulaciju nisu jasni (205). Prekomjerna ekspresija JAGGED2 koja se javlja tijekom početne faze bolesti uzrokovana je epigenetičkim događajima, kao što je hipometilacija ili deacetilacija, zbog gubitka korepresora

SMRT/NCoR2, promotora JAGGED2. T(14;20)(q32;q11) u multiplom mijelomu uzrokuje prekomjernu ekspresiju dva gena: Receptor faktora rasta fibroblasta 3 (FGFR3), koji kodira receptor tirozin kinaze, i MMSET gen koji kodira histonsku metiltransferazu. (15,249) MMSET deregulacija se smatra najvažnijom posljedicom translokacije, koja rezultira pojačanom ekspresijom c-MYC. Translokacija je povezana s agresivnim kliničkim oblicima i općenito se smatra lošim prognostičkim čimbenikom. (225) T(14;16)(q32;q23) u multiplom mijelomu uzrokuje konstitutivnu aktivaciju gena *MAF*. Geni *MAF* i *MAF-B* su dio porodice čimbenika transkripcije koja pozitivno regulira ekspresiju ciklina D2 i integrina B7, i prekomjerno su izraženi u podskupinama bolesnika prema molekularnoj klasifikaciji multiplog mijeloma. (226) Bolesnici s translokacijom koja uključuje gen *MAF* imaju lošu prognozu. (217) TP53 je tumor supresorski protein kodiran genom *TP53* na kromosomu 17p13, te posreduje u odgovoru na različite signale stresa (oksidativni stres, oštećenje DNA i ekspresija onkogeni). Gubitak funkcije TP53 je česta pojava u multiplom mijelomu zbog delecije *TP53* lokusa i/ili mutacije gena *TP53* koja je sekundarna mutacija u multiplom mijelomu i ima negativni prognostički značaj. (227,229) Monosomija kromosoma 13 i delecija regije 13q34 smatrale su se, u brojnim istraživanjima, nepovoljnim prognostičkim čimbenicima multiplog mijeloma i prije nego su objavljeni negativni učinci drugih citogenetičkih promjena visokog rizika u multiplom mijelomu. (230-237) Povezanost signalnog puta Notch s citogenetičkom promjenom, delecijom kromosoma 13q nije tako detaljno istraženo u multiplom mijelomu, već se spominje u istraživanjima drugih limfoproliferativnih bolesti, napose B KLL. U B KLL genetičke lezije uključuju i kromosomske abnormalnosti kao što su delecije kromosoma 13q, 11q i 17p, trisomija 12 i mutacije gena. (240) *NOTCH1* predstavlja najčešće mutirani gen u B KLL, s visokom učestalošću u agresivnim podskupovima KLL-a nemutiranog gena *IGHV* koji izražava određene stereotipe B staničnog receptora (241-243). Mutacije *NOTCH1* bile su ili klonske, što predstavlja rani događaj u razvoju KLL-a, ili subklonske, što ukazuje na sekundarnu mutaciju u razvoju KLL-a i selekciju tijekom progresije bolesti (244). Iz gore navedenih navoda možemo zaključiti da su rezultati ovog istraživanja sukladni do sada objavljenim rezultatima o povezanosti citogenetičkih promjena visokog rizika multiplog mijeloma i ekspresije proteina *NOTCH1*, *JAGGED1* i *DLL1* u tumorskim plazma stanicama što govori o jednoj od mehanizama patogeneze multiplog mijeloma.

Usporedba dobi ispitanika, broja CD34 pozitivnih stanica i leukocita nakon odmrzavanja, između skupina multiplog mijeloma i zdrave koštane srži, pokazuje da nije bilo značajnih razlika u dobi, dok je skupina s multiplim mijelomom imala značajno veće vrijednosti broja CD34+ stanica pri zamrzavanju, kao i broj i udio CD34+ stanica nakon odmrzavanja i značajno manji ukupni broj leukocita pri odmrzavanju. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je u bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma koji zadovoljavaju kriterije za autolognu transplantaciju koštane srži u postupcima leukaferoze prikupljen i zamrznut značajno veći broj CD34 pozitivnih matičnih stanica u odnosu na zdrave darivatelje. Također pokazuju da je broj i udio CD34 pozitivnih matičnih stanica nakon odmrzavanja veći kod bolesnika u odnosu na zdrave darivatelje. Rezultati su očekivani s obzirom na činjenicu da se mobilizacija KMS kod bolesnika potiče i kemoterapijom i čimbenicima rasta kolonija granulocita, dok se mobilizacija kod zdravih darivatelja KMS potiče samo primjenom čimbenika rasta kolonija granulocita. G-CSF stimulira ekspanziju i aktivaciju mijeloidnih i granulocitnih prastanica u koštanoj srži, čime se povećava broj zrelih granulocita (neutrofila) u perifernoj krvi. Oni otpuštaju veliku količinu neutrofilnih serinskih proteaza koje cijepaju međustanične veze između adhezijskih molekula (CXCL12, CXCR4 i VCAM-1) koje su izražene na površini KMS i stanica mikrookoliša i omogućuju mobilizaciju KMS. Uporaba kemoterapije i G-CSF-a stvara i sinergistički učinak na otpuštanje proteaza u koštanoj srži, kao i na smanjenje aktivnosti inhibitora neutrofilnih serinskih proteaza, koji bi inače potiskivali proteolitičku aktivnost enzima otpuštenih iz neutrofila. (245) Posljedica sinergističkog učinka kemoterapije i G-CSF-a je jača mobilizacija KMS u perifernu krv, a time i veći broj prikupljenih KMS postupkom leukaferoze kod bolesnika. Činjenica da je kod zdravih darivatelja prikupljen, zamrznut pa i odmrznut značajno manji broj KMS u odnosu na bolesnike može biti i posljedica činjenice da neki darivatelji teže mobiliziraju KMS iz koštane srži u perifernu krv iz koje se prikupljaju. Ti darivatelji su „loši mobilizatori“, unatoč primjeni G-CSF-a. (246) Kod takvih darivatelja broj CD34 + stanica u perifernoj krvi prije leukaferoze, a nakon minimalno 4 dana stimulacije mobilizacije pomoću G-CSF, ne prelazi 10×10^6 /L. Broj CD34+ u perifernoj krvi od 10×10^6 /L je granica ispod koje, prema postupniku leukaferoze u KB Merkur, u većini slučajeva, ne prikupljamo KMS. Ipak, u nekim situacijama, kada je tjelesna masa primatelja mala i kada procijenimo da je mobilizacija CD34+stanica još uvijek aktivna s uzlaznim prirastom s obzirom na dinamiku porasta broja CD34+ stanica u perifernoj krvi koja se analizira na protočnom citometru i na broj dana koji pacijent dobiva G-

CSF, odlučujemo se za prikupljanje CD34+ stanica leukaferozom i kada je taj broj CD34+ stanica u perifernoj krvi manji od $10 \times 10^6/L$. Tada smo svjesni činjenice da se minimalan broj CD34+ stanica neće moći prikupiti u jednom postupku leukaferoze, nego će trebati 2 ili 3 postupka, ali i činjenice da postoji mogućnost da se ipak neće uspjeti prikupiti dovoljan broj CD34+ stanica za transplantaciju. Također bitno je uočiti da su uzorci darivatelja koji su korišteni u ovom radu prikupljeni u vremenskom periodu od 2006. do 2008. godine kada se za mobilizaciju KMS kod „loših mobilizatora“ nije koristio *plerixafor*, potentniji mobilizator koji se vezanjem na receptor CXCR4 inhibira vezanje njegovog liganda, CXCL12. S obzirom da je CXCR4 izražen na KMS i igra ključnu ulogu u njenom održavanju u niši koštane srži, blokiranje njegovog vezanja na CXCL12 koji je njegov ligand, oslobađa KMS iz niše koštane srži i omogućuje njezinu mobilizaciju u perifernu krv. (247) Ovu mogućnost prikupljanja većeg broja KMS kod „loših mobilizatora“ u vremenskom periodu od 2006. do 2008. godine nismo imali. Drugi razlog činjenice da je broj CD34 pozitivnih stanica u pripravku KMS koji je dobiven postupkom leukaferoze pri zamrzavanju značajno veći u bolesnika nego u zdravih darivatelja je taj što je broj uzoraka zdravih darivatelja relativno mali, a iz etičkih i/ili tehničkih razloga, drugi uzorci KMS su nam bili nedostupni, pa se može govoriti o ograničenosti istraživanja temeljenoj na malom broju ispitanika po skupini. Razlog zašto je broj CD34 pozitivnih stanica nakon odmrzavanja bio značajno veći u bolesnika nego u zdravih darivatelja je većim dijelom posljedica činjenice da je broj CD34 pozitivnih stanica u pripravku KMS darivatelja i prilikom zamrzavanja bio značajno manji, ali je i činjenica da su uzorci KMS darivatelja prikupljeni i zamrzavani u vremenskom periodu od 2006. do 2008. godine, a većina uzoraka bolesnika je prikupljena kasnije, dvije do osam godina nakon prikupljanja i zamrzavanja KMS zdravih darivatelja, što utječe na kvalitetu uzoraka KMS zdravih darivatelja jer su KMS bolesnika bile dvije do osam godina kraće pohranjene u kriospremnici u tekućem dušiku na temperaturi od -150 do -196 °C. Iako većina radova pokazuje da vrijeme čuvanja uzoraka KMS u kriospremnici ne utječe značajno na kvalitetu, vijabilnost i broj CD34+ stanica, postoji mogućnost da je dugotrajno skladištenje pripravaka KMS u tekućem dušiku ipak negativno utjecalo na vijabilnost i broj KMS kao što pokazuju rezultati ovog istraživanja (medijan broja $CD34 \times 10^6/L$ pri zamrzavanju, zdrava koštana srž, je 947,44, a pri odmrzavanju je 32,7) (248) Također, u bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma koji su zadovoljavali kriterije za autolognu transplantaciju koštane srži metodom leukaferoze dobiven je značajno manji ukupni broj

leukocita u odnosu na zdrave darivatelje kojima se provodi leukaferaza. Broj leukocita u pripravku dobivenom leukaferazom je kod bolesnika značajno manji u odnosu na zdrave darivatelje jer postoji razlika u načinu mobilizacije KMS između te dvije skupine ispitanika. Kod zdravih darivatelja je mobilizacija učinjena samo čimbenicima rasta granulocitne loze G-CSF kojeg su kroz četiri dana u dozi 10 µg/kg/dan dobivali potkožnom primjenom. Peti dan je izvršeno prikupljanje KMS. Svi darivatelji su prije početka mobilizacije u venskoj krvi imali normalan broj leukocita (3,4 do 9,7 x 10⁹/L). Zbog učinka G-CSF-a broj leukocita je rastao i u trenutku prikupljanja KMS bio veći nego kod bolesnika kod kojih je mobilizacija provedena kemoterapijom zbog čijeg su učinka svi bolesnici određeni broj dana prije prikupljanja KMS imali značajno snižen broj leukocita (< 1 x10⁹/L). Zbog djelovanja G-CSF-a broj leukocita je rastao, ali ne u onolikoj mjeri kao što je to slučaj kod zdravih darivatelja. Posljedica manjeg broja leukocita u perifernoj krvi bolesnika u odnosu na zdrave darivatelje prije početka leukaferaze je i manji broj prikupljenih leukocita u postupku leukaferaze koji se nalazi u pripravku KMS.

Značajno više serumske vrijednosti LDH i udjela frakcije gama globulina uočene su u bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma s difuznim tipom infiltracije tumorskim plazma stanicama u koštanoj srži. Laktat dehidrogenaza (LDH) važan je enzim anaerobnog metaboličkog puta. Pripada klasi oksidoreduktaza. Funkcija enzima je katalizirati reverzibilnu pretvorbu laktata u piruvat uz redukciju NAD⁺ u NADH i obrnuto. (249) U tumorskim stanicama je pojačana glikoliza. LDH olakšava glikolitički reverzibilni proces pretvaranjem piruvata u laktat. U tumorskom tkivu, njegovo povećanje javlja se zbog visokih razina glukoze kada postoje uvjeti za brzo umnažanje tumorskih stanica, tumorsku invaziju i metastaziranje (250) Prisutan je u skoro svim stanicama organizma u visokim koncentracijama. Oštećenje stanica dovodi do povećanja njegove koncentracije u krvi. Povišene vrijednosti LDH u bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma su prisutne kod otprilike 10% do 15% bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze . Povećanje tijekom progresije bolesti povezano je s povećanjem tumorske mase, recidivom i pojavom ekstramedularne bolesti. (250) Povišena razina LDH predstavlja loš prognostički čimbenik kod bolesnika oboljelih od MM. (251) Rezultati našeg istraživanja koji pokazuju značajno više serumske vrijednosti LDH i udjela frakcije gama globulina u bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma s difuznim tipom infiltracije tumorskim plazma stanicama u koštanoj srži sukladni su rezultatima u literaturi. Difuzni tip infiltrata je povezan s većom količinom tumorske

mase, s višim stadijem bolesti pa time i s mogućom ukupno većom količinom gama globulina. U ovom istraživanju nije se dokazala značajna povezanost difuznog tipa infiltrata s izotipom imunoglobulina čime možemo pretpostaviti da povišene vrijednosti gama globulina mogu biti rezultat reakcije imunološkog sustava, humoralnog odgovora na potencijalne cirkulirajuće tumorske antigene. Ne mora se raditi o cirkulirajućim tumorskim plazma stanicama. Potencijalni tumorski antigeni mogu u limfnim čvorovima izazvati imunološki odgovor koji će kao krajnji rezultat imati stvaranje veće količine poliklonskih gama globulina koji će biti uočeni analizom serumskih proteina elektroforezom.

Istraživanje van Rhee i sur. pokazalo je pojačanu ekspresiju gena *NY-ESO-1* (engl. New York esophageal squamous cell carcinoma) u MM s citogenetičkim promjenama koja može izazvati spontani humoralni i T-stanični imunološki odgovor na tumorske plazma stanice u smislu pojave NY-ESO-1 specifičnih citotoksičnih T stanica i NY-ESO-1– specifičnih antitijela pa bi isti protein mogao biti ciljani tumorski antigen za imunoterapiju bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma s lošom prognozom. (252) Protein NY-ESO-1 je prisutan u karcinomima testisa i brojnim drugim tipovima karcinoma, ali i u MM. Kako dio njegove sekvence aminokiselina ima svojstvo da djeluje kao antigen, izaziva spontani humoralni i stanični imunološki odgovor.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na važnost signalnog puta Notch u krvotvornim matičnim stanicama koštane srži bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma i u samim tumorskim plazma stanicama. Povezanost ekspresije receptora NOTCH1 i liganda JAGGED1 i DLL1 u samo istim vrstama stanica mogla bi razjasniti homotipska aktivacija signalnog puta Notch u multiplom mijelomu. Negativna korelacija između ekspresije receptora NOTCH1 i liganda JAGGED1 u KMS koštane srži multiplog mijeloma, određena imunofenotipizacijom protočnim citometrom djelomično bi se mogla objasniti njihovom međusobnom inhibicijom ako su receptori NOTCH i ligandi receptora NOTCH eksprimirani na istoj stanici što ima za posljedicu cis-inhibiciju signalnog puta Notch (253) Istraživanje Nandagopal i sur. pokazuje da je i cis-aktivacija signalnog puta Notch ipak moguća i da ovisi o afinitetu između liganda i receptora i koncentracijama liganda. (254) Heterotipska aktivacija signalnog puta Notch nije ovim istraživanjem dovoljno razjašnjena, najvjerojatnije zbog korištenja različitih analitičkih metoda u određivanju ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 krvotvornim matičnim stanicama i tumorskim plazma stanicama multiplog mijeloma te potencijalno malog broja ispitanika u skupini. Analiza ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 krvotvornim

matičnim stanicama i tumorskim plazma stanicama multiplog mijeloma predstavlja samo jednu od potencijalnih mogućih signalnih puteva u aktivaciji i ekspresiji ciljnih gena.

Kanonski signalni put Notch aktivacije ciljnog gena *HES1* posredovan aktivacijom receptora NOTCH i NICD uočen je u tumorskim matičnim stanicama. Do sada dostupni podaci istraživanja ukazuju da je maligni tumor sklon metastaziranju često popraćen aberantnim signalnim putem Notch i pojačanom ekspresijom HES1. Nekanonski signalni put Notch može vršiti svoju biološku funkciju neovisno o svojim ligandima, receptorima ili ciljnim genima u normalnom tkivu i u tumoru. Ciljni gen HES1 također može biti moduliran na način neovisan o signalnu putu Notch. Uz signalni put Notch, brojni signalni putevi utječu na ekspresiju ciljnog gena HES1 kao što su signalni put RAS, WNT, Hedgehog, no njihovo djelovanje na HES1 nije tako dobro istraženo kao aktivacija signalnim putem Notch. *HES1* ima ključnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima uključujući staničnu diferencijaciju, zaustavljanje staničnog ciklusa, apoptozu i sposobnost samoobnavljanja, a nedavna istraživanja su pokazala da *HES1* djeluje i u održavanju tumorskih matičnih stanica, metastazama i otpornosti tumorskih stanica na indukciju apoptoze kemoterapijom utječući na ekspresiju proteina kao što su STAT3, p21, MASH1L, NGN, MATH, CD133, NESTIN, RUNX2, SNAIL 1/2, DELTEX1, AKT, pa bi time regulacija gena *HES1* mogla predstavljati obećavajući terapijski cilj. Uzimajući u obzir ogroman potencijal koji HES1 ima u održavanju sposobnosti samoobnavljanja, bilo je važno istražiti važnost uloga koje ovi čimbenici imaju u tumorskim matičnim stanicama. (255) Multipli mijelom je izrazito heterogena bolest u kojoj bi daljnjim istraživanjima bilo moguće primijeniti personalizirano liječenje na temelju složenih mehanizama regulacije signalnih puteva kako u samim tumorskim plazma stanicama tako i u stanicama mikrookoliša.

7. ZAKLJUČCI

U ovom istraživanju analizirani su uzorci krvotvornih matičnih stanica (KMS) (CD34+ stanice) i bioptata koštane srži 36 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma (MM) i KMS od 9 zdravih darivatelja. Uzorci KMS su dobiveni postupkom leukaferenze, a bioptički uzorak koštane srži ubodom biopsijske igle i isisavanjem koštane srži štrcaljkom kroz biopsijsku iglu

1. Ekspresija liganada JAGGED1 i DLL1 u 36 analiziranih uzoraka KMS u multiplom mijelomu određena imunofenotipizacijom protočnim citometrom niža je u odnosu na njihovu ekspresiju u 9 analiziranih uzoraka KMS zdravih osoba. Nema razlike u ekspresiji receptora NOTCH1 u KMS multiplog mijeloma i zdravih osoba.

2. U KMS koštane srži multiplog mijeloma postoji negativna korelacija između ekspresije receptora NOTCH1 i liganda JAGGED1, određena imunofenotipizacijom protočnim citometrom. Ekspresija proteina NOTCH1 je veća u KMS multiplog mijeloma u odnosu na ekspresiju proteina JAGGED1 u istim stanicama. Nije se uočila korelacija između ekspresije receptora NOTCH1 i liganda DLL1 u KMS koštane srži multiplog mijeloma.

U 36 uzoraka TPS, istih onih bolesnika čije smo KMS analizirali, postoji pozitivna korelacija između ekspresije receptora NOTCH1 i liganda JAGGED1 i DLL1, određena imunohistokemijskim bojenjem.

U koštanoj srži multiplog mijeloma postoji korelacija ekspresije receptora NOTCH1 i liganada JAGGED1 i DLL1 samo u istoj vrsti stanica, dok je nema između različitih vrsta stanica, KMS koštane srži multiplog mijeloma i tumorskim plazma stanicama uspoređujući rezultate dobivenih imunofenotipizacijom protočnim citometrom u KMS i imunohistokemijskim bojenjem u TPS.

3. Veći intenzitet ekspresije proteina NOTCH1 u TPS bio je prisutan u difuznom tipu infiltracije u odnosu na nodularni i/ili intersticijski tip infiltracije multiplog mijeloma u koštanoj srži. Nije se uočila razlika u intenzitetu izraženosti ekspresije proteina JAGGED1 i DLL1 u TPS u odnosu na tip infiltracije multiplog mijeloma u koštanoj srži. Nije uočena razlika izraženosti ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS multiplog mijeloma u odnosu na tip infiltracije TPS multiplog mijeloma u koštanoj srži.

4. Ekspresija proteina NOTCH1 i JAGGED1 u tumorskim plazma stanicama bila je značajno veća u multiplom mijelomu s barem jednom citogenetičkom promjenom visokog rizika, t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23); del(13q34) i del(17p13.1) određena metodom FISH u odnosu na uzorke tumorskih plazma stanica bez citogenetičkih promjena visokog rizika.

Nije se uočila povezanost ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u KMS koštane srži multiplog mijeloma s barem jednom citogenetičkom promjenom visokog rizika određena metodom FISH.

Nije se uočila povezanost ekspresije proteina NOTCH1, JAGGED1 i DLL1 u tumorskim plazma stanicama i KMS koštane srži s t(11;14)(q13;q32) - t(11;14)(q13;q32) u multiplom mijelomu analizirana metodom FISH.

5. U bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma koji zadovoljavaju kriterije za autolognu transplantaciju koštane srži je u postupcima leukaferenze prikupljen i zamrznut značajno veći broj CD34 pozitivnih matičnih stanica u odnosu na zdrave darivatelje. Broj i udio CD34 pozitivnih matičnih stanica u odnosu na ukupan broj prikupljenih leukocita je, nakon odmrzavanja, također veći kod bolesnika u odnosu na zdrave darivatelje.

U bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma koji su zadovoljavali kriterije za autolognu transplantaciju koštane srži je metodom leukaferenze prikupljen značajno manji ukupni broj leukocita u odnosu na zdrave darivatelje.

6. Značajno više serumske vrijednosti LDH i udjela frakcije gama globulina uočene su u bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma s difuznim tipom infiltracije tumorskim plazma stanicama u koštanoj srži.

8. LITERATURA

1. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL (2006) Hematopoietic stem cells: The paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 169(2): 338-346
2. Wilson A, Trumpp A (2006) Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 6(2): 93-106
3. Chotinantakul K, Leraanansaksiri W (2012) Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. *Bone Marrow Res.* 2012: 2704254. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770-776
5. Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U (2011) Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* 138(17): 3593–3612
6. Wang L, Zhang H, Rodriguez S, Cao L, Parish J, Mumaw C, Zollman A, Kamoka MM, Mu J, Chen DZ, Srour EF, Chitteti BR, HogenEsch H, Tu X, Bellido TM, Boswell HS, Manshoury T, Verstovsek S, Yoder MC, Kapur R, Cardoso AA, Carlesso N. (2014) Notch-dependent repression of miR-155 in the bone marrow niche regulates hematopoiesis in an NF- κ B-dependent manner. *Cell Stem Cell* 15(1): 51–65
7. Ronchini C, Capobianco AJ (2001) Induction of Cyclin D1 Transcription and CDK2 Activity by Notchic: Implication for Cell Cycle Disruption in Transformation by Notchic. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5925-5934
8. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, Seandel M, Shido K, White IA, Kobayashi M, Witte L, May C, Shawber C, Kimura Y, Kitajewski J, Rosenwaks Z, Bernstein ID, Rafii S. (2010) Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 6(3): 251-264
9. Lilly AJ, Johnson WE, Bunce CM (2011) The haematopoietic stem cell niche: new insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behaviour. *Stem Cells Int.* 274564

10. Milner LA, Bigas A (1999) Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood* 93(8): 2431-2448
11. Wang LD, Wagers AJ (2011) Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 643-655
12. Ferrando AA (2009) The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009: 353-361
13. Houde C, Li Y, Song L, Barton K, Zhang Q, Godwin J, Nand S, Toor A, Alkan S, Smadja NV, Avet-Loiseau H, Lima CS, Miele L, Coignet LJ. (2004) Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood* 104: 3697-3704
14. Jundt F, Pröbsting KS, Anagnostopoulos I, Muehlinghaus G, Chatterjee M, Mathas S, Bargou RC, Manz R, Stein H, Dörken B (2004) Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood* 103(9): 3511-3515
15. Nefedova Y, Cheng P, Alsina M, Dalton WS, Gabrilovich DI (2004) Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. *Blood* 103: 3503-3510
16. Morimura T, Goitsuka R, Zhang Y, Saito I, Reth M, Kitamura D (2000) Cell cycle arrest and apoptosis induced by Notch1 in B cells. *J Biol Chem.* 275(47): 36523-36531
17. Romer S, Saunders U, Jäck HM, Jehn BM (2003) Notch1 enhances B-cell receptor-induced apoptosis in mature activated B cells without affecting cell cycle progression and surface IgM expression. *Cell Death Differ.* 10(7): 833-844
18. Leong KG, Karsan A (2006) Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood* 107(6): 2223-2233
19. Noll JE, Williams SA, Purton LE, Zannettino AC (2012) Tug of war in the haematopoietic stem cell niche: do myeloma plasma cells compete for the HSC niche? *Blood Cancer J.* 2012; 14;2: e91

20. Busslinger M (2004) Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol.* 22: 55-79
21. D, Li J, Hardy RR (1999) Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination. *J Exp Med.* 189(4): 735-740
22. Allman D, Lindsley RC, DeMuth W, Rudd K, Shinton SA, Hardy RR (2001) Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol.* 167(12): 6834-6840
23. Liu YJ (1997) Sites of B lymphocyte selection, activation, and tolerance in spleen. *J Exp Med.* 186(5): 625-629
24. Levine MH, Haberman AM, Sant'Angelo DB, Hannum LG, Cancro MP, Janeway CA Jr, Shlomchik MJ (2000) A B-cell receptor-specific selection step governs immature to mature B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6): 2743-2748
25. Moser K, Tokoyoda K, Radbruch A, MacLennan I, Manz RA (2006) Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol.* 18(3): 265-270
26. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dörner T, Hiepe F (2006) Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol.* 6(10): 741-750
27. Allen CD, Okada T, Cyster JG (2007) Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity.* 27(2): 190-202
28. Kelsoe G (1996) The germinal center: a crucible for lymphocyte selection. *Semin Immunol.* 8(3): 179-184
29. Kunkel EJ, Butcher EC (2003) Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol.* 3(10): 822-829
30. Anderson SM, Khalil A, Uduman M, Hershberg U, Louzoun Y, Haberman AM, Kleinstein SH, Shlomchik MJ (2009) Taking advantage: high-affinity B cells in the germinal center have lower death rates, but similar rates of division, compared to low-affinity cells. *J Immunol.* 183(11): 7314-7325

31. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U (1991) Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*. 354(6352): 389-392
32. Li Z, Woo CJ, Iglesias-Ussel MD, Ronai D, Scharff MD (2004) The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes Dev*. 18(1):1-11
33. Odegard VH, Schatz DG (2006) Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol*. 6(8): 573-583
34. Pereira JP, Kelly LM, Cyster JG (2010) Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses. *Int Immunol*. 22(6): 413-419
35. Yang P, Qu Y, Wang M, Chu B, Chen W, Zheng Y, Niu T, Qian Z (2020) Pathogenesis and treatment of multiple myeloma. *MedComm* 3(2): e146
36. McKenna RW, Kyle RA, Kuehl WM, Harris NL, Coupland RW, Fend F (2017) Plasma cell neoplasms. U: Steven H. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele (ed.) *WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC), 241-258
37. Kuehl WM, Bergsagel PL (2002) Multiple myeloma: Evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2: 175–187
38. Kuehl WM, Bergsagel PL (2012) Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J Clin Invest* 122: 3456–3463
39. O'Donnell E, Cottini F, Raje N, Kenneth A (2017) Myeloma. U: Lichtman MA, Wilmot JP, Kaushansky K, Brook S, Prchal JT, Levi MM, Burns LJ, Armitage JO (ed.) *Williams Hematology*. New York City, McGraw Hill / Medical, 249-289
40. Šekerija M, Bubanović LJ, Lončar J, Čukelj P, Veltruski J, Mikolaj L, Stupnik D (2022) Incidencija raka u hrvatskoj 2020. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske, Bilten 45, Zagreb

41. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR (2003) Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 78(1): 21-33
42. Bladé J, Kyle RA (1998) Multiple myeloma in young patients: clinical presentation and treatment approach. *Leuk Lymphoma* 30: 493.
43. Kyle RA, Child JA, Anderson K, Barlogie B, Bataille R, Bensinger W, Blade J, Boccadoro M, Dalton W, Dimopoulos M, Djulbegovic B, Drayson M, Durie B, Facon T, Fonseca R, Gahrton G, Greipp P, Harousseau JL, Harrington D, Hussein M, Joshua D, Ludwig H, Morgan G, Oken M, Powles R, Richardson P, Roodman D, San Miguel J, Shimizu K, Shustik C, Sirohi B, Sonneveld P, Tricot G, Tuerson I, Van Ness B, Vesole D, Weber D, Jan Westin, Wheatley K (2003) International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 121(5): 749–757
44. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G, Kröger N, Einsele H, Vesole DH, Dimopoulos M, San Miguel J, Avet-Loiseau H, Hajek R, Chen WM, Anderson KC, Ludwig H, Sonneveld P, Pavlovsky S, Palumbo A, Richardson PG, Barlogie B, Greipp P, Vescio R, Turesson I, Westin J, Boccadoro M (2010) 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* 24: 1121–1127
45. Fernández de Larrea C, Kyle R, Rosiñol L, Paiva B, Engelhardt M, Usmani S, Caers J, Gonsalves W, Schjesvold F, Merlini G, Lentzsch S, Ocio E, Garderet L, Moreau P, Sonneveld P, Badros A, Gahrton G, Goldschmidt H, Tuchman S, Einsele H, Durie B, Wirk B, Musto P, Hayden P, Kaiser M, Miguel JS, Bladé J, Rajkumar SV, Mateos MV (2021) Primary plasma cell leukemia: consensus definition by the International Myeloma Working Group according to peripheral blood plasma cell percentage. *Blood Cancer J* 11(12): 192
46. Colombo M, Galletti S, Garavelli S, Platonova N, Paoli A, Basile A, Taiana E, Neri A, Chiamonte R (2015) Notch signaling deregulation in multiple myeloma: A rational molecular target. *Oncotarget* 6(29): 26826-26840

47. Rajkumar SV (2009) Prevention of Progression in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *Clin Cancer Res* 15(18): 5606–5608
48. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, Dispenzieri A, Kumar S, Clark RJ, Baris D, Hoover R, Rajkumar SV (2009) Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 113(22): 5412-5417
49. Chesi M, Bergsagel PL (2013) Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int J Hematol* 97(3):313-323
50. Bergsagel PL, Chesi M, Nardini E, Brents LA, Kirby SL, Kuehl WM (1996) Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 26;93(24): 13931-13936
51. Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A, Godon C, Rapp MJ, Harousseau JL, Grosbois B, Bataille R (1999) 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myélome. Cancer Res* 59(18): 4546-4550
52. Bergsagel PL, Mateos MV, Gutierrez NC, Rajkumar SV, San Miguel JF (2013) Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma. *Blood* 121: 884–892
53. Kumar SK, Mikhael JR, Buadi FK, Dingli D, Dispenzieri A, Fonseca R, Gertz MA, Greipp PR, Hayman SR, Kyle RA, Lacy MQ, Lust JA, Reeder CB, Roy V, Russell SJ, Short KE, Stewart AK, Witzig TE, Zeldenrust SR, Dalton RJ, Rajkumar SV, Bergsagel PL (2009) Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines. *Mayo Clin Proc* 84(12): 1095-1110
54. Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, Bracy D, Mattox S, Vesole DH, Naucke S, Sawyer JR (1995) Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood* 86(11): 4250-4260

55. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Hoyer JD, Lust JA, Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, Dewald GW (2002) Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 100(4):1417-1424
56. Rajkumar SV, Gupta V, Fonseca R, Dispenzieri A, Gonsalves WI, Larson D, Ketterling RP, Lust JA, Kyle RA, Kumar SK (2013) Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma. *Leukemia* 27(8): 1738-1744
57. Neben K, Jauch A, Hielscher T, Hillengass J, Lehnert N, Seckinger A, Granzow M, Raab MS, Ho AD, Goldschmidt H, Hose D (2013) Progression in smoldering myeloma is independently determined by the chromosomal abnormalities del(17p), t(4;14), gain 1q, hyperdiploidy, and tumor load. *J Clin Oncol* 31(34): 4325-4332
58. Glitza IC, Lu G, Shah R, Bashir Q, Shah N, Champlin RE, Shah J, Orlowski RZ, Qazilbash MH (2015) Chromosome 8q24.1/c-MYC abnormality: a marker for high-risk myeloma. *Leuk Lymphoma* 56(3): 602-60759. Kastritis E, Dimopoulos MA (2015) Appraising myc involvement in high risk myeloma. *Leuk Lymphoma* 56: 551–552
60. Boyd KD, Ross FM, Walker BA, Wardell CP, Tapper WJ, Chiecchio L, Dagrada G, Konn ZJ, Gregory WM, Jackson GH, Child JA, Davies FE, Morgan GJ (2011); NCRI Haematology Oncology Studies Group. Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies FAM46C at 1p12 and CDKN2C at 1p32.3 as being genes in regions associated with adverse survival. *Clin Cancer Res* 17(24): 7776-7784
61. Rajan AM, Rajkumar SV (2015) Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer J* 5(10): e365
62. Rasche L, Kortüm KM, Raab MS, Weinhold N. The impact of tumor heterogeneity on diagnostics and novel therapeutic strategies in multiple myeloma. *Int J Mol Sci.* (2019) 20: 1248–1261
63. Bartl R, Frisch B, Fateh-Moghadam A, Kettner G, Jaeger K, Sommerfeld W (1987). Histologic classification and staging of multiple myeloma. A retrospective and prospective study of 674 cases. *Am J Clin Pathol* 87(3): 342-355

64. Brunning RD, McKenna RW (1994) Plasma cell dyscrasias and related disorders. In: AFIP atlas of tumor pathology, 3rd series. Washington (DC): ARP Press; pp. 323-367
65. Durie BG, Salmon SE (1975) A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 36: 42.
66. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin (2005) International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23(15): 3412-3420
67. Garderet L, D'Souza A, Jacobs P, van Biezen A, Schönland S, Kroeger N, Morris C, Hari P (2017) Response Assessment in Myeloma: Practical Manual on Consistent Reporting in an Era of Dramatic Therapeutic Advances. *Biol Blood Marrow Transplant* 23(7): 1193-1202
68. Bašić-Kinda S, Batinić J, Pulanić D, Valković T, Radić-Krišto D, Mandac Rogulj, Gredelj-Šimec NJ, Piršić M, Aurer I, Nemet D (2017) Hrvatske smjernice za liječenje multiplog mijeloma. U: Pulanić D (ed.) Bilten Krohema Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti. Zagreb, Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti KROHEM, 3-13
69. Adams J (2004) The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* 4: 349–360
70. Landowski TH, Megli CJ, Nullmeyer KD, Lynch RM, Dorr RT (2005) Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca²⁺ is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer Res* 65(9): 3828-3836
71. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW (2002) NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2(4): 301-310
72. Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, Schlossman R, Podar K, Munshi NC, Mitsiades N, Anderson KC (2003) Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood* 101(4): 1530-1534

73. Terpos E, Migkou M, Christoulas D, Gavriatopoulou M, Eleutherakis-Papaiakovou E, Kanellias N, Iakovaki M, Panagiotidis I, Ziogas DC, Fotiou D, Kastritis E, Dimopoulos MA (2016) Increased circulating VCAM-1 correlates with advanced disease and poor survival in patients with multiple myeloma: reduction by post-bortezomib and lenalidomide treatment. *Blood Cancer Journal* 6(5): e428
74. Durie BG, Harousseau J_L, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Dimopoulos M, Westin J, Sonneveld P, Ludwig H, Gahrton G, Beksac M, Crowley J, Belch A, Boccadaro M, Cavo M, Turesson I, Joshua D, Vesole D, Kyle R, Alexanian R, Tricot G, Attal M, Merlini G, Powles R, Richardson P, Shimizu K, Tosi P, Morgan G, Rajkumar SV (2006) International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 20: 1467–1473
75. Till JE, McCulloch EA (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14: 213–222
76. McGrath KE, Palis J (2005) Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp Hematol* 33(9): 1021–1028
77. Bertrand JY, Jalil A, Klaine M, Jung S, Cumano A, Godin I (2005) Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* 106: 3004-3011
78. Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, Palis J (2004). Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood* 104: 19-25
79. Palis J (2014) Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front Physiol* 5: 3
80. Böiers C, Carrelha J, Lutteropp M, Luc S, Green J C A, Azzoni E, Woll PS, Mead AJ, Hultquist A, Swiers G, Perdiguero EG, Macaulay IC, Melchiori L, Luis TC, Kharazi S, Bouriez-Jones T, Deng Q, Pontén A, Atkinson D, Jensen CT, Sitnicka E, Geissmann F, Godin I, Sandberg R, de Bruijn MF, Jacobsen SE (2013) Lymphomyeloid contribution of an immune-restricted progenitor emerging prior to definitive hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 13: 535-548
81. Ivanovs A, Rybtsov S, Welch L, Anderson RA, Turner ML, Medvinsky A (2011) Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. *J Exp Med* 208: 2417–2427

82. Crosbie OM, Reynolds M, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C (1999) In vitro evidence for the presence of hematopoietic stem cells in the adult human liver. *Hepatology* 29(4): 1193-1198
83. Dzierzak E, Speck NA (2008) Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 9: 129–136
84. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE (2012) Hematopoiesis: a human perspective. *Cell stem cell* 10: 120-136
85. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404: 193-197
86. Kondo M, Weissman IL, Akashi K (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91: 661-72
87. Lee JY, Hong SH (2020) Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration. *Int J Stem Cells* 13(1): 1–12
88. Morrison SJ, Spradling AC (2008) Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance through life. *Cell* 132: 598-611
89. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M (1998) Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Exp Hematol* 26: 353-360
90. Goodell MA (1999) CD34+ or CD34-: does it really matter? *Blood* 94: 2545- 2547
91. Sato T, Laver JH, Ogawa M (1999) Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 94: 2548-2554
92. Ferraro F, Celso CL, Scadden D (2010) Adult stem cells and their niches. *Adv Exp Med Biol* 695: 155
93. Lander AD, Kimble J, Clevers H, Fuchs E, Montarras D, Buckingham M, Calof AL, Trumpp A, Oskarsson T (2012) What does the concept of the stem cell niche really mean today? *BMC Biol* 10(1): 19

94. Bryan A, Link DC (2014) Regulation of Hematopoietic Stem Cells by Bone Marrow Stromal Cells. *Trends Immunol* 35(1): 32–37
95. Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T (2011) Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends in Immunology*. 32(7): 315–320
96. Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Winkel B, Canty KJ, Harley B, Mahoney JE, Park SY, Lu J, Protopopov A, Silberstein LE (2013) Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol* 15(5): 533-543
97. Thomas J, Liu F, Link DC (2002) Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol* 9: 183-189
98. Guerrouahen BS, Al-hijji I, Tabrizi AR (2011) Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia. *Stem Cells Int* 2011: 375857
99. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, Mizoguchi T, Wei Q, Lucas D, Ito K, Mar JC, Bergman A, Frenette PS (2013) Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* 31:502(7473): 637-643
100. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H (2011) Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*. 23;147(5): 1146-1158
101. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 12;466(7308): 829-834
102. Zhao M, Perry JM, Marshall H, Venkatraman A, Qian P, He XC, Ahmed J, Li L (2014) Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 20(11): 1321-1326
103. Bruns I, Lucas D, Pinho S, Ahmed J, Lambert MP, Kunisaki Y, Scheiermann C, Schiff L, Poncz M, Bergman A, Frenette PS (2014) Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med* 20(11): 1315-1320

104. Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, Schajnovitz A, Ramasamy SK, Kusumbe AP, Ledergor G, Jung Y, Milo I, Poulos MG, Kalinkovich A, Ludin A, Kollet O, Shakhar G, Butler JM, Rafii S, Adams RH, Scadden DT, Lin CP, Lapidot T (2016) Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature* 532(7599): 323-328
105. Zhao M, Li L (2016) Dissecting the bone marrow HSC niches. *Cell Res* 26(9): 975-976
106. Mantel CR, O'Leary HA, Chitteti BR, Huang X, Cooper S, Hangoc G, Brustovetsky N, Srour EF, Lee MR, Messina-Graham S, Haas DM, Falah N, Kapur R, Pelus LM, Bardeesy N, Fitamant J, Ivan M, Kim KS, Broxmeyer HE (2015) Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock. *Cell*. 161(7): 1553-1565
107. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425(6960): 841-846
108. Chitteti BR, Cheng YH, Poteat B, Rodriguez-Rodriguez S, Goebel WS, Carlesso N, Kacena MA, Srour EF (2010) Impact of interactions of cellular components of the bone marrow microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function. *Blood* 115(16) :3239-3248
109. Kobayashi H, Butler JM, O'Donnell R, Kobayashi M, Ding BS, Bonner B, Chiu VK, Nolan DJ, Shido K, Benjamin L, Rafii S (2010) Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* 12(11): 1046-1056
110. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Itkin T, Mäe MA, Langen UH, Betsholtz C, Lapidot T, Adams RH (2016) Age-dependent modulation of vascular niches for haematopoietic stem cells. *Nature* 532(7599): 380-384
111. Mangialardi G, Cordaro A, Madeddu P (2016) The bone marrow pericyte: an orchestrator of vascular niche. *Regen Med* 11(8): 883-895
112. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284(5415): 770-776

113. Lin GL, Hankenson KD (2011) Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 112(12): 3491-501
114. Butko E, Pouget C, Traver D (2016) Complex regulation of HSC emergence by the Notch signaling pathway. *Dev Biol* 1;409(1): 129-138
115. Stier S, Cheng T, Dombkowski D, Carlesso N, Scadden DT (2002) Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 99(7): 2369-2378
116. Maillard I, Koch U, Dumortier A, Shestova O, Xu L, Sai H, Pross SE, Aster JC, Bhandoola A, Radtke F, Pear WS (2008) Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2(4): 356-366
117. Mancini SJ, Mantei N, Dumortier A, Suter U, MacDonald HR, Radtke F (2005) Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 105(6): 2340-2342
118. Kim YW, Koo BK, Jeong HW, Yoon MJ, Song R, Shin J, Jeong DC, Kim SH, Kong YY (2008) Defective Notch activation in microenvironment leads to myeloproliferative disease. *Blood* 112(12): 4628-4638
119. Poulos MG, Guo P, Kofler NM, Pinho S, Gutkin MC, Tikhonova A, Aifantis I, Frenette PS, Kitajewski J, Rafii S, Butler JM (2013) Endothelial Jagged-1 is necessary for homeostatic and regenerative hematopoiesis. *Cell Rep* 4(5): 1022-1034
120. Geiger H, de Haan G, Florian MC (2013) The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat Rev Immunol* 13(5): 376-389
121. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, Weissman IL (2005) Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26): 9194-9199
122. de Haan G, Nijhof W, Van Zant G (1997) Mouse strain-dependent changes in frequency and proliferation of hematopoietic stem cells during aging: correlation between lifespan and cycling activity. *Blood* 89(5): 1543-1550

123. Dykstra B, Olthof S, Schreuder J, Ritsema M, de Haan G (2011) Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 208(13): 2691-2703
124. Zimmermann S, Martens UM (2008) Telomeres, senescence, and hematopoietic stem cells. *Cell Tissue Res* 331(1): 79-90
125. Bellantuono I, Aldahmash A, Kassem M (2009) Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss. *Biochim Biophys Acta* 1792(4): 364-370
126. Singh L, Brennan TA, Russell E, Kim JH, Chen Q, Brad Johnson F, Pignolo RJ (2016) Aging alters bone-fat reciprocity by shifting in vivo mesenchymal precursor cell fate towards an adipogenic lineage. *Bone* 85: 35-36
127. Dong M, Blobel GC (2006) Role of transforming growth factor-beta in hematologic malignancies. *Blood* 107(12): 4589-4596
128. Shi Y, Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 13(6): 685-700
129. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M, Zeddis J, Barlogie B (1999) Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 341(21): 1565-1571
130. Bruns I, Cadeddu RP, Brueckmann I, Fröbel J, Geyh S, Büst S, Fischer JC, Roels F, Wilk CM, Schildberg FA, Hünerlitürkoglu AN, Zilkens C, Jäger M, Steidl U, Zohren F, Fenk R, Kobbe G, Brors B, Czibere A, Schroeder T, Trumpp A, Haas R (2012) Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 120(13): 2620-2630
131. Tabata C, Tabata R, Kadokawa Y, Hisamori S, Takahashi M, Mishima M, Nakano T, Kubo H (2007) Thalidomide prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Immunol* 179(1): 708-714
132. Zorat F, Shetty V, Dutt D, Lisak L, Nascimben F, Allampallam K, Dar S, York A, Gezer S, Venugopal P, Raza A (2001) The clinical and biological effects of thalidomide in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 115(4): 881-894

133. Pronk CJ, Veiby OP, Bryder D, Jacobsen SE (2011) Tumor necrosis factor restricts hematopoietic stem cell activity in mice: involvement of two distinct receptors. *J Exp Med* 208(8): 1563-1570
134. Jeong JY, Silver M, Parnes A, Nikiforow S, Berliner N, Vanasse GJ (2011) Resveratrol ameliorates TNF α -mediated suppression of erythropoiesis in human CD34(+) cells via modulation of NF- κ B signalling. *Br J Haematol* 155(1): 93-101
135. Jakubikova J, Cholujoval D, Beke G, Hideshima T, Klucar L, Leiba M, Jamroziak K, Richardson PG, Kastiris E, Dorfman DM, Anderson KC (2023) Heterogeneity of B cell lymphopoiesis in patients with premalignant and active myeloma. *JCI Insight* 8(3): e159924
136. Gazave E, Lapébie P, Richards GS, Brunet F, Ereskovsky AV, Degnan BM, Borchiellini C, Vervoort M, Renard E (2009) Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. *BMC Evol Biol* 9: 249
137. Morgan TH (1917) The theory of the gene. *The American Naturalist* 51 (609): 513–544
138. Kopan R, Ilagan MX (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137(2): 216–233
139. Colombo M, Mirandola L, Platonova N, Apicella L, Basile A, Figueroa AJ, Cobos E, Chiriva-Internati M, Chiaramonte R (2013) Notch-directed microenvironment reprogramming in myeloma: a single path to multiple outcomes. *Leukemia* 27(5): 1009–1018
140. Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israël A (2000) A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5(2): 207–216
141. Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R (2000) A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* 5(29): 197–206
142. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398(6727): 518–522

143. Pisklakova A, Grigson E, Ozerova M, Chen F, Sullivan DM, Nefedova Y (2016) Anti-myeloma effect of pharmacological inhibition of Notch/gamma-secretase with RO4929097 is mediated by modulation of tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 17(5): 477–485
144. Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A (1995) Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377(6547): 355–358
145. Lamar E, Deblandre G, Wettstein D, Gawantka V, Pollet N, Niehrs C, Kintner C (2001) Nrarp is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway. *Genes Dev* 15(15): 1885-1899
146. Fryer CJ, Lamar E, Turbachova I, Kintner C, Jones KA (2002) Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev* 16: 1397–1411
147. Iso T, Kedes L, Hamamori Y (2003) HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 194(3): 237–255
148. Gallenstein N, Tichy L, Weigand MA, Schenz J (2023) Notch Signaling in Acute Inflammation and Sepsis. *International Journal of Molecular sciences* 24(4): 3458
149. Lai EC (2004) Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131(5): 965–973
150. Bigas A, D’Altri T, Espinosa L (2012) The Notch pathway in hematopoietic stem cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 360: 1–18
151. Schroeder T, Kohlhof H, Rieber N, Just U (2003) Notch signaling induces multilineage myeloid differentiation and up-regulates PU.1 expression. *J Immunol.* 170(11): 5538-5548
152. Aster JC, Pear WS, Blacklow SC (2006) Notch signaling in leukemia. *Annu Rev Pathol* 3: 587–613
153. Bray SJ (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(9): 678–689
154. Mitchell E, Gilbert M, Loomes KM (2018) Alagille Syndrome. *Clin Liver Dis* 22(4): 625-641

155. Yin L, Velazquez OC, Liu ZJ (2010) Notch signaling: emerging molecular targets for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 80(5): 690–701
156. Mirandola L, Comi P, Cobos E, Kast WM, Chiriva-Internati M, Chiaramonte R (2011) Notch-ing from T-cell to B-cell lymphoid malignancies. *Cancer Lett* 308(1): 1–13
157. Chiaramonte R, Basile A, Tassi E, Calzavara E, Cecchinato V, Rossi V, Biondi A, Comi P (2005) A wide role for NOTCH1 signaling in acute leukemia. *Cancer Lett* 219(1): 113–120
158. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC (2004) Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306 (5694): 269–271
159. Leong KG, Karsan A (2006) Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood* 107(6): 2223–2233
160. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Beà S, González-Díaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, López-Guerra M, Colomer D, Tubío JM, López C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernández JM, Puente DA, Freije JM, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Costa D, Carrió A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernández L, Yagüe J, Nicolás P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjosé S, Piris MA, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpí JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigó R, Bayés M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, López-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, López-Otín C, Campo E (2011) Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 475(7354): 101–105
161. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, Grunn A, Fangazio M, Capello D, Monti S, Cresta S, Gargiulo E, Forconi F, Guarini A, Arcaini L, Paulli M, Laurenti L, Larocca LM, Marasca R, Gattei V, Oscier D, Bertonni F, Mullighan CG, Foá R, Pasqualucci L, Rabadan R, Dalla-Favera R, Gaidano G (2011) Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 208(7): 1389–1401

162. Hajdu M, Sebestyén A, Barna G, Reiniger L, Jánosi J, Sréter , Várkonyi J, Demeter J, Kopper L (2007) Activity of the notch-signalling pathway in circulating human chronic lymphocytic leukaemia cells. *Scand J Immunol* 65(3): 271-275
163. Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K, Bartoli A, Coaccioli S, Screpanti I, Marconi P (2009) Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* 113(4): 856-865
164. Lampreia FP, Carmelo JG, Anjos-Afonso F (2017) Notch signaling in the regulation of hematopoietic stem cell. *Curr Stem Cell Rep* 3(3): 202–209
165. Kopan R, Schroeter EH, Weintraub H, Nye JS (1996) Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(4): 1683–1688
166. Lieber T, Kidd S, Alcamo E, Corbin V, Young MW (1993) Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev* 7(10): 1949–1965
167. Rebay I, Fehon RG, Artavanis-Tsakonas S (1993) Specific truncations of *Drosophila* Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* 74(2): 319–329
168. Struhl G, Adachi A (1998) Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* 93(4): 649–660
169. Wang W, Struhl G (2004) *Drosophila* Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development* 131(21): 5367–5380
170. Malecki MJ, Sanchez-Irizarry C, Mitchell JL, Histen G, Xu ML, Aster JC, Blacklow SC (2006) Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes. *Mol Cell Biol* 26(12): 4642–4651
171. Li K, Li Y, Wu W, Gordon WR, Chang DW, Lu M, Scoggin S, Fu T, Vien L, Histen G, Zheng J, Martin-Hollister R, Duensing T, Singh S, Blacklow SC, Yao Z, Aster JC, Zhou BB (2008) Modulation of Notch Signaling by Antibodies Specific for the Extracellular Negative Regulatory Region of NOTCH3. *J Biol Chem* 283(12): 8046–8054

172. Gordon WR, Arnett KL, Blacklow SC (2008) The molecular logic of Notch signaling – a structural and biochemical perspective. *Journal of Cell Science* 121: 3109-3119. Tax FE, Yeager JJ, Thomas JH (1994) Sequence of *C. elegans* lag-2 reveals a cell-signalling domain shared with Delta and Serrate of *Drosophila*. *Nature* 368 (6467): 150–154
174. Grochowski CM, Loomes KM, Spinner NB (2016) Jagged1 (JAG1): Structure, expression, and disease associations. *Gene* 576(1 Pt 3): 381-384
175. Ladi E, Nichols JT, Ge W, Miyamoto A, Yao C, Yang LT, Boulter J, Sun YE, Kintner C, Weinmaster G (2005) The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J Cell Biol* 170(6): 983–992
176. Geffers I, Serth K, Chapman G, Jaekel R, Schuster-Gossler K, Cordes R, Sparrow DB, Kremmer E, Dunwoodie SL, Klein T, Gossler A (2007). Divergent functions and distinct localization of the Notch ligands DLL1 and DLL3 in vivo. *J Cell Biol* 178(3): 465–476
177. Milner LA, Bigas A (1999) Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood* 93(8): 2431-2448
178. Lilly AJ, Johnson WE, Bunce CM (2011) The haematopoietic stem cell niche: new insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behaviour. *Stem Cells Int.* 2011: 274564
179. Vanderbeck AN, Maillard I (2019) Notch in the niche: new insights into the role of Notch signaling in the bone marrow. *Haematologica* 104(11): 2117–2119
180. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, Seandel M, Shido K, White IA, Kobayashi M, Witte L, May C, Shawber C, Kimura Y, Kitajewski J, Rosenwaks Z, Bernstein ID, Rafii S (2010) Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 6(3): 251–264
181. Fernandez L, Rodriguez S, Huang H, Chora A, Fernandes J, Mumaw C, Cruz E, Pollok K, Cristina F, Price JE, Ferkowicz MJ, Scadden DT, Clauss M, Cardoso AA, Carlesso N (2008) Tumor necrosis factor-alpha and endothelial cells modulate Notch signaling in the bone marrow microenvironment during inflammation. *Exp Hematol* 36(5): 545–558

182. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Shmelkov SV, Ramos CA, Zhang F, Rafii S (2005) Tie2 activation contributes to hemangiogenic regeneration after myelosuppression. *Blood* 106(2): 505–513
183. Nandagopal N, Santat LA, LeBon L, Sprinzak D, Bronner ME, Elowitz MB (2018) Dynamic ligand discrimination in the notch signaling pathway. *Cell* 172(4): 869–880
184. Patel AM, Liu YS, Davies SP, Brown RM, Kelly DA, Scheel-Toellner D, Reynolds GM, Stamataki Z (2021) The Role of B Cells in Adult and Paediatric Liver Injury. *Front Immunol.* 12:729143185. Morgan GJ, Davies FE, Gregory WM, Szubert AJ, Bell SE, Drayson MT, Owen RG, Ashcroft AJ, Jackson GH, Child JA (2012) Effects of induction and maintenance plus long-term bisphosphonates on bone disease in patients with multiple myeloma: the Medical Research Council Myeloma IX Trial. *Blood* 119(23): 5374–5383
186. Turesson I, Velez R, Kristinsson SY, Landgren O (2010) Patterns of improved survival in patients with multiple myeloma in the twenty-first century: a population-based study. *J Clin Oncol* 28(5): 830–834
187. Sabol HM, Delgado-Calle J (2021) The multifunctional role of Notch signaling in multiple myeloma. *J Cancer Metastasis Treat* 7: 20
188. Jundt F, Probsting KS, Anagnostopoulos I, Muehlinghaus G, Chatterjee M, Mathas S, Bargou RC, Manz R, Stein H, Dörken B (2004) Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood* 103(9): 3511–3515
189. Škrtić A, Korać P, Krišto DR, Ajduković Stojisavljević R, Ivanković D, Dominis M (2010) Immunohistochemical analysis of NOTCH1 and JAGGED1 expression in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Hum Pathol* 41(12): 1702–1710
190. Nefedova Y, Sullivan DM, Bolick SC, Dalton WS, Gabrilovich DI (2008) Inhibition of Notch signaling induces apoptosis of myeloma cells and enhances sensitivity to chemotherapy. *Blood* 111(4): 2220–2229

191. Chiamonte R, Calzavara E, Balordi F, Sabbadini M, Capello D, Gaidano G, Serra A, Comi P, Sherbet GV (2003) Differential regulation of Notch signal transduction in leukaemia and lymphoma cells in culture. *J Cell Biochem* 88(3): 569–577
192. Xu D, Hu J, Xu S, De Bruyne E, Menu E, Van Camp B, Vanderkerken K, Van Valckenborgh E (2012) Dll1/Notch activation accelerates multiple myeloma disease development by promoting CD138+ MM-cell proliferation. *Leukemia* 26(6): 1402–1405
193. Parmo-Cabanas M, Bartolome RA, Wright N, Hidalgo A, Drager AM, Teixido J (2004) Integrin alpha4beta1 involvement in stromal cell-derived factor-1alpha-promoted myeloma cell transendothelial migration and adhesion: role of cAMP and the actin cytoskeleton in adhesion. *Exp Cell Res* 294(2): 571–580
194. Mirandola L, Apicella L, Colombo M, Yu Y, Berta DG, Platonova N, Lazzari E, Lancellotti M, Bulfamante G, Cobos E, Chiriva-Internati M, Chiamonte R (2013) Anti-Notch treatment prevents multiple myeloma cells localization to the bone marrow via the chemokine system CXCR4/SDF-1. *Leukemia* 27(7): 1558–1566
195. Sanz-Rodriguez F, Hidalgo A, Teixido J (2001) Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* 97(2): 346–351
196. Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B (2011) Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol* 11(9): 597–606
197. Barille S, Akhoundi C, Collette M, Mellerin MP, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R, Amiot M. (1997) Metalloproteinases in multiple myeloma: production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), activation of proMMP-2, and induction of MMP-1 by myeloma cells. *Blood* 90(4): 1649–1655
198. Takebe N, Miele L, Harris PJ, Jeong W, Bando H, Kahn M, Yang SX, Ivy SP (2015) Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol* 12(8): 445–464

199. Chiron D, Maiga S, Descamps G, Moreau P, Le Gouill S, Marionneau S, Ouiller T, Moreaux J, Klein B, Bataille R, Amiot M, Pellat-Deceunynck C (2012) Critical role of the NOTCH ligand JAG2 in self-renewal of myeloma cells. *Blood Cells Mol Dis* 48(4): 247–253
200. Wongchana W, Palaga T (2012) Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages. *Cell Mol Immunol* 9(2): 155–162
201. Xu D, Hu J, De Bruyne E, Menu E, Schots R, Vanderkerken K, Van Valckenborgh E (2012) Dll1/Notch activation contributes to bortezomib resistance by upregulating CYP1A1 in multiple myeloma. *Biochem Biophys Res Commun* 428(4): 518–524
202. Colombo M, Thümmler K, Mirandola L, Garavelli S, Todoerti K, Apicella L, Lazzari E, Lancellotti M, Platonova N, Akbar M, Chiriva-Internati M, Soutar R, Neri A, Goodyear CS, Chiamonte R (2014) Notch signaling drives multiple myeloma induced osteoclastogenesis. *Oncotarget* 5(21): 10393–10406
203. Zanotti S, Smerdel-Ramoya A, Stadmeier L, Durant D, Radtke F, Canalis E (2008) Notch inhibits osteoblast differentiation and causes osteopenia. *Endocrinology* 149(8): 3890–3899
204. Hue S, Kared H, Mehwish Y, Mouhamad S, Balbo M, Levy Y (2012) Notch activation on effector T cells increases their sensitivity to Treg cell-mediated suppression through upregulation of TGF-betaRII expression. *Eur J Immunol* 42(7): 1796-1803
205. Juarez P, Guise TA (2011) TGF-beta in cancer and bone: implications for treatment of bone metastases. *Bone* 48(1): 23–29
206. Rajkumar SV(2016) Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 35: e418-423
207. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I (1996) The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *J Hematother* 5: 213-226
208. Kurić L, Šiftar Z, Kardum Paro MM (2022) Laboratorijska dijagnostika u transplantaciji krvotvornih perifernih matičnih stanica. *MEDIX* 28 (155): 110-114

209. Cook JR, Hsi ED, Worley S, Tubbs RR, Hussein M (2006) Immunohistochemical analysis identifies two cyclin D1+ subsets of plasma cell myeloma, each associated with favorable survival. *Am J Clin Pathol* 125(4): 615-624
210. Molekularna dijagnostika: ABBOT katalog.
<https://www.molecularcatalog.abbott/int/en/Vysis-IGH-CCND1-DF-FISH-Probe-Kit>
(pristupljeno 01.01.2016.)
211. Molekularna dijagnostika: ABBOT katalog.
<https://www.molecularcatalog.abbott/int/en/Vysis-IGH-FGFR3-DF-FISH-Probe-Kit>
(pristupljeno 01.01.2016.)
212. Molekularna dijagnostika: ABBOT katalog.
<https://www.molecularcatalog.abbott/int/en/Vysis-LSI-IGH-MAF-DF-Probe-Kit> (pristupljeno 01.01.2016.)
213. Molekularna dijagnostika: ABBOT katalog.
<https://www.molecularcatalog.abbott/int/en/Vysis-LSI-13-13q14-SpectrumGreen-Probe>
(pristupljeno 01.01.2016.)
214. Molekularna dijagnostika: ABBOT katalog. <https://www.molecularcatalog.abbott/int/en/Vysis-TP53-CEP-17-FISH-Probe-Kit>
(pristupljeno 01.01.2016.)
215. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, Minvielle S, Bataille R (2002) Intergroupe Francophone du Myélome. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 99(6): 2185-2191
216. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl WM, Hernandez JM, Minvielle S, Pilarski LM, Shaughnessy JD Jr, Stewart AK, Avet-Loiseau H (2004) Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res* 64(4): 1546-1558
217. Moore KA, Lemischka IR (2006) Stem cells and their niches. *Science* 311: 1880-1885

218. Scadden DT (2006) The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441(7097): 1075-1079
219. Kumano K, Chiba S, Kunisato A, Sata M, Saito T, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Masuda S, Shimizu K, Takahashi T, Ogawa S, Hamada Y, Hirai H (2003) Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity* (5):699-711
220. Hadland BK, Huppert SS, Kanungo J, Xue Y, Jiang R, Gridley T, Conlon RA, Cheng AM, Kopan R, Longmore GD (2004) A requirement for Notch1 distinguishes 2 phases of definitive hematopoiesis during development. *Blood* 104(10): 3097-3105
221. Dwivedi P, Greis KD (2017) Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling in severe congenital neutropenia, chronic neutrophilic leukemia, and related malignancies. *Exp Hematol.* 46: 9-20
222. Rullinkov G, Tamme R, Sarapuu A, Laurén J, Sepp M, Palm K, Timmusk T (2009) Neuralized-2: expression in human and rodents and interaction with Delta-like ligands. *Biochem Biophys Res Commun* 389(3): 420-425
223. Wang W, Yu S, Zimmerman G, Wang Y, Myers J, Yu VW, Huang D, Huang X, Shim J, Huang Y, Xin W, Qiao P, Yan M, Xin W, Scadden DT, Stanley P, Lowe JB, Huang AY, Siebel CW, Zhou L (2015) Notch Receptor-Ligand Engagement Maintains Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Niche Retention. *Stem Cells* 33(7):2280-2293
224. van Stralen E, van de Wetering M, Agnelli L, Neri A, Clevers HC, Bast BJ (2009) Identification of primary MAFB target genes in multiple myeloma. *Exp Hematol* 37(1): 78-86
225. Ghoshal P, Nganga AJ, Moran-Giupati J, Szafranek A, Johnson TR, Bigelow AJ, Houde CM, Avet-Loiseau H, Smiraglia DJ, Ersing N, Chanan-Khan AA, Coignet LJ (2009) Loss of the SMRT/NCoR2 corepressor correlates with JAG2 overexpression in multiple myeloma. *Cancer Res* 69(10): 4380-4387
226. Min DJ, Ezponda T, Kim MK, Will CM, Martinez-Garcia E, Popovic R, Basrur V, Elenitoba-Johnson KS, Licht JD (2013) MMSET stimulates myeloma cell growth through microRNA-mediated modulation of c-MYC. *Leukemia* 3: 686-694

227. Bergsagel PL, Kuehl WM (2005) Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23(26): 6333-6338
228. Lionetti M, Barbieri M, Manzoni M, Fabris S, Bandini C, Todoerti K (2016) Molecular spectrum of TP53 mutations in plasma cell dyscrasias by next generation sequencing: an Italian cohort study and overview of the literature. *Oncotarget* (16):21353-21361
229. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S, Neri A, Barlogie B, Kuehl WM, Liebisch P, Davies F, Chen-Kiang S, Durie BG, Carrasco R, Sezer O, Reiman T, Pilarski L, Avet-Loiseau H (2009) International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* (12):2210-2221
230. Binder M, Rajkumar SV, Ketterling RP, Greipp PT, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Buadi FK, Hayman SR, Hwa YL, Zeldenrust SR, Lust JA, Russell SJ, Leung N, Kapoor P, Go RS, Gonsalves WI, Kyle RA, Kumar SK (2017) Prognostic implications of abnormalities of chromosome 13 and the presence of multiple cytogenetic high-risk abnormalities in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Cancer J* 7(9): e600
231. Tricot G, Sawyer JR, Jagannath S, Desikan KR, Siegel D, Naucke S, Mattox S, Bracy D, Munshi N, Barlogie B (1997) Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplants. *J Clin Oncol* 15(7): 2659-2666
232. Pérez-Simón JA, García-Sanz R, Tabernero MD, Almeida J, González M, Fernández-Calvo J (1998) Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 91(9) : 3366-3371
233. Zojer N, Königsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Krömer E, Kaufmann H, Riedl L, Gisslinger H, Schreiber S, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J (2000) Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood* 95(6): 1925-1930
234. Chang H, Sloan S, Li D, Zhuang L, Yi QL, Chen CI, Reece D, Chun K, Keith Stewart A (2004) The t(4;14) is associated with poor prognosis in myeloma patients undergoing autologous stem cell transplant. *Br J Haematol* 125(1): 64-68

235. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Litzow MR, Henderson KJ, Van Wier SA, Ahmann GJ, Fonseca R (2005) Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 106(8): 2837-2840
236. Chang H, Qi C, Yi QL, Reece D, Stewart AK (2005) 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* 05(1): 358-360
237. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, Leyvraz S, Michallet M, Yakoub-Agha I, Garderet L, Marit G, Michaux L, Voillat L, Renaud M, Grosbois B, Guillemin G, Benboubker L, Monconduit M, Thieblemont C, Casassus P, Caillet D, Stoppa AM, Sotto JJ, Wetterwald M, Dumontet C, Fuzibet JG, Azais I, Dorvaux V, Zandecki M, Bataille R, Minvielle S, Harousseau JL, Facon T, Mathiot C (2007) Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood* 109(8): 3489-3495
238. Gutiérrez NC, Castellanos MV, Martín ML, Mateos MV, Hernández JM, Fernández M, Carrera D, Rosiñol L, Ribera JM, Ojanguren JM, Palomera L, Gardella S, Escoda L, Hernández-Boluda JC, Bello JL, de la Rubia J, Lahuerta JJ, San Miguel JF (2007) Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* (1):143-150
239. Rosati E, Baldoni S, De Falco F, Del Papa B, Dorillo E, Rompietti C, Albi E, Falzetti F, Di Ianni M, Sportoletti P (2018) NOTCH1 Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front Oncol* 8: 229
240. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, Sougnez C, Stewart C, Sivachenko A, Wang L, Wan Y, Zhang W, Shukla SA, Vartanov A, Fernandes SM, Saksena G, Cibulskis K, Tesar B, Gabriel S, Hacohen N, Meyerson M, Lander ES, Neuberg D, Brown JR, Getz G, Wu CJ (2013) Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 52(4): 714-726

241. Rossi D, Spina V, Bomben R, Rasi S, Dal-Bo M, Brusca A, Rossi FM, Monti S, Degan M, Ciardullo C, Serra R, Zucchetto A, Nomdedeu J, Bulian P, Grossi A, Zaja F, Pozzato G, Laurenti L, Efremov DG, Di-Raimondo F, Marasca R, Forconi F, Del Poeta G, Gaidano G, Gattei V (2013) Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 121(24): 4902-4905
242. Sutton LA, Young E, Baliakas P, Hadzidimitriou A, Moysiadis T, Plevova K, Rossi D, Kminkova J, Stalika E, Pedersen LB, Malcikova J, Agathangelidis A, Davis Z, Mansouri L, Scarfò L, Boudjoghra M, Navarro A, Muggen AF, Yan XJ, Nguyen-Khac F, Larrayoz M, Panagiotidis P, Chiorazzi N, Niemann CU, Belessi C, Campo E, Strefford JC, Langerak AW, Oscier D, Gaidano G, Pospisilova S, Davi F, Ghia P, Stamatopoulos K, Rosenquist R (2016) Different spectra of recurrent gene mutations in subsets of chronic lymphocytic leukemia harboring stereotyped B-cell receptors. *Haematologica*. 101(8): 959-967
243. Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, Ghia P (2017) Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 31(2): 282-291
244. Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M, Jares P, Navarro A, Martín-García D, Beà S, Salaverria I, Oldreive C, Aymerich M, Suárez-Cisneros H, Rozman M, Villamor N, Colomer D, López-Guillermo A, González M, Alcoceba M, Terol MJ, Colado E, Puente XS, López-Otín C, Enjuanes A, Campo E (2016) Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 127(17): 2122-2130
245. Winkler IG, Lévesque JP (2006) Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: when innate immunity assails the cells that make blood and bone. *Exp Hematol*. 34(8): 996-1009
246. Moog R (2008) Management strategies for poor peripheral blood stem cell mobilization. *Transfus Apher Sci* 38(3): 229-236
247. Bonig H, Papayannopoulou T (2013) Hematopoietic stem cell mobilization: updated conceptual renditions. *Leukemia* (1): 24-31
248. Lysak D, Brychtová M, Leba M, Čedíková M, Georgiev D, Jindra P, Vlas T, Holubova M (2021) Long-Term Cryopreservation Does Not Affect Quality of Peripheral Blood Stem Cell

Grafts: A Comparative Study of Native, Short-Term and Long-Term Cryopreserved Haematopoietic Stem Cells. *Cell Transplant* 30: 9636897211036004

249. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero CA, Férard G, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jørgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schimmel HG, Vialle A, Weidemann G, Siekmann L (2002) IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. Part 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase. *Clin Chem Lab Med* 40(6): 643-648

250. Miao P, Sheng S, Sun X, Liu J, Huang G (2013) Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life* 65(11): 904-910

251. Gkatzamanidou M, Kastritis E, Gavriatopoulou MR, Nikitas N, Gika D, Mparmparousi D, Matsouka C, Terpos E, Dimopoulos MA (2011) Increased serum lactate dehydrogenase should be included among the variables that define very-high-risk multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 11(5): 409-413

252. van Rhee F, Szmania SM, Zhan F, Gupta SK, Pomtree M, Lin P, Batchu RB, Moreno A, Spagnoli G, Shaughnessy J, Tricot G (2005) NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood* 105(10): 3939-3944

253. Sprinzak D, Lakhanpal A, Lebon L, Santat LA, Fontes ME, Anderson GA, Garcia-Ojalvo J, Elowitz MB (2010) Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature* 465(7294): 86-90

254. Nandagopal N, Santat LA, Elowitz MB (2019) *Cis*-activation in the Notch signaling pathway. *Elife*. 10;8: e37880

255. Liu ZH, Dai XM, Du B (2015) Hes1: a key role in stemness, metastasis and multidrug resistance. *Cancer Biol Ther*. 16(3): 353-359

9. PRILOZI

PRILOG 1.

POPIS KRATICA

- ACD-A- dekstroza citratna kiselina formula A (engl. *acid citrate dextrose formula-A*)
- ADAM- metaloproteinaza ADAM (engl. *a disintegrin and metalloprotease*)
- AID- aktivacija inducirana citidin deaminazom (engl. *activation induced cytidine deaminase*)
- AML - akutna mijeloična leukemija
- B-ALL – B stanična akutna limfatična leukemija
- BCR – B stanični receptor (engl. *B cell receptor*)
- B-KLL - B kronična limfatična leukemija
- CAR stanice- retikularne stanice koje proizvode CXCL12
- CD – leukocitni diferencijacijski biljeg (engl. *cluster of differentiation*)
- CRAB – povišena razina kalcija, bubrežno zatajenje, anemija, lezije kosti (engl. *increased plasma calcium level, renal insufficiency, anemia, and bone lesions*)
- CXCL12 - CXC kemokinski ligand 12 (engl. *chemokine (C-X-C motif) ligand 12*)
- CXCL13 - CXC kemokinski ligand 13 (engl. *chemokine (C-X-C motif) ligand 13*)
- CXCR4- CXC kemokinski receptor 4 (engl. *C-X-C motif chemokine receptor 4*)
- CXCR5- CXC kemokinski receptor 5 (engl. *C-X-C motif chemokine receptor 5*)
- DMSO – dimetil sulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*)
- DSL- DELTA-SERRATE-LAG domena
- ECD – izvanstanična domena (engl. *extracellular domain*)
- EGF – epidermalni čimbenik rasta (engl. *epidermal growth factor*).
- ER- endoplazmatski retikulum
- FISH - interfazna fluorescentna *in situ* hibridizacija
- G-CSF - čimbenik rasta granulocitne loze (engl. *granulocyte colony-stimulating factor*)
- GM-CSF - čimbenik stimulacije rasta kolonija granulocita- monocita (engl. *granulocyte-monocyte colony stimulating factor*)
- HERP – gen *HERP* (engl. *hairy enhancer of split related repressor protein*)
- HES – gen *HES* (engl. *hairy enhancer of split*)
- ICAM1 - unutarstanična adhezijska molekula 1 (engl. *intracellular adhesion molecule 1*)

ICD – unutarstanična domena (engl. *intracellular domain*)

IgA- imunoglobulin A

IgD - imunoglobulin D

IgE - imunoglobulin E

IGF-1 - inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (engl. *insulin-like growth factor-1*)

IgG - imunoglobulin G

IGH - gen za teški lanac imunoglobulina

IgM - imunoglobulin M

IL-6 - interleukin 6

IMWG - međunarodna radna skupina za multipli mijelom (engl. *The International Myeloma Working Group*)

KMS - krvotvorna matična stanica

KROHEM- Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti

KS – koštana srž

LDH – laktat dehidrogenaza

LT- KMS - dugo živuće krvotvorne matične stanice (LT, engl. *long term*)

MAM - koaktivator proteina porodice Mastermind (engl. *mastermind like transcriptional coactivator*)

MDS - mijelodisplasični sindrom

MGUS – monoklonska gamopatija neodređenog značenja (engl. *monoclonal gammopathy of undetermined significance*)

MIB1 - E3 ubikvintin protein ligaza (engl. *mindbomb e3 ubiquitin protein ligase 1*)

MM – multipli mijelom

MMSET- SET domena multiplog mijeloma (engl. *multiple myeloma SET domain*)

MNNL (engl. *module at the N-terminus of notch ligands*)

NF-κB – nuklearni čimbenik κB (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NK - stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer*)

NRR - negativna regulatorna regija

PCL - plazmatsanična leukemija (engl. *plasma cell leukemia*)

POEMS - polineuropatija, organomegalija, endokrinopatija, M protein, kožne promjene

ROS – slobodni radikali kisika (engl. *reactive oxygen species*)
SMM – šuljajući multipli mijelom (engl. *smoldering multiple myeloma*)
SNO - vretenasti N- cadherin pozitivni osteoblasti (engl. *spindle-shaped N-cadherin positive osteoblasts*)
ST-KMS kratko živuće krvotvorne matične stanice (ST, engl. *short term*)
T-ALL - T-stanična akutna limfatična leukemija
TD - transmembranska domena
TD-ICD – transmembranska unutarstanična domena (eng. *transmembrane intracellular domain*)
TEMPI - teleangiektazije, povišen eritropoetin i eritrocitoza, monoklonska gamapatija, perinefritičko nakupljanje tekućine, intrapulmonalni „šantovi“
TGF β - transformirajući čimbenik rasta β (engl. *transforming growth factor β*)
TNF α - α čimbenik nekroze tumora (eng. *tumor necrosis factor α*)
TPS – tumorska plazma stanica
VCAM-1 - vaskularna stanična adhezijska molekula (engl. *vascular cell adhesion molecule 1*)
VDPR - vrlo dobra parcijalna remisija
VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)
VLA-4 - molekula stanične adhezije (engl. *very late antigen-4*)

PRILOG 2.

Standardni protokolu za krioprezervaciju i pohranjivanje krvotvornih matičnih stanica Banke krvotvornih matičnih stanica Kliničke bolnice Merkur, „SOP-INT HEM KMS-2, Pohranjivanje krvotvornih matičnih stanica“

Dokument SOP-INT HEM KMS-2, Pohranjivanje krvotvornih matičnih stanica“ je službeni dokument u vlasništvu Kliničke bolnice Merkur koja jedina ima pravo na objavljivanje SOP-a.

10. ŽIVOTOPIS

Silvana Jurenc rođena je 29. prosinca 1970. godine u Derventi. Osnovnu školu i Matematičku gimnaziju završila je u Derventi. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu u Zagrebu u ožujku 1997. godine. Pripravnički staž u trajanju dvije godine obavila je u Domu zdravlja Novi Zagreb. Državni ispit položila je 1997.godine. Nakon položenog državnog ispita radila je u hitnoj službi OB Dr. Tomislav Bardek u Koprivnici. Od 2001.godine zaposlena je u Ministarstvu obrane RH, gdje je radila do veljače 2006. godine. Za vrijeme službe u Hrvatskoj vojsci stekla je čin poručnika Hrvatske vojske. Od ožujka 2006. godine do prosinca 2008.godine radila je u KB Merkur kao specijalizant transfuzijske medicine.

Specijalistički ispit položila je u prosincu 2009.godine, s odličnim uspjehom. Bila je voditeljica Jedinice za transfuzijsku medicinu KB Merkur u razdoblju od 2010.do 2012. godine. Članica je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za transfuzijsku medicinu. Aktivno je sudjelovala na 5 domaćih i 9 međunarodnih skupova i kongresa.

Sudjelovala je na više tečajeva, radionica i simpozija. Objavljena su joj 2 rada citirana u CC časopisima, 2 rada u ostalim časopisima te je autor i suautor u 8 kongresnih priopćenja objavljenih u cc časopisima i u 6 kongresnih priopćenja objavljenih u ostalim časopisima.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

1. Škrtić A, Jakšić O, Ostojić S, Antica M, Crnković P, Skelin J, Jurenc S, Habijanec B, Radić Kristo D (2021) Association between BCL2, BCL2 E17, MCL1 and BAX Protein Expression, Bone Marrow Microenvironment Histological Features, Clinical Presentation, Therapeutic Outcome, and the Overall Survival in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. Blood 138 1;4716-4717 doi:10.1182/blood-2021- 154486
2. Vrhovac R, Perić Z, Jurenc S, Kardum-Skelin I, Jelić-Puskarić B, Jakić B (2010) Post-thaw viability of cryopreserved hematopoietic progenitor cell grafts: does it matter? Coll Antropol 34(1):163-9

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u ostalim časopisima:

1. Jurenc S (2023) Uloga transfuziologa u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica. Medix 155:

2. Prkačin I, Mesarić J, Cavrić G, Jurenec S, Hundrić-Hašpl Ž, Kardum-Skelin I (2011) Sindrom hiperhemolize u bolesnice bez hemoglobinopatije. Acta medica Croatica. 65: 223-227

Kongresna priopćenja u CC časopisima:

1. Radić-Krišto D, Zatezalo V, Mišura Jakobac K, Gredelj Šimec N, Jurenec S, Pavić N, Mandac Rogulj I, Martinović M, Planinc Peraica A, Ostojić Kolonić S (2015) Peg-Filgrastim versus filgrastim in prevention of hebrile neutropenia in lymphoma patients after autologous peripheral blood stem cell transplantation. Bone marrow transplantation ABS-2640
2. Jakšić O, Sever M, Basic-Kinda S, Bojanic I, Jurenec S, Maricic I, Dzepina G, Aurer Igor, Pretnar J, Labar B, Jakšić B, Pejisa V, Cernelc P, Nemet D (2013) Recruitment of CD34+cells during large and standard volume apheresis after mobilization with or without plerixafor. Bone marrow transplantation S189-S190
3. Jurenec S, Lukić M, Zatezalo V, Radić-Krišto D, Jakšić B (2014) CD34+ cell number and cell viability impact on engraftment. Bone marrow transplantation PH-P132
4. Gredelj Šimec N, Zatezalo V, Radić-Krišto D, Jurenec S, Lukić M, Zovko N, Ostojić Kolonić S (2015) Peripheral blood stem cell mobilization with pegfilgrastim in lymphoma patients. Bone marrow transplantation ABS-2547
5. Jurenec S, Minigo H, Vrhovac R, Mesarić J (2010) Adverse events in peripheral progenitor cell Collection. Blood Transfusion s42-s43
6. 4. Vrhovac R, Perić Z, Jurenec S, Kardum-Skelin I, Jelić-Puškarčić B, Šiftar Z, Mesarić J, Minigo H, Jakšić B (2009) Post-Thaw Viability of Cryopreserved Hematopoietic Progenitor Cell Grafts Influences Patients' Predisposition towards Infectious Complications in the Post-Transplant Period. Blood 114: 22
7. Mesarić J, Jurenec S, Guštin D, Sonicki Z, Brkljačić-Kerhin V, Kocman B (2007) Blood-transfusion requirements in orthopic liver transplantation: experience at a Croatian referral center. Transfusion M, Paul (ur.). Blackwell Publishing.
8. Perić Z, Kalac M, Jurenec S, Kovačević V, Bukovski-Simonoski S, Tambić-Andrašević A, Minigo H, Jakšić B, Vrhovac, R (2009) Filgrastim dose has an impact on infectious complications in patients with lymphoma following autologous stem cell transplantation Haematologica. 94(s2): 188-189

Kongresna priopćenja u ostalim časopisima:

1. Jurenec S, Mandac Smoljanović I, Zatezalo V, Radić-Krišto D (2021) Utjecaj talidomida u uvodnoj terapiji na mobilizaciju i prikupljanje krvotvornih matičnih stanica u bolesnika s multiplim mijelomom. Liječ.vjsn 143 suplement 2: 61-67
2. Jurenec S, Jurenec F, Radulović G, Pavičić Šarić J (2021) Uremijsko krvarenje kod pacijentice nakon transplantacije bubrega. Liječ.vjesn 143 suplement 2: 95-130
3. Mesarić J, Jurenec S, Sonicki Z (2008) Transfusion of fresh frozen plasma: audit of prescriptions. Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine (S1) 20-51 / Messmer, Konrad (ur.). Oxford : Wiley-Blackwell: 28-29
4. Jurenec S, Radić-Krišto D, Ostojić Kolonić S, Gredelj Šimec N, Planinc-Peraica A, Mesarić J, Minigo H (2012) Mobilizacija i sakupljanje perifernih krvotvornih matičnih stanica. Liječ vjesn 121-121
5. Jurenec S, Mesarić J, Vrhovac R, Kardum-Skelin I, Minigo H, Jakšić B (2007) Utjecaj DMSO-a na periferne krvotvorne matične stanice. Liječ Vjesn 129: Suplement 3
6. Jurenec S, Minigo H, Vrhovac R, Jakšić B, Mesarić J (2007) Prikupljanje perifernih krvotvornih matičnih stanica (PKMS) pomoću staničnog separatora COBE Spectra: naša iskustva // Liječ Vjesn 129: Suplement 3

Sa suprugom Franjom je u braku od 1997.godine i imaju dva sina, Domagoja (rođ. 1998.) i Tomislava (rođ. 2003.)