

lek. Agnieszka Barchnicka

KORELACJA WYBRANYCH WSKAŹNIKÓW USZKODZENIA
SZPIKU Z ZAAWANSOWANIEM CHOROBY
ORAZ WYNIKAMI LECZENIA U CHORYCH NA SZPICZAKA
PLAZMOCYTOWEGO

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

PROMOTOR: DR HAB. N. MED. SEBASTIAN GROSICKI, PROF. NADZW. SUM

ODDZIAŁ KLINICZNY HEMATOLOGII I PROFILAKTYKI CHORÓB NOWOTWOROWYCH
WYDZIAŁ NAUK O ZDROWIU W BYTOMIU
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH

Wydział Nauk Medycznych w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

2020

lek. Agnieszka Barchnicka

Oddział Kliniczny Hematologii i Profilaktyki Chorób Nowotworowych

SP ZOZ Zespół Szpitali Miejskich, ul. Strzelców Bytomskich 11, 41-500 Chorzów

Kolegium Szkoły Doktorskiej Wydziału Nauk o Zdrowiu w Bytomiu

e-mail: agnieszka@barchnicka.pl

Recenzenci:

1. Prof. dr hab. n. med. Iwona Hus, Klinika Hematologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. ul. Indiry Gandhi 14. 02-776 Warszawa
2. Prof dr hab. n. med. Grzegorz Mazur, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych, Nadciśnienia Tętniczego i Onkologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław

Składam serdeczne podziękowania promotorowi pracy Profesorowi Sebastianowi Grosickiemu za opiekę, pomoc oraz czas poświęcony w toku realizacji przewodu doktorskiego. Dziękuję również moim Koleżankom i Kolegom z Oddziału Hematologii w Chorzowie za pomoc i wsparcie w realizacji pracy.

Pracę dedykuję mężowi Jarkowi, córce Aleksandrze i teściowej Irenie. Bez Waszego wsparcia i cierpliwości realizacja tej pracy nie byłaby możliwa.

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	1
Wykaz skrótów	4
Wykaz tabel	8
Wykaz rycin	9
1. Wstęp	10
Wprowadzenie	10
1.1. Definicja i epidemiologia szpiczaka plazmocytoowego	11
1.2. Etiopatogeneza szpiczaka plazmocytoowego	12
1.3. Obraz kliniczny szpiczaka plazmocytoowego	13
1.4. Zasady rozpoznawania szpiczaka plazmocytoowego	14
1.5. Klasyfikacje stopnia zaawansowania szpiczaka plazmocytoowego	16
1.6. Czynniki rokownicze w szpiczaku plazmocytoowym	17
1.6.1. Cytogenetyka	18
1.6.2. Wskaźniki biologiczne i laboratoryjne	23
1.6.3. Minimalna choroba resztkowa (MRD)	24
1.7. Leczenie szpiczaka plazmocytoowego	24
1.7.1. Leczenie chorych kwalifikujących się do wysokodawkowanej chemioterapii	25
1.7.1.1 Autologiczne przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych	27
1.7.1.2. Allograftacja komórek krwiotwórczych	28
1.7.2. Leczenie chorych niekwalifikujących się do wysokodawkowanej chemioterapii	29
1.7.3. Leczenie podtrzymujące	31
1.7.4. Leczenie postaci opornych i nawrotowych	32
1.7.5. Nowe leki w terapii szpiczaka plazmocytoowego	33
1.7.6. Ocena odpowiedzi na leczenie u chorych na szpiczaka plazmocytoowego	34
1.8. Angiogeneza i jej rola w stanach fizjologicznych i patologicznych	35
1.9. Czynniki stymulujące i hamujące angiogenezę	38
1.10. Znaczenie angiogenezy w szpiczaku plazmocytoowym	40
1.10.1. Naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF)	45
1.10.2. Zasadowy czynnik wzrostu dla fibroblastów (bFGF)	46

1.10.3. Endoglin (CD105)	46
1.10.4. FLT-3 ligand	47
1.11. Zastosowanie leczenia antyangiogennego w szpiczaku plazmocytowym	48
1.12. Metody oceny angiogenezy	50
1.12.1. Metody bezpośredniej oceny angiogenezy	50
1.12.2. Metody pośredniej oceny angiogenezy	52
2. Założenia i cele pracy	53
3. Materiał i metody	54
3.1. Dane kliniczne	54
3.2. Ocena histopatologiczna i ocena średniej gęstości naczyń	56
3.3. Analiza osoczowych stężeń białek proangiogennych	58
3.4. Metody statystyczne	59
3.5. Metody oceny cytogenetycznej	60
4. Wyniki	61
4.1. Analiza badanej grupy	61
4.1.1. Ocena osoczowych stężeń białek proangiogennych w badanej grupie pacjentów	65
4.1.2. Ocena MVD i wybranych parametrów szpiku kostnego w badanej grupie pacjentów	68
4.1.3. Ocena zależności stężenia białek proangiogennych i MVD	73
4.2. Ocena zależności między stężeniem białek proangiogennych, MVD a stopniem zaawansowania szpiczaka plazmocytowego oraz ryzykiem cytogenetycznym	74
4.2.1. Klasyfikacja Salmon Durie	74
4.2.2. Klasyfikacja ISS	76
4.2.3. Klasyfikacja R-ISS	78
4.2.4. Zmiany cytogenetyczne w badaniu FISH	80
4.3. Ocena zależności między stężeniem białek proangiogennych i MVD a wczesną odpowiedzią na leczenie	81
4.3.1. Ocena korelacji MVD z odpowiedzią na leczenie	82
4.3.2. Ocena korelacji stężenia białek proangiogennych z odpowiedzią na leczenie	84
4.3.3. Analiza krzywych ROC dla wybranych parametrów jako czynników prognostycznych szpiczaka mnogiego	85
5. Dyskusja	87

5.1.	Stopień nasilenia angiogenezy a parametry kliniczne i histopatologiczne u chorych na MM w momencie diagnozy _____	88
5.2.	Stopień nasilenia angiogenezy a wczesne wyniki leczenia _____	95
6.	<i>Wnioski</i> _____	98
	<i>Piśmiennictwo</i> _____	99
	<i>Streszczenie</i> _____	113
	<i>Abstract</i> _____	115

Wykaz skrótów

AHSCT	autologiczne przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych
AL	amyloidoza AL (immunoglobulin light chain amyloidosis)
ALT	aminotransferaza alaninowa
alloHSCT	allogeniczne przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych
Ang-1	angiopoetyna 1
ASO-PCR	allospecyficzna reakcja polimerazy łańcuchowej
AST	aminotransferaza asparaginowa
AUC	powierzchnia pod krzywą (area under curve)
bFGF	zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (basic fibroblast growth factor)
BRAF	gen kodujący kinazę serynowo-treoninową, protoonkogen
CCND1	cyclina D1
CCND3	cyklina D3
C-MAF	czynnik transkrypcyjny, protoonkogen
CR	całkowita remisja (complete remission)
CRAB	C (Calcium), R (Renal Insufficiency), A (Anemia), B (Bone)
CRP	białko C-reaktywne
CTD	cyklofosfamid, talidomid, deksametazon
del17(p)	delecja genu 17p
D-Rd	daratumumab, lenalidomid, deksametazon
D-VTd	daratumumab, bortezomib, talidomid, deksametazon
EDTA	kwas wersenowy
EGF	nabłonkowy czynnik wzrostu (endothelial growth factor)
FDA	Food and Drug Administration
FGF	fibroblastyczny czynnik wzrostu (fibroblast growth factor)
FGFR3	receptor typu III dla czynnika wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor receptor 3)
FISH	fluorescencyjna hybrydyzacja in situ
FLT-3	kinaza tyrozynowa (FMS-like tyrosine kinase 3)
G-CSF	czynnik wzrostu kolonii granulocytowych
GEP	profil ekspresji genów (gene expression profile)
GVM	przeszczep przeciwko szpiczakowi (graft versus myeloma)

HbA1C	hemoglobina glikowana
HGF	czynnik wzrostowy hepatocytów (hepatocyte growth factor)
HE	hematoksylina
H-MM	hyperdiploid multiple myeloma
HPF	high power fields
IFM	Intergroupe Francophone du Myélome
IgA	immunoglobulina A
IgD	immunoglobulina D
IgG	immunoglobulina G
IGH	ciężki łańcuch immunoglobuliny
IL	interleukina
IMWG	międzynarodowa Grupa Robocza ds. Szpiczaka (International Myeloma Working Group)
ISS	międzynarodowy system rokowniczy (International Staging System)
HLCr	heavy/light chain ratio
KRAS	białko z rodziny RAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)
LDH	dehydrogenaza mleczanowa
MAFB	gen V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B
MFC	analiza cytometryczna wieloparametrowa (Multiparameter flow cytometry)
MGP	Myeloma Genome Project
MGUS	gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu (monoclonal gammopathy of undetermined significance)
MM	szpiczak plazmocytowy (multiple myeloma)
MMPs	metaloproteinazy (metalloproteinases)
MMSET	gen multiple myeloma SET domain
MPR	melfalan, prednizon, lenalidomid
MPT	melfalan, prednizon, talidomid
MPV	melfalan, prednizon, bortezomib
MR	minimalna odpowiedź (minimal response)
MRD	minimalna choroba resztkowa (minimal residual disease)
mSMART	model Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy
MVD	gęstość mikronaczyń (microvascular density)

MYC	gen regulatorowy dla czynnika transkrypcji
NaCl	chlorek sodu
NGS	sekwencjonowanie nowej generacji (next generation sequencing)
NH-MM	non-hyperdiploid multiple myeloma
NRAS	białko z rodziny RAS (neuroblastoma RAS viral oncogene homolog)
NTO	nadciśnienie tętnicze oporne
OPG	osteoprotegeryna
OPN	osteopontyna
ORR	odsetek całkowitych odpowiedzi (overall response)
OS	przeżycie całkowite (overall survival)
PAD	bortezomib, doksorubicyna, deksametazon
PCLI	indeks znakowania plazmocytów (plasma cell labeling index)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (polimerase chain reaction)
PD	progresja choroby (disease progression)
PDGF	czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (platelet-derived growth factor)
PDECGF	czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego komórek śródbłónka platelet-derived endothelial cell growth factor)
PET-CT	pozytronowa tomografia emisyjna
PFS	przeżycie wolne od choroby (progression free survival)
PIGF	łożyskowy czynnik wzrostu (placenta growth factor)
PR	częściowa odpowiedź (partial response)
RANK	aktywator receptora jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B
RANKL	ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B
RAS	białko, błonowa GTP-aza
Rd	lenalidomid, deksametazon
RIC	kondycjonowanie o zmniejszonej intensywności
R-ISS	zmodyfikowany system rokowniczy (Revised International Staging System)
ROC	Receiver Operating Characteristic
sCR	rygorystyczna remisja całkowita (stringent complete remission)

SD	stabilizacja choroby (disease stabilisation)
SDF-1	czynnik pochodzenia zrębowego-1 (stromal derived factor-1)
SFLC ratio	stosunek łańcuchów lekkich w surowicy (serum free light chain ratio)
SLiM	S (Sixty), Li (Light Chains), M (MR – rezonans magnetyczny)
t(4;14)	translokacja 4;14
t(11;14)	translokacja 11;14
t(14;16)	translokacja 14;16
TBI	napromienianie całego ciała (total body irradiation)
TGF	czynnik wzrostu nowotworu (tumor growth factor)
TiMPs	tkankowe inhibitory metaloproteinaz (tissue inhibitors of metalloproteinases)
TNF- α	czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor α)
tPA	tkankowy aktywator plazminogenu (urokinase plasminogen activator)
TP53	gen kodujący czynnik transkrypcyjny p53
uPa	urokinazowy aktywator plazminogenu (urokinase plasminogen activator)
VCAM-1	naczyniowa cząsteczka adhezyjna (vascular cell adhesion molecule)
VCD	bortezomib, cyklofosfamid, deksametazon
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (vascular endothelial growth factor)
VEGFR	receptor dla czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego (vascular endothelial growth factor receptor)
VGPR	bardzo dobra częściowa odpowiedź (very good partial response)
VLA-4	antygen późnej aktywacji-4 (very late antigen-4)
VTD	bortezomib, talidomid, deksametazon

Wykaz tabel

Tabela 1: Kryteria rozpoznania szpiczaka plazmocytoowego wg IMWG (2014)	15
Tabela 2: Klasyfikacja stopnia zaawansowania wg ISS oraz R-ISS	17
Tabela 3: Klasyfikacja pierwotnych zmian cytogenetycznych i molekularnych w szpiczaku plazmocytoowym	19
Tabela 4: Podział na grupy ryzyka cytogenetycznego wg mSMART	21
Tabela 5: Schematy w leczeniu indukującym szpiczaka plazmocytoowego u chorych, którzy są kwalifikowani do autotransplantacji szpiku	26
Tabela 6: Schematy w leczeniu indukującym szpiczaka plazmocytoowego u chorych, którzy nie są kwalifikowani do autotrasplantacji szpiku	30
Tabela 7: Czynniki stymulujące i hamujące angiogenezę w zależności od etapu angiogenezy [66]	38
Tabela 8: Rodzaje czynników stymulujących i hamujących angiogenezę	39
Tabela 9: Czynniki angiogenne i ich rola w szpiczaku plazmocytoowym	42
Tabela 10: Rodzaje białka monoklonalnego (diagnoza)	63
Tabela 11: Średnie stężenia białek proangiogennych w zależności od płci chorych	66
Tabela 12: Średnie stężenia białek proangiogennych w zależności od wieku chorych	66
Tabela 13: Średnie stężenia białek proangiogennych w zależności od nacieku szpiku plazmocydami (biopsja aspiracyjna szpiku)	66
Tabela 14: Średnie stężenia białek proangiogennych w zależności od nacieku szpiku plazmocydami (trepanobiopsja szpiku)	67
Tabela 15: Średnie stężenia białek prangiogennych w zależności od stopnia włóknienia szpiku w trepanobiopsji	67
Tabela 16 - Korelacja stężeń białek proangiogennych z MVD (współczynniki Spearmana)	73
Tabela 17: Średnie stężenia białek proangiogennych i MVD w badanej grupie chorych wg Salmon Durie	76
Tabela 18: Średnie stężenia białek proangiogennych w badanej grupie chorych wg ISS	77
Tabela 19: Stężenia białek proangiogennych oraz MVD w zależności od stopnia zaawansowania wg ISS	77
Tabela 20: Stężenie białek proangiogennych w chorych przy podziale na grupy wg R-ISS	78
Tabela 21 - Stężenie białek proangiogennych i MVD w badanej grupie wg R-ISS	79
Tabela 22: Średnie stężenia białek proangiogennych i MVD w zależności od nie- i prawidłowego wyniku badania FISH	80
Tabela 23 - Średnie stężenia białek proangiogennych oraz MVD w przypadku kariotypu nie- i hiperdiploidalnego	81
Tabela 24 - Średnie stężenia białek proangiogennych w zależności od obecności zmian wysokiego ryzyka	81
Tabela 25: Charakterystyka pacjentów z progresją choroby i wczesnym zgonem	84

Wykaz rycin

<i>Rycina 1: Etapy procesu angiogenezy</i>	37
<i>Rycina 2: Czynniki regulujące proces angiogenezy</i>	41
<i>Rycina 3: Obraz szpiku kostnego w preparacie trepanobioptatu z wybarwionymi naczyniami krwionośnymi</i>	57
<i>Rycina 4: Obraz szpiku kostnego w preparacie trepanobioptatu z wybarwionymi naczyniami krwionośnymi</i>	57
<i>Rycina 5: Podział grupy chorych w zależności od klasyfikacji R-ISS</i>	61
<i>Rycina 6: Podział grupy chorych w zależności od klasyfikacji ISS</i>	62
<i>Rycina 7: Podział grupy chorych w zależności od klasyfikacji Salmon Durie</i>	62
<i>Rycina 8: Rodzaje zmian cytogenetycznych w badanej grupie chorych metodą FISH</i>	64
<i>Rycina 9: Rozkład MVD w badanej grupie</i>	68
<i>Rycina 10: Rozkład wartości MVD w całej badanej grupie</i>	69
<i>Rycina 11: Rozkład MVD w zależności od nacieku szpiku kostnego w mielogramie</i>	70
<i>Rycina 12: Rozkład MVD w zależności od nacieku szpiku kostnego w trepanobiopsji szpiku</i>	71
<i>Rycina 13: Rozkład MVD w zależności od włóknienia szpiku w trepanobiopsji szpiku</i>	72
<i>Rycina 14: Średnie osoczowe stężenie endogliny w badanej grupie w zależności od stopnia zaawansowania</i>	74
<i>Rycina 15: Średnie osoczowe stężenie endogliny w badanej grupie w zależności od stopnia zaawansowania</i>	75
<i>Rycina 16: Rozkład wartości MVD a powodzenie leczenia</i>	82
<i>Rycina 17: Rozkład wartości MVD w zależności od uzyskanej odpowiedzi na leczenie</i>	83
<i>Rycina 18: Krzywa ROC dla MVD</i>	85
<i>Rycina 19: Krzywa ROC dla endogliny</i>	85
<i>Rycina 21: Krzywa ROC dla VEGF B</i>	86
<i>Rycina 20: Krzywa ROC dla VEGF A</i>	86
<i>Rycina 23: Krzywa ROC dla FGF 2</i>	86
<i>Rycina 22: Krzywa ROC dla VEGF C</i>	86

1. Wstęp

Wprowadzenie

Szpiczak plazmocytowy (MM) jest chorobą nowotworową, wywodzącą się z limfocytów B, które znajdują się w końcowym etapie procesu różnicowania. Stanowi około 10% nowotworów hematologicznych, a 1% wszystkich nowotworów występujących u ludzi [1].

U chorych na szpiczaka plazmocytozowego istotną rolę odgrywa określenie stadium zaawansowania choroby. Od wielu lat trwają także badania nad możliwością określenia nowych czynników prognostycznych.

Pomimo znaczącego postępu, jaki dokonał się w poznaniu biologii nowotworu oraz opracowania nowych terapii szpiczaka plazmocytozowego, nadal obserwuje się istotne zróżnicowanie odpowiedzi na leczenie. Niektórzy pacjenci charakteryzują się dobrą reakcją na zastosowaną terapię i długim okresem przeżycia, u innych szybko dochodzi do oporności na kolejne linie leczenia, progresji i w konsekwencji śmierci.

Niestety aktualne systemy rokownicze nie zawsze znajdują odzwierciedlenie w faktycznym przebiegu choroby u pacjentów z MM. Zatem istotne wydaje się dążenie do poznania nowych wskaźników prognostycznych.

W ostatnich latach opublikowano prace wskazujące na znaczenie angiogenezy w rozwoju nowotworów hematologicznych, zwłaszcza szpiczaka plazmocytozowego.

Angiogeneza jest procesem formowania nowych naczyń krwionośnych z komórek śródbłonna już istniejących kapilarów, który zachodzi w dojrzałych tkankach [2]. Zjawisko to może występować w procesach fizjologicznych, ale zdecydowanie częściej jednak w stanach patologicznych, jak np. onkogeneza. Udowodniono, że powstawanie nowych naczyń krwionośnych jest niezbędnym warunkiem rozwoju i progresji nowotworów litych [3]. Zatem założenie oparte na blokowaniu procesu angiogenezy stało się podstawą dla poszukiwania i opracowania nowych terapii leczniczych opartych na działaniu antyangiogennym [4].

Proces angiogenezy może być oceniany różnymi metodami, do których należą: ocena stężenia czynników stymulujących oraz hamujących angiogenezę w płynach ustrojowych, ocena gęstości mikronaczyń (MVD) w tkance nowotworowej oraz

badania molekularne dotyczące genów kodujących określone białka związane z angiogenezą.

Dotychczas przeprowadzono badania, których wyniki wskazują na rolę procesu angiogenezy w rozwoju i progresji szpiczaka plazmocytoowego [68-72]. Szczególnie istotne wydaje się zatem ustalenie korelacji nasilenia tego procesu w momencie rozpoznania choroby oraz implikacji dla wyników leczenia i rokowania.

1.1. Definicja i epidemiologia szpiczaka plazmocytoowego

Szpiczak plazmocytoowy (szpiczak mnogi, multiple myeloma, MM) należy do chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. Nowotwór ten wywodzi się z transformujących limfocytów B, znajdujących się w końcowym etapie procesu różnicowania, w którym dokonała się rekombinacja klasy łańcucha ciężkiego immunoglobuliny [1]. Zgodnie z klasyfikacją WHO z 2016 roku, oprócz szpiczaka plazmocytoowego, do nowotworów wywodzących się z komórki plazmatycznej należą: odosobniony guz plazmocytoowy kości, guz plazmocytoowy pozaszpikowy, gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu (MGUS), choroby łańcuchów ciężkich oraz choroby złogów immunoglobulin monoklonalnych [5].

MM charakteryzuje się klonalną proliferacją i gromadzeniem się nowotworowych komórek plazmatycznych w szpiku kostnym, zwykle obecnością białka monoklonalnego (IgG, IgA, IgD lub łańcuchy lekkie) w surowicy krwi lub/i w moczu oraz charakterystycznymi zmianami kostnymi.

Na szpiczaka plazmocytoowego chorują przede wszystkim osoby w starszym wieku, częściej mężczyźni. Zachorowania przed 50 rokiem życia występują zaledwie w 10% przypadków. Szczyt zachorowań dotyczy osób w 7 dekadzie życia. Zapadalność na szpiczaka plazmocytoowego w Europie wynosi około 5,5/100000 [6].

1.2. Etiopatogeneza szpiczaka plazmocytoowego

Etiopatogeneza szpiczaka plazmocytoowego nie jest do końca poznana. Do czynników ryzyka mogą należeć predyspozycje genetyczne, długotrwała ekspozycja na czynniki infekcyjne (wirusowe lub bakteryjne) oraz schorzenia autoimmunizacyjne, związane z przewlekłą, zwiększoną aktywacją układu immunologicznego. Wyniki metaanaliz wskazują, że prawie 4-krotne ryzyko rozwoju szpiczaka dotyczy krewnych pierwszego stopnia i korelacja ta jest bardziej wyraźna w przypadku mężczyzn [7]. Dodatkowe znaczenie może mieć także ekspozycja na niektóre substancje chemiczne takie jak: benzen, środki ochrony roślin, azbest oraz promieniowanie jonizujące [8].

Zgodnie z jedną z popularniejszych hipotez, rozwój szpiczaka plazmocytoowego przebiega wieloetapowo i może trwać wiele lat. Punktem wyjścia są translokacje chromosomowe, które zachodzą w genach kodujących łańcuchy ciężkie immunoglobulin w trakcie somatycznych hipermutacji i przełączania klas. Jeśli dojdzie do przypadkowych translokacji regionu 14q32, następuje deregulacja onkogenu poprzez zestawienie z sekwencjami wzmacniającymi immunoglobuliny, co w konsekwencji powoduje unieśmiertelnienie klonu komórkowego [9]. W efekcie powstaje ograniczona liczba monoklonalnych plazmocytoów i rozpoczyna się bezobjawowe stadium przednowotworowe nazywane gammopatią monoklonalną o nieokreślonym znaczeniu [10]. Dalsza ewolucja MGUS do pełnoobjawowego szpiczaka plazmocytoowego związana jest z kumulacją dodatkowych aberracji genetycznych, dotyczących między innymi genu MYC, RAS (KRAS i NRAS), FGFR3 oraz BRAF.

Przez długi czas uważano, że rozwój szpiczaka plazmocytoowego przebiega w sposób liniowy w wyniku kumulujących się mutacji genetycznych, poczynając od MGUS, poprzez postać szpikową szpiczaka plazmocytoowego, kończąc na postaci pozaszpikowej i białaczce plazmatycznokomórkowej. Ostatnie badania z zastosowaniem metod sekwencjonowania nowej generacji wykazały złożoność struktury genetycznej choroby. Na każdym kolejnym etapie rozwoju szpiczaka i progresji, powstawanie nowych mutacji wiąże się z ewolucją subklonalną w układzie rozgałęzionym. Oznacza to, że każdy z subklonów może posiadać inną mutację, a co za tym idzie odmienny fenotyp i wrażliwość na leki [11]. Uważa się także, że oprócz zmian molekularnych zachodzących w klonach nowotworowych plazmocytoów, w

postępie choroby istotną rolę odgrywa mikrośrodowisko szpiku, które zbudowane jest z macierzy, z włókien kolagenowych oraz licznych rodzajów komórek, między innymi mezynchymalnych komórek macierzystych, osteoklastów, fibroblastów, osteoblastów, limfocytów T oraz komórek śródbłonna naczyniowego. Interakcje, jakie zachodzą pomiędzy nowotworowymi plazmocytami a komórkami mikrośrodowiska szpiku, poprzez parakrynnne mediatory oraz bezpośrednie oddziaływanie poprzez receptory i cząsteczki adhezyjne (min. VCAM-1 i integryna VLA-4), mają wpływ na przeżycie, rozwój oraz ewolucję klonu nowotworowego [12]. Nowotworowe plazmocyty posiadają także zdolność wytwarzania cytokin o działaniu autokrynnym, co stymuluje ich proliferację.

1.3. Obraz kliniczny szpiczaka plazmocytoowego

U ponad 80% pacjentów z objawowym MM dochodzi do zajęcia układu kostnego pod postacią zmian osteolitycznych. Zmiany kostne powstają w wyniku interakcji pomiędzy komórkami szpiczakowymi a komórkami mikrośrodowiska szpiku, co w efekcie powoduje supresję osteoblastów a zwiększenie aktywności osteoklastów. Procesy te zachodzą poprzez szlaki sygnałowe wewnątrz- i pozakomórkowe, takie jak min: RANK (aktywator receptora jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B), RANKL (ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B), OPG (osteoprotegeryna), NOTCH oraz Wnt [13].

Obraz kliniczny szpiczaka plazmocytoowego związany jest z rozrostem nowotworowych komórek w szpiku oraz wydzielanych przez nie cytokin oraz białek. U około 1/3 chorych mogą pojawić się niecharakterystyczne objawy ogólne (osłabienie, spadek masy ciała), zwiększona skłonność do infekcji. Najczęstszym jednak objawem (60-70% chorych) są bóle kostne, zlokalizowane głównie w obrębie kręgosłupa, ale także żebrach oraz kościach długich, spowodowane zmianami osteolitycznymi i wtórnymi złamaniami. Konsekwencją nacieku szpiku może być cytopenia obwodowa, początkowo głównie pod postacią niedokrwistości, a w miarę postępu choroby także leukopenii i małopłytkowości. U około 30% chorych dochodzi do niewydolności nerek, co jest związane z produkcją dużych ilości nieprawidłowych immunoglobulin lub ich fragmentów przez nowotworowe plazmocyty. Najczęstszą postacią choroby nerek w przebiegu szpiczaka jest nefropatia wałeczkowa spowodowana bezpośrednim

uszkodzeniem komórek cewek bliższych nerek przez kompleks łańcuchów lekkich immunoglobulin z białkiem Tamm-Horsfalla. Innymi, rzadkimi postaciami zajęcia nerek w przebiegu szpiczaka są: choroba depozytowa monoklonalnych immunoglobulin oraz amyloidoza AL [14]. U 1/10 chorych mogą się pojawić także objawy zespołu nadlepkoci, spowodowane dużym stężeniem białka monoklonalnego, pod postacią zaburzeń widzenia, skazą krwotoczną oraz objawami ze strony ośrodkowego układu nerwowego.

1.4. Zasady rozpoznawania szpiczaka plazmocytoowego

Do rozpoznania szpiczaka plazmocytoowego niezbędne jest wykazanie obecności klonalnych plazmocytów w szpiku kostnym lub w biopsji tkankowej. Ocenę klonalności można przeprowadzić za pomocą badania immunofenotypowego, immunohistochemicznego oraz immunofluorescyjnego (restrykcja łańcuchów kappa/lambda). Zgodnie z wytycznymi, odsetek plazmocytów w szpiku może być oceniony za pomocą biopsji aspiracyjnej lub trepanobiopsji. Jeżeli istnieją różnice pomiędzy wielkością nacieku komórkami plazmatycznymi, należy brać pod uwagę większą wartość. Obecność i ilość białka monoklonalnego jest brana pod uwagę w kryteriach rozpoznania szpiczaka plazmocytoowego, aczkolwiek nie jest warunkiem koniecznym (szpiczak niewydzielający) [1]. W tabeli 1 przedstawiono zmodyfikowane kryteria rozpoznania szpiczaka plazmocytoowego wg IMWG z 2014 roku [15].

Tabela 1: Kryteria rozpoznania szpiczaka plazmocytoowego wg IMWG (2014)

Szpiczak plazmocytoowy
Obecność klonalnych plazmocytoów w szpiku kostnym $\geq 10\%$ lub guz plazmocytoowy potwierdzony w biopsji oraz ≥ 1 z wymienionych poniżej kryteriów:
A) objawy CRAB (uszkodzenia narządowe) 1. C (calcium) - stężenie wapnia $> 2,75$ mmol/l lub skorygowane stężenie wapnia $> 0,25$ mmol/l powyżej górnej wartości referencyjnej 2. R (renal) – niewydolność nerek, przejawiające się zwiększeniem poziomu kreatyniny > 2 mg/dl lub klirens kreatyniny < 40 ml/ml 3. A (anemia) – stężenie hemoglobiny poniżej 10 g/dl lub 2 g/dl poniżej wartości referencyjnej 4. B (bone) – jedno lub więcej ognisko osteolizy w klasycznym badaniu radiologicznym, tomografii komputerowej lub PET-CT B) Objawy SLIM (biomarkery nowotworu) 1. S (sixty) – odsetek plazmocytoów w szpiku kostnym powyżej 60% 2. Li (light chains) – stosunek stężenia klonalnych do nieklonalnych wolnych łańcuchów lekkich w surowicy krwi, co najmniej 100, przy czym stężenie klonalnego łańcucha powinno wynosić co najmniej 100 mg/l 3. M (MR) – obecność co najmniej dwóch ogniskowych nacieków w badaniu rezonansu magnetycznego kośćca (MR), każdy o wymiarze co najmniej 5 mm
Szpiczak bezobjawowy (tłący)
Spełnienie 2 poniższych kryteriów:
A) Stężenie białka monoklonalnego w surowicy krwi (IgG lub IgA) ≥ 30 g/l lub w moczu > 500 mg/24h lub/i obecność klonalnych plazmocytoów w szpiku 10-60% B) Bez kryteriów, które definiują szpiczaka plazmocytoowego i bez amyloidozy AL

W przypadku obecności we krwi obwodowej komórek szpiczakowych, należy ocenić czy u chorego nie doszło do rozwoju białaczki plazmatycznokomórkowej. Białaczka plazmatycznokomórkowa może mieć zarówno postać pierwotną jak i wtórną (schyłkowe stadium szpiczaka plazmocytoowego). Podstawowym kryterium rozpoznania jest stwierdzenie nowotworowych plazmocytoów we krwi w liczbie 2000/ μ l lub 20% leukocytoów we krwi obwodowej [16].

1.5. Klasyfikacje stopnia zaawansowania szpiczaka plazmocytoowego

Ocena stadium zaawansowania oraz rokowania odbywa się zgodnie z zaleceniami ekspertów Międzynarodowej Grupy Roboczej ds. Szpiczaka (IMWG) według klasyfikacji ISS z 2005 roku (Międzynarodowa Klasyfikacja Prognostyczna – z ang. International Staging System) [17] oraz aktualnie zmodyfikowanej klasyfikacji R-ISS (z ang. Revised International Staging System) z 2015 roku. Obie klasyfikacje przedstawiono w tabeli 2. Klasyfikacja ISS dzieli pacjentów chorych na MM na trzy grupy rokownicze (niskiego, pośredniego i wysokiego ryzyka) w zależności od dwóch parametrów: stężenia β -2 mikroglobuliny oraz albuminy. Wysokie stężenie β -2 mikroglobuliny jest wykładnikiem dużej masy nowotworu oraz zaburzonej funkcji nerek, natomiast niskie stężenie albuminy może być spowodowane działaniem cytokin uwalnianych przez komórki szpiczaka, min. IL-6.

Oprócz parametrów wykorzystywanych w określeniu stopnia zaawansowania według ISS, w klasyfikacji R-ISS bierze się pod uwagę stężenie dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz obecność zmian cytogenetycznych wysokiego ryzyka określanych za pomocą badania FISH: del(17p) i/lub t(4;14) i/lub t(14;16) [18]. Stężenie LDH powyżej normy może świadczyć o wysokim indeksie proliferacyjnym choroby, większej agresywności choroby lub obecności dużej masy nowotworu (guz plazmocytoowy). Wykazano, że LDH może stanowić niezależny czynnik rokowniczy i wpływać na wskaźniki przeżycia chorych ze szpiczakiem [19].

Klasyfikacje stopnia zaawansowania (R-ISS i ISS) pozwalają na identyfikację chorych z grupy wysokiego ryzyka. Udowodniono, że przeżycia chorych w poszczególnych grupach zidentyfikowanych za pomocą klasyfikacji ISS różnią się istotnie od siebie i wynoszą odpowiednio: ISS 1 – 62 miesiące, ISS 2 – 45 miesięcy i ISS 3 – 29 miesięcy [17]. Z kolei 5-letnie wskaźniki przeżyć chorych w poszczególnych stadiach zaawansowania według klasyfikacji R-ISS w grupie pacjentów z grupy niskiego ryzyka kształtowały się na poziomie 60-70%, w grupie pośredniego ryzyka – 40-60%, a grupie wysokiego ryzyka 15-40% [18].

Tabela 2: Klasyfikacja stopnia zaawansowania wg ISS oraz R-ISS

ISS			R-ISS	
Stopień	Kryteria		Stopień	Kryteria
	Stężenie β -2 mikroglobuliny w surowicy (mg/l)	Stężenie albumin w surowicy (g/dl)		
1	<3,5	$\geq$ 3,5	1	ISS1, LDH-norma, nie ma zmian cytogenetycznych
2	<3,5	<3,5	2	Nie spełnia kryteriów R-ISS 1 i R-ISS 2
	3,5-5,5	niezależnie		
3	>3,5	niezależnie	3	ISS-3 i zmiany cytogenetyczne wysokiego ryzyka lub aktywność LDH w surowicy > norma

LDH – dehydrogenaza mleczanowa, ISS – International Staging System (międzynarodowa klasyfikacja prognostyczna), R-ISS Revised International Staging System (zmodyfikowana międzynarodowa klasyfikacja prognostyczna)

Starszą klasyfikację, oceniającą masę nowotworu według Salmon – Durie z 1975 roku obecnie stosuje się rzadko. Opiera się ona na ocenie stężenia hemoglobiny, białka monoklonalnego M, stężeniu wapnia w surowicy krwi, dobowym wydalaniu wapnia z moczem, dobowym wydalaniu z moczem łańcuchów lekkich oraz obecności zmian osteolitycznych w kośćcu i kwalifikuje chorych do trzech stadiów zaawansowania, a dodatkowo do grupy A i B w zależności od stężenia kreatyniny w surowicy krwi.

1.6. Czynniki rokownicze w szpiczaku plazmocytowym

Jak już wspomniano, szpiczak plazmocytowy jest nowotworem cechującym się dużą heterogennością pod względem cech biologicznych, przebiegu klinicznego i rokowania. W ciągu ostatnich 20 lat obserwuje się stały postęp w zakresie poznania szeregu czynników klinicznych i laboratoryjnych, które mogą mieć znaczenie rokownicze u chorych na MM. Wyzwaniem nadal pozostaje identyfikacja chorych z chorobą wysokiego ryzyka z momencie rozpoznania.

Zgodnie z zaleceniami IMWG (2014) czynniki rokownicze u chorych na szpiczaka plazmocytoowego możemy podzielić na prognostyczne oraz predykcyjne. Markery prognostyczne dostarczają ogólnie informacji o rokowaniu. W przeciwieństwie do nich, markery predykcyjne określają prawdopodobieństwo uzyskania odpowiedzi na dany lek lub schemat terapeutyczny i rokowanie z tym związane. Niektóre markery mogą mieć zarówno charakter prognostyczny jak i predykcyjny. Przykładem może być delecja 17p, która jest znanym czynnikiem prognostycznym złego rokowania w szpiczaku. Nie jest to natomiast czynnik predykcyjny, gdyż nie określa żadnej metody terapeutycznej, która może być zastosowana w leczeniu z danym skutkiem [20].

Do najbardziej poznanych czynników rokowniczych w szpiczaku plazmocytoowym należą zmiany cytogenetyczne w komórkach szpiczakowych, ale także cechy biologiczne choroby jak zdolność proliferacyjna plazmocytów, oraz niektóre wskaźniki laboratoryjne oraz głębokość odpowiedzi, jaką udaje się uzyskać w wyniku leczenia.

Duże znaczenie mają czynniki osobnicze. Do czynników pogarszających rokowanie należą: wiek pacjenta >65 roku życia, niewydolność nerek, zły stan ogólny w momencie rozpoznania, ale także rodzaj klasy łańcucha ciężkiego i lekkiego immunoglobuliny (IgA i łańcuch lekki lambda).

1.6.1. Cytogenetyka

Niewątpliwie do jednych z najbardziej uznanych czynników rokowniczych w szpiczaku plazmocytoowym należą zmiany cytogenetyczne oraz molekularne. Jak już wspomniano wcześniej, szpiczak plazmocytoowy jest nowotworem cechującym się dużą heterogennością i niestabilnością genetyczną.

Cytogenetyka klasyczna pozwala na wykrycie zaburzeń chromosomowych u około 20-30% pacjentów i pozwala wyróżnić dwa podtypy choroby: postać hiperdiploidalną (hyperdiploid multiple myeloma H-MM) i nie-hiperdiploidalną (non-hyperdiploid multiple myeloma NH-MM). W przypadku postaci NH-MM częściej występują translokacje chromosomowe [21]. Cytogenetyka klasyczna nie jest badaniem z wyboru w przypadku szpiczaka plazmocytoowego z uwagi na trudności w uzyskaniu komórek plazmatycznych w stadium metafazy. Jest to spowodowane ich niewielką aktywnością proliferacyjną oraz zwykle stosunkowo niskim odsetkiem

nowotworowych plazmocytów w aspiracie szpiku. Dodatkowo niektórych istotnych aberracji jak translokacja t(4;14) nie można wykryć za pomocą klasycznych metod prążkowych.

Zdecydowanie dokładniejszym badaniem diagnostycznym w szpiczaku plazmocytowym jest technika fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ - FISH, (z ang. fluorescence in situ hybridization), która pozwala na wykrycie trisomii w komórkach szpiczakowych u około 40% chorych, a u większości pozostałych – translokacje dotyczące genów kodujących ciężki łańcuch immunoglobulin (IGH) zlokalizowanych na chromosomie 14q32. U niewielkiego odsetka chorych zmiany te mogą współistnieć. Klasyfikację pierwotnych zmian cytogenetycznych i molekularnych przedstawiono w tabeli 3 [22].

Tabela 3: Klasyfikacja pierwotnych zmian cytogenetycznych i molekularnych w szpiczaku plazmocytowym

Rodzaj zmiany genetycznej	Gen/chromosom	Odsetek chorych na szpiczaka (%)
Trisomie	Trisomie dotyczące nieparzystych chromosomów oprócz chromosomu 1,13 i 21	42
Translokacje dotyczące IGH		30
t(11;14) (q13;q32)	CCND1	15
t(4;14) (p16;q32)	FGFR-3 and MMSET	6
t(14;16) (q32;q23)	C-MAF	4
t(14;20) (q32;q11)	MAFB	<1
Inne translokacje IGH	CCND3, t(6;14) MM	5
Translokacje IGH+kariotyp trisomiczny	Obecność trisomii oraz co najmniej jednej z translokacji IGH	15
Izolowana monosomia chromosomu 14	W niektórych przypadkach może dotyczyć translokacji 14q32 z nieznanymi chromosomami partnerskimi	4,5
Inne translokacje chromosomalne z wyłączeniem IGH lub trisomii lub monosomii 14 lub trisomii		5,5
Bez stwierdzonych zmian		3

IGH – ciężki łańcuch immunoglobuliny, FGFR-3 - receptor typu III dla czynnika wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor receptor 3), MMSET – gen multiple myeloma SET domain, MAFB – gen V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B, C-MAF - czynnik transkrypcyjny, protoonkogen, CCND1 – cyklina D1, CCND3 – cyklina D3

W miarę postępu choroby, pojawiają się wtórne, charakterystyczne zmiany cytogenetyczne i molekularne jak: del(17p), monosomia 13/del(13), mutacje RAS, del(1p) oraz translokacje dotyczące genu MYC. Zmiany cytogenetyczne i molekularne, zarówno pierwotne jak i wtórne mają niewątpliwy wpływ na przebieg choroby u danego chorego, a więc odpowiedź na leczenie oraz rokowanie [22]. Niektóre z wtórnych zmian, jak monosomia/delecja chromosomu 13 mogą pojawić się na wczesnych etapach rozwoju szpiczaka, a zwłaszcza u chorych z MGUS i szpiczakiem bezobjawowym. Dawniej, kiedy posługiwano się głównie cytogenetyką klasyczną, zmiany te wiązano ze złym rokowaniem, co nie potwierdziło się w dalszych badaniach, opartych na technice FISH. Z kolei del(17p) lub monosomia 17 są stwierdzane głównie w dalszych etapach choroby i wiążą się niewątpliwie z gorszym rokowaniem zarówno pod względem przeżycia wolnego od choroby (PFS) jak i przeżycia ogólnego (OS).

W tabeli 4 przedstawiono stratyfikację pacjentów ze szpiczakiem, zgodną z zaleceniami Polskiej Grupy Szpiczakowej, na podstawie modelu mSMART (z ang. Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy) [1,23]. Model ryzyka obejmuje głównie pierwotne zmiany genetyczne, które wyjściowo determinują status chorego. Niewątpliwie jednak, wtórne zmiany cytogenetyczne a więc przede wszystkim del(17p) oraz prawdopodobnie del(1p) są niezależnie związane ze złym rokowaniem. Trisomia chromosomów nieparzystych może stanowić bufor dla zmian genetycznych wysokiego ryzyka, aczkolwiek w literaturze znajdują się sprzeczne dane na ten temat [22].

Tabela 4: Podział na grupy ryzyka cytogenetycznego wg mSMART

Grupy ryzyka	Zmiany cytogenetyczne
Standardowe	Hiperdiploidia t(11;14) t(6;14)
Pośrednie	Hipodiploidia t(4;14) metodą FISH del (13) metodą cytogenetyczną PCLI $\geq 3\%$ Amplifikacja 1q21
Wysokie	Del(17p) t(14;16) metodą FISH t(14;20) Del(1p) Niekorzystna sygnatura GEP

PCLI - indeks znakowania plazmocytołów (plasma cell labeling index); GEP – profil ekspresji genów (gene expression profile), FISH - fluorescencyjna hybrydyzacja in situ, del - delecja

Wykazano, że del(17p) jest jednym z najsilniejszych czynników złego rokowania. U chorych z del(17p) przebieg choroby jest agresywniejszy, częściej dochodzi do zajęcia ośrodkowego układu nerwowego, wystąpienia białaczki plazmocytovej lub guzów pozaszpikowych. Obecnie brak jest danych dotyczących odsetka komórek szpiczakowych del(17p), które wyznaczałoby punkt odcięcia dla określenia rokowania, zwłaszcza, że wyniki niektórych badań wskazują, iż obecność del(17p) w niewielkim odsetku komórek nie musi wiązać się ze złym rokowaniem. Według niektórych źródeł, złe rokowanie może oznaczać obecność powyżej 30-60% komórek szpiczakowych z del(17p) [24].

W badaniu Binder i wsp. opublikowano wyniki analizy dotyczącej znaczenia prognostycznego współistnienia zmian cytogenetycznych wysokiego ryzyka u chorych ze świeżo zdiagnozowanym szpiczakiem plazmocytowym. Zmiany wysokiego ryzyka oceniano za pomocą techniki FISH i stanowiły one uznane już do tej pory niekorzystne translokacje: t(4;14), t(14;16), t(14;20) oraz delecja 17p. Wykazano, że współistnienie dwóch zmian genetycznych pogarsza rokowanie w porównaniu z chorymi, u których stwierdza się izolowaną zmianę genetyczną wysokiego ryzyka [25]. Kumulacja może

obejmować del17p oraz jedną z translokacji. Kombinacja dwóch translokacji występuje niezwykle rzadko i może mieć miejsce wyłącznie w przypadku istnienia dwóch odrębnych klonów nowotworowych.

Dane pochodzące z analiz opierających się na wykorzystaniu technik sekwencjonowania nowej generacji NGS (z ang. next generation sequencing) opublikowane w 2017 roku pozwoliły na identyfikację kolejnych istotnych mutacji genowych w szpiczaku plazmocytowym, które mogą mieć wpływ na rokowanie: mutacje *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *FAM46C*, *DIS3*, *TRAF*, *CYLD* i *LTB* pozostają bez wpływu na rokowanie [26]. Z kolei mutacje *TP53*, *ATM* i *ATR* wiążą się ze złym, a *IRF4* i *EGR1* z dobrym rokowaniem [26].

W ramach projektu Myeloma Genome Project (MGP) trwają badania nad ujednoliceniem danych molekularnych i odniesieniu ich do obrazu klinicznego i rokowania u chorych na szpiczaka plazmocytoowego z wykorzystaniem NGS. Najnowsza analiza przeprowadzona przez Walker i wsp. pozwoliła na wyodrębnienie całkiem nowej grupy pacjentów ekstremalnie wysokiego ryzyka, charakteryzująca się dwoma zmianami w DNA na poziomie genomu, określanymi jako Double-hit myeloma. Są to pacjenci, u których stwierdza się bialleliczną inaktywację *TP53* lub *ISS 3* z amplifikacją (≥ 4 kopie) *CKS1B* (1q21). W tej grupie chorych stwierdzono zdecydowanie krótsze średnie PFS – 15,4 miesiące i średnie OS - 20,7 miesięcy, w porównaniu z grupą niskiego lub pośredniego ryzyka.

Zgodnie z modelem ryzyka zaproponowanym przez badaczy, grupa niskiego ryzyka obejmowała chorych, u których *ISS* wynosiło 1 lub 2 bez obciążających czynników genetycznych, natomiast w grupie pośredniego ryzyka znaleźli się chorzy, u których stwierdzono *ISS 1* oraz t(4;14) lub del(17p); lub chorzy z *ISS 3* bez towarzyszących czynników genetycznych. Rokowanie w grupie double-hit MM było złe pomimo zastosowania w terapii nowych leków, niezależnie od tego, czy zgodnie z kryteriami klasyfikacji IMWG byli oni kwalifikowani do grupy niskiego/standardowego ryzyka lub wysokiego [27].

1.6.2. Wskaźniki biologiczne i laboratoryjne

PCLI (indeks znakowania plazmocytołów) odzwierciedla liczbę nowotworowych plazmocytołów w szpiku kostnym, które znajdują się w fazie S cyklu komórkowego, co pośrednio świadczy o zdolności klonu do proliferacji. Już w latach 90-tych XX wieku odnotowano, że pomiar PCLI obok stężenia β -2 mikroglobuliny może stanowić niezależny wskaźnik rokowniczy w szpiczaku plazmocytołowym. Wykazano między innymi, że u chorych znajdujących się w stabilnej fazie choroby, wysoki PCLI może prognozować szybką progresję i zgon chorego [28].

Z uwagi na dostępność bardziej praktycznych metod diagnostycznych, aktualnie PCLI jest używany rzadko, aczkolwiek jest uwzględniony w modelu podziału na grupy ryzyka przedstawionym w tabeli 4.

Oznaczanie stężenia łańcuchów kappa i lambda w surowicy krwi, oprócz monitorowania choroby, może mieć także znaczenie prognostyczne, zwłaszcza w przypadku pacjentów z MGUS, szpiczakiem odosobnionym lub bezobjawowym. W badaniu Dimopoulos i wsp. stwierdzono, że u chorych z MGUS z nieprawidłowym stosunkiem łańcuchów lekkich (SFLC ratio) istnieje zwiększone ryzyko progresji w porównaniu z chorymi z prawidłowym ich stosunkiem, niezależnie od rodzaju oraz stężenia białka monoklonalnego w surowicy krwi [29]. Podobnie, stosunek łańcuchów przekraczający 100 u chorych ze szpiczakiem bezobjawowym, może poprzedzać wystąpienie progresji, a zatem zasadne mogłoby być wdrożenie leczenia [28].

Jedną z nowszych technik monitorowania szpiczaka plazmocytołowego o wartości prognostycznej jest test Hevylite™, który pozwala na dokładne oznaczenie stężenia kompletnych immunoglobulin wraz z typem łańcucha lekkiego. Za pomocą tej metody możliwe jest także obliczenie proporcji (HLCr) stężenia immunoglobuliny monoklonalnej do poliklonalnej w zakresie tej samej klasy, którego interpretacja ma znaczenie rokownicze. Jeżeli w chwili diagnozy MM wskaźnik ten będzie nieprawidłowy, może być wykładnikiem skróconego PFS. Jeżeli dochodzi do normalizacji wskaźnika po leczeniu nawet, jeżeli immunofiksacja nadal wskazuje na obecność białka monoklonalnego, jest to czynnik korzystny rokowniczo, podczas gdy ewolucja wskaźnika do ponownych wartości nieprawidłowych może świadczyć o zbliżającej się progresji choroby, pomimo iż inne parametry laboratoryjne pozostają prawidłowe [30].

Do innych parametrów laboratoryjnych, które mogą świadczyć o gorszym rokowaniu u chorego należą min. [1]:

- podwyższone stężenie IL-6 w surowicy krwi
- podwyższone stężenie CRP w surowicy krwi (> 6 mg/dl)
- podwyższone stężenie β 2-mikroglobuliny w surowicy krwi (uwzględniając niewydolność nerek)

1.6.3. Minimalna choroba resztkowa (MRD)

Istnieje bezpośrednia zależność pomiędzy głębokością odpowiedzi na leczenie a długością przeżycia w szpiczaku plazmocytowym [31]. W 2006 roku, IMWG wprowadziło do kryteriów odpowiedzi pojęcie rygorystycznej odpowiedzi całkowitej (sCR), która oznaczała min. Nieobecność klonalnych plazmocytów w biopsji szpiku oceniane metodą immunohistochemiczną i immunofluorescencyjną. Pojęcie sCR z czasem ewoluowało do całkowitej odpowiedzi molekularnej (mCR) definiowanej, jako nieobecność wykrywalnej choroby (rearranżacja genu IGH). Za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Obecnie, w ocenie choroby resztkowej stosuje się technikę cytometrii przepływowej z analizą wieloparametrową (MFC) lub allelospecyficznego PCR (ASO-PCR). Ostatnio prowadzone badania skupiają się także na roli techniki NGS w ocenie MRD. Czulość powyższych metod przedstawia się odpowiednio: MFC: 10^{-5} do 10^{-6} , ASO-PCR: 10^{-5} do 10^{-6} , NGS: 10^{-6} [28].

1.7. Leczenie szpiczaka plazmocytoowego

Pomimo postępu, jaki dokonał się w ostatnim latach w zakresie diagnostyki i leczenia, szpiczak plazmocytowy pozostaje nowotworem nieuleczalnym. Rodzaj terapii jest uzależniony od wieku chorego, ale także stanu ogólnego oraz współistniejących obciążeń. Idea chemioterapii wysokodawkowanej wspomaganej autologicznym przeszczepieniem macierzystych komórek krwiotwórczych (AH SCT) w szpiczaku plazmocytowym narodziła się latach 80 ubiegłego wieku i nadal uważana jest za najskuteczniejszą opcję terapeutyczną [32].

1.7.1. Leczenie chorych kwalifikujących się do wysokodawkowanej chemioterapii

Aktualnie standardem leczenia pacjentów do 70 roku życia, w dobrym stanie ogólnym i nieobciążonych istotnymi schorzeniami, pozostaje terapia indukująca mająca na celu uzyskanie jak najgłębszej odpowiedzi, a następnie AHSCT [1]. Wskazania do wykonania zabiegu u starszych pacjentów, ale w dobrym stanie klinicznym i bez obciążeń powinny być ustalane indywidualnie.

W leczeniu indukującym w Polsce u chorych kwalifikujących się do AHSCT stosuje się przede wszystkim schematy trójkowe, oparte na bortezomibie (inhibitor proteosomu), deksametazonie oraz trzecim leku, którym może być cytostatyk (np. cyklofosfamid, doksorubicyna) lub lek immunomodulujący (talidomid). Schematy lekowe, najczęściej stosowane u chorych kwalifikowanych do autotransplantacji zostały przedstawione w tabeli 5.

W badaniu Evolution oceniano skuteczność i bezpieczeństwo terapii indukującej opartej na czterech lekach (bortezomib, deksametazon, cyklofosfamid oraz lenalidomid). Wykazano, że w porównaniu ze standardową terapią trójkową, takie schematy wiążą się z podobnym OS i PFS, natomiast toksyczność jest zdecydowanie większa [33]. W Polsce lenalidomid nie jest refundowany w terapii pierwszoliniowej szpiczaka plazmocytowego.

Tabela 5: Schematy w leczeniu indukującym szpiczaka plazmocytoowego u chorych, którzy są kwalifikowani do autotransplantacji szpiku

Schemat leczenia	Dawkowanie	Schemat stosowania (dzień podania)
VCD Cykle co 3 tygodnie	Bortezomib 1,3 mg/m ² sc Cyklofosfamid 500 mg/m ² po lub iv Deksametazon 20-40 mg po lub iv	1,4,8,11 1 (8) 1,2,4,5,8,9,11,12
VTD Cycle co 3 tygodnie	Bortezomib 1,3 mg/m ² sc Talidomid 100-200 mg/d po Deksametazon 20-40 mg po lub iv	1,4,8,11 1-21 1,2,4,5,8,9,11,12
PAD Cycle co 4 tygodnie	Bortezomib 1,3 mg/m ² sc Doksorubicyna 4,5-9 mg/m ² iv Deksametazon 20 mg po lub iv	1,4,8,11 1-4 1,2,4,5,8,9,11,12, 17-20

sc – podskórnice, po – doustnie, iv – dożylnie, VCD – bortezomib, cyklofosfamid, deksametazon, VTD – bortezomib, talidomid, deksametazon, PAD – bortezomib, doksorubicyna, deksametazon

Aktualnie kwestią sporną pozostaje moment zarówno kolekcji komórek krwiotwórczych jak i wykonania samej procedury przeszczepowej. Zaletą wykonania procedury kolekcji komórek krwiotwórczych po 3-4 cyklach leczenia może być jej większa skuteczność, ale z drugiej strony istnieje potencjalnie większe ryzyko kontaminacji materiału przeszczepowego komórkami nowotworowymi w porównaniu do procedury wykonanej po dłuższym okresie leczenia z często głębszą remisją choroby. Z drugiej strony wydłużony okres leczenia indukującego może skutkować utrudnioną kolekcją komórek krwiotwórczych oraz większą toksycznością [1].

1.7.1.1 Autologiczne przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych

Zgodnie z aktualnymi zaleceniami, terapia wysokodawkowana z następowym przeszczepieniem autologicznych macierzystych komórek krwiotwórczych jest standardem postępowania mającego na celu wydłużenie zarówno PFS jak i OS, co zostało udowodnione w badaniach klinicznych [1]. Krew obwodowa jest preferowanym źródłem pozyskiwania komórek krwiotwórczych do AHSCT u chorych na MM. Autologiczne przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej wiąże się z mniejszym ryzykiem zanieczyszczenia komórkami nowotworowymi a także szybszym okresem regeneracji układu krwiotwórczego.

Mobilizacja (kolekcja) komórek krwiotwórczych do AHSCT polega na zastosowaniu chemioterapii (cyklofosfamid, arabinozyd cytozyny, etopozyd) a następnie czynnika wzrostu kolonii granulocytowych (G-CSF). Proces kolekcji komórek prowadzi się za pomocą leukaferozy. Warunkiem koniecznym dla powodzenia pojedynczej procedury AHSCT jest uzyskanie minimum $2 \times 10^6/\text{kg}$ m.c komórek CD34+, a do procedury podwójnej - $5 \times 10^6/\text{kg}$ m.c. W przypadku problemów z kolekcją komórek istnieje możliwość zastosowania pleryksaforu, antagonisty receptora chemokinowego (CXCR4), który wzmacnia efekt mobilizacji komórek macierzystych wywołany przez G-CSF.

Procedura AHSCT obejmuje podanie melfalanu, jako leczenia mieloablacyjnego w dawce $200 \text{ mg}/\text{m}^2$ dożylnie (doba -2 lub w dawkach podzielonych w dobach -3, -2). U chorych, u których istnieje duże ryzyko powikłań dawkę melfalanu można zmniejszyć do $140 \text{ mg}/\text{m}^2$. Aktualnie wydaje się, że jest to najbardziej optymalny schemat kondycjonowania do AHSCT w szpiczaku plazmocytowym [34]. W badaniu III fazy IFM 2014-02 wykazano, że dołączenie bortezomibu do wysokich dawek melfalanu w kondycjonowaniu nie przekłada się na poprawę wyników wczesnych jak i odległych [35].

U chorych, którzy nie osiągnęli VGPR po pierwszej procedurze AHSCT, istnieją wskazania do wykonania drugiej, jako tzw. przeszczepu tandemowego. Takie postępowanie zostało ustalone na podstawie randomizowanych badań klinicznych,

które wykazały poprawę rokowania zarówno w kontekście PFS jak i OS u chorych poddanych przeszczepowi tandemowemu [36]. Z uwagi na fakt, że badania były prowadzone przed erą wprowadzenia nowych leków do terapii szpiczaka plazmocytoowego, kwestia zasadności i korzyści ze stosowania przeszczepu tandemowego powróciła w badaniach klinicznych takich jak EMN02/HO95 oraz StaMINA. W badaniu EMN02/HO95 wykazano poprawę głębokości odpowiedzi, PFS i OS, z około 30% zmniejszeniem ryzyka zgonu i progresji [37]. Z kolei w badaniu StaMINA nie udowodniono wyższości przeszczepu tandemowego nad pojedynczym w obliczu możliwości leczenia nowymi lekami [38].

Na podstawie aktualnie dostępnych danych wydaje się, że przeszczep tandemowy nadal będzie zajmował ważne miejsce w terapii chorych ze szpiczakiem, aczkolwiek najwięcej korzyści z jego przeprowadzenia mogą odnieść pacjenci z grup wysokiego ryzyka (cytogenetycznego oraz R-ISS 3) [34].

U chorych, u których przeprowadzono procedurę AHSCT, a doszło do progresji istnieje możliwość wykonania tzw. ratunkowego AHSCT. Wskazania do powtórnego wykonania AHSCT obejmują chorych w dobrym stanie klinicznym, u których odstęp pomiędzy pierwszym AHSCT a progresją wynosi 18 miesięcy lub więcej [39].

1.7.1.2. Allotransplantacja komórek krwiotwórczych

Allotransplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych od zdrowego dawcy (alloHSCT) wydaje się aktualnie jedyną metodą, która może doprowadzić do wyleczenia chorego na szpiczaka plazmocytoowego. Jest to jednak procedura obciążona dużym ryzykiem ciężkich powikłań, w tym śmiertelnych (odsetek może sięgać ponad 30%), stąd nie jest stosowana w standardowym postępowaniu [1].

W przypadku alloHSCT, nie istnieje ryzyko zanieczyszczenia materiału przeszczepowego przez komórki nowotworowe, co może się zdarzyć w przypadku AHSCT. Dodatkowo podnosi się korzystną rolę mechanizmu przeszczep przeciwko szpiczakowi (GVM – z ang. graft versus myeloma), w którym prawdopodobnie pośredniczą alloreaktywne limfocyty T dawcy. W kondycjonowaniu mieloablacyjnym stosuje się schematy chemioterapii oparte na cyklofosfamidzie oraz melfalanie w skojarzeniu z TBI (napromienianie całego ciała – z ang. total body irradiation), rzadziej z busulfanem.

W celu zmniejszenia odsetka ciężkich powikłań, opracowano procedury niemieloablacyjne - kondycjonowanie o zmniejszonej intensywności (RIC), które wiążą się z lepszą tolerancją, ale też większym ryzykiem progresji. W kondycjonowaniu stosuje się tutaj schematy oparte na melfalanie, fludarabinie oraz TBI w skojarzeniu.

Podejmuje się próby stosowania w terapii złożonej wyjściowo z autotransplantacji macierzystych komórek krwiotwórczych a następnie allotransplantacji niemieloablacyjnej, jako drugiej procedury, aczkolwiek wyższość takiego postępowania nie została dotąd udowodniona [40].

Aktualnie wydaje się, że największe korzyści z ewentualnego zastosowania leczenia wysokodawkowaną chemioterapią z następową allotransplantacją komórek krwiotwórczych mogą odnieść chorzy młodszy, z czynnikami wysokiego ryzyka, niewystarczającą odpowiedzią na leczenie indukujące oraz szybką progresją po AHSCT (do 24 miesięcy), optymalnie w ramach badań klinicznych [39].

1.7.2. Leczenie chorych niekwalifikujących się do wysokodawkowanej chemioterapii

U chorych niekwalifikujących się do wysokodawkowanej chemioterapii z uwagi na wiek, stan ogólny lub schorzenia współistniejące stosuje się leczenie mniej intensywne. Celem leczenia pierwszego rzutu jest uzyskanie remisji, wydłużenie przeżycia wolnego od choroby, a także przeżycia całkowitego. W Polsce najczęściej stosuje się schematy: MP (melfalan, prednizon), MPT (melfalan, prednizon, talidomid), MPV (melfalan, prednizon, bortezomib), a także te stosowane u chorych kwalifikujących się do AHSCT: VCD (bortezomib, cyklofosfamid, deksametazon), VD (bortezomib, deksametazon), rzadziej CTD (cyklofosfamid, talidomid, deksametazon). W krajach zachodnich w ramach schematów chemioterapii indukującej stosuje się szeroko lenalidomid – Rd (lenalidomid, deksametazon) oraz MPR (melfalan, prednizon, lenalidomid), który w Polsce nie jest refundowany w pierwszej linii leczenia. Schematy leczenia przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6: Schematy w leczeniu indukującym szpiczaka plazmocytoowego u chorych, którzy nie są kwalifikowani do autotrasplantacji szpiku

Schemat leczenia	Dawkowanie	Schemat stosowania (dzień podania)
MPT Cycle co 4 tygodnie 6-12 cykli	Melfalan 4 mg/m ² po Talidomid 100 mg/d po Prednizon 40 mg/m ² po	1-7 a la longue 1-7
MPV Cycle 42-dniowe 9 cykli	Melfalan 9 mg/m ² Bortezomib 1,3 mg/m ² sc Prednizon 60 mg/m ² po	1-4 1, 4, 8, 11, 22, 25, 32 (cycle 1-4), 1, 8, 22, 29 (cycle 5-9) 1-4
CTD Cykle co 3 tygodnie	Cyklofosfamid 500 mg/m ² /d iv lub 625 mg/m ² /d po Talidomid 100 mg/d po Deksametazon 20 mg/d po	1 A la longue 1-4, 9-12
Rd Cykle co 4 tygodnie	Lenalidomid 25 mg/d po Deksametazon 40 mg/d po	1-21 1-4, 9-12, 17-20

sc- podskórnice, po – doustnie, iv – dożylnie, MPT – melfalan, talidomid, prednizon, MPV – melfalan, bortezomib, prednizon, CTD – cyklofosfamid, talidomid, deksametazon, Rd – lenalidomid, deksametazon

Skuteczność i bezpieczeństwo terapii stosowanych w leczeniu chorych niekwalifikujących się do AHSCT oceniano w szeregu badań klinicznych. W przypadku schematów zawierających melfalan, odnotowano korzyści w dołączeniu do terapii bortezomibu lub leku immunomodulującego (talidomid, lenalidomid). W badaniu III fazy VISTA wykazano 31% zmniejszenie ryzyka zgonu w przypadku dołączenia bortezomibu do terapii melfalan + prednizon oraz korzystny wpływ na OS [41]. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku porównania schematu MP i MPT (badanie HOVON). Odnotowano istotnie wyższy odsetek całkowitych odpowiedzi ORR (66%) w grupie leczonej MPT w porównaniu do MP (45%) [42].

W wieloośrodkowym, międzynarodowym badaniu FIRST porównywano skuteczność i bezpieczeństwo podawania lenalidomidu i deksametazonu w sposób

ciągly ze schematem MPT (leczenie trwało 72 tygodnie) u starszych chorych na szpiczaka plazmocytoowego, niekwalifikujących się do AHSCT. Odnotowano zmniejszenie ryzyka progresji lub zgonu o 28% u chorych kontynuujących stosowanie lenalidomidu i deksametazonu w porównaniu do chorych, którzy otrzymali MPT. Dodatkowo okazało się, że leczenie lenalidomidem i deksametazonem w sposób ciągły zmniejsza także ryzyko progresji lub zgonu w porównaniu do chorych, u których zastosowano 18 cykli lenalidomidu [43].

1.7.3. Leczenie podtrzymujące

Leczenie podtrzymujące ma na celu podtrzymanie remisji i można je stosować zarówno u chorych, którzy otrzymali wysokodawkowaną chemioterapię wspomaganą autotransplantacją szpiku lub nie.

Jednym z najlepiej przebadanych leków w leczeniu podtrzymującym po AHSCT jest talidomid w monoterapii. Badania wskazują na korzystny wpływ talidomidu na PFS i OS, aczkolwiek jego przewlekłe stosowanie może się wiązać z kumulacją powikłań toksycznych takich jak neuropatia oraz zwiększonym ryzykiem powikłań zakrzepowych. Istnieją także przesłanki przemawiające za niestosowaniem talidomidu w podtrzymywaniu u chorych z grupy wysokiego ryzyka cytogenetycznego [44].

Lenalidomid w leczeniu podtrzymującym po AHSCT oceniano wyjściowo w dwóch niezależnych randomizowanych badaniach III fazy. W badaniu CALB porównywano leczenie podtrzymujące lenalidomidem a placebo, wykazano istotnie krótszy średni czas do progresji w grupie leczonej lenalidomidem (46 miesięcy vs 27 miesięcy w grupie placebo) [45]. W badaniu III fazy IFM wykazano istotnie lepsze OS w grupie chorych przyjmujących lenalidomid w podtrzymywaniu vs placebo (odpowiednio 88% vs 80%) [46].

Terapia lenalidomidem wydaje się być lepiej tolerowana niż w przypadku talidomidu, aczkolwiek pewnym ograniczeniem w przewlekłym stosowaniu wydaje się działanie mielotoksyczne, oraz zwiększenie ryzyka powstawania drugich, pierwotnych nowotworów. McCarthy i wsp. dokonali metaanalizy dostępnych wyników badań dotyczących lenalidomidu w leczeniu podtrzymującym, która wykazała korzyści dotyczące istotnego wydłużenia PFS, OS w porównaniu do placebo lub obserwacji [47].

Podejmuje się również próby stosowania bortezomibu w leczeniu podtrzymującym zarówno po AHSCT jak i osiągnięciu remisji u chorych niepoddanych AHSCT. Niestety stosowanie bortezomibu wiąże się z dużą toksycznością neurologiczną, co ogranicza możliwość stosowania leku w sposób przewlekły. Zaletą z kolei jest możliwość stosowania leku u chorych z niewydolnością nerek. W badaniu HOVON wykazano poprawę odsetka całkowitych odpowiedzi (ORR) oraz dobrą tolerancję w przypadku podtrzymywania po AHSCT [48].

W przypadku chorych niekwalifikujących się do AHSCT do rozważenia może być terapia podtrzymująca bortezomibem 1x w tygodniu lub rzadziej. Analiza wyników badania UPFRONT wskazuje na dość dobrą tolerancję takiego postępowania, nie odnotowano istotnego zwiększenia toksyczności [49].

1.7.4. Leczenie postaci opornych i nawrotowych

W przebiegu leczenia chorych na MM dochodzi do selekcji klonów. Każdy kolejny nawrót choroby charakteryzuje się większą agresywnością lub opornością na leczenie, wynikającą przede wszystkim z kumulacji zmian genetycznych. W terapii kolejnych linii stosuje się schematy złożone z kilku leków, najczęściej leków immunomodulujących (talidomid, lenalidomid, pomalidomid), inhibitorów proteasomu (bortezomib, karfilzomib) oraz ewentualnie tradycyjnych leków cytostatycznych (bendamustyna, cyklofosfamid, doksorubicyna) w połączeniu ze sterydem [50]. W przypadku, jeżeli wcześniej zastosowane leczenie było skuteczne (pacjent osiągnął co najmniej PR), dobrze tolerowane, a przerwa do progresji wynosiła co najmniej 6 miesięcy, można spróbować je powtórzyć. Jak już wspomniano wcześniej, w przypadku nawrotu AHSCT możliwa jest kwalifikacja do przeszczepu ratunkowego po spełnieniu kryterium odstępu czasowego.

1.7.5. Nowe leki w terapii szpiczaka plazmocytoowego

W ciągu ostatniego dziesięciolecia dokonał się ogromny postęp w opracowaniu nowych leków, z których część została już zarejestrowana w leczeniu szpiczaka plazmocytoowego, a inne pozostają w zaawansowanych fazach badań klinicznych [51-58]. Dzięki wprowadzeniu nowych terapii, odnotowano istotne wydłużenie PFS i OS. Zastosowanie nowych leków może dotyczyć zarówno chorych rozpoczynających leczenie jak i w przypadku nawrotu lub oporności choroby. Do nowych leków należą: pomalidomid (lek immunomodulujący III generacji), karfilzomib (inhibitor proteasomu II generacji), iksazomib (inhibitor proteasomu III generacji), przeciwciała monoklonalne, takie jak: daratumumab (anty-CD38) i elotuzumab (anty-CS1), panobinostat (inhibitor deacytlazy histonowej), a także wenetoklaks (doustny inhibitor bcl2), rikolinostat (doustny inhibitor deacetylazy histonowej), selineksor (inhibitor selektywnej eksportyny 1), izatuksimab (przeciwciało anty-CD38), meflufen (cytostatyk alkilujący działający poprzez peptydazy).

U chorych kwalifikujących się do wysokodawkowanej chemioterapii wspomaganej AHSCT, trwają badania kliniczne III fazy nad zastosowaniem kombinacji karfilzomibu, lenalidomidu oraz deksametazonu. Odnotowano wysoki odsetek odpowiedzi (w tym głębokiej z negatywizacją MRD) [51].

Inne badania mają na celu ocenę dodania do standardowego leczenia trójkowego przeciwciał monoklonalnych (daratumumab, elotuzumab) celem zwiększenia odsetka CR z ujemnym MRD przed planowanym AHSCT.

U chorych niekwalifikujących się do AHSCT oraz postaci opornych i nawrotowych podejmuje się próby zastosowania nowych leków w połączeniu z dotychczasowymi schematami leczenia w leczeniu indukującym remisję, ale także w monoterapii, jako leczenie podtrzymujące. Najczęściej są to przeciwciała monoklonalne (daratumumab, elotuzumab). Wyniki randomizowanych badań klinicznych III fazy – kombinacja daratumumabu z lenalidomidem i deksametazonem (POLLUX) lub z bortezomibem i deksametazonem (CASTOR) u chorych na nawrotowego/opornego szpiczaka plazmocytoowego - opublikowano w 2016 roku i stały się one podstawą do zarejestrowania daratumumabu przez FDA w tym wskazaniu w 2016 roku [52, 53].

Elotuzumab jest kolejnym przeciwciałem monoklonalnym, które uzyskało rejestrację również w 2016 roku w nawrotowym szpiczaku plazmocytowym, u chorych po co najmniej jednej linii leczenia. Podstawą stały się wyniki badania randomizowanego III fazy ELOQUENT-2, w którym stosowano lenalidomid i deksametazon w skojarzeniu lub nie z elotuzumabem [54].

W 2018 roku opublikowano wyniki randomizowanego badania klinicznego III fazy ALCYONE u chorych na nieleczzonego MM niekwalifikujących się do AHSCT, w którym jedna grupa chorych była leczona schematem MPV, a druga grupa – MPV + daratumumab. Wykazano, że dołączenie daratumumabu do terapii pozwala na zmniejszenie ryzyka progresji choroby i zgonu [55]. Na tej podstawie w roku 2018 FDA zarejestrowała schemat D-VMP do leczenia w tej grupie chorych, a już w roku 2019 na podstawie wyników kolejnych badań randomizowanych III fazy u chorych na MM niekwalifikujących się do AHSCT zarejestrowano do stosowania schemat D-Rd (daratumumab, lenalidomid, deksametazon – badanie MAIA), oraz schemat D-VTd (daratumumab, bortezomib, talidomid, deksametazon – badanie CASSIOPEIA) [56,57]

W 2019 roku opublikowano wstępne wyniki badań I/II fazy dotyczącej zastosowania terapii podtrzymującej iksazomibem u nowo zdiagnozowanych chorych na szpiczaka plazmocytoowego wskazujące na potencjalną korzyść w postaci pogłębienia odpowiedzi na leczenie i dobrego profilu bezpieczeństwa [58].

U chorych na nawrotowego/opornego szpiczaka plazmocytoowego w Polsce od listopada 2018 roku istnieje możliwość stosowania pomalidomidu w skojarzeniu z deksametazonem (u chorych, u których wcześniej stosowano lenalidomid i bortezomib).

1.7.6. Ocena odpowiedzi na leczenie u chorych na szpiczaka plazmocytoowego

Ocenę odpowiedzi szpiczaka mnogiego na leczenie przeprowadza się według ujednoliconych kryteriów przyjętych przez International Myeloma Working Group (IMWG) w 2006 roku oraz zaktualizowanych w 2014, opisujących następujące kategorie odpowiedzi [60].

- remisja całkowita (CR)
- rygorystyczna remisja całkowita (sCR; stringent CR)
- immunofenotypowa remisja całkowita
- molekularna remisja całkowita
- bardzo dobra remisja częściowa (VGPR)
- remisja częściowa (PR)
- stabilizacja choroby (SD)
- progresja choroby (PD)
- nawrót (relapse) z CR

1.8. Angiogeneza i jej rola w stanach fizjologicznych i patologicznych

Angiogeneza jest procesem formowania nowych naczyń krwionośnych z komórek śródbłonna już istniejących kapilarów, który zachodzi w dojrzałych tkankach [61]. Angiogeneza może występować w procesach fizjologicznych takich jak: wzrost organizmu, przerost mięśni pod wpływem wysiłku fizycznego, implantacja zarodka do błony śluzowej macicy, rozwój łożyska lub laktacja. Zdecydowanie częściej jednak do angiogenezy dochodzi w stanach patologicznych, zwłaszcza nowotworach, ale także np. w nadmiernym tworzeniu tkanki tłuszczowej i w konsekwencji - otyłości. Nie zawsze jest to zjawisko niepożądane jak na przykład proces tworzenia krążenia obocznego w przypadku miażdżycy naczyń wieńcowych.

Rolę angiogenezy w nowotworzeniu po raz pierwszy opisał Folkman, publikując wyniki badania wskazującego na zwiększoną ilość mikronaczyń w szpiku kostnym u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną [62].

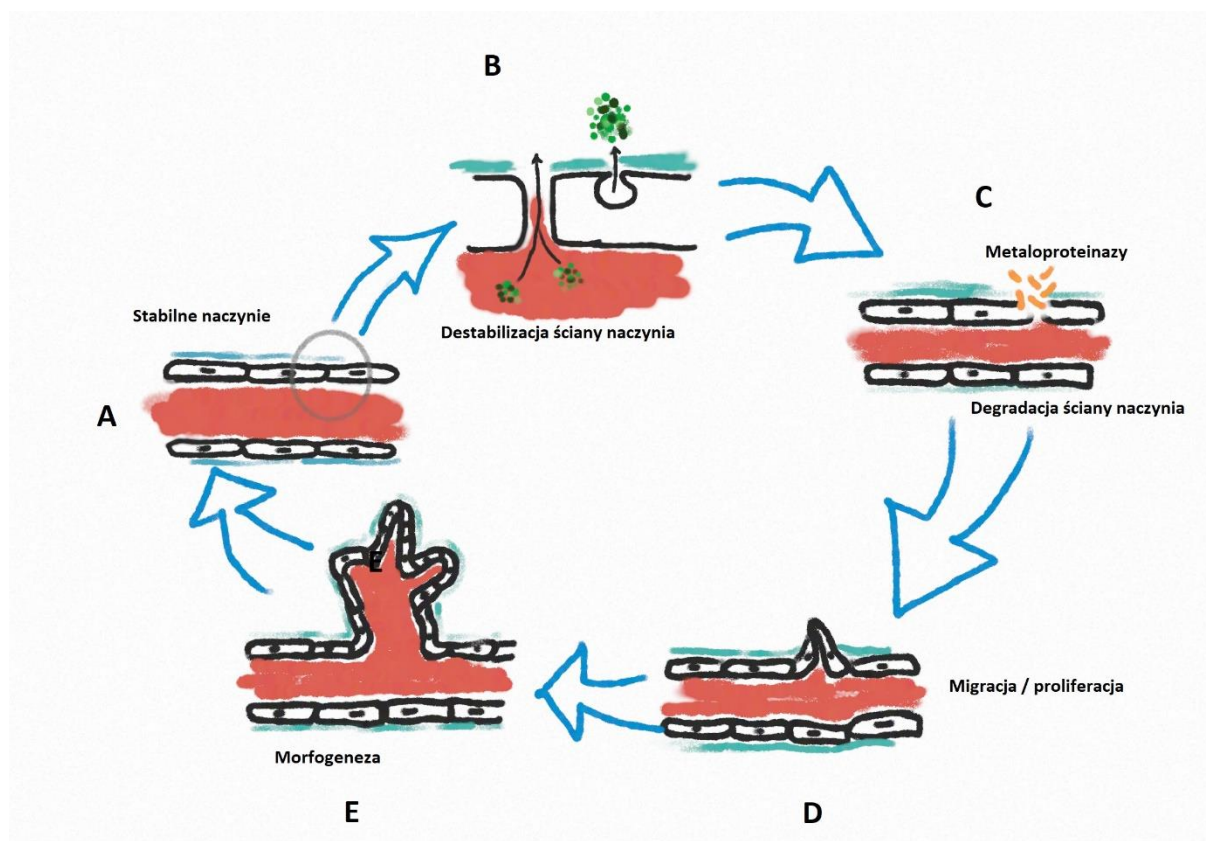
Tworzenie nowych naczyń nie jest jednolitym procesem i może przebiegać w kilku mechanizmach:

1. **Waskulogeneza** – proces zachodzący we wczesnych fazach rozwoju człowieka (embriogeneza). Naczynia krwionośne wytwarzane są z hemangioblastów, czyli komórek macierzystych śródbłonna, które powstają w woreczku żółtkowym zarodka.

2. **Arteriogeneza** – proces przekształcania istniejących wcześniej tętniczek kolateranych w dojrzałe naczynia, poprzez pogrubienie warstwy mięśniowej. Arteriogeneza może odgrywać istotną rolę w narządach niedotlenionych z powodu procesu miażdżycowego ograniczającego przepływ krwi przez naczynia.
3. **Angiogeneza** – proces, który wymaga obecności istniejącej już sieci naczyń krwionośnych i zachodzi na drodze tzw. pączkowania naczyń włosowatych pod wpływem różnych czynników pobudzających oraz hamujących.

Etapy procesu angiogenezy przedstawiono na rycinie 1. Angiogeneza jest procesem kilkuetapowym i zazwyczaj rozpoczyna się od pobudzenia komórek śródbłonna na skutek zwiotczenia ściany naczynia krwionośnego (proces mediowany przez tlenek azotu) (A). Pod wpływem interakcji białek pobudzających i hamujących, elementów macierzy zewnątrzkomórkowej oraz innych komórek, zmniejsza się przyleganie komórek śródbłonna i rozpoczyna się destabilizacja ściany naczynia (B), a następnie degradacja ściany naczynia przez metaloproteinazy (C). W kolejnych etapach dochodzi do migracji komórek śródbłonna i ich proliferacji (D). Równocześnie powstaje nowa błona podstawna naczyń, umacniana poprzez wbudowywanie perycytów, czyli komórek przydanki. Komórki śródbłonna łączą się ze sobą oraz błoną podstawną poprzez cząsteczki adhezyjne. Powoduje to stabilizację ściany nowopowstającego naczynia. Czynniki pobudzające angiogenezę powodują proliferację komórek śródbłonna. W kolejnych fazach dochodzi do rozdzielania i tworzenia pączków naczyniowych (E) i dojrzewania nowych naczyń krwionośnych [62, 63].

Rycina 1: Etapy procesu angiogenezy



W przypadku nowotworu, tworzenie nowych naczyń przebiega inaczej niż w warunkach fizjologicznych. Sieć nowo powstałych naczyń ma zazwyczaj charakter chaotyczny, charakterystyczne są także: zwiększona przepuszczalność ścian naczyń oraz zaburzenia przepływu krwi [63]. W angiogenezie nowotworowej istotną rolę odgrywa proces tzw. „przełącznika angiogennego” (z ang. angiogenic switch). Polega on na zaburzeniu równowagi pomiędzy czynnikami stymulującymi a hamującymi angiogenezę. Dochodzi do zmniejszenia wytwarzania czynników hamujących, a tym samym przewagi czynników pobudzających angiogenezę. Zjawisko to może zachodzić na każdym etapie rozwoju nowotworu, ale jest uzależnione od rodzaju nowotworu i jego interakcji z mikrośrodowiskiem [64]. Własna sieć naczyń krwionośnych jest istotnym elementem przetrwania i rozwoju guzów nowotworowych. Pośredniczą także w procesie rozsiewu nowotworu i chronią nowotwór przed układem odpornościowym.

1.9. Czynniki stymulujące i hamujące angiogenezę

Utrzymywanie równowagi pomiędzy czynnikami stymulującymi a hamującymi proces angiogenezy ma istotne znaczenie dla zapewnienia prawidłowego funkcjonowania organizmu i zapobiegania niepotrzebnemu tworzeniu naczyń. Czynniki wpływające na angiogenezę mogą działać w sposób endokrynnny (poprzez krwioobieg), parakrynnny (z przyległych komórek) lub autokrynnny (z komórek śródbłónka) a punktem docelowym są dla nich komórki śródbłónka naczyniowego. Czynniki proangiogenne mogą być wytwarzane zarówno przez komórki organizmu jak i komórki nowotworowe [62].

W tabeli 7 przedstawiono podział czynników proangiogennych oraz antyangiogennych w zależności od etapów angiogenezy, na których obserwuje się ich działanie [66].

Tabela 7: Czynniki stymulujące i hamujące angiogenezę w zależności od etapu angiogenezy [66]

Etapy procesu angiogenezy	Czynniki proangiogenne	Czynniki antyangiogenne
Degradacja błony podstawnej	uPA, TPA, MMPs	PAI, TIMPs
Migracja komórek śródbłónka	VEGF (A, B, C, D)	angiostatyna trombospondyna
Proliferacja komórek śródbłónka	PDGF, PDECGF, FGF	endostatyna, prolaktyna
Kanalizacja naczyń	angiopoetyna 1, TGF- α	interferony, angiopoetyna 2
Stabilizacja nowo powstałego naczyń	EGF angiogenina	

uPa (urokinase plasminogen activator) — urokinazowy aktywator plazminogenu; tPA (tissue plasminogen activator) — tkankowy aktywator plazminogenu; MMPs (metalloproteinases) — metaloproteinazy; TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) — tkankowe inhibitory metaloproteinaz; TGF (tumor growth factor) — czynnik wzrostu nowotworu; VEGF (vascular endothelial growth factor) — naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu; PDGF (platelet-derived growth factor) — czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego; PDECGF (platelet-derived endothelial cell growth factor) — czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego komórek śródbłónka; FGF (fibroblast growth factor) — fibroblastyczny czynnik wzrostu, EGF (endothelial growth factor) — nabłonkowy czynnik wzrostu

Zestawienie czynników proangiogennych i antyangiogennych pod względem budowy oraz funkcji w organizmie przedstawiono z kolei w tabeli 8 [63].

Tabela 8: Rodzaje czynników stymulujących i hamujących angiogenezę

Rodzaj	Czynniki proangiogenne	Czynniki antyangiogenne
Czynniki wzrostu	Angiogeniny, Angiotropiny, VEGF, GCSF, HGF, PDGF, TNF- α , TGF α i β , FGF a i b	
Inhibitory proteaz		TIMP-1, TIMP-2, PAI-1
Proteazy	uPA	
Onkogeny	c-myc, ras, c-src, c-jun	
Cytokiny	IL-1 IL-6 IL-8	IL-10 IL-12
Pierwiastki śladowe	miedź	cynk
Inne	erytopoetyna angiopoetyna-1 angiostatyna II endotelina tlenek azotu prostaglandyna E1 i E2 tromopoetyna urokinaza ceruloplazmina	angiopoetyna-2 angiotensyna angiostatyna endostatyna interferony α , β , γ , czynnik płytkowy-4 prolaktyna trombospondyna 1 i 2 troponina-1 somatostatyna witamina A retinoidy laminina

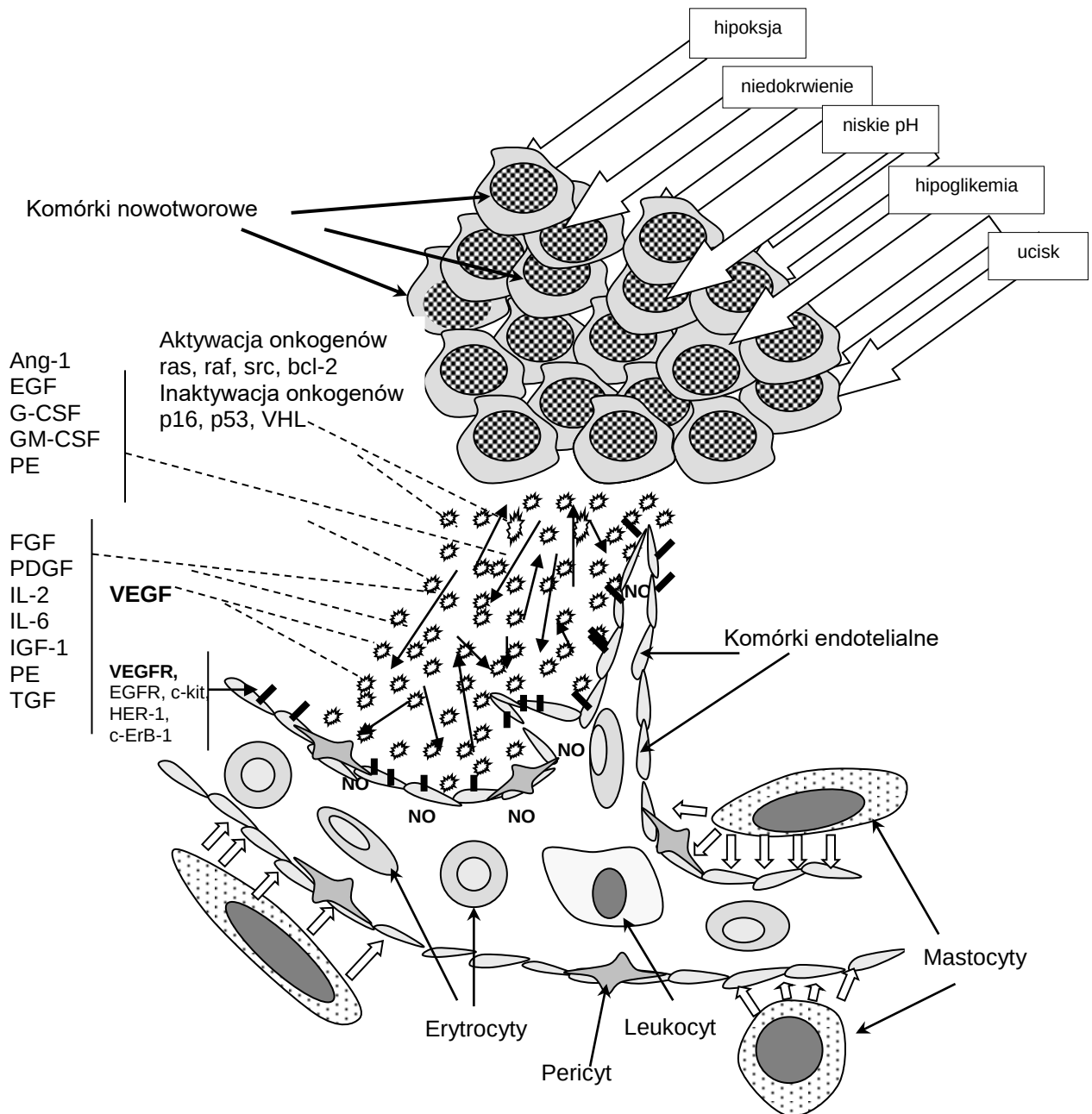
VEGF (vascular endothelial growth factor) — naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu, GCSF (granulocyte colony stimulating factor) - czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytarnych, HGF (hepatocyte growth factor) czynnik wzrostowy hepatocytów, PDGF (platelet-derived growth factor) — czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego, TNF- α (tumor necrosis factor α) czynnik martwicy nowotworów, TGF α i β (transforming growth factor) transformujący czynnik wzrostu, a i b FGF (fibroblast growth factor) czynnik wzrostowy fibroblastów, TIMP 1 i 2 (tissue inhibitors of metalloproteinases) — tkankowe inhibitory metaloproteinaz, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) - inhibitor aktywatora plazminogenu-1, uPa (urokinase plasminogen activator) — urokinazowy aktywator plazminogenu, IL (interleukin) – interleukiny

1.10. Znaczenie angiogenezy w szpiczaku plazmocytowym

Na zjawisko angiogenezy w szpiczaku plazmocytowym po raz pierwszy zwrócono uwagę w badaniu przeprowadzonym przez Vacca i wsp. Wykazano zwiększoną aktywność *in vitro* nowotworowych komórek plazmatycznych pobranych od pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym pod względem produkcji czynników proangiogennych w porównaniu do komórek plazmatycznych pobranych od chorych z MGUS oraz szpiczakiem tłącym [67].

W przypadku szpiczaka plazmocytoowego wykazano istnienie ścisłego związku pomiędzy komórką nowotworową a podścieliskiem szpiku kostnego. Kontakt patologicznego plazmocyta z komórkami podścieliska, fibroblastami, ale także komórkami tucznymi, makrofagami oraz limfocytami T prowadzi do zwiększonego wydzielania cytokin prozapalnych oraz czynników proangiogennych, takich jak: czynnik wzrostu dla śródbłónki naczyń (VEGF), czynnik wzrostu dla hepatocytów (HGF), czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF α), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), osteopontyna (OPN), metaloproteinazy, angiopoetyna-1 (Ang-1), interleukiny 6 i 8 (IL-6 i IL-8), czynnik pochodzenia zrębowego-1 (SDF-1, ang. stromal derived factor-1, CXCL1) [61, 62]. Czynniki regulujące proces angiogenezy w przypadku szpiczaka plazmocytoowego przedstawiono na rycinie 2.

Rycina 2: Czynniki regulujące proces angiogenezy



VEGFR – receptor dla naczyniowego czynnika wzrostu; PDGF – czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego; FGF – czynnik wzrostu dla fibroblastów; EGFR – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu; HER –receptor dla ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu; IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu 1; Ang-1 – angiopoetyna 1; EGF – naskórkowy czynnik wzrostu; G-CSF – czynnik wzrostu dla granulocytów; GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; PE – endostatyna w surowicy

Komórki szpiczakowe mogą same wytwarzać czynniki proangiogenne, ale także stymulować inne komórki mikrośrodowiska szpiku kostnego do ich produkcji. Istotną rolę w tym procesie odgrywają zwłaszcza makrofagi. Wykazano, że u chorych z szpiczakiem plazmocytowym, odnotowuje się większy odsetek makrofagów CD68+ niż w przypadku szpiczaka tłęcego lub MGUS [69]. Makrofagi mogą chronić komórki szpiczakowe zarówno przed spontaniczną jak i indukowaną chemioterapią apoptozą [71]. Dodatkowo, poddane działaniu czynników proangiogennych (VEGF i FGF-2), makrofagi mogą różnicować się do komórek posiadających cechy komórek śródbłonna, a więc współuczestniczyć w procesach angiogenezy [70].

W tabeli 9 przedstawiono zestawienie głównych rodzajów czynników angiogennych, wraz ze źródłem pochodzenia oraz działaniem u chorych na szpiczaka plazmocyтового [72].

Tabela 9: Czynniki angiogenne i ich rola w szpiczaku plazmocytowym

Czynnik angiogeny	Źródło	Receptory	Działanie w obserwacjach doświadczalnych
VEGF (naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu)	Komórki szpiczakowe (MMPCs) Komórki śródbłonna naczyniowego (MMECs)	VEGFR-2 na komórkach śródbłonna naczyniowego (ECs) VEGFR-1 na komórkach podścieliska szpiku kostnego (BMSCs) VEGFR-3 na komórkach szpiczakowych (MMPCs)	Zwiększona ekspresja w aktywnym szpiczaku Proliferacja, wzrost i chemotaksja MMECs i BMSCs Sekrecja IL-6 i VEGF przez BMSCs Ekspresja koreluje z MVD w szpiku
FGF-2 (fibroblastyczny czynnik wzrostu)	MMPCs	FGF-2R-2 receptor	Zwiększona ekspresja w aktywnym szpiczaku Proliferacja, wzrost i chemotaksja MMECs i BMSCs

Czynnik angiogeny	Źródło	Receptory	Działanie w obserwacjach doświadczalnych
			Sekrecja IL-6 i VEGF przez BMSCs Ekspresja koreluje z MVD w szpiku
HGF (czynnik wzrostowy hepatocytów)	MMPCs	c-Met	Zwiększona ekspresja w aktywnym szpiczaku
Ang-1 (angiopoetyna 1)	MMPCs	Tie-2/Tek	Zwiększona ekspresja w aktywnym szpiczaku. Ekspresja koreluje z gęstością mikronaczyń w szpiku. Wzmacnia nowopowstałe naczynia przez zwiększanie interakcji pomiędzy komórkami śródbłonna i komórkami okołosródbłonkowymi
Ang-2 (angiopoetyna 2)	MMPCs	Tie-2/Tek	Działanie angiogenne w obecności VEGF
IGF-1 (insulinopodobny czynnik wzrostu 1)	MMPCs, BMSCs MMECs	IGF-1R	Stymuluje MMPCs do sekrecji VEGF Zwiększona ekspresja w aktywnym szpiczaku Wzmacnia proliferację, wzrost i chemotaksję MMECs, BMSCs
IL-8 (inteleukina 8)	BMCs, MMECs	IL-8R	Zwiększona ekspresja w aktywnym szpiczaku
OPN (osteopontyna)	MMPCs, BMSCs MMECs	CD44	Korelacja z gęstością mikronaczyń w szpiku

Czynnik angiogeny	Źródło	Receptory	Działanie w obserwacjach doświadczalnych
MMP-2/9 (metaloproteinazy 2 i 9)	MMPCs, BMSCs MMECs	Izoformy kolagenu	Zwiększona ekspresja w aktywnym szpiczaku
PDGF-BB (czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego BB)	MMPCs	PDGFR β	Aktywuje komórki mięśni gładkich w tworzeniu nowopowstałego naczynia
ADM (adrenomodullina)	MMPCs	ADMR	W warunkach in vitro indukuje angiogenezę
TNF- α (czynnik martwicy nowotworów)	MMPCs, BMSCs MMECs	TNF- α R	Stymuluje sekrecję IL-6, ekspresję cząsteczek adhezyjnych i resorpcję kości
CXCL8/IL8 (chemokiny 8/IL8)	MMECs	CXCR2	Działanie parakrynnie pomiędzy MMECs i MMPCs celem zwiększenia proliferacji i chemotaksji MMPCs
CXCL11/I-TAC (chemokiny 11/I-TAC)	MMECs	CXCR3	Działanie parakrynnie pomiędzy MMECs i MMPCs celem zwiększenia proliferacji i chemotaksji MMPCs
CXCL12/SDF-1 α (chemokina 12/zrębowy czynnik wzrostu)	MMECs	CXCR4	Działanie parakrynnie pomiędzy MMECs i MMPCs celem zwiększenia proliferacji i chemotaksji MMPCs
TGF- β 1	MMPCs BMSCs MMECs	TGF- β 1R	Stabilizuje nowopowstałe naczynia

1.10.1. Naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF)

Naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF (z ang. vascular growth factor) stanowi rodzinę białek, które odgrywają kluczową rolę w procesie tworzenia naczyń krwionośnych [73]. VEGF został odkryty w 1983 roku – wyjściowo określany jako VPF – czynnik przepuszczalności naczyń (VPF – z ang. vascular permeability factor). Wytwarzanie VEGF jest stymulowane przez niedobór tlenu w różnych rodzajach komórek. W procesie tym znaczenie ma czynnik indukowany hipoksją HIF (z ang. hypoxia-inducible factor), który działa, jako czynnik transkrypcyjny prowadząc do nasilenia produkcji i uwalniania VEGF [74]. VEGF stanowi w istocie rodzinę białek: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F oraz PlGF (łożyskowy czynnik wzrostu). Z kolei VEGF-A występuje w postaci pięciu izoform (VEGF 121, 145, 165, 181, 206). Białka z rodziny VEGF łączą się ze swoimi specyficznymi receptorami, które umiejscowione są na komórkach śródbłonka. Receptory VEGF są złożone z domeny zewnątrzkomórkowej (siedem domen immunoglobulinopodobnych), pojedynczego przezbłonowego odcinka i wewnątrzkomórkowej rozszczepionej domeny – kinazy tyrozynowej. Pobudzenie receptora aktywuje proces proliferacji, wzrostu i migracji komórek śródbłonka oraz ich orientację przestrzenną w nowych naczyniach krwionośnych. Do receptorów dla czynników VEGF należą: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3. Dodatkowo neuropilina-1 i neuropilina-2 powodują zwiększenie powinowactwa białek VEGF do ich receptorów. Wykazano, że zwiększona produkcja VEGF towarzyszy wielu guzom litym (min. rakowi piersi, nerek, żołądka, pęcherza moczowego, trzonu i szyjki macicy oraz glejakowi wielopostaciowemu). VEGF stanowi jeden z celów badań nad nowymi terapiami antynowotworowymi [63].

Do najważniejszych mechanizmów, które pobudzają wytwarzanie VEGF przez komórki nowotworowe należą: niedotlenienie, działanie innych czynników proangiogennych (PDGF, TGF α i TGF β , bFGF) oraz mutacje onkogenów (np. p53). W warunkach doświadczalnych, w hodowlach tkankowych, wykazano zwiększenie ekspresji VEGF nawet 50-krotnie w atmosferze, która zawierała 0-3% tlenu w stosunku do hodowli w atmosferze zawierającej 21% tlenu [75].

Komórki szpiczakowe posiadają zdolność wydzielania VEGF. Oprócz aktywacji procesów związanych z angiogenezą, VEGF powoduje także stymulację sekrecji IL6 oraz VEGF przez komórki podścieliska szpiku kostnego zapoczątkowując pętlę

wydzielania parakrynnego [76]. Świadczy o tym obecność receptorów VEGFR-1 na komórkach szpiczakowych, których aktywacja powoduje proliferację komórek szpiczakowych na drodze sygnałowej MEK-1/ERK [77]. W badaniu Wróbel i wsp. (2003) wykazano zwiększenie ekspresji VEGF w szpiku kostnym u pacjentów z aktywnym szpiczakiem plazmocytowym [78].

1.10.2. Zasadowy czynnik wzrostu dla fibroblastów (bFGF)

Zasadowy czynnik wzrostu dla fibroblastów (bFGF, FGF β , FGF-2) należy do białek proangiogennych, które stymulują proliferację, migrację, mobilizację i przeżycie komórek śródbłónka w procesie tworzenia nowych naczyń. Cytokina bFGF powoduje także zwiększenie aktywności kolagenaz, dzięki czemu ułatwia migrację komórek śródbłónka poprzez destrukcję błony podstawnej naczyń. Stymuluje wytwarzanie kolagenu, fibronektyny, a także proteoglikanów, dzięki czemu wpływa na utrzymanie właściwej budowy nowopowstającego naczynia [79].

W szeregu przeprowadzonych badań odnotowano zwiększone stężenie bFGF zarówno w szpiku kostnym jak i surowicy krwi u chorych na szpiczaka plazmocytoowego [80, 81]. W badaniu Sezer i wsp. wykazano, że stężenie bFGF jest zwiększone u chorych na szpiczaka plazmocytoowego i ulega obniżeniu w przypadku skutecznej terapii [82]. Cytokina FGF-2 zwiększa sekrecję IL-6, która w sposób parakrynnny zwiększa wydzielanie FGF-2 przez komórki szpiczakowe, wpływając tym samym nie tylko na proces tworzenia nowych naczyń, ale także wzrost i przeżycie komórek szpiczakowych [83]. W badaniu Wróbel i wsp. (2017), u chorych na szpiczaka plazmocytoowego wykonywano genotypowanie alleli VEGF i bFGF za pomocą techniki PCR-RFLP. Rezultaty badania wskazują na istnienie związku polimorfizmu genu bFGF z przebiegiem klinicznym szpiczaka plazmocytoowego (ryzyko progresji choroby oraz odpowiedź na leczenie chemioterapeutyczne) [84].

1.10.3. Endoglina (CD105)

Endoglina (CD105) jest glikoproteiną, występującą na komórkach śródbłónka naczyń krwionośnych, które są w aktywnej fazie proliferacji i towarzyszy receptorowi

TGF- β . Posiada zdolność wiązania TGF- β 1, TGF β 3, aktywiny A, BMP-2 i BMP-7, biorąc udział w procesie angiogenezy, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych – przede wszystkim kontroli proliferacji komórek śródbłonna, ale także ich migracji. W nowotworach litych, endoglina może być obecna zarówno w naczyniach zlokalizowanych w obrębie guzów nowotworowych jak i naczyniach obocznych [85].

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że stężenie rozpuszczalnej endogliny (sCD105) w osoczu u pacjentów chorych na nowotwory ma związek ze stopniem zaawansowania choroby, skutecznością zastosowanego leczenia, ale także ryzykiem progresji [86]. Jest udowodnionym czynnikiem predykcyjnym powstawania przerzutów w nowotworach piersi lub odbytnicy [87].

U chorych na szpiczaka plazmocytozy odnotowano zwiększone stężenia rozpuszczalnej endogliny w osoczu, korelujące z ISS, które mogą ulegać obniżeniu w przypadku skutecznego leczenia [88]. W badaniu Tsirakis i wsp. porównywano średnie stężenia sCD105 w grupie chorych na szpiczaka plazmocytozy, MGUS z grupą kontrolną osób zdrowych. Stężenia sCD105 były istotnie wyższe w grupie chorych, ze zróżnicowaniem w zakresie stopnia zaawansowania choroby. Odnotowano także korelację z Ki-67, MVD i IL-6 [89]. Obserwacje te mogą wskazywać na rolę endogliny z procesie angiogenezy związanym z progresją choroby.

1.10.4. FLT-3 ligand

FLT-3 ligand jest białkiem związanych z procesem hematopoezy. Aktywacja receptora FLT-3 związanego z kinazą tyrozynową klasy III powoduje uruchomienie procesów związanych ze wzrostem, różnicowaniem komórek macierzystych i progenitorowych krwiotworzenia, co zaobserwowano zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. FLT-3 ligand wchodzi w interakcje z innymi cytokinami jak np. interleukina 7 (IL-7) oraz czynnikiem komórek macierzystych (SCF) [90]. Uważa się także, że cytokina ta odgrywa istotną rolę we wczesnym rozwoju limfocytów B oraz komórek dendrytycznych. Wyniki badań sugerują, że FLT3 ligand może być markerem progresywnej postaci chłoniaka Hodgkina, ale także szpiczaka plazmocytozy [91].

Istotnym źródłem FLT-3 ligand w szpiku kostnym mogą być komórki śródbłonna naczyń umiejscowionych w szpiku kostnym, stymulowane przez czynniki takie jak:

interferon- α , MIP1- α (makrofagalne białko zapalne-1 alfa - z ang. macrophage inflammatory protein 1 alfa), oraz TGF- β [92].

W badaniu Kokonozaki i wsp. po raz pierwszy odnotowano zwiększone stężenie rozpuszczalnej formy FLT-3 ligand u chorych na szpiczaka plazmocytoowego [91]. W badaniu Steiner i wsp. stwierdzono zależność pomiędzy wysokimi stężeniami FLT3-L w szpiku kostnym i krwi obwodowej u chorych na szpiczaka plazmocytoowego a nawrotową i oporną postacią choroby [93]. Wydaje się, że cytokina ta może stanowić przydatny marker diagnostyczny i terapeutyczny.

1.11. Zastosowanie leczenia antyangiogennego w szpiczaku plazmocytoowym

Aktualne podejście w leczeniu onkologicznym, poza konwencjonalną chemioterapią zmierza ku terapii zindywidualizowanej. Celem terapii przeciwnowotworowej staje się nie tylko sam nowotwór, ale także jego mikrośrodowisko. Proces angiogenezy wydaje się istotnym czynnikiem zarówno dla wzrostu jak i przeżycia nowotworu. Niektóre leki stosowane w terapii szpiczaka plazmocytoowego wykazują działanie antyangiogenne i mogą być stosowane zarówno w monoterapii lub stanowić element złożonego schematu leczenia [65].

Pierwszym lekiem o potencjalnym działaniu antyangiogennym w leczeniu szpiczaka plazmocytoowego był talidomid. Początkowo stosowany w monoterapii, wykazał skuteczność u chorych na opornego szpiczaka plazmocytoowego – częściową odpowiedź na leczenie uzyskało prawie 1/3 pacjentów, a 14% chorych uzyskało całkowitą remisję [94]. Mechanizm efektu antyangiogennego talidomidu nie został do końca poznany. Zaobserwowano, że talidomid może wykazywać istotne działanie immunomodulujące poprzez zmniejszenie syntezy TNF- α , oraz wewnątrzkomórkowej cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM, co wpływa na interakcję pomiędzy komórkami podścieliska szpiku a komórkami szpiczakowymi [95]. W badaniu Gupta i wsp. odnotowano istotne zmniejszenie ekspresji białek proangiogennych (VEGF oraz interleukiny 6) u chorych na szpiczaka plazmocytoowego w wyniku zastosowania talidomidu oraz nowszego leku immunomodulującego – lenalidomidu [96]. W badaniu Lu i wsp., które przeprowadzono w warunkach *in vitro*, wykazano, że lenalidomid

hamuje tworzenie mikronaczyń w sposób zależny od dawki [97]. Pomalidomid, który jest jeszcze nowszą cząsteczką należącą do grupy leków immunomodulujących, hamuje proces angiogenezy poprzez zmniejszenie migracji i adhezji komórek śródbłónka naczyniowego oraz zmniejszenie stężenia VEGF i HIF-1 [98].

Bortezomib jest lekiem należącym do grupy inhibitorów proteosomu i selektywnym inhibitorem czynnika jądrowego (NF- κ B), blokując w sposób specyficzny podjednostkę β proteosomu 26S. Działanie przeciwnowotworowe bortezomibu może być także związane z hamowaniem angiogenezy. W badaniu Roccaro i wsp. w modelu doświadczalnym zaobserwowano zależne od dawki bortezomibu hamowanie wytwarzania VEGF, IL-6, IGF-1 oraz angiopoetyny 1 i 2 [99]. Podobne działanie antyangiogenne przypisuje się dla karfilzomibu, inhibitora proteosomu II generacji.

Z uwagi na udowodnioną rolę, jaką cytokiny z rodziny VEGF odgrywają w rozwoju i progresji wielu nowotworów, w tym szpiczaka plazmocytozy, istnieje już kilka zarejestrowanych leków anti-VEGF, inne pozostają w fazie badań klinicznych. W badaniu White i wsp. chorym na opornego i nawrotowego szpiczaka plazmocytozy podawano bewacyzumab, przeciwciało monoklonalne, które wiąże się z VEGF, hamując jego wiązanie z receptorami Flt-1 (VEGFR-1) i KDR (VEGFR-2) na powierzchni komórek śródbłónka. Niestety nie odnotowano istotnej różnicy dotyczącej PFS u chorych leczonych bortezomibem i bewacyzumabem w porównaniu z chorymi leczonymi bortezomibem w monoterapii [100]. Podobne obserwacje dotyczyły badań z innymi lekami anti-VEGF jak semaxanib (SU5416) — inhibitor kinazy tyrozynowej VEGFR-2, c-Kit oraz FLT3, pazopanib – inhibitor kinaz tyrozynowych o aktywności skierowanej przeciw receptorom (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR- α i β), czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR) i receptora czynnika komórek macierzystych (c-KIT) [101, 102].

MikroRNA (miRNA) to grupa małych, niekodujących RNA, które w postaci dojrzałej regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. Wykazano, że niektóre miRNA mogą być zaangażowane w proces angiogenezy nowotworowej. W badaniu Roccaro i wp. wykazano, że u chorych na opornego i nawrotowego szpiczaka plazmocytozy dochodzi do niedoboru miRNA-15 i miRNA16, które w warunkach in vitro wpływają na proces formowania kapilar i proliferację komórek śródbłónka naczyniowego. W przypadku udanej transfekcji cząsteczek pre-miRNA-15 i pre-miR-16 do komórek szpiczakowych, uzyskano istotne zahamowanie sekrecji VEGF [103].

Kolejną cząsteczką miRNA, której niedobór można stwierdzić w komórkach szpiczaka plazmocytoowego jest miR-199a-5p, której bezpośrednim celem jest HIF1- α . Zwiększenie ekspresji miR-199a-5p może prowadzić do zmniejszenia ekspresji HIF1- α , a tym samym stężenia czynników proangiogennych jak bFGF, VEGF-A i IL-6 w nowotworowych plazmocytach w warunkach *in vitro* [104].

1.12. Metody oceny angiogenezy

Metody oceny procesu angiogenezy możemy podzielić na bezpośrednie oraz pośrednie. Metody bezpośrednie opierają się na badaniu histopatologicznym fragmentu wybranej tkanki, gdzie dokonuje się oceny gęstości unaczynienia, natomiast metody pośrednie polegają na pomiarze stężeń lub ekspresji wybranych białek związanych z angiogenezą.

1.12.1. Metody bezpośredniej oceny angiogenezy

W metodzie bezpośredniej, wykładnikiem nasilenia stopnia angiogenezy jest ocena gęstości mikronaczyń MVD (z ang. microvessel density). Tkanka nowotworowa zawiera obszary cechujące się wysoką zawartością nowych, nieprawidłowych naczyń krwionośnych, układających się w sposób kłębkowy. Miejsca o wysokim unaczynieniu są nazywane „hot spots”. Oprócz miejsc „hot spots”, w tkance nowotworowej są także obszary, które zawierają niewielką liczbę naczyń. Metoda oceny MVD po raz pierwszy została opracowana przez Weidner’a i jest nadal stosowana z modyfikacjami.

Punktem wyjścia dla tej metody stanowi odpowiednie barwienie immunohistochemiczne za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko markerom, które są specyficzne dla komórek śródbłónka naczyniowego. Do markerów tych należą: antygen CD34, CD31 oraz czynnik von Willebrandta, rzadziej VE-kadhedryna, CD105, typ IV kolagenu oraz $\alpha\beta 3$ integryna [105]. Czynnik von Willebrandta jest glikoproteiną, która umiejscowiona jest na powierzchni komórek śródbłónka i bierze udział w ich adhezji. Antygen CD34 (sialomucyna) występuje w wyższym stężeniu niż czynnik von Willebrandta i reguluje proces migracji komórek śródbłónka, pojawia się we wczesnym etapie tworzenia nowych naczyń, ich różnicowania oraz dojrzewania. Z

kolei glikoproteina CD31 należy do cząsteczek PECAM (płytkowo-śródbłonkowe cząsteczki adhezji komórkowej, (z ang. platelet endothelial cell adhesion molecule). Antygen CD105 (endoglina) staje się coraz bardziej przydatnym markerem dla oceny MVD w tkance nowotworowej. W badaniu Moghaddam i wsp. oceniano znaczenie endogliny, jako markera angiogenezy w glejaku mózgu. Gęstość naczyń oceniana z wykorzystaniem endogliny była istotnie wyższa w tkance nowotworowej niż w prawidłowej tkance mózgowej, podczas gdy nie odnotowano takiej zależności przy wykorzystaniu antygenu CD31 [106].

W metodzie MVD, oceniając preparaty odpowiednio zabarwionej immunohistochemicznie tkanki pod mikroskopem przy małym powiększeniu, wyszukuje się miejsca „hot spots”. Następnie, używając dużego powiększenia, oblicza się ilość pojedynczych naczyń w danym obszarze. Zgodnie z metodą Weidnera, jako naczynie definiuje się zarówno uformowane naczynie jak i pojedynczą komórkę śródbłonka. Zdaniem innych badaczy, naczyniem można nazwać jedynie strukturę, która posiada widoczne światło. W metodzie MVD, jako wynik przyjmuje się średnią liczbę naczyń/mm². Dokonuje się oceny od 3 do 10 miejsc „hot spots” [105].

Podczas gdy metoda MVD dostarcza informacji głównie na temat oceny profilu gęstości naczyń, metodą pozwalającą na ocenę powierzchni lub objętości zajmowanej przez naczynie jest metoda Chalkley’a. Podobnie jak w przypadku MVD, naczynia wybarwia się immunohistochemicznie, a następnie do pomiarów wykorzystuje tzw. siatkę kartograficzną Chalkley’a z zaznaczonymi 25 punktami, nałożoną na okular. Po znalezieniu w preparacie miejsc „hot spots” dokonuje wyboru trzech lub czterech obszarów, w którym największa liczba punktów siatki nakłada się na naczynie barwione immunohistochemicznie [107].

Wraz z postępem metod oceny histopatologicznej, istnieje możliwość rejestrowania obrazów uzyskanych pod mikroskopem za pomocą kamery cyfrowej i oceny za pomocą programu do analizy obrazu. Pozwala to na dokonanie komputerowej analizy morfometrycznej i obliczenie nie tylko ilości naczyń w polu widzenia, ale także powierzchni i objętości [108, 109].

Całkowita powierzchnia mikronaczyń (TVA – z ang. total micorvascular area) pozwala na określenie powierzchni zajętej przez naczynia włosowate w tkance nowotworowej. Oblicza się ją poprzez wykorzystanie odpowiedniego obiektywu charakteryzującego się znaną średnicą widzenia w polach „hot spots”.

W 2016 roku, Marien i wsp. opublikowali pracę dotyczącą alternatywnej metody oceny mikronaczyń z wykorzystaniem WSI – obrazów cyfrowych całych preparatów mikroskopowych (z ang. whole-slide images). Metoda ta pozwala na analizę unaczynienia w całym preparacie, nie tylko w wybranych miejscach [110].

Metodą, która dostarcza informacji dotyczących nie tylko cech histologicznych, ale także aktywności czynników, które wpływają na proces angiogenezy jest oparowany przez Mehta i wsp. indeks angiogeniczny (AI – z ang. angiogenesis index). Wskaźnik oblicza się na podstawie systemu punktacji parametrów takich jak: ekspresja trombospondyny-1, białka p53 oraz liczby naczyń włosowatych. Liczba uzyskanych punktów koreluje z rokowaniem, jako czynnik prognostyczny całkowitego przeżycia chorych [111].

1.12.2. Metody pośredniej oceny angiogenezy

Metoda pośrednia oceny angiogenezy obejmuje badanie aktywności cytokin proangiogennych w osoczu, surowicy lub w moczu za pomocą ilościowych testów immunoenzymatycznych (ELISA, z ang. enzyme-linked immunosorbent assay) a także oceny ekspresji tych cytokin lub ich receptorów w tkance nowotworowej za pomocą metody Western blot oraz reakcji łańcuchowej polimerazy qPCR [112]. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że dobrym i nieinwazyjnym wskaźnikiem oceny intensywności angiogenezy może być ocena liczby krążących komórek śródbłónka (CECs – z ang. circulating endothelial cells) we krwi obwodowej [113].

2. Założenia i cele pracy

Jak już wspomniano na początku pracy, szpiczak plazmocytowy jest chorobą heterogenną, cechującą się trudnym do przewidzenia przebiegiem i rokowaniem. Dlatego też, wciąż trwają badania nad określeniem potencjalnych nowych czynników pozwalających na dokładniejsze określenie stopnia zaawansowania oraz rokowania. Dotychczas udowodniono, że większy stopień nasilenia angiogenezy w obrębie guza nowotworowego może korelować z zaawansowaniem, gorszym przebiegiem i odpowiedzią na leczenie niektórych nowotworów litych. Wiele prac wskazuje na to, że podobne obserwacje mogą dotyczyć także nowotworów hematologicznych, w tym szpiczaka plazmocyтового. Stopień nasilenia angiogenezy można oceniać różnymi metodami, zarówno histopatologicznymi jak i laboratoryjnymi, co rodzi pytanie, czy i jaka metoda może być potencjalnie lepszym narzędziem, które będzie można wykorzystywać w postępowaniu diagnostycznym i rokowniczym u pacjentów chorych na szpiczaka plazmocyтового.

W związku z powyższym, ustalono następujące cele pracy:

1. Ocena korelacji stopnia nasilenia angiogenezy metodą MVD oraz stężenia białek proangiogennych (endogлина, VEGF A, VEGF B, FGF2, FLT3) z wybranymi parametrami klinicznymi, histopatologicznymi i genetycznymi określonymi w momencie diagnozy u chorych na szpiczaka plazmocyтового
2. Ocena korelacji stopnia nasilenia angiogenezy metodą MVD oraz stężenia białek proangiogennych (endogлина, VEGF A, VEGF B, FGF2, FLT3) wynikami chemioterapii pierwszej linii u chorych na szpiczaka plazmocyтового.
3. Ocena wartości prognostycznej stopnia nasilenia angiogenezy metodą MVD oraz stężenia białek proangiogennych (endogлина, VEGF A, VEGF B, FGF2, FLT3) dla wyników wczesnych chemioterapii pierwszej linii u chorych na szpiczaka plazmocyтового.

3. Materiał i metody

3.1. Dane kliniczne

Badanie miało charakter jednoośrodkowy, prospektywny. Do badania włączono 53 chorych na nowo zdiagnozowanego szpiczaka plazmocytozowego w Oddziale Hematologicznym SPZOZ Zespole Szpitali Miejskich w Chorzowie w okresie od lipca 2016 roku do lipca 2018 roku. Pacjenci po przekazaniu im pełnej informacji na temat badania, wyrazili świadomą zgodę na swój udział w projekcie.

Kryteria włączenia do badania:

1. Wiek ≥ 18 roku życia
2. Potwierdzone rozpoznanie szpiczaka plazmocytozowego (postać wydzielająca) zgodnie z kryteriami IMWG
3. Podpisanie świadomej i dobrowolnej zgody pacjenta na wzięcie udziału w badaniu

Kryteria wyłączenia z badania:

1. Rozpoznanie postaci niewydzielającej szpiczaka plazmocytozowego
2. Poprzedzająca włączenie do badania terapia onkologiczna
3. Czynna infekcja ostra lub przewlekła
4. Istotne obciążenia kliniczne:
 - Niewydolność serca w klasie czynnościowej III-IV wg NYHA
 - Objawowa choroba niedokrwienności serca
 - Zawał mięśnia sercowego w ciągu 6 miesięcy od włączenia do badania
 - Istotna klinicznie arytmia
 - Istotne kliniczne i oporne nadciśnienie tętnicze (NTO)
 - Niekontrolowana cukrzyca definiowana, jako $HbA1c > 8$ g/dl
 - Istotna klinicznie astma oskrzelowa lub/i POCHP
5. Potwierdzona lub podejrzewana ciąża i okres karmienia piersią

Rozpoznanie szpiczaka plazmocytoowego ustalano na podstawie kryteriów wg IMWG z 2014 roku [15]. W ramach badań diagnostycznych u chorych przeprowadzano szczegółowy wywiad lekarski, badanie fizykalne, wykonywano badania laboratoryjne (morfologia krwi obwodowej z rozmazem, ALT, AST, bilirubina całkowita, bilirubina pośrednia, glukoza, kreatynina, kwas moczowy, LDH, sód, potas, chlorki, wapń całkowity, albumina, wolne łańcuchy kappa, wolne łańcuchy lambda, ratio kappa/lambda, IgG, IgM, IgA, $\beta 2$ mikroglobulina, elektroforeza białek surowicy oraz moczu), biopsję aspiracyjną szpiku z rękojeści mostka lub talerza kości biodrowej. U chorych pobierano 2 ml szpiku (z biopsji aspiracyjnej, z pierwszej porcji) do sterylnej probówki z heparyną litową. Probówki zabezpieczano a następnie wysyłano do Pracowni Cytogenetyki IHIT w Warszawie celem wykonania badania FISH pod kątem czynników złego rokowania: delecja genu TP53, rearanżacje genu IGH – t(4;14), t(14;16).

Dodatkowo pobierano szpik celem wykonania rozmazów i oceny mikroskopowej nacieku komórkami plazmatycznymi (mielogram). U chorych wykonywano zdjęcia radiologiczne kośćca celem oceny obecności zmian osteolitycznych.

W pierwszym etapie badań mających na celu oznaczenie stężenia białek angiogennych, zabezpieczono od każdego chorego 20 ml krwi żyłnej pobranej z żyły łokciowej do jałowych probówek typu Vacutainer (Becton Dickinson) zawierających antykoagulant (EDTA) i przekazano do lokalnego laboratorium szpitalnego. Probówki następnie wirowano w laboratorium przez 10 minut z szybkością 1000 obrotów/minutę. Osocze odpipetowywano do jałowych probówek i przechowywano w temperaturze – 70 °C do czasu wykonania analizy.

U chorych wykonywano także trepanobiopsję szpiku z kolca biodrowego tylnego górnego. Materiał z trepanobiopsji był przekazywany do Pracowni Histopatologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach Ligocie. Ocenę stężenia endogliny, VEGFA, VEGFB, FGF2, FLT3 w surowicy krwi (metodą immunoenzymatyczną ELISA) przeprowadzono w Centralnym Laboratorium Śląskich Laboratoriów Analitycznych sp. zoo za pomocą zestawów firmy Cloud Clone corp.

Po ustaleniu rozpoznania szpiczaka plazmocytoowego, chorzy otrzymywali leczenie pierwszej linii zgodnie z obowiązującymi standardami, według schematów opartych na bortezomibie. Wczesną odpowiedź na leczenie pierwszej linii oceniano po

zakończeniu VI cykli leczenia, chyba, że wcześniej stwierdzano cechy progresji choroby lub zgon chorego.

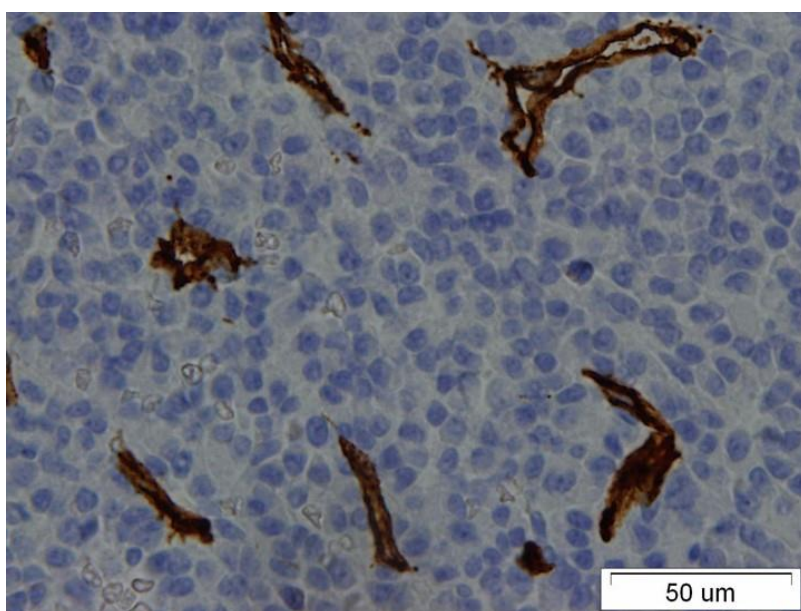
Ocenę odpowiedzi szpiczaka mnogiego na leczenie przeprowadzono według ujednoliconych kryteriów przyjętych przez IMWG w 2006 roku oraz zaktualizowanych w 2014.

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach w dniu 10.05.2016 (Uchwała nr KNW/0022/KBI/20/I/16).

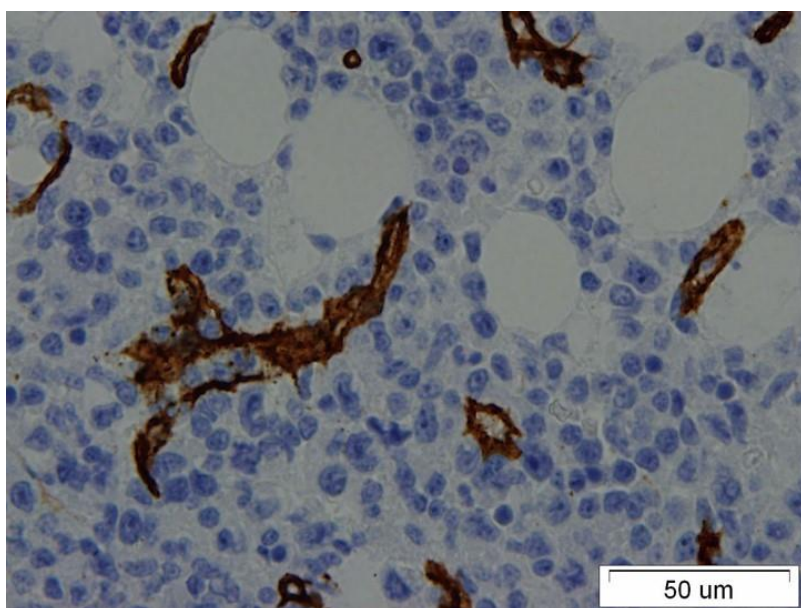
3.2. Ocena histopatologiczna i ocena średniej gęstości naczyń

Materiał tkankowy uzyskany za pomocą trepanobiopsji szpiku bezpośrednio po pobraniu umieszczano bezpośrednio w utrwalaczu oxfordzkim (formaldehyd 40%, kwas octowy lodowaty, NaCl, woda destylowana) przez 48-72 h. Następnie materiał był przekazywany do pracowni histopatologicznej, gdzie płukano go przez 30 minut w wodzie destylowanej. Po utrwaleniu, materiał z trepanobiopsji umieszczano w roztworze buforowym Tris przez około 72 h. Następnie poddano go standardowej obróbce tkankowej i zatapiano w parafinie. Bloczki parafinowe krojono na skrawki grubości 2-3 μm i nanoszono na szkiełka podstawowe. Tkankę barwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną (HE). Uzyskane preparaty poddano standardowej ocenie histopatologicznej, jaką wykonuje się w diagnostyce szpiczaka plazmocytoowego. Oceniono odsetkowy naciek komórkami plazmatycznymi oraz stopień włóknienia retikulinowego. Wykonano także barwienie w kierunku obecności amyloidu.

Dla celów związanych z oceną angiogenezy, wykorzystano panel barwień immunohistochemicznych i histochemicznych za pomocą Dako Autostainer Link 48 zgodnie z zaleceniami producenta. We wszystkich analizowanych przypadkach do wyznakowania naczyń włosowatych przy obliczaniu gęstości mikronaczyń w skrawkach (MVD) zastosowano mysie przeciwciała monoklonalne Anti-Human CD34, class II, clone QBEnd10 and poliklonalne przeciwciała królicze Anti-Human CD117, clone A4502. Wszelkie procedury związane z barwieniem (procedura wstępna mająca celu cieplne odmaskowanie antygeny (HIER), procedura barwienia i interpretacja wyniku) przeprowadzono za pomocą urządzenia Dako Omnis.



Rycina 3: Obraz szpiku kostnego w preparacie trepanobioptatu z wybarwionymi naczyniami krwionośnymi



Rycina 4: Obraz szpiku kostnego w preparacie trepanobioptatu z wybarwionymi naczyniami krwionośnymi

Dla oznaczenia średniej gęstości naczyń w preparatach trepanobioptatu wybierano miejsca o subiektywnie największej ilości naczyń („hot spots”) używając powiększenia x40 (HPF - high power fields), następnie x100, naczynia liczono przy powiększeniu x400 przy pomocy programu komputerowego firmy Olympus - Cell B software w 10 polach widzenia, następnie wyliczano średnią arytmetyczną oraz

medianę. Pole widzenia miało wymiar 222,52 x 166,4 μm . Na rycinach 3 i 4 przedstawiono obraz mikroskopowy szpiku kostnego (powiększenie 400x) z uwidocznionymi wybarwionymi immunohistochemicznie mikronaczyniami krwionośnymi.

3.3. Analiza osoczowych stężeń białek proangiogennych

W celu oznaczania osoczowych stężeń: VEGF A, VEGF B, VEGF C, FGF2, FLT-3 oraz endogliny wykorzystywano metodę immunoenzymatyczną ELISA. W badaniach zastosowano gotowe zestawy firmy Cloud Clone corp.

Wyjściowo, analizowane osocze pacjenta było inkubowane z płytkami reakcyjnymi opłaszczanymi przeciwciałem monoklonalnym specyficznym dla badanego czynnika. Białka proangiogenne zawarte w osoczu (VEGF A, VEGF B, VEGF C, FGF2, endoglina, FLT-3) były specyficznie wiązane i unieruchamiane na powierzchni, tworząc w ten sposób fazę stałą reakcji. Następnie po wypłukaniu zbędnych składników, do studzienki dodawano specyficzne przeciwciała sprzężone z peroksydazą chrzanową (specyficzne dla badanego składnika). W wyniku reakcji otrzymywano kompleks immunologiczny o strukturze „kanapkowej”. Kompleks stanowiło opłaszczane na płytce przeciwciało monoklonalne I rzędu –badane białko proangiogenne – przeciwciało monoklonalne II rzędu, które było znakowane enzymem. Kolejnym etapem było usunięcie substancji niezwiązanych z kompleksem immunologicznym. Wówczas do układu reakcyjnego dodawano roztwór substratu dla enzymu znacznikowego: tetrametylobenzydynę i rozcieńczony kwas. Pomiaru absorbancji dokonywano za pomocą czytnika do mikropłytek LEDETEC. Wartość absorbancji odczytywano dla długości fali $\lambda=450\text{ nm}$ stężenia badanego parametru w oparciu o wielopunktową krzywą kalibracyjną. Oznaczenia osoczowych stężeń białek proangiogennych wyrażano w: VEGF A – pg/ml, VEGF B – pg/ml, VEGF C – ng/ml, FGF2 – pg/ml, endoglina – ng/ml, FLT-3 – pg/ml.

Progi detekcji (LLD-Lower Limit of Detection) dla poszczególnych białek proangiogennych były następujące:

- VEGF A 7,9 pg/ml

- VEGF B 5,5 pg/ml
- VEGF C 0,057 ng/ml
- endogлина 0,063 ng/ml
- FGF2 4,67 pg/ml
- FLT-3 12,2 pg/ml

3.4. Metody statystyczne

Zmienne jakościowe przedstawiono, jako częstości bezwzględne wraz z odsetkiem ich poszczególnych kategorii. Do oceny zależności pomiędzy zmiennymi jakościowymi wykorzystano test χ^2 bądź dokładny test Fishera, gdy liczba obserwacji w poszczególnych kategoriach była niewielka.

Rozkłady zmiennych ilościowych zgodne z rozkładem normalnym scharakteryzowano poprzez średnią wraz z odchyleniem standardowym lub medianę oraz dolny i górny kwartyl w przypadku, gdy rozkład odbiegał od normalnego. Ocenę zgodności z rozkładem normalnym przeprowadzono w oparciu o test Shapiro-Wilka. Do porównania zmiennych ilościowych w dwóch podgrupach wykorzystano test t-Studenta, gdy rozkład był zgodny z normalnym, w przeciwnym wypadku stosowano test U Manna-Whitney'a. W przypadku podziału na więcej niż dwie grupy zmienne ilościowe o rozkładzie normalnym porównano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), dodatkowo przeprowadzono test trendu liniowego, z kolei gdy rozkład odbiegał od normalnego porównania oparto o test Kruskala-Wallisa, natomiast trend liniowy oceniono z wykorzystaniem testu Jonckheere-Terpstra. Siłę zależności pomiędzy zmiennymi ilościowymi obliczono przy użyciu współczynnika korelacji Spearmana. Do oceny jakości potencjalnych testów diagnostycznych w predykcji odpowiedzi na leczenie wykreślono krzywe ROC (ang. Receiver Operating Characteristic), obliczono pole powierzchni pod krzywą (AUC - ang. area under curve) wraz z 95% przedziałem ufności wyznaczonym w oparciu o metodę DeLong [110]. Optymalny punkt odcięcia dla krzywej ROC wyznaczono na podstawie wskaźnika Youdena.

Poziom statystycznej znamienności ustalono jako $\alpha = 0,05$. Analizy statystyczne wykonano przy pomocy pakietu statystycznego SAS, wersja 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

3.5. Metody oceny cytogenetycznej

W badaniu przeprowadzano ocenę cytogenetyczną za pomocą metody fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH, z ang. fluorescence in situ hybridization).

Panel badania FISH wykonanego w Pracowni Cytogenetyki IHIT w Warszawie obejmował następujące aberracje:

1. Rearanżację genu IGH (14q32)
2. translokację t(4;14) powodującą fuzję genową IgH/FGFR3 *switch region translocation* – t(4;14)(p16;q32)
3. translokację t(14;16) powodującą fuzję genową IgH/c-MAF- t(14;16)(q32;q23)
4. ocenę liczby kopii genów TP53 i ATM (delecja genu TP53, hypo-, hyperdiploidia)

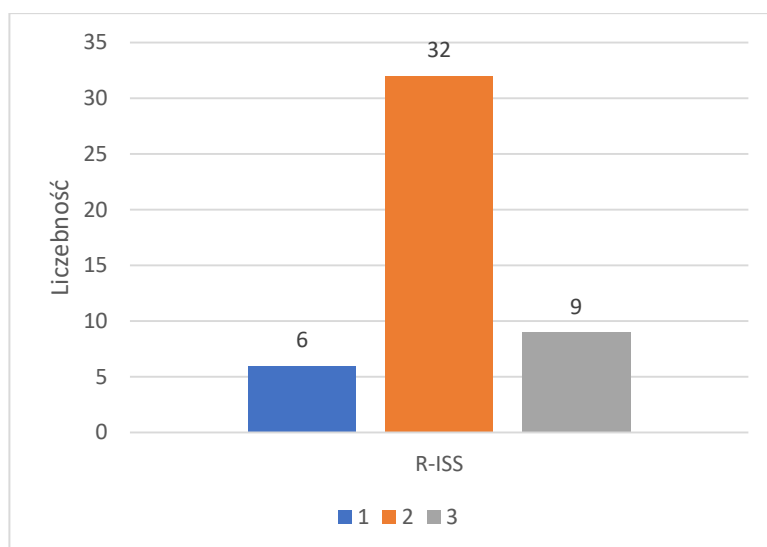
Materiałem badanym były izolowane komórki plazmatyczne CD138+ z hodowli bezpośredniej szpiku kostnego.

4. Wyniki

4.1. Analiza badanej grupy

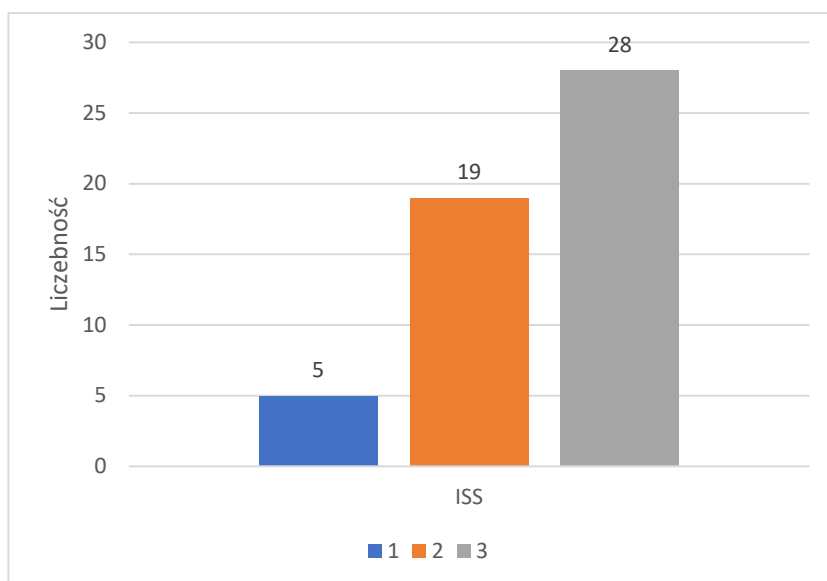
Mediana wieku chorych wynosiła 67 lat (31-83). Wśród chorych było 25 kobiet i 28 mężczyzn.

U chorych określono stopień zaawansowania choroby używając klasyfikacji R-ISS, ISS oraz Salmon - Durie. U 47 pacjentów określono stopień zaawansowania choroby w klasyfikacji R-ISS, u 38 chorych R-ISS wynosił 1 lub 2 (80,85%), u 9 chorych wynosił 3 (19,15%). Szczegółowy podział pacjentów w zależności od stopnia zaawansowania wg R-ISS, przedstawiono na rycinie 5.



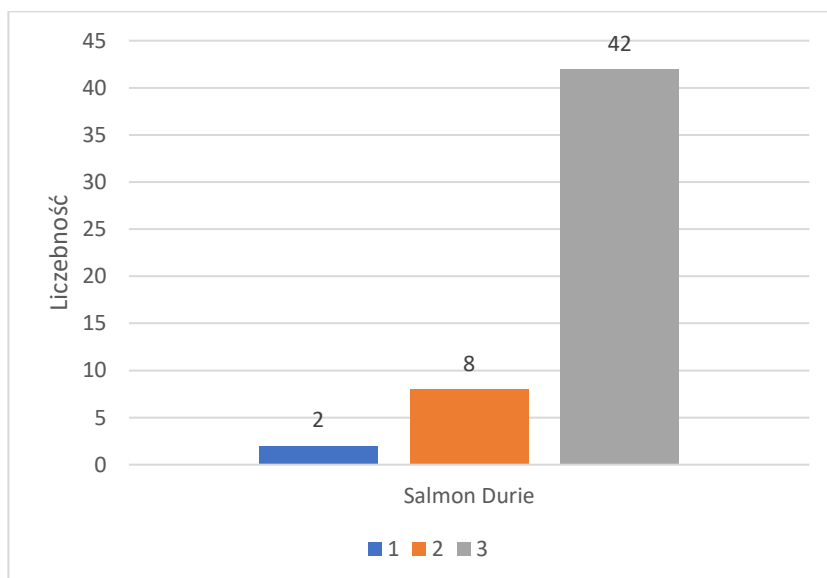
Rycina 5: Podział grupy chorych w zależności od klasyfikacji R-ISS

U 52 pacjentów określono stopień zaawansowania choroby w klasyfikacji ISS, u 24 chorych ISS wynosił 1 lub 2 (46,15%) u 28 chorych wynosił 3 (53,85%). Szczegółowy podział pacjentów w zależności od stopnia zaawansowania wg ISS, przedstawiono na rycinie 6.



Rycina 6: Podział grupy chorych w zależności od klasyfikacji ISS

U 52 pacjentów określono stopień zaawansowania choroby w klasyfikacji Salmon Durie, u 10 chorych ISS wynosił 1 lub 2 (19,23%) u 42 chorych wynosił 3 (80,77%). Szczegółowy podział pacjentów w zależności od stopnia zaawansowania wg Salmon Durie przedstawiono na rycinie 7.



Rycina 7: Podział grupy chorych w zależności od klasyfikacji Salmon Durie

Charakterystykę chorych pod względem rodzaju białka monoklonalnego w momencie rozpoznania choroby przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10: Rodzaje białka monoklonalnego (diagnoza)

Rodzaj immunoglobuliny	Liczebność chorych	Odsetek chorych (%)
IgA kappa	6	11,32
IgA lambda	3	5,66
IgG	1	1,89
IgG kappa	23	43,40
IgG lambda	11	20,75
Wolne łańcuchy kappa	2	3,77
Wolne łańcuchy lambda	7	13,21

W badanej grupie u 7 chorych (13,21%) w badaniu elektroforezy białek surowicy krwi stwierdzono dwa rodzaje białka monoklonalnego (szpiczak biklonalny), podczas gdy u 46 chorych (86,79%) stwierdzono jeden rodzaj białka monoklonalnego. U pacjentów oceniano także obecność guza plazmocytowego (plasmocytoma), który wykryto u 5 chorych (9,43%).

U wszystkich 53 pacjentów oceniono naciek komórkami plazmatycznymi w biopsji aspiracyjnej szpiku kostnego. U 36 pacjentów naciek komórkami plazmatycznymi w szpiku kostnym wynosił <50%, a u 17 pacjentów wynosił ≥50%. U 50 pacjentów określono naciek komórkami plazmatycznymi w ocenie histopatologicznej szpiku (trepanobiopsja). U 19 pacjentów naciek komórkami plazmatycznymi w szpiku kostnym wynosił <50%, a u 31 pacjentów wynosił ≥50%.

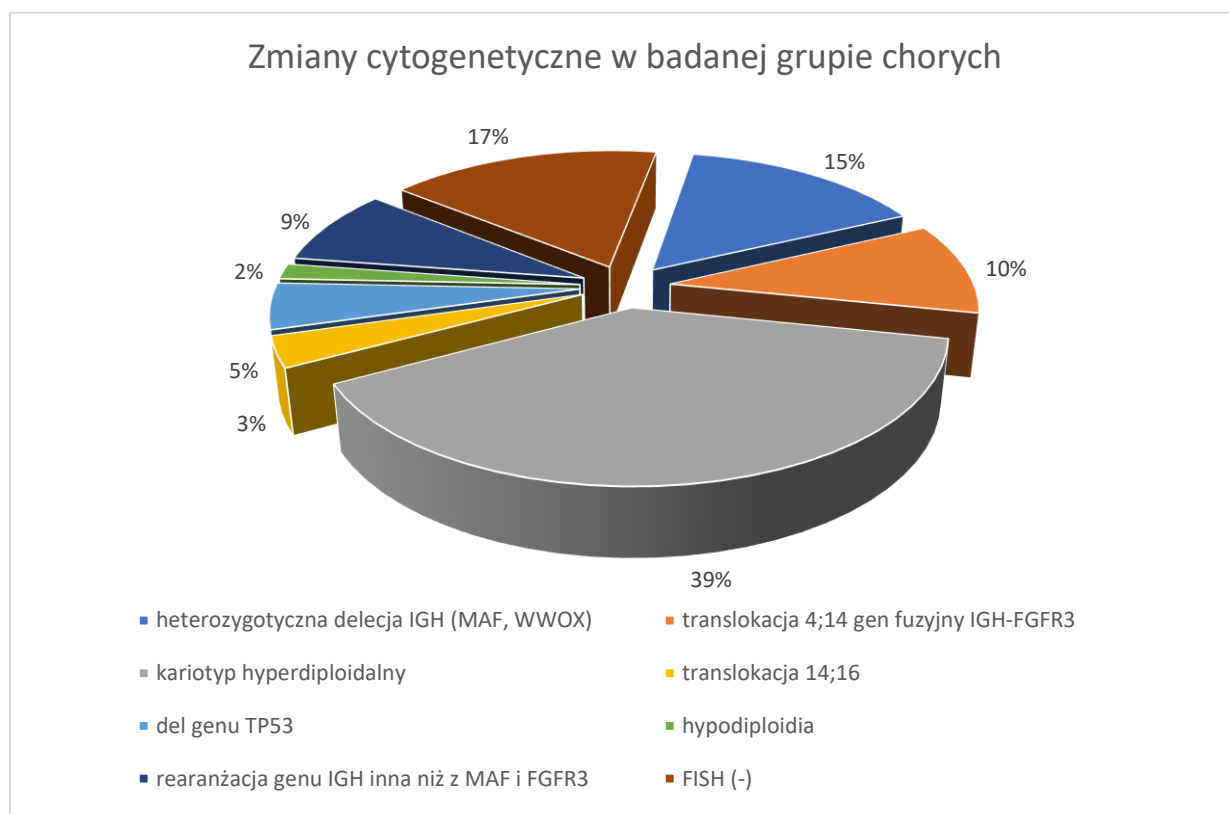
W badaniu histopatologicznym dodatkowo oceniano stopień nasilenia włóknienia retikulinowego w szpiku kostnym. Stopień włóknienia oceniano od 0-2, przy czym stopień 0 odpowiadał nieobecności włóknienia, a stopień 2 włóknieniu o największym nasileniu. Stopień włóknienia określono łącznie u 46 chorych. U 9 chorych stopień włóknienia oceniono, jako 0, u 22 chorych jako 1, a u pozostałych 16 chorych jako 3.

W leczeniu pierwszej linii u chorych stosowano następujące schematy leczenia chemioterapeutycznego oparte na bortezomibie: VCD (bortezomib + cyklofosfamid +

deksametazon) u 49 chorych (92,45%), VD (bortezomib + deksametazon) u 2 chorych (3,77%) oraz VTD (bortezomib + deksametazon + talidomid) u 2 chorych (3,77%).

U wszystkich 53 chorych w badanej grupie oceniono odpowiedź na leczenie. Całkowitą remisję (CR) osiągnęło 3 chorych (5,66%), bardzo dobrą odpowiedź na leczenie (VGPR) osiągnęło 19 chorych (35,85%), u 20 chorych (37,74%) stwierdzono częściową remisję (PR), natomiast stabilizację choroby (SD) uzyskano u 5 chorych (9,43%). U 6 chorych (11,32%) stwierdzono progresję choroby (PD).

W badanej grupie chorych, badanie cytogenetyczne metodą FISH wykonano u 48 z 53 pacjentów. U 38 chorych (79,17%) stwierdzono metodą FISH zmiany cytogenetyczne w zakresie badanego panelu aberracji (rycina 8).



Rycina 8: Rodzaje zmian cytogenetycznych w badanej grupie chorych metodą FISH

4.1.1. Ocena osoczowych stężeń białek proangiogennych w badanej grupie pacjentów

W badanej grupie pacjentów oznaczono stężenie endogliny u 48 chorych, VEGF A u 47 chorych, VEGF B u 48 chorych, FGF2 u 48 chorych, FLT-3 u 32 chorych. Średnie stężenie endogliny wynosiło 2,38 ng/ml (0,6-3,87 ng/ml, mediana 2,43 ng/ml). Średnie stężenie VEGF A wynosiło 61,28 pg/ml (5,59-694,12 pg/ml, mediana 42,26 pg/ml). Średnie stężenie VEGF B wynosiło 2,08 pg/ml (0,29-23,69 pg/ml, mediana 0,29 pg/ml). Średnie stężenie VEGF C wynosiło 0,41 ng/ml (0,0-8,45 ng/ml, mediana 0,0 ng/ml). Średnie stężenie FGF2 wynosiło 357,35 pg/ml (51,58-1090,91 ng/ml, mediana 291,53 ng/ml). Średnie stężenie FLT3 wynosiło 29,43 pg/ml (8,63-413,85 ng/ml, mediana 8,63 ng/ml). Warto podkreślić, że w przypadku VEGF C u 21 (44,68%), a w przypadku FLT3 aż u 29 chorych (90,63%) stężenie w osoczu było poniżej progu detekcji.

Porównano średnie stężenia białek proangiogennych w zależności od płci w grupie badanej. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w tym zakresie. Wyniki przedstawiono w tabeli 11.

W badanej grupie analizowano stężenia białek proangiogennych u młodszych (< 60 roku życia) oraz u starszych pacjentów (≥60 lat). Nie stwierdzono znamienności statystycznej, a wyniki przedstawiono w tabeli 12.

W badanej grupie chorych dokonano analizy stężeń białek proangiogennych w zależności od nacieku szpiku kostnego komórkami plazmatycznymi, ocenianego w biopsji aspiracyjnej oraz trepanobiopsji szpiku. Zarówno w przypadku biopsji aspiracyjnej szpiku jak i trepanobiopsji, średnie stężenia endogliny, VEGF A, VEGF B, VEGF C oraz FGF2 nie różniły się statystycznie w podgrupie chorych z naciekiem szpiku komórkami plazmatycznymi ≥50% vs <50%. Szczegółowe wartości przedstawiono w tabelach 13 i 14.

Tabela 11: Średnie stężenia białek proangiogennych w zależności od płci chorych

	Kobiety	Mężczyźni	p
endoglina	2,56 (2,20 – 2,80) ng/ml	2,28 (2,05 – 2,78) ng/ml	0,3948
VEGF A	42,26 (24,61 – 77,06) pg/ml	44,03 (18,92 – 70,95) pg/ml	1
VEGF B	0,29 (0,29 – 2,93) pg/ml	0,53 (0,29 – 3,17) pg/ml	0,6334
VEGF C	0,16 (0,00 – 0,20) ng/ml	0,00 (0,00 – 0,18) ng/ml	0,2364
FGF2	311,15 (258,57 – 518,14) pg/ml	281,68 (107,56 – 330,61) pg/ml	0,2322
FLT-3	8,63 (8,63 – 8,63) pg/ml	8,63 (8,63 – 8,63) pg/ml	0,7636

Tabela 12: Średnie stężenia białek proangiogennych w zależności od wieku chorych

	Chorzy < 60 roku życia	Chorzy ≥ 60 roku życia	p
endoglina	2,48 (0,34) ng/ml	2,34 (0,61) ng/ml	0,3299
VEGF A	44,03 (14,65 – 70,95) pg/ml	42,26 (30,87 – 73,31) pg/ml	0,8527
VEGF B	0,29 (0,29 – 1,76) pg/ml	0,35 (0,29 – 3,17) pg/ml	0,6012
VEGF C	0,09 (0,00 – 0,21) ng/ml	0,00 (0,00 – 0,19) ng/ml	0,2529
FGF2	315,66 (259,57 – 359,73) pg/ml	278,40 (107,56 – 498,34) pg/ml	0,231
FLT 3	8.63 (8.63 - 8.63) pg/ml	8.63 (8.63 - 8.63) pg/ml	0,1459

Tabela 13: Średnie stężenia białek proangiogennych w zależności od nacieku szpiku plazmacytami (biopsja aspiracyjna szpiku)

	Naciek < 50%	Naciek ≥50%	p
endoglina	2,42 (0,57) ng/ml	2,28 (0,50) ng/ml	0,4142
VEGF A	41,19 (18,92 – 73,31) pg/ml	45.98 (35,16 - 71.43) pg/ml	0,6848
VEGF B	0,41 (0,29 – 3,17) pg/ml	0,29 (0,29 – 2,93) pg/ml	0,4973
VEGF C	0,13 (0,00 – 0,19) ng/ml	0,00 (0,00 – 0,17) ng/ml	0,3
FGF 2	292,55 (199,45 – 498,34) pg/ml	289,83 (200,81 – 354,98) pg/ml	0,707

Tabela 14: Średnie stężenia białek proangiogennych w zależności od nacieku szpiku plazmocytami (trepanobiopsja szpiku)

	Naciek < 50%	Naciek ≥50%	p
endoglina	2,50 (0,49) ng/ml	2,29 (0,58) ng/ml	0,211
VEGF A	49,89 (32,69 – 80,83) pg/ml	41,73 (14,65 – 62,97) pg/ml	0,3202
VEGF B	1,48 (0,29 – 3,17) pg/ml	0,29 (0,29 – 3,17) pg/ml	0,2636
VEGF C	0,16 (0,00 – 0,24) ng/ml	0,00 (0,00 – 0,19) ng/ml	0,2174
FGF 2	268,03 (199,45 – 452,14) pg/ml	295,27 (200,81 – 491,74) pg/ml	0,6703

W badanej grupie przeprowadzono analizę stężeń białek proangiogennych w zależności od stopnia nasilenia włóknienia retikulinowego w szpiku. U 9 chorych stwierdzono brak włóknienia (stopień 0), u 22 chorych stwierdzono włóknienie 1 stopnia, a u 15 chorych – włóknienie 2 stopnia. Dla celów analizy podzielono chorych na dwie podgrupy – podgrupę o mniejszym nasileniu włóknienia (włóknienie 0 i 1 stopnia) oraz podgrupę o większym nasileniu włóknienia (włóknienie 2 stopnia).

Stwierdzono istotnie wyższe stężenie endogliny w grupie o większym nasileniu włóknienia ($p=0,0228$). W przypadku pozostałych białek proangiogennych nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Wyniki przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15: Średnie stężenia białek prangiogennych w zależności od stopnia włóknienia szpiku w trepanobiopsji

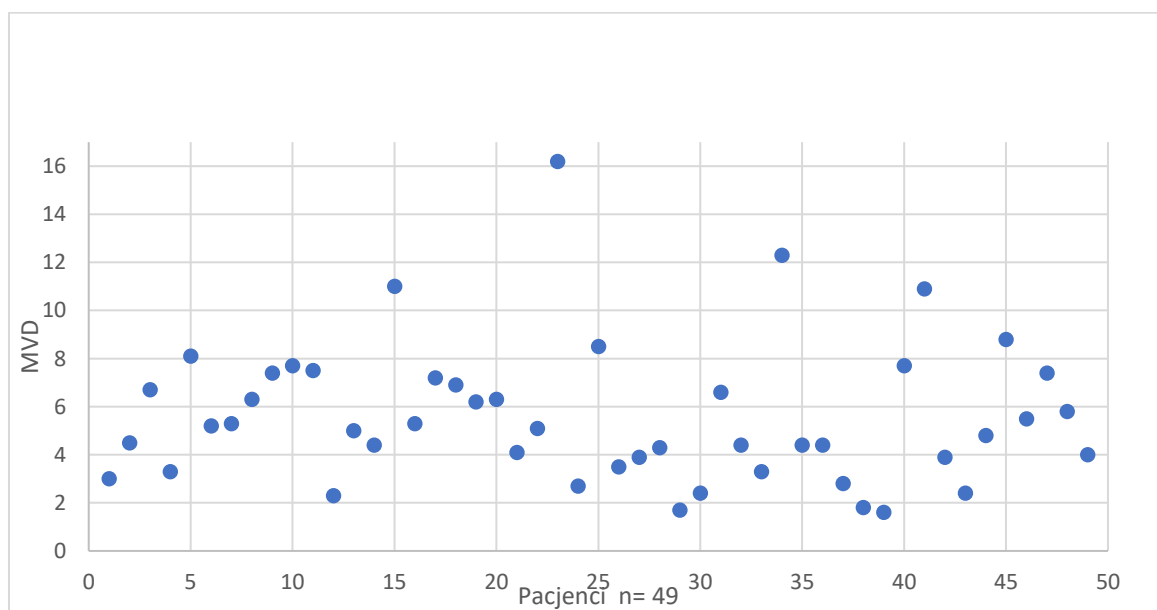
	Włóknienie 0+1	Włóknienie 2	p
endoglina	2,43 (2,08 – 2,63) ng/ml	2,81 (2,26 – 2,87) ng/ml	0,0228
VEGF A	41,73 (31,06 – 59,90) pg/ml	41,19 (14,65 – 96,33) pg/ml	0,9443
VEGF B	1,26 (0,29 – 3,26) pg/ml	0,29 (0,29 – 2,93) pg/ml	0,4741
VEGF C	0,00 (0,00 – 0,18) ng/ml	0,17 (0,00 - 0,20) ng/ml	0,0567
FGF2	290,17 (107,99 – 495,04) pg/ml	310,21 (276,48 – 465,35) pg/ml	0,3396

4.1.2. Ocena MVD i wybranych parametrów szpiku kostnego w badanej grupie pacjentów

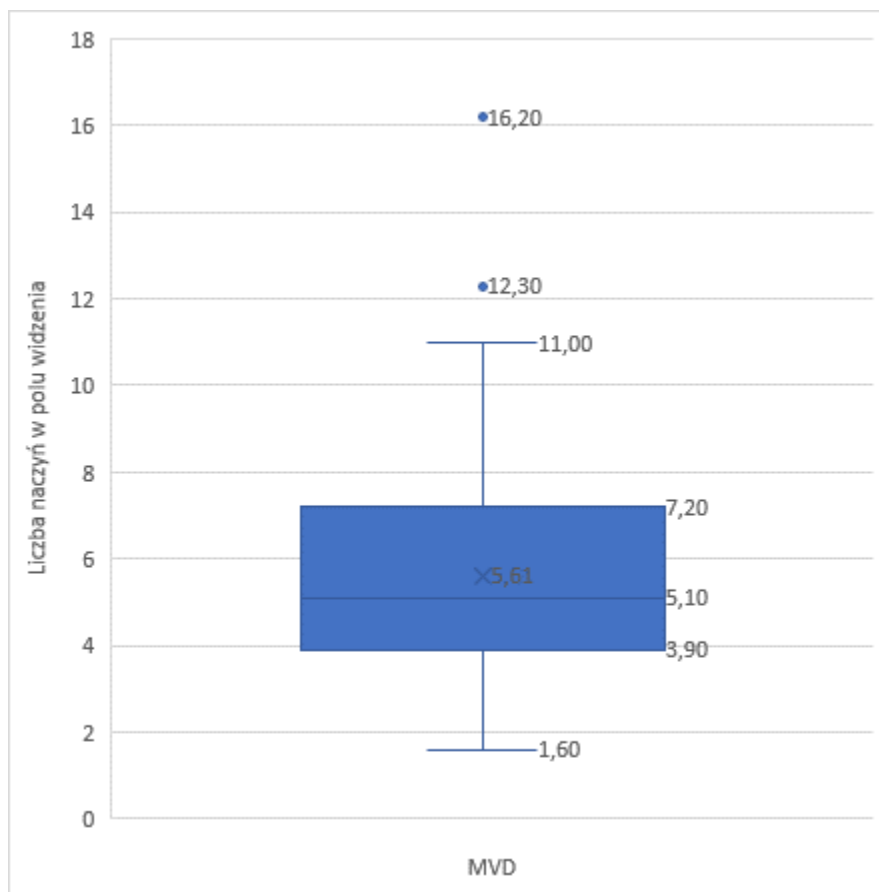
U 49 pacjentów dokonano oceny gęstości mikronaczyń (MVD). Zakres MVD mieścił się w przedziale 1,6-16,2 (mediana 5,1). Średnia MVD wynosiła $5,61 \pm 2,89$. Rozkład MVD w badanej grupie przedstawiono na rycinach 9 i 10.

W badanej grupie chorych dokonano analizy MVD w zależności od nacieku szpiku kostnego komórkami plazmatycznymi, ocenianego w mielogramie oraz trepanobiopsji szpiku.

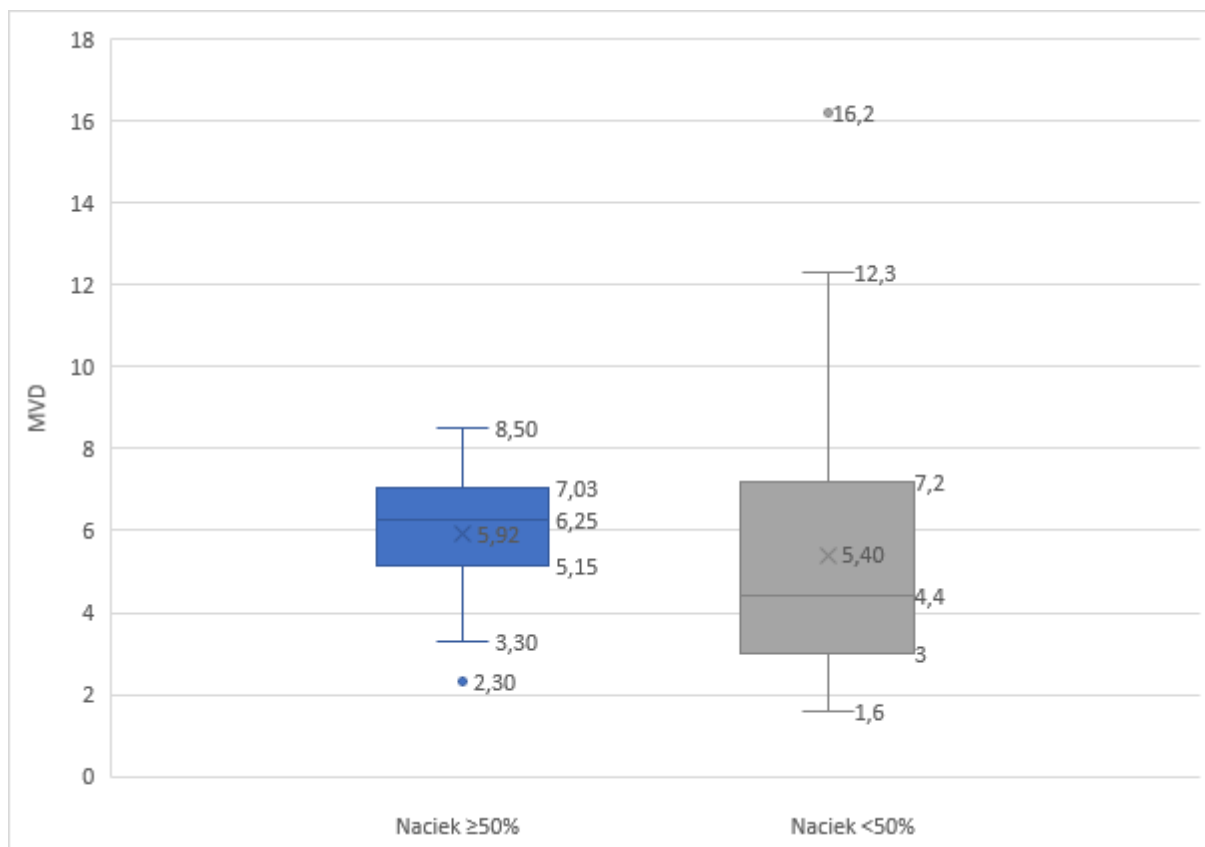
W przypadku mielogramu, wartości MVD były większe w przypadku podgrupy chorych z naciekiem $\geq 50\%$ vs $<50\%$: odpowiednio 6,25 (5,10 – 7,15) i 4,40 (3,30 – 7,20), przy czym różnice nie były istotne statystycznie ($p=0,1535$). Szczegółowy rozkład MVD w badanych podgrupach przedstawiono na rycinie 11.



Rycina 9: Rozkład MVD w badanej grupie

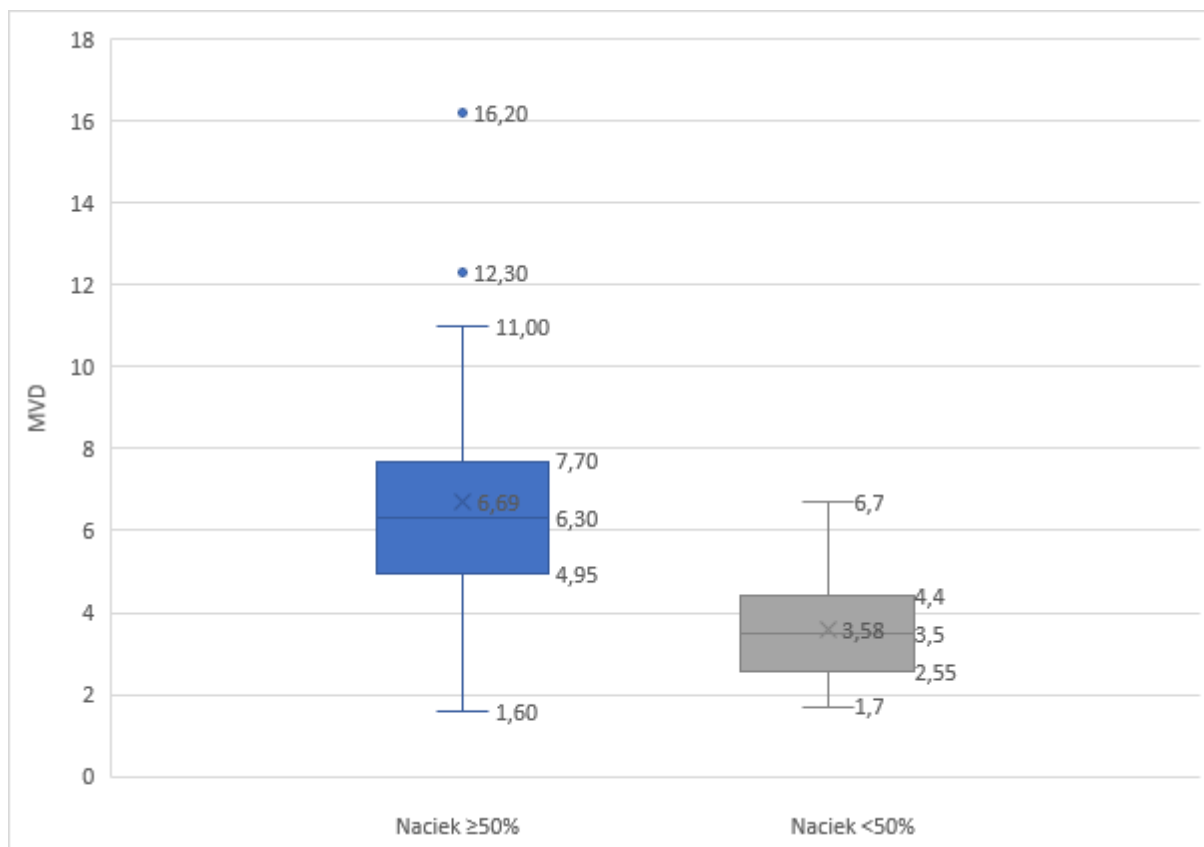


Rycina 10: Rozkład wartości MVD w całej badanej grupie



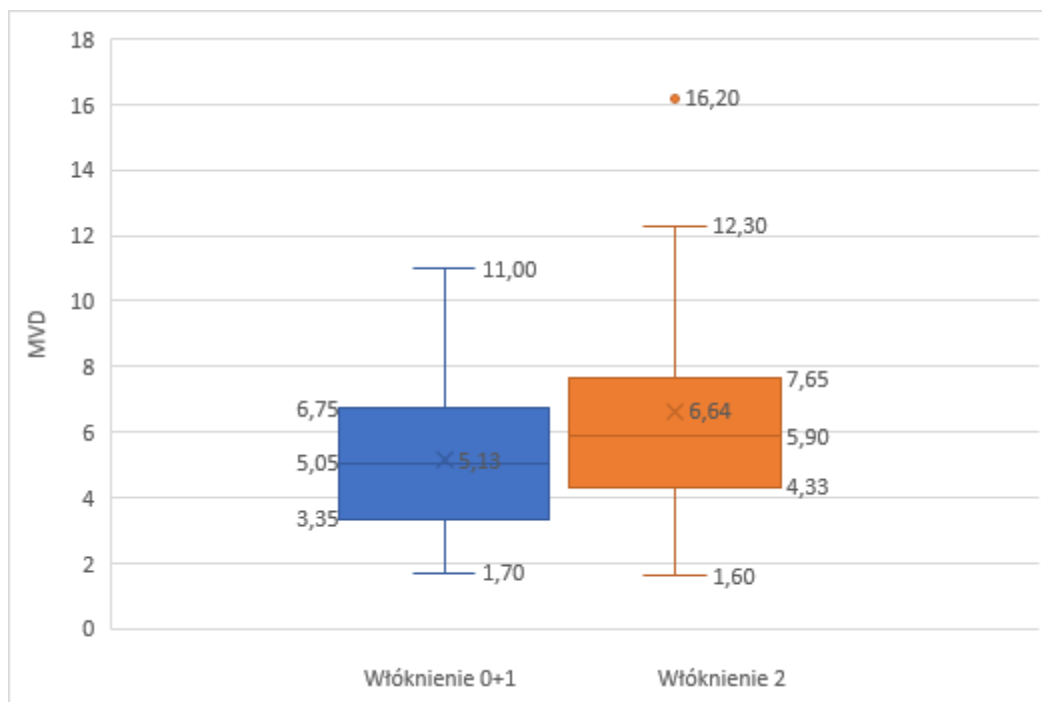
Rycina 11: Rozkład MVD w zależności od nacieku szpiku kostnego w mielogramie

W przypadku trepanobiopsji szpiku, stwierdzono, że wartości MVD były istotnie większe w przypadku podgrupy chorych z naciekiem komórkami plazmatycznymi $\geq 50\%$ vs $< 50\%$, odpowiednio: 6,30 (4,80 – 7,70) i 3,50 (2,70 – 4,40), $p=0,0002$. Szczegółowy rozkład wartości MVD w badanych podgrupach przedstawiono na rycinie 12.



Rycina 12: Rozkład MVD w zależności od nacieku szpiku kostnego w trepanobiopsji szpiku

Kolejnym krokiem analizy była ocena MVD w zależności od stopnia włóknienia szpiku. Podobnie jak w przypadku analizy dotyczącej białek proangiogennych, podzielono chorych na dwie podgrupy – podgrupę o mniejszym nasileniu włóknienia (włóknienie 0 i 1 stopnia) oraz podgrupę o większym nasileniu włóknienia (włóknienie 2 stopnia). Porównano wartości MVD w obu podgrupach. Odnotowano nieznacznie większe wartości MVD w podgrupie bardziej nasilonego włóknienia (6,50 vs 4,98), ale różnica nie była istotna statystycznie ($p=0,0761$). Szczegółowy rozkład MVD w badanych podgrupach przedstawiono na rycinie 13.



Rycina 13: Rozkład MVD w zależności od włóknienia szpiku w trepanobiopsji szpiku

4.1.3. Ocena zależności stężenia białek proangiogennych i MVD

W badanej grupie, przeprowadzono analizę wykorzystującą współczynniki Spearmana celem określenia, czy większe stężenie białek proangiogennych koreluje ze zwiększoną MVD w szpiku kostnym. Analiza nie potwierdziła istotnego statystycznie związku ani w przypadku MVD określonego jako średnia arytmetyczna, ani jako mediana. Wyniki przedstawiono w tabeli 16:

Tabela 16 - Korelacja stężeń białek proangiogennych z MVD (współczynniki Spearmana)

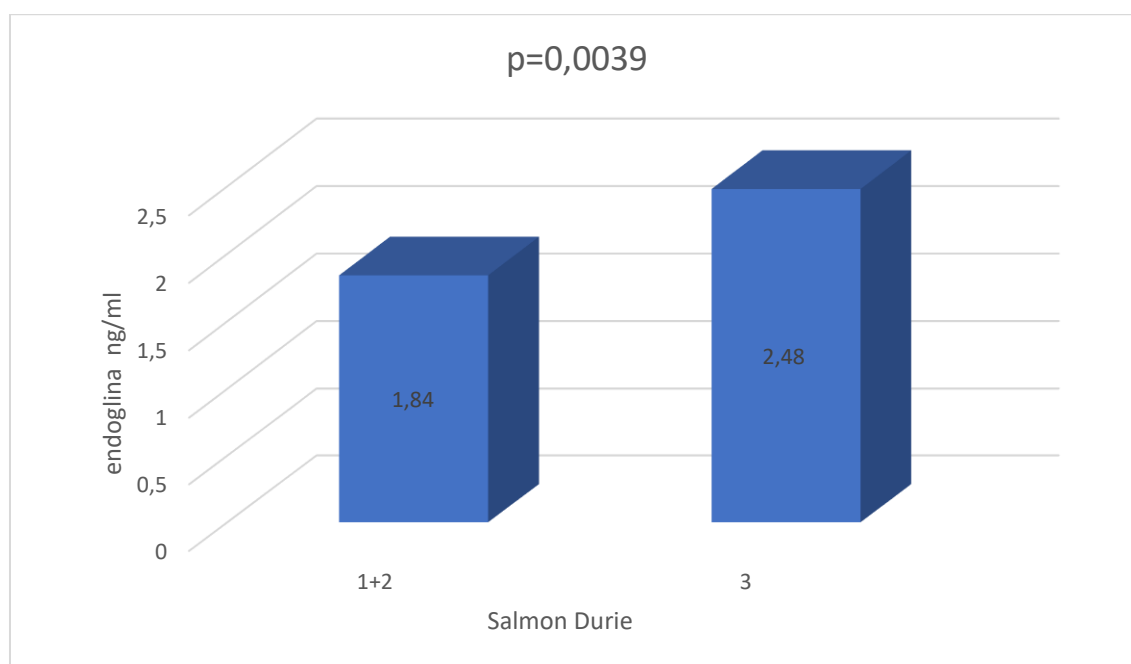
	MVD mediana	MVD średnia arytmetyczna
endoglina	0,13472 p=0,3833	0,13910 p=0,3678
VEGF A	-0,08244 p=0,5992	-0,14830 p=0,3426
VEGF B	0,12828 p=0,4066	0,08953 p=0,5633
VEGF C	0,04074 p=0,7953	0,01367 p=0,9307
FGF 2	-0,00680 p=0,9651	0,03300 p=0,8316
FLT3	-0,20514 p=0,2768	-0,24344 p=0,1949

4.2. Ocena zależności między stężeniem białek proangiogennych, MVD a stopniem zaawansowania szpiczaka plazmocytowego oraz ryzykiem cytogenetycznym

Dla potrzeb analizy, w przypadku stopnia zaawansowania określanego w klasyfikacji Salmon Durie, ISS oraz R-ISS, pacjentów wyjściowo podzielono na dwie podgrupy – podgrupę o mniejszym zaawansowaniu choroby (stopień 1+2) oraz największym zaawansowaniu (stopień 3). W celu oceny ryzyka genetycznego, pacjentów podzielono na podgrupy według wybranych parametrów stwierdzanych w badaniu FISH.

4.2.1. Klasyfikacja Salmon Durie

We wstępnej analizie porównywano średnie stężenia białek proangiogennych w podgrupie chorych o niższym zaawansowaniu choroby (stopień 1 i 2) z podgrupą o wyższym zaawansowaniu choroby (stopień 3) zgodnie z klasyfikacją Salmon Durie. Stężenie endogliny było istotnie statystycznie większe w grupie wyższego zaawansowania, co przedstawiono na rycinie 14.

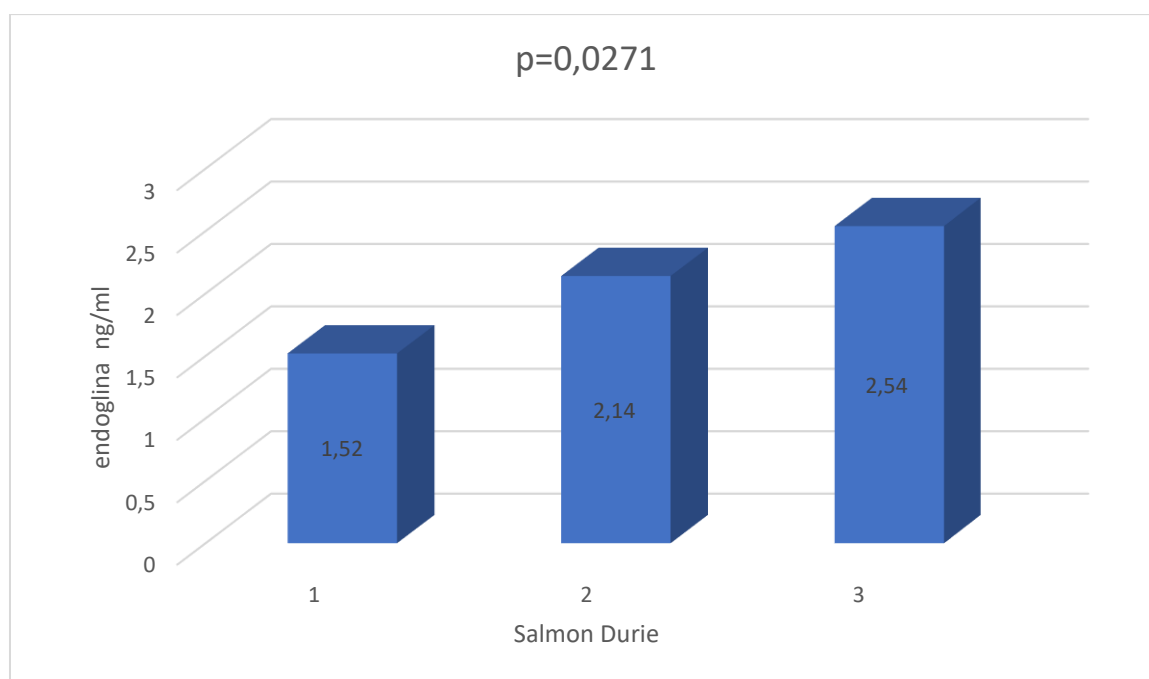


Rycina 14: Średnie osoczowe stężenie endogliny w badanej grupie w zależności od stopnia zaawansowania

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniach pozostałych białek proangiogennych; w podgrupie niższego zaawansowania vs wyższego zaawansowania VEGF A wynosiło odpowiednio: 62,97 pg/ml i 39,41 pg/ml ($p=0,1043$), VEGF C: 0,0 ng/ml i 0,13 ng/ml ($p=0,4382$), FGF 2: 325,85 pg/ml i 291,19 ($p=1$). Nie stwierdzono także istotnej statystycznie różnicy w MVD u chorych z wyższym a niższym stopniem zaawansowania wg Salmon Durie.

W toku dalszej analizy oceniano średnie stężenie białek proangiogennych u chorych przy podziale na trzy grupy: z 1, 2 i 3 stopniem zaawansowania zgodnie z klasyfikacją Salmon Durie.

Stwierdzono, że zwiększenie średnich stężeń endogliny koreluje istotnie statystycznie ze zwiększeniem stopnia zaawansowania wg klasyfikacji Salmon Durie (rycina 15).



Rycina 15: Średnie osoczowe stężenie endogliny w badanej grupie w zależności od stopnia zaawansowania

Analizując MVD, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic przy podziale chorych na trzy grupy wg stopnia zaawansowania zgodnie z klasyfikacją Salmon Durie. Wyniki przedstawiono w tabeli 17.

Tabela 17: Średnie stężenia białek proangiogennych i MVD w badanej grupie chorych wg Salmon Durie

	Salmon Durie 1	Salmon Durie 2	Salmon Durie 3	p
endoglina	1,52 (1,52 – 1,52) ng/ml	2,14 (1.79 - 2.20) ng/ml	2,54 (2,17 – 2,81) ng/ml	0,0271*
VEGF A	52,91 (52,91 – 52,91) pg/ml	66,96 (44,39 – 77,06) pg/ml	39,41 (14,65 – 73,31) pg/ml	0,2425
VEGF B	8,74 (8,74 – 8,74) pg/ml	2,55 (1,23 – 3,46) pg/ml	0,29 (0,29 – 2,26) pg/ml	0,0135*
VEGF C	0,00 (0,00 – 0,00) ng/ml	0,00 (0,00 – 0,93) ng/ml	0,13 (0,00 – 0,19) ng/ml	0,5315
FGF 2	104,99 (104,99 – 104,99) pg/ml	342,79 (290,51 – 452,14) pg/ml	291,19 (208,63 – 495,04) pg/ml	0,4975
MVD	2,50 (2,00 – 3,00)	4,75 (4,00 – 7,00)	5,00 (4,00 – 7,00)	0,1529

4.2.2. Klasyfikacja ISS

Wyjściowo porównywano stężenia białek proangiogennych w grupie pacjentów o niższym zaawansowaniu choroby (stopień 1 i 2) i grupie o wyższym zaawansowaniu choroby (stopień 3), zgodnie z klasyfikacją ISS. Nie odnotowano istotnych różnic statystycznie istotnych w analizowanych grupach pacjentów.

Analizując średnią gęstość naczyńową w grupie o mniejszym i większym zaawansowaniu wg ISS, wartość MVD była istotnie statystycznie większa w grupie chorych z wyższym stopniem zaawansowania ($p=0,0417$). Wyniki przedstawiono w tabeli 18. Następnie, podobnie jak w przypadku klasyfikacji Salmon Durie, przeprowadzono analizę średnich stężeń białek proangiogennych oraz MVD w trzech grupach pacjentów: 1, 2 i 3 stopnia zaawansowania wg klasyfikacji ISS. Nie

odnotowano istotnych statystycznie różnic w stężeniach białek, natomiast stwierdzono namiennie statystycznie większą MVD wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania wg klasyfikacji ISS. Wyniki przedstawiono w tabeli 19. Analiza trendu liniowego (na podstawie analizy wariancji ANOVA) mediany średniej gęstości naczyniowej w zakresie badanych grup wykazała znamienność statystyczną ($p=0,0376$).

Tabela 18: Średnie stężenia białek proangiogennych w badanej grupie chorych wg ISS

	ISS 1 + 2	ISS 3	p
endoglina	2,45 (1,88 – 2,75) ng/ml	2,47 (2,25 – 2,87) ng/ml	0,2741
VEGF A	46,87 (14,65 - 77,06) pg/ml	41,19 (24,61 – 73,31) pg/ml	0,9563
VEGF B	0,29 (0,29 – 1,82) pg/ml	0,41 (0,29 – 3,23) pg/ml	0,492
VEGF C	0,15 (0,00 – 0,19) ng/ml	0,00 (0,00 – 0,21) ng/ml	0,9727
FGF 2	293,91 (162,43 – 405,94) pg/ml	280,32 (199,45 – 518,14) pg/ml	0,9578
MVD	4,60 (1,85)	6,09 (3,05)	0,0417*

Tabela 19: Stężenia białek proangiogennych oraz MVD w zależności od stopnia zaawansowania wg ISS

	ISS 1	ISS 2	ISS 3	p
endoglina	2,20 (1,90 – 2,51) ng/ml	2,53 (1,85 – 2,80) ng/ml	2,47 (2,25 – 2,87) ng/ml	0,4087
VEGF A	46,87 (46,87 – 70,95) pg/ml	38,17 (14,65 – 83,25) pg/ml	41,19 (24,61 – 73,31) pg/ml	0,931
VEGF B	0,82 (0,29 – 1,23) pg/ml	0,29 (0,29 – 3,17) pg/ml	0,41 (0,29 – 3,23) pg/ml	0,7803
VEGF C	0,00 (0,00 – 1,11) ng/ml	0,16 (0,00 – 0,19) ng/ml	0,00 (0,00 – 0,21) ng/ml	0,8382
FGF 2	300,71 (259,57 – 325,85) pg/ml	292,55 (108,42 – 498,34) pg/ml	280,32 (199,45 – 518,14) pg/ml	0,9934
MVD	3,00 (2,20 – 3,85)	4,50 (3,90 – 6,30)	6,20 (4,10 – 7,50)	0,0465*

4.2.3. Klasyfikacja R-ISS

Wyściowo porównywano stężenia białek proangiogennych w grupie chorych o niższym zaawansowaniu choroby (stopień 1 i 2) z grupą chorych o wyższym zaawansowaniu (stopień 3) zgodnie z klasyfikacją R-ISS. Nie odnotowano istotnych różnic statystycznych w analizowanych grupach pacjentów. Wyniki przedstawiono w tabeli 20.

Tabela 20: Stężenie białek proangiogennych w chorych przy podziale na grupy wg R-ISS

	R-ISS 1+2	R-ISS 3	p
endoglina	2,32 (0,58) ng/ml	2,46 (0,38) ng/ml	0,5461
VEGF A	44,39 (18,92 – 71,43) pg/ml	42,26 (41,19 – 80,83) pg/ml	0,4312
VEGF B	0,29 (0,29 – 2,11) pg/ml	2,23 (0,29 – 3,23) pg/ml	0,3453
VEGF C	0,01 (0,00 – 0,20) ng/ml	0,00 (0,00 – 0,19) ng/ml	0,4611
FGF 2	290,17 (153,94 – 471,94) pg/ml	258,57 (107,56 – 330,61) pg/ml	0,7562
MVD	4,88 (2,10)	7,61 (3,94)	0,0746

Analiza stężeń białek proangiogennych w trzech grupach pacjentów: 1, 2 i 3 stopnia zaawansowania wg klasyfikacji R-ISS nie wykazała różnic znamienych statystycznie. Stwierdzono natomiast znamienne statystycznie większą MVD wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania wg klasyfikacji R-ISS. Wyniki przedstawiono w tabeli 21.

Tabela 21 - Stężenie białek proangiogennych i MVD w badanej grupie wg R-ISS

	R -ISS 1	R- ISS 2	R-ISS 3	p
endoglina	2,28 (0,40) ng/ml	2,32 (0,61) ng/ml	2.46 (0,38) ng/ml	0,8246
VEGF A	43,14 (14,65 – 70,95) pg/ml	44,39 (30,87 – 71,43) pg/ml	42,26 (41,19 – 80,83) pg/ml	0,6967
VEGF B	0,29 (0,29 – 0,82) pg/ml	0,29 (0,29 – 3,17) pg/ml	2,23 (0,29 – 3,23) pg/ml	0,3166
VEGF C	0,09 (0,00 – 1,11) ng/ml	0,01 (0,00 – 0,19) ng/ml	0,00 (0,00 – 0,19) ng/ml	0,5922
FGF 2	313,28 (292,55 – 452,14) pg/ml	275,00 (104,99 – 491,74) pg/ml	258,57 (107,56 – 330,61) pg/ml	0,3376
MVD	3,40 (1,19)	5,11 (2,13)	7,61 (3,94)	0,0092*

4.2.4. Zmiany cytogenetyczne w badaniu FISH

Nie odnotowano istotnych różnic statystycznych w przypadku stężenia białek proangiogennych w grupie chorych, u których stwierdzono prawidłowy kariotyp w porównaniu z grupą chorych, u których badanie FISH wykazało jakiekolwiek nieprawidłowości, bez względu na ich znaczenie rokownicze. W przypadku MVD, mediana była istotnie większa u pacjentów z nieprawidłowym wynikiem badania FISH. Wyniki przedstawiono w tabeli 22.

Tabela 22: Średnie stężenia białek proangiogennych i MVD w zależności od nie- i prawidłowego wyniku badania FISH

	FISH nieprawidłowy	FISH prawidłowy	p
endoglina	2.,5 (1,88 – 2,78) ng/ml	2,43 (2,25 – 2,62) ng/ml	0,5157
VEGF A	41,73 (14,65 – 62,97) pg/ml	65,63 (34,09 – 80,83) pg/ml	0,1406
VEGF B	0,29 (0,29 – 2,93) pg/ml	0,82 (0,29 – 3,46) pg/ml	0,3996
VEGF C	0,08 (0,00 – 0,19) ng/ml	0,00 (0,00 – 0,13) ng/ml	0,3443
FGF 2	290,51 (107,56 – 465,35)	275,56 (232,75 – 498,34)	0,7345
MVD	5,50 (4,00 – 7,00)	3,75 (3,00 – 4,00)	0,0296*

Następnie wyodrębniono grupę chorych, w której w badaniu FISH wykazano obecność zmian sugerujących kariotyp hyperdiploidalny. Nie stwierdzono znamienne istotnych różnic zarówno dotyczących stężeń białek proangiogennych jak i MVD w porównaniu z pozostałymi pacjentami. Wyniki przedstawiono w tabeli 23.

Tabela 23 - Średnie stężenia białek proangiogennych oraz MVD w przypadku kariotypu nie- i hiperdiploidalnego

	Kariotyp niehiperdiploidalny	Kariotyp hiperdiploidalny	p
endogлина	2,42 (0,64) ng/ml	2,26 (0,41) ng/ml	0,3232
VEGF A	48,65 (16,79 – 78,95) pg/ml	41,73 (33,93 – 58,10) pg/ml	0,6307
VEGF B	0,29 (0,29 – 2,26) pg/ml	0,76 (0,29 – 3,17) pg/ml	0,9226
VEGF C	0,00 (0,00 – 0,19) ng/ml	0,01 (0,00 – 0,21) ng/ml	0,7678
FGF 2	312,94 (21,19 – 527,47) pg/ml	276,48 (94,97 – 321,59) pg/ml	0,1433
MVD	4,50 (3,50 – 6,50)	5,25 (4,00 – 7,00)	0,5291

W toku dalszej analizy, porównywano średnie stężenia białek proangiogennych i MVD u pacjentów, u których stwierdzono zmiany wysokiego ryzyka cytogenetycznego (t(4;14), t(14;16) oraz delecję TP53) w porównaniu z pozostałymi pacjentami. Nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych. Wyniki przedstawiono w tabeli 24.

Tabela 24 - Średnie stężenia białek proangiogennych w zależności od obecności zmian wysokiego ryzyka

	Zmiany nieobecne	Zmiany obecne	p
endogлина	2,34 (0,56) ng/ml	2,39 (0,54) ng/ml	0,8212
VEGF A	42,26 (31,25 – 70,95) pg/ml	56,11 (14,65 – 116,07) pg/ml	0,7134
VEGF B	0,59 (0,29 – 3,17) pg/ml	0,29 (0,29 – 1,88) pg/ml	0,202
VEGF C	0,00 (0,00 - 0,20) ng/ml	0,00 (0,00 - 0,19) ng/ml	0,8538
FGF 2	291,53 (200,81 – 491,74) pg/ml	222,93 (107,56 – 330,61) pg/ml	0,4288
MVD	5,07 (2,25)	6,89 (3,97)	0,2172

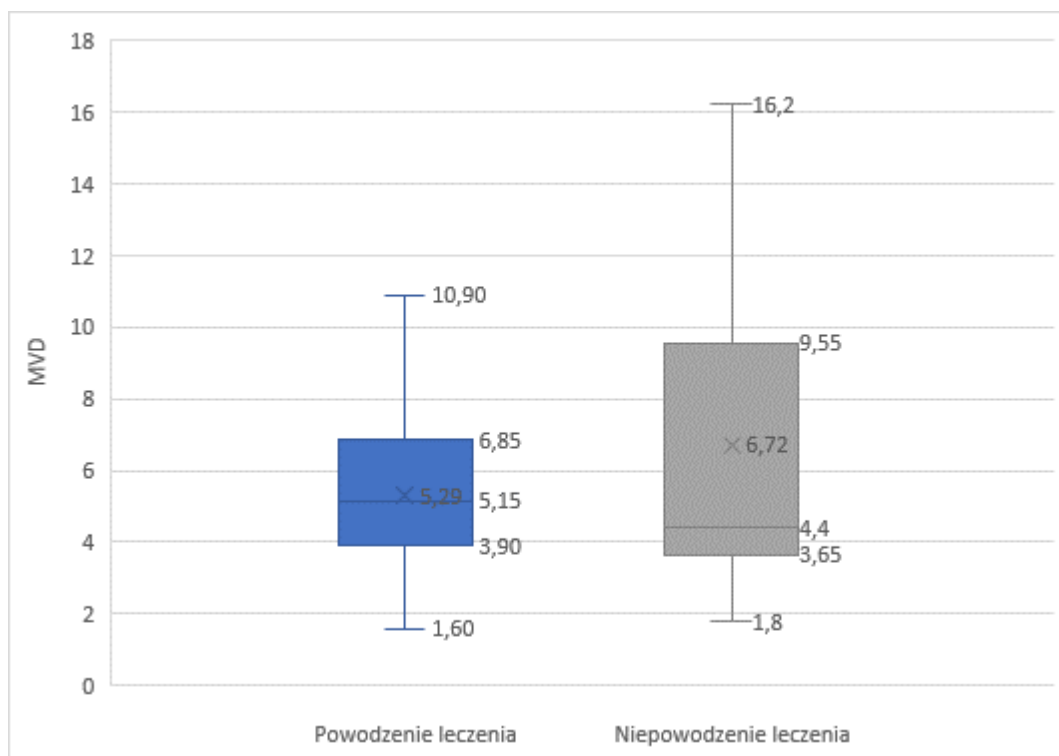
4.3. Ocena zależności między stężeniem białek proangiogennych i MVD a wczesną odpowiedzią na leczenie

Kolejnym etapem analizy danych w pracy była ocena korelacji stężenia białek proangiogennych oraz średniej gęstości naczyń w kontekście wczesnej odpowiedzi na

leczenie (ocenianej po VI cyklach leczenia, chyba, że stwierdzono wcześniej progresję choroby lub zgon pacjenta). Dla celów analizy wyodrębniono dwie podgrupy chorych – podgrupę pacjentów, która odpowiedziała pozytywnie na leczenie, w której pacjenci uzyskali co najmniej częściową odpowiedź na leczenie (PR) oraz podgrupę pacjentów, u których stwierdzono stabilizację choroby lub progresję (niepowodzenie leczenia).

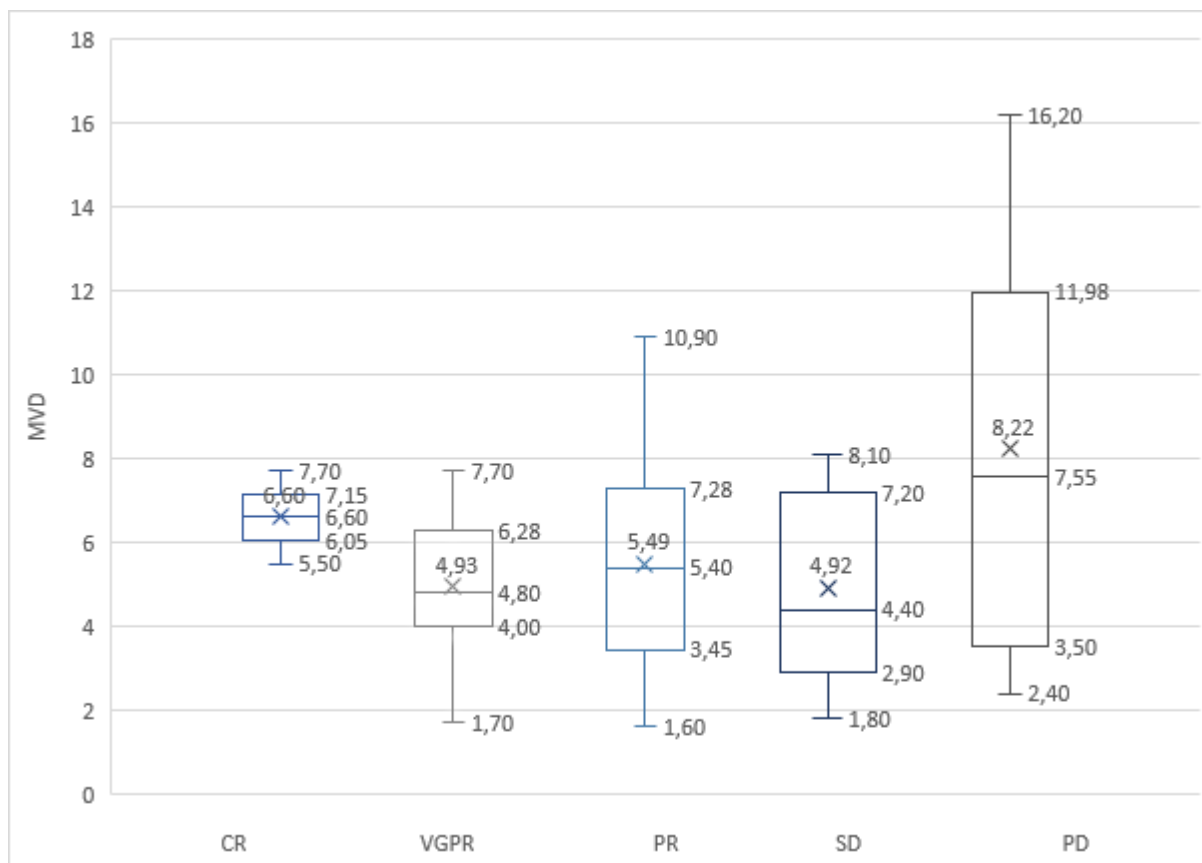
4.3.1. Ocena korelacji MVD z odpowiedzią na leczenie

Ocenę korelacji MVD z odpowiedzią na leczenie analizowano u 49 pacjentów. W podgrupie chorych, którzy odpowiedzieli na leczenie, średnia MVD wynosiła 5,29 (2,14) ($\geq$ PR), podczas gdy w podgrupie niepowodzenia ($<$ PR) było większe – 6,72 (4,64). Różnica nie była istotna statystycznie ($p=0,3419$). Podobną obserwację uzyskano w przypadku mediany MVD – wynosiła odpowiednio: w podgrupie pozytywnej odpowiedzi na leczenie – 5,14 (2,01) oraz w podgrupie niepowodzenia – 6,45 (4,17). Różnica nie była istotna statystycznie ($p=0,3346$). Szczegółowy rozkład MVD w zależności od odpowiedzi na leczenie przedstawiono na rycinie 16.



Rycina 16: Rozkład wartości MVD a powodzenie leczenia

Na rycinie 17 przedstawiono rozkład wartości MVD w zależności od odpowiedzi na leczenie, jaką uzyskali pacjenci.



Rycina 17: Rozkład wartości MVD w zależności od uzyskanej odpowiedzi na leczenie

Warto odnotować, że 3 z 6 chorych, u których stwierdzono progresję choroby i wartości MVD były istotnie większe niż u pozostałych doszło do wczesnego zgonu po rozpoznaniu progresji. Pacjentów tych cechowało także wysokie zaawansowanie choroby we wszystkich trzech klasyfikacjach stopnia zaawansowania. W tabeli 25 załączono szczegółową charakterystykę tych chorych.

Tabela 25: Charakterystyka pacjentów z progresją choroby i wczesnym zgonem

	ISS	R-ISS	SD	MVD	Naciek plazmocytami w trepanobiopsji	Cytogenetyka
Pacjent lat 41	3	3	3	11	90%	hyperdiploidia
Pacjent lat 48	3	3	3	16,2	70%	t(4;14)
Pacjentka lat 58	3	3	3	12,3	90%	Mutacja TP53, t(14;16)

4.3.2. Ocena korelacji stężenia białek proangiogennych z odpowiedzią na leczenie

Ocenę korelacji stężenia endogliny z odpowiedzią na leczenie analizowano u 48 pacjentów. W grupie pacjentów, którzy pozytywnie odpowiedzieli na leczenie ($\geq$ PR), średnie stężenie endogliny wynosiło 2,49 ng/ml (2,12-2,81 ng/ml), a w grupie chorych z niepowodzeniem leczenia ($<$ PR) było mniejsze – 2,28 ng/ml (1,85-2,55 ng/ml), różnica nie była istotna statystycznie ($p=0,2917$).

Ocenę korelacji stężenia VEGF A z odpowiedzią na leczenie analizowano u 47 pacjentów. W grupie pacjentów, którzy pozytywnie odpowiedzieli na leczenie ($\geq$ PR), średnie stężenie VEGF A wynosiło 41,73 pg/ml (18,92-70,95 pg/ml), a w grupie chorych z niepowodzeniem leczenia ($<$ PR) stężenie było większe – 52,91 pg/ml (37,99-80,83 pg/ml), ale różnica nie była istotna statystycznie ($p=0,3681$).

Ocenę korelacji stężenia VEGF B z odpowiedzią na leczenie analizowano u 48 pacjentów. W grupie pacjentów, którzy pozytywnie odpowiedzieli na leczenie ($\geq$ PR), średnie stężenie VEGF B wynosiło 0,29 pg/ml (0,29-3,17 pg/ml), a w grupie chorych z niepowodzeniem leczenia ($<$ PR) było większe – 0,35 pg/ml (0,29-1,73 pg/ml), ale różnica nie była istotna statystycznie ($p=0,8063$).

Ocenę korelacji stężenia FGF 2 z odpowiedzią na leczenie analizowano również u 48 pacjentów. W grupie pacjentów, którzy pozytywnie odpowiedzieli na leczenie ($\geq$ PR), średnie stężenie FGF 2 wynosiło 293,91 pg/ml (199,45-491,74 pg/ml), a w grupie

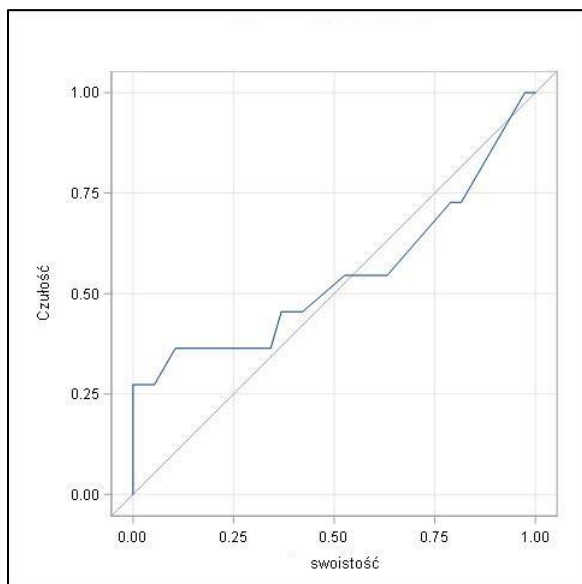
chorych z niepowodzeniem leczenia (<PR) było mniejsze – 240,75 pg/ml (200,81-330,61 pg/ml), różnica nie była istotna statystycznie ($p=0,5044$).

4.3.3. Analiza krzywych ROC dla wybranych parametrów jako czynników prognostycznych szpiczaka mnogiego

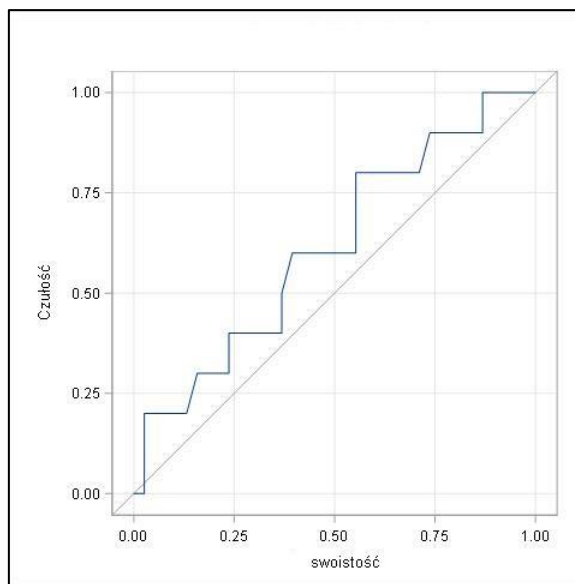
Celem określenia czynnika, który potencjalnie mógłby dyskryminować niepowodzenie leczenia choroby, dokonano analizy krzywych ROC dla badanych białek proangiogennych oraz MVD.

Powierzchnia pod krzywą ROC wykreśloną dla wszystkich badanych parametrów wynosiła odpowiednio: MVD – 0,5443, endogliny – 0,6118 ng/ml; VEGF A – 0,4006 pg/ml; VEGF B – 0,525 pg/ml; VEGF C – 0,5468 ng/ml; FGF 2 0,5711 pg/ml. Takie wyniki wskazują na brak zdolności dyskryminacyjnej tych parametrów do oceny niepowodzenia na leczenie. Krzywe ROC przedstawiono na rycinach 19-22.

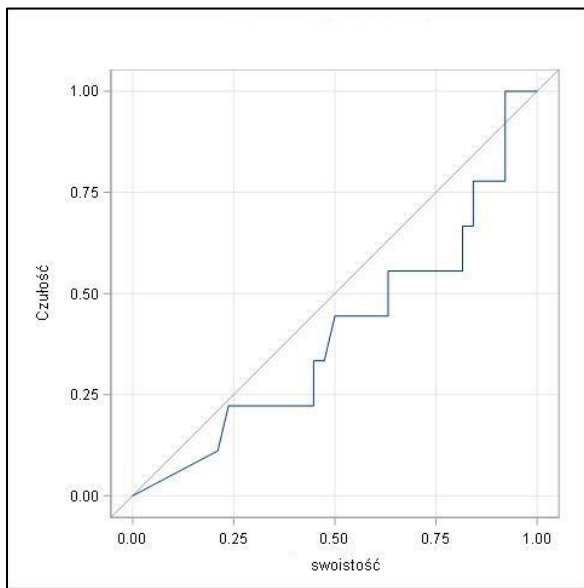
Rycina 19: Krzywa ROC dla endogliny



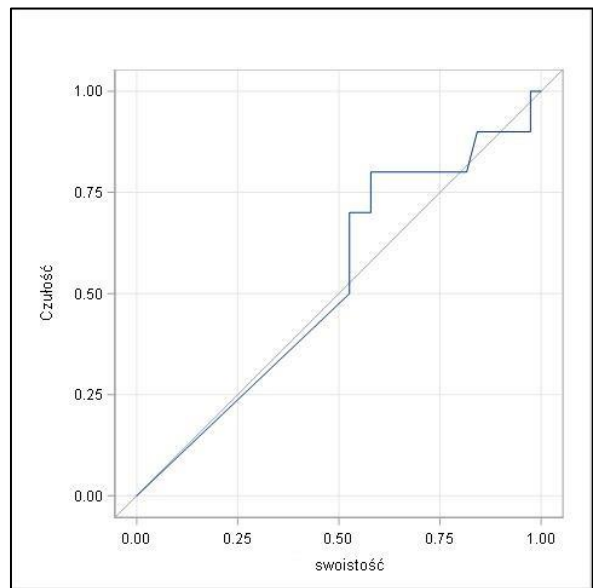
Rycina 18: Krzywa ROC dla MVD



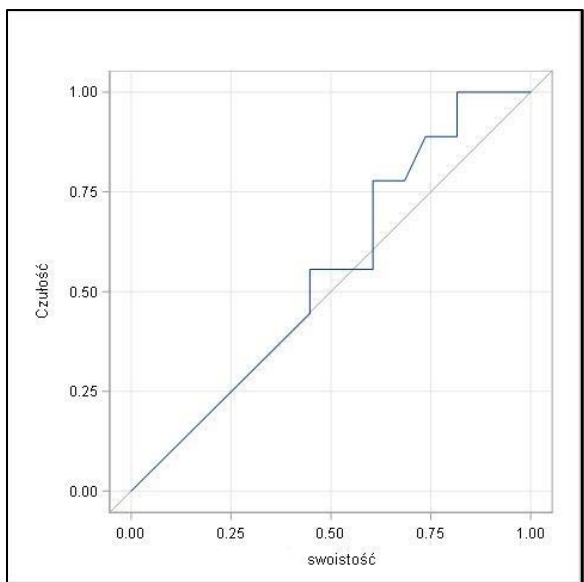
Rycina 21: Krzywa ROC dla VEGF A



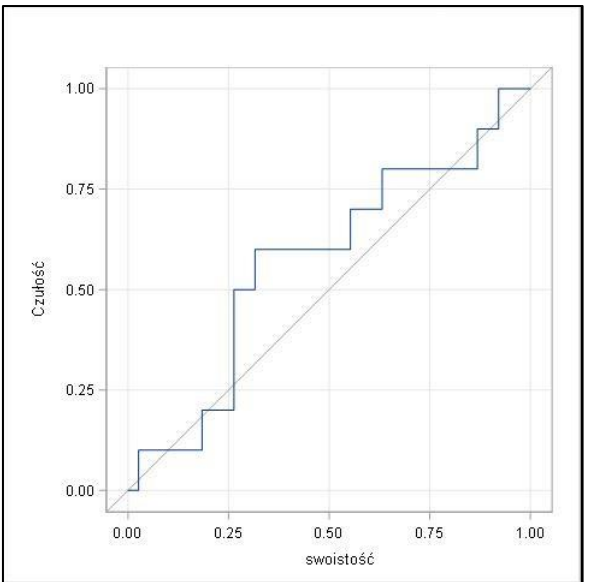
Rycina 20: Krzywa ROC dla VEGF B



Rycina 23: Krzywa ROC dla VEGF C



Rycina 22: Krzywa ROC dla FGF 2



5. Dyskusja

Od wielu lat rola angiogenezy w rozwoju nowotworów jest przedmiotem zainteresowań zarówno naukowców jak i klinicystów. W wielu dotychczas prowadzonych badań udowodniono związek stopnia nasilenia angiogenezy z klinicznymi i patologicznymi cechami złośliwości niektórych nowotworów litych. Obserwacje te dotyczyły między innymi raka piersi [105], raka żołądka [116], raka płuca [118], raka prostaty [117], a także nowotworów hematologicznych. Niektóre prace nie potwierdzają opisanych powyżej zależności, aczkolwiek są w zdecydowanej mniejszości [119]. W przypadku szpiczaka plazmocytozy, pierwsze obserwacje dotyczące angiogenezy opublikował w 1999 roku Vacca i wsp [67].

W badaniu stanowiącym przedmiot rozprawy oceniano stopień nasilenia angiogenezy w sposób bezpośredni (MVD) i pośredni (stężenia białek proangiogennych) u chorych ze świeżo zdiagnozowanym, aktywnym szpiczakiem mnogim. Dla celów analizy podzielono badaną grupę chorych na podgrupy z zależności od wybranych parametrów klinicznych jak i histopatologicznych.

W pracy własnej wykorzystano metodę bezpośrednią oceny angiogenezy opartą na standardowej metodzie Weindera, wykorzystując barwienie immunohistochemiczne antygenu CD34, który jest uznanym markerem dla oceny MVD w tkance nowotworowej [108]. Celem zwiększenia precyzji wyniku liczono średnią gęstość naczyń w 10 polach widzenia z wykorzystaniem programu komputerowego, aczkolwiek w piśmiennictwie można znaleźć prace, w których wykorzystywano do tego celu 3-10 pól widzenia [105-107]. Pomimo modyfikacji i unowocześnieniu, jakim metoda Weidnera uległa przez ostatnie lata, niestety może być nadal obciążona szeregiem wad. Jedną z nich jest kwestia różnorodności unaczynienia tkanki nowotworowej i problem z identyfikacją miejsc, w których to unaczynienie jest największe. Do tego dochodzi także kwestia doświadczenia i umiejętności osoby, która ocenia preparaty. Udoskonalenie i wprowadzenie nowych technik oceny wspomaganą komputerowo być może pozwoli na uzyskanie bardziej standaryzowanych wyników.

5.1. Stopień nasilenia angiogenezy a parametry kliniczne i histopatologiczne u chorych na MM w momencie diagnozy

We wstępnej analizie w badaniu własnym, chorych podzielono na podgrupy w zależności od wielkości nacieku komórkami plazmatycznymi w szpiku kostnym, ocenianym dwoma metodami – w preparatach z biopsji aspiracyjnej szpiku kostnego (mielogram) oraz trepanobiopsji. Jako wartość progową przyjęto nacieki komórkami plazmatycznymi o wartości 50%. Stwierdzono istotnie większe wartości MVD w podgrupie chorych z naciekiem w trepanobiopsji $\geq 50\%$ w porównaniu z grupą, w której nacieki były mniejsze niż 50% ($p=0,0002$). Podobne obserwacje poczynili Baur i wsp., którzy stwierdzili, że wraz ze wzrostem ilości plazmacytów w szpiku kostnym (ocenianej w badaniu histologicznym szpiku), dochodzi do istotnego zwiększenia średniej gęstości naczyniowej [120]. Z kolei w badaniu Rana i wsp., oceniano MVD u chorych na świeżo zdiagnozowanego szpiczaka plazmacytowego w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami (odpowiednio dobranymi pod kątem płci i wieku). Stwierdzono istotnie wyższą wartość MVD u pacjentów chorych na szpiczaka w porównaniu z grupą kontrolną. Dodatkowo odnotowano większą wartość MVD u chorych z dużą masą nowotworu oraz rozlanym naciekiem w szpiku kostnym [121]. W badaniu Ahn i wsp. stwierdzono słabą korelację pomiędzy naciekiem plazmacytami w szpiku kostnym a MVD, nieistotną statystycznie ($p=0,097$) [124]. W badaniu Lee i wsp. z 2015 roku ponownie zaobserwowano istotną korelację pomiędzy zwiększonym MVD a większym naciekiem plazmacytami w szpiku kostnym ($p=0,002$) [125].

W pracy własnej nie stwierdzono natomiast korelacji pomiędzy procentowym odsetkiem plazmacytów w szpiku kostnym ocenianym w materiale z aspiratu (mielogram), a zwiększonym MVD. Owszem, odnotowano nieznacznie większe wartości MVD w grupie z większym ($\geq 50\%$) naciekiem, ale nie były one istotne statystycznie ($p=0,1535$). Ocena nacieku plazmacytami w szpiczaku plazmacytowym, opierająca się jedynie na wyniku mielogramu jest coraz mniej spotykana w piśmiennictwie. Zgodnie z aktualnymi wytycznymi opublikowanymi przez Polską Grupę Szpiczakową (PGM) [1], trepanobiopsja szpiku powinna stanowić podstawowe badanie w postępowaniu diagnostycznym u chorych na szpiczaka plazmacytowego, nie tylko dla celu określenia odsetka plazmacytów, ale przede wszystkim oceny

klonalności na podstawie badania immunohistochemicznego. Mielogram jednak nie przestaje być badaniem użytecznym w diagnostyce szpiczaka plazmocytoowego. Zarówno PGM jak i inni autorzy, zalecają połączenie obu metod celem optymalnej oceny nacieku komórkami plazmatycznymi, co jak pokazują badania, ma nie tylko znaczenie dla postawienia rozpoznania, ale także rokowania u chorych [129].

W pracy własnej analizowano także stężenia białek proangiogennych w zależności od nacieku szpiku kostnego komórkami plazmatycznymi. Zarówno w przypadku biopsji aspiracyjnej szpiku jak i trepanobiopsji, średnie stężenia endogliny, VEGF A, VEGF B, VEGF C oraz FGF2 nie różniły się statystycznie w podgrupie chorych z naciekiem szpiku komórkami plazmatycznymi $\geq 50\%$ vs $< 50\%$. Podobną obserwację poczynili w 2008 roku Marković i wsp., aczkolwiek w swojej pracy nie oceniali stężenia VEGF, a ekspresję. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy dodatnią ekspresją VEGF a zwiększonym naciekiem plazmocyty w szpiku kostnym [134]. W pracy Usnarskiej-Zubkiewicz i wsp. badano stężenia VEGF u chorych na szpiczaka plazmocytoowego i również nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem VEGF a naciekiem plazmocyty w szpiku kostnym [135].

Jednym z elementów oceny histopatologicznej preparatów z trepanobiopsji w pracy własnej było określenie stopnia włóknienia retikulinowego w szpiku kostnym. Retikulina, jako substancja występująca w prawidłowym szpiku kostnym, może ulegać zwiększeniu w szeregu stanów patologicznych, zarówno o podłożu nie- jak i nowotworowym, aczkolwiek etiologia tego zjawiska nie jest do końca poznana [126].

W piśmiennictwie dostępne są dane, które pokazują występowanie tendencji do zwiększonego włóknienia szpiku u chorych na szpiczaka plazmocytoowego, co może być związane ze zwiększonym wydzielaniem czynników takich jak min. TGF- β , VEGF oraz IL-6. Czynniki te nie tylko stymulują proliferację nowych naczyń, ale także działają mitogennie w stosunku do fibroblastów [128]. Z dotychczas prowadzonych badań wynika także, że nasilone włóknienie szpiku w szpiczaku plazmocytoowym może powodować niedoszacowanie oceny nacieku komórkami plazmatycznymi w szpiku kostnym w biopsji aspiracyjnej szpiku kostnego. Jest to kolejny argument przemawiający za potrzebą wykonywania oceny histopatologicznej szpiku w trakcie dagnostyki szpiczaka plazmocytoowego. W pracy Subramanian i wsp.[136] wykazano ponadto, że zwiększone włóknienie istotnie koreluje ze słabym zróżniowaniem morfologicznym nowotworowych plazmocytoów ($p=0,020$) oraz aktywnością mitotyczną

($p=0,003$), które można uznać za markery prognostyczne w szpiczaku plazmocytowym. W badaniu tym średni czas przeżycia u chorych z nasilonym włóknieniem szpiku wynosił zaledwie 11 miesięcy.

W pracy własnej, w badaniu histopatologicznym szpiku, stopień włóknienia oceniano (zgodnie z piśmiennictwem) w skali od 0 do 2, przy czym stopień 0 oznaczało brak włóknienia, a stopień 2 oznaczał największe nasilenie włóknienia. Chorych podzielono na dwie podgrupy – podgrupę o mniejszym nasileniu włóknienia (włóknienie 0 i 1 stopnia) oraz podgrupę o większym nasileniu włóknienia (włóknienie 2 stopnia). Porównano wartości MVD a także stężenia białek proangiogennych w obu podgrupach. Odnotowano nieznacznie większe wartości MVD w podgrupie bardziej nasilonego włóknienia, ale różnica nie była istotna statystycznie. W pracy Babarović i wsp. oceniano zależność stopnia włóknienia w szpiku kostnym z innymi parametrami histopatologicznymi, laboratoryjnymi i klinicznymi u chorych na świeżo zdiagnozowanego szpiczaka plazmocytozowego, zarówno przed jak i po leczeniu. Wykazano, że wyższy stopień włóknienia szpiku istotnie korelował z wyższą wartością MVD ($p=0,032$), a także naciekiem plazmocytami w szpiku kostnym ($p=0,058$). Nie zaobserwowano natomiast takiej zależności w szpiku kostnym chorych po leczeniu [127].

W badaniu własnym wykazano także istotnie zwiększone stężenie endogliny u chorych w podgrupie bardziej nasilonego włóknienia ($p=0,0228$). W przypadku pozostałych białek proangiogennych nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. W przypadku endogliny opublikowano prace, które wskazują na jej rolę w procesach przebiegających ze zwiększonym włóknieniem, między innymi w mięśniu sercowym, nerkach oraz wątrobie. W pracy Ponzoni i wsp.[137] oceniano proces angiogenezy w idiopatycznym włóknieniu szpiku i stwierdzono, iż istotnie koreluje on z włóknieniem, aczkolwiek w ocenie endogliny wykorzystano barwienia immunohistochemiczne, a nie jej stężenie w surowicy krwi. W piśmiennictwie brakuje prac, które skupiłyby się na badaniu stężenia endogliny w aspekcie nie tylko angiogenezy w szpiczaku plazmocytowym, ale także i włóknienia szpiku.

Kolejnym krokiem analizy w pracy własnej była ocena korelacji MVD oraz stężeń białek proangiogennych w surowicy krwi ze stopniem zaawansowania szpiczaka plazmocytozowego, biorąc pod uwagę trzy aktualnie obowiązujące klasyfikacje: Salmon Durie, ISS oraz R-ISS.

W analizie dotyczącej wartości MVD u pacjentów w poszczególnych stadiach zaawansowania według klasyfikacji Salmon Durie, nie wykazano istotnych statystycznie różnic, zarówno dzieląc chorych na mniejszy (1+2) i większy (3) stopień zaawansowania, jak i zachowując podział zgodnie z klasyfikacją na stopień 1, 2 i 3. Odnotowano wprawdzie, że wartości MVD były najniższe w grupie najmniejszego zaawansowania, a największe w grupie największego zaawansowania, odpowiednio: stopień 1: 2,55 (1,80 – 3,30), stopień 2: 4,85 (4,30 – 7,20), stopień 3: 5,25 (3,95 - 7,40). Być może badanie w większej grupie chorych pozwoliłoby na wykazanie różnicy istotnej statystycznie. W badaniu Lee i wsp [125] wykazano, że wartości MVD wzrastają istotnie wraz ze stopniem zaawansowania wg Salmon Durie ($p=0,006$). Warto jednak podkreślić, że liczba pacjentów, którzy wzięli udział w badaniu była ponad dwukrotnie większa (107 chorych) niż w badaniu własnym. Podobne wyniki przedstawili w swojej pracy Niemöller i wsp [131]. Porównali MVD u chorych na szpiczaka plazmocytozy przed rozpoczęciem leczenia, jednakże zastosowali inny podział pacjentów do analizy, mianowicie wyodrębnili podgrupę chorych o najmniejszym stopniu zaawansowania (1 stopień) i podgrupę większego zaawansowania (stopień 2+3). W grupie chorych o najmniejszym stopniu zaawansowania wartości MVD były istotnie niższe niż w przypadku grupy większego zaawansowania ($p=0,005$). W badaniu własnym nie zdecydowano się na taki podział chorych do analizy, ponieważ ze stopniem zaawansowania 1 było zaledwie 2 chorych, tymczasem resztę stanowili pacjenci z wyższym stopniem zaawansowania (50 chorych).

Podobnych obserwacji dokonali Jose i wsp. [132]. Pomimo, iż badanie opublikowano w 2019 roku, a rekrutacja trwała w ciągu ostatnich kilku lat, stopień zaawansowania u chorych oceniano jedynie wg klasyfikacji Salmon Durie. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy stadium choroby a MVD ($p<0,05$).

Z kolei w badaniu Sucak i wsp., które objęło 29 chorych na nieleczony szpiczaka plazmocytozy podobnie jak w badaniu własnym nie wykazano związku pomiędzy MVD a stopniem zaawansowania wg Salmon Durie [130].

W pracy własnej, w analizie dotyczącej stężeń białek proangiogennych u pacjentów w poszczególnych stadiach zaawansowania według klasyfikacji Salmon Durie, wykazano istotnie statystycznie zwiększone stężenia endogliny u chorych z

większym zaawansowaniem choroby. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniach pozostałych białek proangiogennych.

W badaniu Sezer i wsp. [82] oceniano stężenia FGF-2, VEGF oraz HGF były istotnie zwiększone u chorych z wyższym stopniem zaawansowania wg Salmon Durie (I+II vs III). W akapicie powyżej, dotyczącym związku MVD ze stadium zaawansowania, wyjaśniono, dlaczego taka analiza nie była możliwa w badaniu własnym.

Podobne obserwacje poczyniono także w pracy Usnarskiej-Zubkiewicz i wsp. [135]. Badanie objęło łącznie 34 pacjentów, wśród których 22 zakwalifikowano jako II stopień wg Salmon Durie, a pozostałych 12 jako stopień III. U chorych ze stopniem zaawansowania III, stwierdzono istotnie wyższe stężenie VEGF w porównaniu z grupą ze stopniem zaawansowania II.

W pracy Tsirakis i wsp. [89] oceniano korelację endogliny z różnymi parametrami dotyczącymi chorych na szpiczaka plazmocytozy i podobnie jak w niniejszej pracy, odnotowano większe stężenia endogliny u chorych z większym zaawansowaniem choroby w klasyfikacji Salmon Durie ($p < 0,002$).

W analizie własnej, w poszczególnych stadiach zaawansowania w klasyfikacji ISS oraz R-ISS wykazano istotne różnice statystyczne dotyczące wartości MVD u chorych. Odnotowano istotne zwiększanie wartości MVD wraz z większym stopniem zaawansowania. W przypadku klasyfikacji ISS dotyczyło to zarówno analizy przy podziale chorych na podgrupę mniejszego (1+2) a większego (3) zaawansowania ($p = 0,0417$), jak i zachowując podział chorych zgodnie z klasyfikacją na stopień 1, 2 i 3 ($p = 0,0465$). W przypadku klasyfikacji R-ISS, istotną statystycznie różnicę odnotowano jedynie w przypadku analizy w podgrupach chorych podzielonych zgodnie z klasyfikacją stopnia zaawansowania (stopień 1, 2 i 3) – $p = 0,0092$.

W przypadku białek proangiogennych, w pracy własnej nie stwierdzono istotnych różnic w ich stężeniu w zależności od stopnia zaawansowania w klasyfikacjach ISS oraz R-ISS. W pracy Marković i wsp. [134] porównywano stężenia wybranych białek proangiogennych (endoglina, angiogenina i VEGF) w zależności od stopnia zaawansowania w klasyfikacji ISS i stwierdzono istotnie zwiększone stężenia tych białek w przypadku wyższego stopnia zaawansowania.

Porównując liczbę prac dostępnych w piśmiennictwie dotyczących związku MVD, ze stopniem zaawansowania, okazuje się, że większość dotyczy klasyfikacji

Salmon Durie. W badaniu Lee i wsp [125] wykazano silną korelację pomiędzy wartością MVD a stopniem zaawansowania wg ISS ($p < 0,001$). W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono natomiast prac, w które dotyczyłyby oceny korelacji pomiędzy wartością MVD ale także stężeniami białek proangiogennych, a najnowszą klasyfikacją R-ISS. Może to wynikać z faktu, że klasyfikacja R-ISS została opracowana stosunkowo niedawno, w 2015 roku.

W przypadku szpiczaka plazmocytoowego, obecność specyficznych zmian cytogenetycznych, jak wspomniano we wstępie, stanowi niezależny czynnik rokowniczy. Badanie cytogenetyczne jest aktualnie jednym z podstawowych badań wykonywanych u chorych na szpiczaka plazmocytoowego. W badaniu własnym, oprócz oceny wartości MVD oraz stężenia białek proangiogennych w zależności od stopnia zaawansowania w klasyfikacji R-ISS (uwzględniająca obecność niektórych zmian cytogenetycznych w ocenie rokowania), poszerzono analizę o ocenę korelacji wartości MVD oraz stężenia białek proangiogennych z poszczególnymi zmianami cytogenetycznymi, wykrytymi w badaniu FISH w badanej grupie chorych.

Wykazano istotnie zwiększone wartości MVD w grupie chorych, u których badanie FISH wykazało jakiejkolwiek nieprawidłowości ($p = 0,0296$). W przypadku pacjentów, u których stwierdzono zmiany wysokiego ryzyka cytogenetycznego ($t(4;14)$, $t(14;16)$ oraz delecję TP53), wartości MVD były większe niż u chorych, u których tych zmian nie stwierdzono, aczkolwiek różnica nie była istotna statystycznie, co może być związane ze stosunkowo niewielką grupą badanych przypadków. Z kolei porównując grupę chorych, u których w badaniu FISH wykazano obecność zmian sugerujących kariotyp hyperdiploidalny, z grupą, w której takich zmian nie stwierdzono, nie odnotowano znamiennej istotnych różnic w zakresie MVD.

W dostępnym piśmiennictwie brakuje prac dotyczących korelacji zmian cytogenetycznych z gęstością naczyń w szpiku kostnym u chorych na szpiczaka plazmocytoowego.

W pracy Schreiber i wsp. [133], opublikowanej w 2000 roku, oceniano MVD u chorych na szpiczaka plazmocytoowego w odniesieniu do określonych zmian cytogenetycznych w badaniu FISH. Wykazano, że obecność co najmniej jednej zmiany cytogenetycznej, uznanej jako niekorzystnej rokowniczo jak delecja 13q14, delecja 17p, aberracje chromosomu 11 jak $t(11;14)$ wiąże się z zwiększonymi wartościami

MVD. Aczkolwiek szczegółowa analiza pokazała, że istotność statystyczna została osiągnięta jedynie w przypadku delecji 13q14.

W przypadku stężeń białek proangiogennych, nie odnotowano istotnych różnic statystycznych u chorych, u których stwierdzono prawidłowy kariotyp w porównaniu z podgrupą chorych, u których badanie FISH wykazało jakiekolwiek nieprawidłowości, bez względu na ich znaczenie rokownicze. Podobne rezultaty uzyskano porównując stężenia tych białek w grupie chorych, w której w badaniu FISH wykazano obecność zmian sugerujących kariotyp hyperdiploidalny vs pozostali chorzy.

W przypadku obecności zmian cytogenetycznych, określanych jako zmiany wysokiego ryzyka cytogenetycznego (t(4;14), t(14;16) oraz delecja TP53) stężenia VEGF A oraz endogliny były nieznacznie większe niż u chorych, u których tych zmian nie stwierdzono, aczkolwiek różnica nie była istotna statystycznie. Może być związane ze stosunkowo niewielką grupą badanych przypadków, co wymagałoby dalszej eksploracji.

Podobnie jak w przypadku gęstości naczyniowej, w dostępnym piśmiennictwie brakuje prac dotyczących korelacji zmian cytogenetycznych ze stężeniem białek proangiogennych u chorych na szpiczaka plazmocytoowego. W 2013 roku opublikowano pracę Hattori i wsp. [138], w której autorzy skupili się na charakterystyce linii komórkowej, którą nazwano MUM24, pochodzącej od pacjentki chorej na szpiczaka plazmocytoowego, odpornej na kilka zastosowanych linii leczenia, między innymi obejmujących talidomid. Wykryto szereg nieprawidłowości cytogenetycznych, jak delecja TP53 oraz t(4;14). Wykazano, że komórki te posiadały zdolność do uwalniania dużych ilości czynników proangiogennych jak VEGF, FGF-2 oraz HGF, a obecność traslokacji t(4;14) wiązano z ekspresją receptora FGFR3. Z pewnością kwestia korelacji stopnia angiogenezy a zmian cytogenetycznych wymaga głębszej eksploracji na większej grupie chorych.

5.2. Stopień nasilenia angiogenezy a wczesne wyniki leczenia

Istotnym punktem badania własnego była ocena stopnia nasilenia angiogenezy w szpiku kostnym przed leczeniem w kontekście odpowiedzi na zastosowanie leczenia I linii.

Wszyscy chorzy, którzy zostali włączeni do badania otrzymali chemioterapię I linii opartą na bortezomibie oraz deksametazonie w kombinacji z cyklofosfamidem lub talidomidem, zgodnie z aktualnie obowiązującym standardem w Polsce. Większość chorych otrzymała leczenie według schematu VCD (bortezomib, cyklofosfamid, deksametazon). Odpowiedź oceniono u wszystkich pacjentów.

W badanej grupie dla celów analizy dokonano podziału chorych na tych, którzy odpowiedzieli na leczenie i uzyskali co najmniej PR (grupa powodzenia leczenia) oraz tych, którzy nie odpowiedzieli na leczenie, to znaczy uzyskali SD lub wystąpiła progresja na leczenie (grupa niepowodzenia leczenia).

W podgrupie powodzenia leczenia, MVD (zarówno średnia jak i mediana) była niższa niż w podgrupie niepowodzenia. Różnice te jednak nie były istotne statystycznie (odpowiednio: $p=0,3419$ i $p=0,3346$).

W badaniu Bhatti i wsp [122] – podobnie jak w pracy własnej, oceniano angiogenezę metodami bezpośrednimi - jako MVD i TVA w preparatach z trepanobiopsji szpiku u chorych w momencie rozpoznania choroby. Odnotowano istotnie mniejsze nasilenie angiogenezy u chorych, którzy uzyskali całkowitą remisję (określonych jako grupę powodzenia leczenia) w porównaniu do pozostałych chorych. W badaniu tym wzięło udział ponad dwukrotnie więcej chorych niż w badaniu własnym (110 chorych vs 53 chorych). Taki podział chorych jak zastosował w analizie Bhatti był możliwy z powodu istotnie większej ilości chorych, którzy uzyskali całkowitą remisję (38 chorych), co stanowiło prawie jedną trzecią wszystkich pacjentów w badaniu. Tymczasem w badaniu własnym całkowitą remisję uzyskało jedynie 3 pacjentów, co uniemożliwiło pod względem statystycznym wykonanie analizy w takich podgrupach jak w badaniu Bhatti. Dlatego też podjęto decyzję o dokonaniu podziału pacjentów na dwie grupy biorąc pod uwagę jako chorych odpowiadających na leczenie także tych, którzy uzyskali VGPR jak i PR.

Z kolei w badaniu Babarović i wsp [127], w którym badana grupa objęła 42 pacjentów, zastosowano podobny jak w pracy własnej podział chorych na

odpowiadających (co najmniej MR) i nieodpowiadających na leczenie. Stwierdzono istotną statystycznie większą wartość MVD w szpiku kostnym przed leczeniem u chorych, którzy nie odpowiedzieli na leczenie.

W pracy własnej wprawdzie nie stwierdzono istotnej różnicy MVD między podgrupami chorych, którzy odpowiedzieli a nie odpowiedzieli na leczenie, aczkolwiek można zauważyć, że w grupie niepowodzenia MVD była nieznacznie wyższa. Być może analiza w szerszej grupie pacjentów pozwoliłaby na uzyskanie znamienności obserwowanej różnicy.

W pracy własnej szczególną uwagę zwrócono na 6 pacjentów, u których stwierdzono progresję choroby. U 3 z nich, u których doszło do wczesnego zgonu zaraz po stwierdzeniu progresji choroby stwierdzono szczególnie wysokie wartości MVD. Pacjentów tych cechowało dodatkowo wysokie zaawansowanie choroby stwierdzane w klasyfikacjach ISS, R-ISS oraz Salmon Durie oraz u 2 z nich obecność zmian cytogenetycznych wysokiego ryzyka – między innymi t(4;14), mutacji TP53 oraz t(14;16). Podobne obserwacje poczynili wspomniani powyżej Bhatti i wsp. Odnotowali istotnie większe nasilenie angiogenezy u chorych, u których stwierdzono gwałtowną progresję oraz zgon. W badaniu Sezer i wsp.[123] stwierdzono istotną różnicę w przeżywalności chorych, u których stwierdzono wysoki a niski stopień nasilenia angiogenezy w szpiku kostnym. Na podstawie wielowariantowej analizy Coxa, biorąc pod uwagę dotychczas uznane w szpiczaku plazmocytowym czynniki prognostyczne jak np. stężenie $\beta 2$ mikroglobuliny, MVD pozostało istotnym czynnikiem prognostycznym.

W pracy własnej nie odnotowano różnic istotnych statystycznie dotyczących stężeń białek proangiogennych pomiędzy grupami chorych pozytywnie i negatywnie odpowiadających na leczenie. Być może wynika to ze zbyt małej liczby pacjentów włączonych do badania, co uniemożliwiało wyznaczenie innego podziału kryteriów powodzenia leczenia. W pracy Saltarella i wsp. opublikowanej w 2019 roku [139], badaniem objęto prawie dwukrotnie większą liczbę chorych (n=124). Wykazano, że w grupie chorych, którzy najlepiej odpowiedzieli na leczenie (odpowiedź co najmniej VGPR), wyjściowe (w momencie diagnozy) stężenia białek proangiogennych (między innymi FGF-2, VEGF, ANG-2) były istotnie niższe. Autorzy wyznaczyli również punkty odcięcia dla stężeń czynników proangiogennych, które determinowały lepszą odpowiedź na leczenie. W pracy własnej na podstawie przyjętych kryteriów

powodzenia i niepowodzenia leczenia, nie udało się na podstawie krzywych ROC wyznaczyć punktów odcięcia stężeń badanych białek proangiogennych.

Podsumowując, należy podkreślić, że jednym z istotnych ograniczeń pracy była liczba zrekrutowanych pacjentów. Poza uzyskanymi, istotnymi wynikami wskazującymi na związek stopnia nasilenia angiogenezy w zaawansowaniu choroby, rysowały się także trendy, które moim zdaniem są interesujące pod kątem dalszego badania tego zagadnienia.

6. Wnioski

1. Stwierdzono korelację MVD oraz nacieku nowotworowymi plazmocytami w szpiku kostnym, stopniem zaawansowania choroby w klasyfikacji ISS oraz R-ISS, a także nieprawidłowym wynikiem badania FISH oraz korelację stężenia endogliny u chorych z zaawansowaniem choroby w klasyfikacji Salmon Durie oraz z nasileniem włóknienia szpiku.
2. Nie stwierdzono istotnej korelacji stopnia nasilenia angiogenezy ocenianego metodą MVD oraz stężenia badanych białek proangiogennych z wczesnymi wynikami leczenia u chorych na szpiczaka plazmocytozowego.
3. Nie stwierdzono istotnej wartości prognostycznej stopnia nasilenia angiogenezy ocenianego metodą MVD oraz stężenia badanych białek proangiogennych dla wyników wczesnych chemioterapii pierwszej linii u chorych na szpiczaka plazmocytozowego

Piśmiennictwo

1. Dmoszyńska A, Usnarska-Zubkiewicz L, Walewski J i wsp. Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczakowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocytoowego oraz innych dyskracji plazmocytoowych na rok 2017. *Acta Haematol Pol.* 2017; 48(2): 55–103
2. Cines DB, Pollak ES, Buck CA et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998; 91(10): 3527–3561
3. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-1186
4. Kerbel RS. Clinical trials of antiangiogenic drugs: opportunities, problems, and assessment of initial results. *J Clin Oncol* 2001, 19: 45-51
5. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016, 127(20), 2375-2390
6. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49: 1374–1403
7. Schinasi LH, Brown EE, Camp NJ et al. Multiple myeloma and family history of lymphohaematopoietic cancers: Results from the International Multiple Myeloma Consortium. *Br J Haematol.* 2016;175(1):87-101
8. Serghianis TN, Zagouri F, Tsilimidos G et al. Risk Factors for Multiple Myeloma: A Systematic Review of Meta-Analyses *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* , Volume 15, Issue 10, 563 – 577
9. Kyrtsonis MC, Bartzis V, Papanikolaou X et al. Genetic and molecular mechanisms in multiple myeloma: a route to better understand disease pathogenesis and heterogeneity. *Appl Clin Genet.* 2010;3:41-51
10. Agarwal A, Ghobrial IM. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: a review of the current understanding of epidemiology, biology, risk stratification, and management of myeloma precursor disease. *Clin Cancer Res* 2013; 19:985–994
11. Furukawa Y, Kikuchi J. Molecular pathogenesis of multiple myeloma *Int J Clin Oncol* 2015; 20: 413

12. Gámez B, Edwards CM. Contributions of the Bone Microenvironment to Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance Pathogenesis. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(6):635-641
13. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer J*. 2018;8(1):7
14. Heher EC, Rennke HG, Laubach JP, Richardson PG. Kidney disease and multiple myeloma. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(11):2007-17
15. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15: 538–548
16. Mina R, D'Agostino M, Cerrato C, Gay F, Palumbo A. Plasma cell leukemia: update on biology and therapy. *Leuk Lymphoma*. 2017 Jul;58(7):1538-1547
17. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG et al. International staging system for multiple myeloma *J Clin Oncol* 2005;23: 3412– 3420
18. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S et al. Revised international staging system for multiple myeloma: a report from international myeloma working group. *J Clin Oncol* 2015; 33(26):2863–2869
19. Terpos E, Katodritou E, Roussou M et al. High serum lactate dehydrogenase adds prognostic value to the international staging system even in the era of novel agents *Eur J Haematol* 2010; 85: 114– 119
20. Chng WJ, Dispenzieri A, Chim CS et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28:269–77
21. Debes-Marun CS, Dewald GW, Bryant S et al. Chromosome abnormalities clustering and its im-plications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia*, 2003; 17: 427-436
22. Rajan AM, Rajkumar SV. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer J*. 2015;5:365
23. Mikhael JR, Dingli D, Roy V et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: Updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Guidelines 2013. *Mayo Clin Proc* 2013; 88: 360–376

24. Usmani SZ, Rodriguez-Otero P, Bhutani M et al. Defining and treating high-risk multiple myeloma. *Leukemia* 2015;29:2119–2125
25. Binder M, Rajkumar SV, Ketterling RP et al. 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, e600 (2017)
26. Manier S, Salem KZ, Park J et al. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14:100-113
27. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP et al. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. *Leukemia.* 2018;33(1):159–170
28. Hanbali A, Hassanein M, Rasheed W, Aljurf M, Alsharif F. The Evolution of Prognostic Factors in Multiple Myeloma. *Adv Hematol.* 2017;2017:4812637
29. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood.* 2011;117(18):4701–4705
30. Suska A., Jurczyszyn A: Użyteczność testów Hevylite™ w diagnostyce i monitorowaniu szpiczaka plazmocytoowego i gammapatii monoklonalnej o niezdefiniowanym znaczeniu. *Przegląd lekarskie* 2017/74/12 695-701
31. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2018, 132(23), 2456-2464
32. Engelhardt M, Kleber M, Udi J et al. Consensus statement from European experts on the diagnosis, management, and treatment of multiple myeloma: from standard therapy to novel approaches. *Leuk Lymphoma.* 2010;51(8): 1424–43
33. Kumar S, Flinn I, Richardson PG et al. Randomized, multicenter, phase 2 study (EVOLUTION) of combinations of bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, and lenalidomide in previously untreated multiple myeloma. *Blood.* 2012;119(19):4375–82
34. Al Hamed R, Bazarbachi AH, Malard F, Harousseau JL, Mohty M Current status of autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2019;9(4):44

35. Roussel M, Moreau P, Huynh A et al. Bortezomib and high-dose Melphalan vs. high-dose melphalan as conditioning regimen before autologous stem cell transplantation in de novo multiple myeloma patients: a phase 3 study of the Intergroupe Francophone Du Myelome (IFM) Blood. 2010 Jan 7;115(1):32-7
36. Attal M, Harousseau JL, Facon T et al. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. N. Engl. J. Med. 2003;349:2495–2502
37. Cavo M, Petrucci MT, Di Raimondo F et al. Upfront single versus double autologous stem cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma: an intergroup, multicenter, phase III study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95 MM Trial) Blood. 2016;128:991
38. Stadtmauer EA, Pasquini MC, Blackwell B et al. Autologous Transplantation, Consolidation, and Maintenance Therapy in Multiple Myeloma: Results of the BMT CTN 0702 Trial. J Clin Oncol. 2019 Mar 1;37(7):589-597
39. Giralt S, Garderet L, Durie B et al. American Society of Blood and Marrow Transplantation, European Society of Blood and Marrow Transplantation, Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, and International Myeloma Working Group Consensus Conference on Salvage Hematopoietic Cell Transplantation in Patients with Relapsed Multiple Myeloma. Biol. Blood. Marrow Transplant. 2015;21:2039–2051
40. Bashir Q, Qazilbash MH. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Myeloma: When and in Whom Does It Work. Curr Hematol Malig Rep. 2017 Apr;12(2):126-13
41. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK et al. Persistent overall survival benefit and no increased risk of second malignancies with bortezomib-melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone in patients with previously untreated multiple myeloma. J Clin Oncol. 2013; 31:448–455
42. Wijermans P, Schaafsma M, Termorshuizen F et al. Phase III study of the value of thalidomide added to melphalan plus prednisone in elderly patients with newly diagnosed multiple myeloma: the HOVON 49 Study. J Clin Oncol. 2010; 28:3160–3166

43. Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A et al. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2014; 371:906–917
44. Sengsayadeth S, Malard F, Savani BN, Garderet L, Mohty M. Posttransplant maintenance therapy in multiple myeloma: the changing landscape. *Blood Cancer J*. 2017;7(3):e545
45. McCarthy PL, Owzar K, Hofmeister CC et al. Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2012; 366:1770–1781
46. Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, Caillot D, Moreau P, Facon T et al. Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2012; 366: 1782–1791
47. McCarthy PL, Holstein SA, Petrucci MT et al. Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol*. 2017;35(29):3279–3289
48. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IG, van der Holt B et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol*. 2012; 30:2946–2955
49. Anderson KC, Alsina M, Atanackovic D et al. Multiple Myeloma, Version 2.2016: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2015;13(11):1398–1435
50. Dingli D, Ailawadhi S, Bergsagel PL et al. Therapy for Relapsed Multiple Myeloma: Guidelines From the Mayo Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy. *Mayo Clin Proc*. 2017;92(4):578–598
51. Korde N, Roschewski M, Zingone A et al. Treatment With Carfilzomib-Lenalidomide-Dexamethasone With Lenalidomide Extension in Patients With Smoldering or Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *JAMA Oncol*. 2015;1(6):746-754
52. Dimopoulos MA, San-Miguel J, Belch A et al. Daratumumab plus lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma: updated analysis of POLLUX. *Haematologica*. 2018 Dec;103(12):2088-2096

53. Spencer A, Lentzsch S, Weisel K et al. Daratumumab plus bortezomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma: updated analysis of CASTOR. *Haematologica*. 2018 Dec;103(12):2079-2087
54. Gavriatopoulou M, Terpos E, Dimopoulos MA et al. The extended 4-year follow-up results of the ELOQUENT-2 trial. *Oncotarget*. 2019 Jan 4;10(2):82-83
55. Mateos MV, Dimopoulos MA, Cavo M et al . Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med*. 2018 Feb 8;378(6):518-528
56. Facon T, Kumar S, Plesner T et al. Daratumumab plus Lenalidomide and Dexamethasone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med*. 2019 May 30;380(22):2104-2115
57. Moreau P, Attal M, Hulin C et al. Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019 Jul 6;394(10192):29-38
58. Dimopoulos MA, Laubach JP, Echeveste Gutierrez MA et al: Ixazomib maintenance therapy in newly diagnosed multiple myeloma: An integrated analysis of four phase I/II studies. *Eur J Haematol*. 2019 Jun;102(6):494-503
59. Dimopoulos MA, Facon T, Richardson PG et al: ELOQUENT-1: A phase III, randomized, open-label trial of lenalidomide/dexamethasone with or without elotuzumab in subjects with previously untreated multiple myeloma (CA204-006). *Journal of Clinical Oncology* 2012 30:15_suppl, TPS8113-TPS8113
60. Engelhardt M, Terpos E, Kleber M et al. European Myeloma Network recommendations on the evaluation and treatment of newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2014;99:232–242
61. Cines DB, Pollak ES, Buck CA et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998; 91(10): 3527–3561

62. Folkman J. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med.* 1995;333(26):1757–1763
63. Kutrzyk A. Angiogeneza — możliwości, problemy, perspektywy. *Postepy biochemii* 2015 61(1):25-34
64. Bryan BA, D'Amore PA. What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64:2053–2065
65. Barchnicka A, Olejniczak-Nowakowska M, Krupa-Kotara K, Grosicki S. The importance of antiangiogenic effect in multiple myeloma treatment. *Adv Clin Exp Med.* 2018 Feb;27(2):291-297
66. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:401–410
67. Vacca A, Ribatti D, Presta M et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood.* 1999;93:3064–3073
68. Giuliani N, Storti P, Bolzoni M et al: Angiogenesis and multiple myeloma. *Cancer Microenvironment* (2011)4:325-337
69. Otjacques E, Binsfeld M, Noel A, Beguin Y, Cataldo D, Caers J. Biological aspects of angiogenesis in multiple myeloma. *Int J Hematol.* 2011;94:505–518
70. Rajkumar SV, Mesa RA, Fonseca R et al. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin. Cancer Res.* 2002;8:2210–2216
71. Zheng Y, Cai Z, Wang S et al. Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood.* 2009;114:3625–3628
72. Ribatti D, Vacca A. New Insights in Anti-Angiogenesis in Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci.* 2018 Jul 12;19(7):2031
73. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor, that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219: 983-985
74. Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci.* 2012 Sep;37(9):364-72

75. Thomas K. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; 271: 603-606
76. Dankbar B, Padro T, Leo R et al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood*. 2000;95:2630–2636
77. Podar K, Tai YT, Davies FE et al. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood*. 2001;98:428–435
78. Wróbel T, Mazur G, Surowiak P, Dziegiel P, Usnarska-Zubkiewicz L, Kulczkowski K. Increased expression of vascular endothelial growth factor in bone marrow of multiple myeloma patients. *Eur J Intern Med*. 2003 Mar;14(2):98-100
79. Tung - Ping Poon R, Tat-Fan S, Wong J.: Clinical implications of circulating angiogenic factors in can-cer patients. *J. Clin. Oncol*. 2001, 19, 1207
80. Vacca A, Ribatti D, Presta M et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood*. 1999;93: 3064-3073.
81. Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo G et al. Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. *Haematologica*. 2000;85: 800-805
82. Sezer O, Jakob C, Eucker J et al. Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma. *Eur J Haematol*. 2001;66: 83-88
83. Mitsiades CS, Mitsiades NS, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC. The role of the bone marrow microenvironment in the pathophysiology and therapeutic management of multiple myeloma: interplay of growth factors, their receptors and stromal interactions. *Eur J Cancer*. 2006;42:1564–1573
84. Wróbel T, Butrym A, Łacina P i wsp. bFGF Polymorphism Is Associated with Disease Progression and Response to Chemotherapy in Multiple Myeloma Patients. *Anticancer Res*. 2017 Apr;37(4):1799-1803

85. Dallas NA, Samuel S, Xia L et al. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14: 1931-1937
86. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S: CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.*, 2003; 17: 984-992
87. Jarosz M, Szala S. Endoglina jako cel terapii przeciwnowotworowej. *Postepy Hig Med Dosw* 2013; 67: 79-89
88. Pappa C, Alexandrakis M, Boula A et al. Emerging roles of endoglin/CD105 and angiogenic cytokines for disease development and progression in multiple myeloma patients. *Hematol Oncol* 2013; 34: 201–205
89. Tsirakis G, Pappa CA, Spanoudakis M et al. Clinical significance of sCD105 in angiogenesis and disease activity in multiple myeloma. *Eur J Intern Med.* 2012 Jun;23(4):368-73
90. Åhsberg J, Tsapogas P, Qian H et al. Interleukin-7-induced Stat-5 acts in synergy with Flt-3signaling to stimulate expansion of hematopoietic progenitor cells, *J. Biol.Chem.* 285 (2010) 36275–36284
91. Kokonozaki M, Tsirakis G, Devetzoglou M et al. Potential role of FLT3-ligand in the angiogenic process of multiple myeloma. *Leukemia research.* 2015;39:1467–1472
92. Solanilla A, Grosset C, Lemercier C et al, Expression of FLT3-ligand by the endothelialcell, *Leukemia* 14 (2000) 153–162
93. Steiner N, Hajek R, Sevcikova S et al. High levels of FLT3-ligand in bone marrow and peripheral blood of patients with advanced multiple myeloma. *PLoS ONE* 2017; 12(7)
94. Singhal S, Mehta J, Desikan R et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med.* 1999;341:1565–1571
95. Dmoszyńska A. Angiogeneza i leczenie antyangiogenne w szpiczaku plazmocytowym. *Onkol Prak Klin.* 2009;5 (Supl A):A56–A61
96. Gupta D, Treon SP, Shima Y et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: Therapeutic applications. *Leukemia.* 2001;15:1950–1961

97. Lu L, Payvandi F, Wu L, et al. The anti-cancer drug lenalidomide inhibits angiogenesis and metastasis via multiple inhibitory effects on endothelial cell function in normoxic and hypoxic conditions. *Microvasc Res*. 2009;77:78–86
98. Chanan-Khan AA, Swaika A, Paulus A et al. Pomalidomide: The new immunomodulatory agent for the treatment of multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2013;3(9):e143
99. Roccaro AM, Hideshima T, Raje N et al. Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res*. 2006;66(1):184–191
100. White D, Kassim A, Bhaskar B, Yi J, Wamstad K, Paton VE. Results from AMBER, a randomized phase 2 study of bevacizumab and bortezomib versus bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma. *Cancer*. 2013;119(2):339–347
101. Zangari M, Anaissie E, Stopeck A et al. Phase II study of SU5416, a small molecule vascular endothelial growth factor tyrosine kinase receptor inhibitor, in patients with refractory multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(1 Pt 1):88–95
102. Prince HM, Honemann D, Spencer A et al. Vascular endothelial growth factor inhibition is not an effective therapeutic strategy for relapsed or refractory multiple myeloma: A phase 2 study of pazopanib (GW786034). *Blood*. 2009;113:4819–4820
103. Roccaro AM, Sacco A, Thompson B et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood*. 2009;113:6669–6680
104. Raimondi L, Amodio N, Di Martino MT, et al. Targeting of multiple myeloma-related angiogenesis by miR-199a-5p mimics: In vitro and in vivo anti-tumor activity. *Oncotarget*. 2014;5(10):3039–3054
105. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991 324(1):1–8
106. Afshar Moghaddam N, Mahsuni P, Taheri D. Evaluation of Endoglin as an Angiogenesis Marker in Glioblastoma. *Iran J Pathol*. 2015;10(2):89–96

107. Hansen S, Grabau DA, Sorensen FB, Bak M, Vach W, Rose C. The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 139-146
108. Mikalsen LTG, Dhakal HP, Bruland ØS, Nesland JM, Olsen DR. Quantification of Angiogenesis in Breast Cancer by Automated Vessel Identification in CD34 Immunohistochemical Sections. *Anticancer Res.* 2011, 31, 4053-4060
109. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol* 1995; 177:275-283
110. Marien KM, Croons V, Waumans Y et al. Development and validation of a histological method to measure microvessel density in whole-slide images of cancer tissue. *PLoS ONE* 2016; 11(9):e0161496
111. Mehta R., Kyshtoobayeva A., Kurosaki T et al. Independent association of angiogenesis index with outcome in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2001, 7, 81-88
112. Wosztal A., Korycka-Wołowicz A.: Angiogeneza i limfangiogeneza oraz ich znaczenie w nieziarniczych chłoniakach złośliwych. *Acta Hematol. Pol.* 2010, 41, 21-23
113. Góra-Tybor J, Krawczyńska A. Krążące komórki śródbłónka – nieinwazyjny marker angiogenezy. *Acta Haematologica Polonica* 2007, 38, Nr 2, str. 195–202
114. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988;44:837–45
115. Liotta LA, Stracke ML. Tumor invasion and metastases: biochemical mechanisms. *Cancer Treat Res.* 1988;40:223–38
116. Tomoda M, Maehara Y, Kakeji Y et al. Intratumoral neovascularization and growth pattern in early gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 11: 2340-2346
117. Dugonjić AS, Usaj SK, Eri Z, Latinović LT. Significance of microvessel density in prostate cancer core biopsy. *Vojnosanit Pregl.* 2015 Apr;72(4):317-27

118. Kolesnik AP, Shevchenko AI, Tumanskiĭ VA, Evseev AV, Shishkin MA. The influence of microvessel density in the tumor on the prognosis in patients with stage I-II non-small cell lung cancer after surgical treatment. *Vopr Onkol.* 2013;59(6):735-9
119. Frangou EM, Lawson J, Kanthan R. Angiogenesis in male breast cancer. *World J Surg Oncol.* 2005 Mar 2;3(1):16
120. Baur A, Bartl R, Pellengahr C, Baltin V, Reiser M. Neovascularization of bone marrow in patients with diffuse multiple myeloma: a correlative study of magnetic resonance imaging and histopathologic findings. *Cancer.* 2004 Dec 1;101(11):2599-604
121. Rana C, Sharma S, Agrawal V, Singh U. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma and its correlation with clinicopathological factors. *Ann Hematol.* 2010 Aug;89(8):789-94
122. Bhatti SS, Kumar L, Dinda AK, Dawar R. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: use of light microscopy as well as computerized image analyzer in the assessment of microvessel density and total vascular area in multiple myeloma and its correlation with various clinical, histological, and laboratory parameters. *Am J Hematol.* 2006 Sep;81(9):649-56
123. Sezer O, Niemoller K, Eucker J et al. Bone marrow microves-sel density is a prognostic factor for survival in-patients withmultiple myeloma. *Ann Hematol* 2000;79:574–577
124. Ahn MJ, Park CK, Choi JH et al. Clinical significance of microvessel density in multiple myeloma patients. *J Korean Med Sci.* 2001 Feb;16(1):45-50
125. Lee N, Lee H, Moon SY et al. Adverse prognostic impact of bone marrow microvessel density in multiple myeloma. *Ann Lab Med.* 2015 Nov;35(6):563-9
126. Kuter DJ, Bain B, Mufti G et al. Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres . *Br J Haematol .* 2007;139:351–362
127. Babarović E, Valković T, Štifter S et al. Assessment of bone marrow fibrosis and angiogenesis in monitoring patients with multiple myeloma. *Am J Clin Pathol.* 2012 Jun;137(6):870-8

128. Dong M, Globe GC. Role of transforming growth factor- β in hematologic malignancies. *Blood* . 2006;107:4589–4596
129. Stifter S, Babarović E, Valković T et al. Combined evaluation of bone marrow aspirate and biopsy is superior in the prognosis of multiple myeloma. *Diagn Pathol*. 2010 May 18;5:30
130. Sucak GT, Aki SZ, Yüzbaşıoğlu B, Akyürek N et al. Prognostic value of bone marrow microvessel density and angiogenic cytokines in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplant, *Leukemia & Lymphoma* 2011, 52:7, 1281-1289
131. Niemöller K, Jakob C, Heider U et al. Bone marrow angiogenesis and its correlation with other disease characteristics in multiple myeloma in stage I versus stage II-III. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003 Apr;129(4):234-8. Epub 2003 Apr 17
132. Jose M, Prabhalakshmy KK: Microvessel Density, Ki 67 Index and haematological profile in multiple myeloma. *Journal of Medical Science and Clinical Research*. Vol 07, Iss 01 January 2019, 347-355
133. Schreiber S, Ackermann J, Obermair A et al. Multiple myeloma with deletion of chromosome 13q is characterized by increased bone marrow neovascularization. *Br J Haematol*. 2000 Sep;110(3):605-9
134. Marković O, Marisavljević D, Cemerikić V et al. Expression of VEGF and microvessel density in patients with multiple myeloma: clinical and prognostic significance. *Med Oncol*.2008;25(4):451-7
135. Usnarska-Zubkiewicz L, Mazur G, Wróbel T, Poreba M, Kuliczowski K. Expression of serum vascular endothelial growth factor correlates with clinical outcome in multiple myeloma. *Pol Arch Med Wewn*. 2003 Jul;110(1):719-24
136. Subramanian R, Basu D, Dutta TK. Significance of bone marrow fibrosis in multiple myeloma. *Pathology*. 2007 Oct;39(5):512-5
137. Ponzoni M, Savage DG, Ferreri AJ et al. Chronic idiopathic myelofibrosis: independent prognostic importance of bone marrow microvascular density evaluated by CD105 (endoglin) immunostaining. *Mod Pathol*. 2004 Dec;17(12):1513-20
138. Hattori Y, Du W, Yamada T, Ichikawa D, Matsunami S, Matsushita M. A myeloma cell line established from a patient refractory to thalidomide therapy

revealed high-risk cytogenetic abnormalities and produced vascular endothelial growth factor. *Blood Cancer J.* 2013;3(5):e115

139. Saltarella I, Morabito F, Giuliani N et al. Prognostic or predictive value of circulating cytokines and angiogenic factors for initial treatment of multiple myeloma in the GIMEMA MM0305 randomized controlled trial. *J Hematol Oncol.* 2019 Jan 9;12(1):4

Streszczenie

Wprowadzenie

Szpiczak plazmocytowy (MM) jest chorobą nowotworową, która wywodzi się z limfocytów B, które znajdują się w końcowym etapie procesu różnicowania. Pomimo postępu jaki dokonał się w ostatnich latach w diagnostyce i leczeniu, choroba ta pozostaje nieuleczalna, a jej przebieg jest trudny do przewidzenia. Dane dostępne w piśmiennictwie wskazują na rolę procesu angiogenezy w rozwoju i progresji szpiczaka plazmocyтового. Stopień nasilenia angiogenezy w szpiku kostnym u chorych na szpiczaka plazmocyтового można oceniać w sposób bezpośredni poprzez określenie gęstości mikronaczyń w preparacie histologicznym szpiku (MVD – mean vessel density) lub pośredni przez badanie stężeń białek proangiogennych.

Cele

Celem pracy była ocena korelacji stopnia nasilenia angiogenezy metodą MVD oraz stężenia białek proangiogennych (endoglina, VEGF A, VEGF B, FGF2, FLT3) z wybranymi parametrami klinicznymi, histopatologicznymi oraz genetycznymi określonymi w momencie diagnozy u chorych na MM a także wczesnymi wynikami leczenia oraz ich wartości prognostycznej.

Materiał i metody

Do badania włączono 53 chorych na nowo zdiagnozowanego MM w Oddziale Hematologicznym SPZOZ Zespole Szpitali Miejskich w Chorzowie. Wśród chorych było 25 kobiet i 28 mężczyzn, a mediana wieku wynosiła 67 lat. Ocenę osoczowych stężeń białek proangiogennych (endoglina, VEGF A, VEGF B, FGF2, FLT3) dokonano za pomocą ilościowych testów immunoenzymatycznych (ELISA, z ang. enzyme-linked immunosorbent assay). U chorych wykonano biopsję aspiracyjną szpiku kostnego, trepanobiopsję oraz badanie cytogenetyczne FISH. Ocenę MVD przeprowadzano w materiale uzyskanym z trepanobiopsji szpiku z użyciem barwień immunohistochemicznych (przeciwciała przeciwko antygenowi CD34), licząc naczynia

w 10 polach widzenia o subiektywnie największej ilości naczyń („hot spots”). Stopień zaawansowania choroby określano przy użyciu klasyfikacji R-ISS, ISS oraz Salmon Durie. Wszyscy pacjenci otrzymali leczenie chemioterapeutyczne według schematów opartych na bortezomibie. Ocenę efektu leczenia przeprowadzano po 6 cyklach leczenia wg kryteriów IMWG.

Wyniki

W momencie diagnozy MM, MVD była istotnie zwiększona w przypadku wyższego stadium zaawansowania ($p = 0,0417$) wg klasyfikacji ISS oraz u pacjentów z $\geq 50\%$ naciekiem komórek plazmatycznych w trepanobiopsji szpiku kostnego ($p = 0,0002$). Stwierdzono istotnie wyższe stężenie endogliny w grupie chorych z wyższym stopniem zaawansowania choroby według klasyfikacji Salmon Durie ($p=0,0039$) oraz u chorych z większym nasileniem włóknienia szpiku ($p=0,0228$). Wykazano istotnie zwiększone wartości MVD w grupie chorych, u których badanie FISH wykazało nieprawidłowości ($p=0,0296$).

Nie stwierdzono natomiast istotnej korelacji między stężeniami białek proangiogennych lub MVD a wczesną odpowiedzią na leczenie.

Wnioski

Stwierdzono korelację MVD oraz nacieku nowotworowymi plazmocytami w szpiku kostnym, stopniem zaawansowania choroby w klasyfikacji ISS oraz R-ISS, a także nieprawidłowym wynikiem badania FISH oraz korelację stężenia endogliny u chorych z zaawansowaniem choroby w klasyfikacji Salmon Durie oraz z nasileniem włóknienia szpiku. Nie stwierdzono istotnej korelacji oraz wartości prognostycznej stopnia nasilenia angiogenezy ocenianego metodą MVD oraz stężenia badanych białek proangiogennych dla wyników wczesnych chemioterapii pierwszej linii u chorych na szpiczaka plazmocytowego.

Słowa kluczowe: szpiczak plazmocytowy, angiogeneza, białka proangiogenne, rokowanie, chemioterapia

Abstract

Introduction

Multiple myeloma (MM) is a cancer that originates from B lymphocytes that are in the final stages of differentiation. Despite the progress that has been made in diagnostics and treatment during the recent years, the disease remains incurable and its course is difficult to predict. Data available in the literature indicate the role of angiogenesis in the development and progression of MM. The incidence of angiogenesis in the bone marrow in patients with MM may be assessed directly by determining the microvessel density in the histological preparation of the bone marrow (MVD - mean vessel density) or indirectly by measuring the levels of proangiogenic proteins.

Objective

The aim of the study was to assess the correlation of the incidence of angiogenesis with the MVD method and the concentration of proangiogenic proteins (endoglin, VEGF A, VEGF B, FGF2, FLT3) with selected clinical, histopathological and genetic parameters determined at the time of diagnosis in patients with MM and also with the early treatment results and their prognostic value.

Materials and Methods

We enrolled 53 patients with newly diagnosed multiple myeloma, 25 women and 28 men. The median age was 67 years. The assessments of plasma concentration of endoglin, VEGFA, VEGFB, FGF2, FLT3 ligand were evaluated with ELISA test. The bone marrow biopsy, aspirate and cytogenetics (FISH) were also performed. MVD was estimated using standard immunohistochemical method (antibodies against anti-CD34) by counting the number of microvessels in ten "hot spots". The staging was performed using R-ISS, ISS and Salmon Durie systems. All the patients received bortezomib-based treatment, and the disease assesement was performed after 6 cycles of treatment as per IMWG criteria.

Results

At the time of MM diagnosis, MVD was significantly increased in the higher stage ($p = 0.0417$) according to ISS classification and in the case of $\geq 50\%$ plasma cell infiltration in bone marrow trephine biopsy ($p = 0.0002$). A significantly higher endoglin concentration was found in the group of patients with a higher stage of disease according to the Salmon Durie classification ($p = 0.0039$) and in patients with a higher severity of bone marrow fibrosis ($p = 0.0228$). Significantly increased MVD values were found in the group of patients in whom FISH showed abnormalities ($p = 0.0296$).

There was no significant correlation between proangiogenic protein or MVD levels and early response to treatment.

Conclusions

There was a significant correlation between MVD and infiltration of malignant plasma cells in the bone marrow, the ISS and R-ISS stage and abnormal FISH result. There was also a significant correlation of endogline levels in patients with advanced disease in the Salmon Durie classification and the severity of bone marrow fibrosis.

There was no significant correlation or prognostic value of angiogenesis assessed by MVD or the concentration of proangiogenic proteins for the early results of frontline chemotherapy in patients with MM.

Key words: multiple myeloma, angiogenesis, proangiogenic proteins, prognosis, chemotherapy