

ЕКСПРЕСИЈА ПРОТЕИНА *p53* КОД БОЛЕСНИКА СА МУЛТИПЛИМ МИЈЕЛОМОМ

Оливера МАРКОВИЋ¹, Драгомир МАРИСАВЉЕВИЋ¹, Весна ЧЕМЕРИКИЋ²,
Маја ПЕРУНИЧИЋ², Милица ЧОЛОВИЋ²

¹Клиничко-болнички центар „Бежанијска коса”, Београд;

²Институт за хематологију, Клинички центар Србије, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Мутације гена *p53* су једна од најчешћих стечених генетских аберација и лош прогностички фактор код болесника с различитим малигним болестима. Код болесника са мултиплим мијеломом (ММ) мутације овог гена су ретке, а њихов утицај на ток и прогнозу болести није јасан.

Циљ рада Циљ студије је био да се утврде учесталост и клинички значај имунохистохемијске експресије протеина *p53* код болесника са новооткривеним мултиплим мијеломом.

Метод рада У испитивање је укључено 58 болесника са новооткривеним ММ (26 жена и 32 мушкарца), просечне старости од 62 године. Дијагноза ММ је постављена на основу стандардних критеријума. Клинички стадијум болести је одређен према класификацији Дурија и Салмона (*Durie – Salmon*), хистолошки градус на основу морфолошких особина доминантне популације плазмочита, а хистолошки стадијум на основу процента плазмочита у костној сржи. Експресија *p53* је испитивана на парафинским исечцима костне сржи коришћењем стандардне имунохистохемијске анализе с антителом према протеину *p53*. Узорци су се сматрали позитивним ако је забележена јасна позитивност једра у више од 5% плазмочита.

Резултати Нуклеусна експресија протеина *p53* утврђена је код девет болесника (15,52%). Имунохистохемијска експресија протеина *p53* није била у значајној повезаности са клиничким стадијумом болести (*I+II* према *III*), концентрацијом β_2 -микроглобулина у серуму (≤ 6 *mg/l* према >6 *mg/l*), хистолошким градусом (*I* према *II+III*), хистолошким стадијумом ($<20\%$ према $21-50\%$ према $>50\%$) и степеном остеолитичких лезија (≤ 3 према >3). Медијана преживљавања болесника с имунореактивношћу на протеин *p53* била је 10 месеци, а код болесника с изостанком имунореактивности на *p53* 36 месеци. Међутим, ова разлика није била статистички значајна ($p=0,2$).

Закључак Учесталост имунохистохемијске експресије протеина *p53* код испитаника са новооткривеним ММ је релативно мала. Није утврђена повезаност експресије овог протеина с клиничким и хистолошким особинама болести, нити са временом преживљавања болесника.

Кључне речи: мултипли мијелом; имунохистохемија; *p53*; биологија; прогноза

УВОД

Ген *p53* је један од кључних гена у сложеној мрежи сигналних путева одговорних за регулацију ћелијског циклуса и апоптозе. Његов генски производ, протеин *p53*, контролише ћелијски циклус (у *G1* и *G2* фази) и апоптозу ћелија одговарајући на ненормалне пролиферационе сигнале и стрес, укључујући оштећење ДНК [1]. По својој структури је једарни фосфопротеин чији се ген налази на кратком краку хромозома 17 [2]. У нормалним ћелијама које нису изложене стресу протеин *p53* се везује за *MDM-2*, *JNK* или *Pirh-2*, који промовишу његову деградацију преко пута убиквитин-протеозома [3]. После излагања ћелије стресу или оштећења ДНК различитим механизмима, долази до активације гена *p53*, који учествује у отклањању насталог оштећења или дела ДНК када је оштећење велико [3]. Чињенице да је *p53* најчешће делетирани или мутиран ген у туморима код човека и да породице са герминативним мутацијама 53 имају повећану склоност за малигнитете у млађем животном добу указују на значајну улогу гена *p53* у спречавању малигног преображаја [3, 4]. Инактивација протеина *p53* може бити последица мутације његовог гена или губитка алела механизмом инсерције и делеције. Мутације гена *p53* утичу на интеракцију протеина *p53* са ДНК, односно нарушавају његов структурни интегритет, водећи делимичном или потпуном губитку њего-

ве функције [4]. Досад је описано 21.000 различитих мутација гена *p53* које су забележене у различитим типовима тумора код људи, а око 20% њих се налази у пет тзв. жаришних (*hot spot*) кодона [4-6]. Мутације гена *p53* воде експресији измењеног протеина *p53* (90%) или потпуном изостанку протеина (10%). Иако најчешће мутације гена *p53* воде потпуном губитку активности протеина, у више од 50% ретких мутација овог гена задржава се значајна активност протеина [4]. Мутантни облици протеина *p53* представљају врло хетерогену групу с различитим степеном губитка активности, што може допринети различитом клиничком испољавању тумора, али и тешкоћама у утврђивању њиховог значаја у клиничким студијама [4]. До инактивације гена *p53* може доћи и инхибицијом промотера гена *p53*, односно повећањем експресије инхибитора протеина *p53* [5]. На пример, нагомилавање онкопротеина *MDM-2*, који прави комплекс са протеином *p53*, доводи до губитка активационе способности протеина *p53*. Слично томе, везивање за вирусне протеине може изазвати губитак његове активности или убрзање његовог распада. У неким солидним малигнитетима описана је и цитоплазматска локализација протеина *p53*, која може допринети губитку активности протеина *p53* [5].

Мутације гена *p53* бележе се код више од 50% солидних тумора, а у неким од њих (тумори плућа и дојке) су индикатор лоше прогнозе болести [7, 8].

У хематолошким малигнитетима мутације гена *p53* су ређе, али, када постоје, показатељ су лоше прогнозе, нарочито код болесника с акутним мијелоидном леукемијом, мијелодиспластичним синдромима и агресивним неходжкинским (*non-Hodgkin*) лимфомима [9]. Настанак ових мутација је често повезан с рецидивом или погоршањем хематолошких малигнитета, односно с агресивнијим током болести [9]. Мутације гена *p53* се ретко откривају и код болесника са мултиплим мијеломом (ММ) [10-16], а њихов значај у патогенези и утицај на ток болести нису у потпуности јасни.

ЦИЉ РАДА

Циљ рада је био да се одреде учесталост имунохистохемијске експресије протеина *p53* и његов клинички значај код болесника са новооткривеним ММ.

МЕТОД РАДА

Испитивањем је обухваћено 58 болесника са новооткривеним ММ, дијагностикованих и лечених у Институту за хематологију Клиничког центра Србије у Београду. Испитивање је обављено од јануара 1997. до јануара 2000. године. Испитаници су надгледани најмање 27 месеци, а највише 63 месеца (студија је закључена априла 2002. године). Код свих болесника су у локалној анестезији урађене аспирациона пункција и трепанациона биопсија гребена илијачне кости. Дијагноза ММ постављена је на основу критеријума *Chronic Leukemia-Myeloma Task Force* [17]. Класификација по клиничким стадијумима извршена је по систему Дјурија и Салмона (*Durie – Salmon*) [18]. Анализирани су следећи параметри: старост, комплетна крвна слика са леукоцитном формулом, функција бубрега (уреа, креатинин), калцијум, фосфор и укупни протеини у серуму, електрофореза и имуноелектрофореза протеина, *CRP*, β_2 -микроглобулин, протеини у 24-часовном урину (квалитативно и квантитативно) и присуство литичних лезија костију. Хистолошка класификација је урађена према моделу који су предложили Сејлер (*Sailer*) и сарадници [19] 1995. године, према којем се класификација обавља на основу морфолошких особина доминантне популације плазмозита (градус *I* – зрели, градус *II* – интермедијарни, градус *III* – плазмабластни мијелом). Према степену инфилтрације костне сржи, болесници су сврстани у три групе (стадијум *I* – мање од 20% плазмозита, стадијум *II* – 20-50% плазмозита, стадијум *III* – више од 50% плазмозита у костној сржи) према моделу Бартла (*Bartl*) и сарадника [20]. Пролиферациона активност мијеломских ћелија испитана је методом имунохистохемије уз коришћење антитела према *Ki-67*, према моделу Лаја (*Lai*) и сарадника [21].

Сви болесници су лечени конвенционалном хемотерапијом (32 болесника протоколом *VAD*, 14 болесника протоколом *VMCP*, 11 болесника протоколом *VMCP* и један болесник комбинацијом преднизона и мелфалана). Укупно преживљавање је рачунато од тренутка постављања дијагнозе болести.

Метод имунохистохемије

Експресија протеина *p53* испитивана је на парафинским исечцима костне сржи добијеним трепанобиопсијом гребена илијачне кости, уз употребу трокара по Јамшиди (*Jamshida*) у локалној анестезији. Цилиндри костне сржи су фиксирани у *B5* фиксативу, декалцификовани у петопроцентном воденом раствору мравље киселине у трајању од шест сати и калуљени у парафину. Сечењем парафинских блокова, са лонгитудинално усмереном кости, добијени су исечци дебљине 3 μm , који су затим депарафинисани ксилолом и рехидрирани алкохолима. С обзиром на то да су препарати фиксирани у *B5*, пре започињања поступка преципитати живиног пигмента отклањани су са депарафинисаних исечака Луголовим раствором и нитријум-тиосулфатом. За демаскирање епитопа примењен је микроталасни претретман у 0,01 М цитратном пуферу *pH* 6,0 (два пута по пет минута). Као примарно антитело коришћено је комерцијално моноклонско антитело према протеину *p53* (*DAKO, M7001* клон *DO-7*). За визуелизацију је коришћен *LSAB-2* (*DAKO LSAB-2 System, KO675*), а као хромоген употребљен је *AEC* (*DAKO, K3464*). После наношења хромогена примењивано је контрастно бојење хематоксилином по Мајеру (*Mayer*). Сви узорци костне сржи су прегледани на увељичању од 400 пута, које су независно анализирала два аутора. Експресија протеина *p53* у мијеломским ћелијама утврђена је на основу процента плазмозита (одређеног бројањем најмање 500 плазмозита на више различитих видних поља), који су показивали имунореактивност с антителом *p53*. Узорци су сматрани позитивним када је у 5% или више плазмозита забележена јасна позитивност једра [22]. Као позитивна контрола коришћени су парафински исечци колоректумског карцинома у којем је утврђен висок степен експресије овог протеина, а као негативна контрола узорци на којима је уместо примарног антитела коришћен пуфер.

Статистичка анализа података

За статистичку анализу података коришћен је програмски пакет *SPSS*, верзија 8. Повезаност имунохистохемијске експресије протеина *p53* са клиничким, биохемијским и патохистолошким параметрима болести испитивана је Спирмановим (*Spearman*) коефицијентом корелације ранга и χ^2 -тестом. Утицај присуства имуноекспресије протеина *p53* на преживљавање болесника процењиван је Каплан-Мајеровим (*Kaplan-Meier*) методом (*log-rank* тест).

РЕЗУЛТАТИ

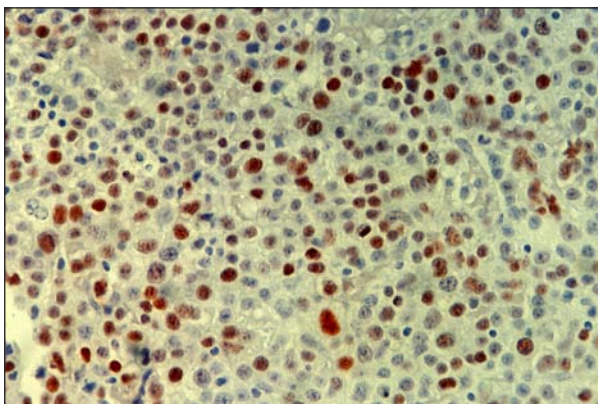
Клиничке одлике испитиваних болесника приказане су у табели 1. Имунохистохемијска реактивност узорака на антитело *p53* утврђена је код девет од 58 болесника, или 15,52% испитаника (Слика 1). Применом Спирмановог коефицијента корелације ранга и χ^2 -теста није утврђена повезаност имунохистохемијске експресије протеина *p53* са старашћу и полом бо-

лесника, вредношћу укупних протеина, албумина, хемоглобина, *CRP*, β_2 -микроглобулина, креатинина и калцијума у серуму, бројем тромбоцита и одговором на терапију. Имунохистохемијска експресија протеина *p53* није била статистички значајно повезана ни са клиничким стадијумом болести (*I+II* према *III*), хистолошким градусом (*I* према *II+III*), хистолошким стадијумом (*I* према *II* према *III*) и бројем остеолитичких лезија (≤ 3 према >3).

Медијана преживљавања болесника са једарном имунореактивношћу на антитело *p53* (5% и више пла-

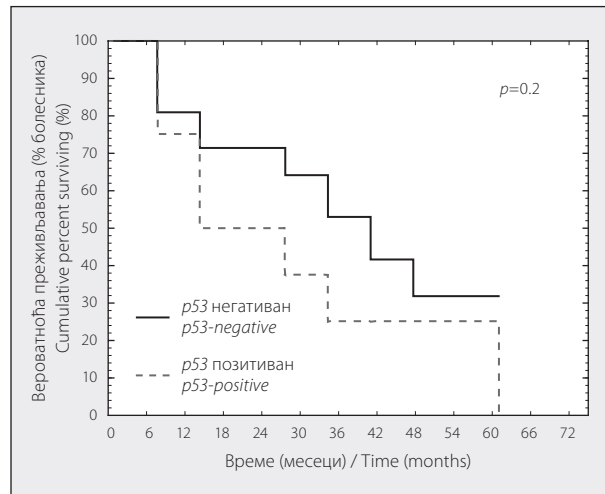
ТАБЕЛА 1. Клиничке одлике болесника са мултиплим мијеломом.
TABLE 1. Clinical features of patients with multiple myeloma on presentation.

| Одлике Variables | Број болесника Number of patients | Средња вредност Mean value | Медијана Median | Опсег Range |
|---|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Старост (године) Age (years) | 58 | 61.74 | 63 | 38-80 |
| Укупни протеини (g/l) Total proteins (g/l) | 58 | 91.98 | 90 | 55-147 |
| Албумини (g/l) Albumins (g/l) | 58 | 34.76 | 35.05 | 17.16-46.32 |
| Хемоглобин (g/l) Hemoglobin (g/l) | 58 | 96.57 | 92.50 | 48-165 |
| Тромбоцити ($\times 10^9/l$) Platelets ($\times 10^9/l$) | 58 | 226.79 | 221 | 27-690 |
| <i>CRP</i> (mg/l) <i>CRP</i> (mg/l) | 38 | 16.14 | 9.50 | 0.00-95 |
| β_2 -микроглобулин (mg/l) β_2 -microglobulin (mg/l) | 25 | 7.12 | 3.87 | 1.28-20.7 |
| Креатинин ($\mu\text{mol/l}$) Creatinine ($\mu\text{mol/l}$) | 58 | 186.14 | 118.65 | 56-896 |
| Калцијум (mmol/l) Calcium (mmol/l) | 58 | 2.53 | 2.39 | 2.00-3.90 |
| Протеинурија (g/24 h) Urinary proteins (g/24 h) | 57 | 1.79 | 1.20 | 0.10-6.70 |
| Број остеолитичких лезија Number of osteolytic lesions | 58 | 3.43 | 3 | 0.00-8 |
| Плазмацити у костној сржи (%) Plasma cells in bone marrow (%) | 58 | 48.61 | 44 | 12-95 |



СЛИКА 1. Исечак костне сржи болесника са мултиплим мијеломом који показује имунореактивност плазма-ћелија с антителом *p53* (увеличање $\times 400$).

FIGURE 1. Section of paraffin-embedded bone marrow specimen in myeloma patient showing the immunoreactivity of plasma cells with anti-p53 antibody (magnification, $\times 400$).



ГРАФИКОН 1. Вероватноћа преживљавања болесника с имунореактивношћу *p53* у 5% и више плазмацита (испрекидана линија) и болесника с имунореактивношћу *p53* у до 5% плазмацита (пуна линија).

GRAPH 1. Probability of survival in patients with *p53* immunoreactivity in $\geq 5\%$ of plasma cells (broken line), compared to patients with *p53* immunoreactivity in $<5\%$ of plasma cells (full line) (log-rank test).

змоцита) је била 10 месеци, а код болесника с изостанком имунореактивности на ово антитело (до 5% плазмацита) 36 месеци, али ова разлика није била статистички значајна (Графикон 1).

ДИСКУСИЈА

Ћелије са недостатком активности *p53* немају способност заустављања ћелијског циклуса у фази *G1* после оштећења ДНК, што доводи до изостанка отклањања генетски оштећене ћелије механизмом програмирање ћелијске смрти (апоптозом) [1]. Губитак функције протеина *p53* најчешће је последица "missense" мутације гена *p53*, затим "nonsense" мутације гена или делеције региона *17p13* [3]. Учесталост и дистрибуција места мутација се разликују између малигнитета која потичу од различитих врста ткива. Мутације гена *p53* могу бити лоциране на различитим местима, али су најчешће између аминокиселинских резидуа 130 и 290. Различити мутирани облици овог гена имају и различита биолошка и биохемијска својства, због чега болесници с различитим мутираним облицима протеина *p53* имају и различиту прогнозу [4].

Мутације гена *p53* се откривају различитим молекуларним техникама (*PCR*, *FISH*, *Southern blotting*), али и техником имунохистохемије, којом се присуство мутација одређује индиректно. Наиме, због кратког полуживота (6-20 минута) „дивљи“ тип протеина *p53* се не акумулира у нормалним ткивима у количинама које се могу открити имунохистохемијским методом. Мутирани облици протеина имају дужи полуживот од „дивљег“ типа, што доводи до накупљања велике количине овог протеина у малигним ћелијама, који на тај начин постаје детектабилан имунохистохемијским методом [3]. Међутим, имунореактивност на антитело *p53* није у апсолутној корелацији са присуством мутација гена *p53* због тога што тзв. "nonsense" мутације овог гена доводе до синтезе измењеног про-

теина који губи имунореактивност с антителом *p53*. Такође, експресија овог протеина може бити регулисана и другим механизмима, независним од генских мутација [4].

У овој студији експресија једра протеина *p53* забележена је код 15,52% болесника са новооткривеним мијеломом. Мала учесталост експресије *p53* (до 10% болесника) [10, 11, 13-16] или чак изостанак мутације гена *p53* [13] описани су у студијама које су користиле молекуларне технике доказивања мутација (углавном *PCR*), из чега је изведен закључак да мутације овог гена нису од већег значаја за патогенезу ММ. Занимљиво је да знатно већу учесталост мутација гена *p53* (16,6-39% болесника) описују аутори студија у којима је примењивана имунохистохемијска техника којом се мутације гена *p53* откривају индиректно [12, 21-25]. Прунери (*Pruneri*) и сарадници [25] су утврдили имунореактивност на антитело *p53* код чак 39,6% испитаника, док су у истој групи болесника мутације *PCR* техником доказане код свега 8,8% њих. Разлике у учесталости мутација гена *p53* условљене коришћеном техником откривања приписују се непотпуној анализи свих региона гена *p53* *PCR* техником, односно лажно позитивној имунохистохемијској анализи као последици повећане количине протеина *p53* у нормалним ткивима са брзом пролиферацијом (активирани *T*-лимфоцити) или везивања за неке протеине који га инактивирају, али продужавају његов живот [9]. С обзиром на то да нема оптималног метода за процену активности протеина *p53*, комбинована примена различитих метода откривања, али и анализа транскрипционе активности гена *p53* одређивањем активности гена које активира ген *p53* (*MDM-2*, *p21*), могла би допринети доношењу поузданијих закључака о значају губитка активности овог гена у појединим малигним обољењима.

За разлику од болесника са мултиплим мијеломом, мутације гена *p53* се чешће откривају у плазмоцитној леукемији (20-40% болесника) [26]. Претпоставља се да су ове мутације, као „касни догађај” у малигној трансформацији плазмocyта, можда одговорне за прелазак у агресивнији облик болести, тј. леукемијску фазу.

У литератури је мало података о утицају мутација гена *p53* на клиничке одлике и ток болести. У нашој студији није забележена значајна повезаност имунохистохемијске експресије протеина *p53* са клиничким и хистолошким параметрима болести, што је у складу с резултатима студије Пајдаша (*Paydaş*) и сарадника [23]. С друге стране, Канаварос (*Kanavaros*) и сарадници [24] су утврдили да је повећана експресија протеина *p53* повезана са високим пролиферационим потенцијалом малигнух ћелија, плазмобластном морфологијом и високим степеном инфилтрације костне сржи. У литератури постоје подаци да мутације *p53* имају утицај на развој резистенције малигнух ћелија на цитотоксичне лекове код различитих врста солидних и хематолошких малигнитета, што је у вези са његовим значајем у очувању интегритета генома и кључној улози у апоптози. Међутим, постоји мало података о повезаности мутација гена *p53* са резистенцијом мијеломских ћелија на ове лекове. У појединој студијама је утврђена повезаност делеције гена *p53* са резистенцијом болести на терапију [27, 28]. Међутим,

у нашој студији, као ни у студији Пајдаша и сарадника [23], није утврђена разлика у одговору на терапију у односу на имуноекспресију на антитело *p53*. Опречни подаци о значају *p53* за резистенцију на терапију могу се протумачити како различитим генетским и негенетским механизмима инактивације гена *p53*, тако и сложености још недовољно разјашњених механизма резистенције на лекове [29].

У неколико студија је утврђено да су делеције гена *p53* независан прогностички фактор у ММ без обзира на то да ли се примењује конвенционална хемотерапија или високодозна хемотерапија с аутологом трансплантацијом костне сржи [28, 30]. Краће преживљавање болесника са мијеломом и нуклеусном имуноекспресијом протеина *p53* утврдили су Прунери и сарадници [25] 2003. и Кумар (*Kumar*) и сарадници [12] 2004. године, закључујући да је имунохистохемијска експресија протеина *p53* показатељ агресивнијег тока болести. Иако су наши болесници са експресијом једра протеина *p53* живели у просеку три и по пута краће него болесници с изостанком имуноекспресије овог протеина (10 према 36 месеци), ова разлика није достигла ниво статистичке значајности.

ЗАКЉУЧАК

Иако ова студија није са сигурношћу утврдила клинички значај имунохистохемијске експресије протеина *p53* у мултиплом мијелому, надамо се да ће будућа испитивања на већем броју испитаника и праћење присуства мутација у различитим фазама болести довести поузданије закључке о улози мутација гена *p53* у овој болести.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vogelstein B, Kinzler KW. *p53* function and dysfunction. *Cell* 1992; 70:523-5.
2. Martin ACR, Facchiano AM, Cuff AL, et al. Integrating mutation data and structural analysis of the *p53* tumour-suppressor protein. *Human Mutation* 2002; 19:149-64.
3. Palmero I, Peters G. Perturbation of cell cycle regulators in human cancer. *Cancer Surv* 1996; 27:351-67.
4. Soussi T, Kato S, Levy P, Ishioka C. Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Hum Mutat* 2005; 25:6-17.
5. Hamroun D, Kato S, Ishioka C, Clausters M, Beroud C, Soussi T. The UMD TP53 database and website: update and revisions. *Hum Mutat* 2006; 27(1):14-20.
6. Soussi T, Lozano G. *p53* mutation heterogeneity in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 331:834-42.
7. Horio Y, Takahashi T, Kuroishi T, et al. Prognostic significance of *p53* mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1993; 53:1-6.
8. Thorlacius S, Borresen AL, Eufjord JE. Somatic *p53* mutations in human breast carcinomas in an Icelandic population: A prognostic factor. *Cancer Res* 1993; 53:1637-40.
9. Imamura J, Miyoshi I, Koeffler HP. *p53* in Hematologic malignancies. *Blood* 1994; 84(8):2412-21.
10. Ollikainen H, Syrjanen S, Koskela K, et al. *p53* gene mutations are rare in patients but common in patient-originating cell lines in multiple myeloma. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57(4):281-9.
11. Neri A, Baldini L, Trecca L, et al. *p53* gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. *Blood* 1993; 81(1):128-35.
12. Kumar V, Varma N, Varma S, et al. Flowcytometric analysis of DNA indices expression of *p53* and multidrug resistance genes in multi-

- ple myeloma patients. *Anal Quant Cytol Histol* 2004; 26(5):271-7.
13. Corradini P, Inghirami G, Astolfi M, et al. Inactivation of tumor suppressor genes, p53 and Rb1 in plasma cell dyscrasias. *Leukemia* 1994; 8(5):758-67.
 14. Preudhomme C, Facon T, Zandecki M, et al. Rare occurrence of p53 gene mutations in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1992; 81(3):440-3.
 15. Owen RG, Davis SA, Randerson J, et al. p53 gene mutations in multiple myeloma. *Mol Pathol* 1997; 50(1):18-20.
 16. Yasuga Y, Hirotsawa S, Yamamoto K, et al. N-ras and p53 gene mutations are very rare events in multiple myeloma. *Int J Hematol* 1995; 62(2):91-7.
 17. Chronic Leukemia and Myeloma Task Force of the National Cancer Institute. Proposed guidelines for protocol studies. *Plasma cell myeloma. Cancer Chemother Rep* 1973; 4:145-58.
 18. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer* 1975; 36:842-54.
 19. Sailer M, Vykoupil KE, Peest D, et al. Prognostic relevance of a histologic classification system applied in bone marrow biopsies from patients with multiple myeloma: A histopathological evaluation of biopsies from 153 untreated patients. *Eur J Haematol* 1995; 54:137-46.
 20. Bartl R, Frisch B, Fateh-Moghadam A, et al. Histologic classification and staging of multiple myeloma. A retrospective and prospective study of 674 cases. *Am J Clin Pathol* 1987; 87:342-55.
 21. Lai MD, Medeiros Q, Wilson CS, et al. Expression of the cell-cycle-related proteins E2F-1, p53, mdm-2, p21^{waf-1}, and Ki-67 in multiple myeloma: correlation with cyclin-D1 immunoreactivity. *Mod Pathol* 1998; 11(7):642-7.
 22. Elghetany TM, Alter B. p53 Protein overexpression in bone marrow biopsies of patients with Shwaahman-Diamond Syndrome has a prevalence similar to that of patients with refractory anemia. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126:452-5.
 23. Paydaş S, Şahin B, Seyrek E, Zorludemir S. p53 protein expression in multiple myeloma. *Ann Med Sci* 1997; 6:15-17.
 24. Kanavaros P, Stefanaki K, Vlachonikolis J, et al. Immunohistochemical expression of the p53, p21/waf-1, Rb, p16 and Ki-67 proteins in multiple myeloma. *Anticancer Res* 2000; 20(6):4619-25.
 25. Pruneri G, Carboni N, Baldini L, et al. Cell cycle regulators in multiple myeloma: prognostic implication of p53 nuclear accumulation. *Hum Pathol* 2003; 34(1):41-7.
 26. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998; 91(1):3-21.
 27. Elnenaei Mo, Gruszka-Westwood AM, A'Hernt R, et al. Gene abnormalities in multiple myeloma; the relevance of TP53, MDM2, and CDKN2A. *Haematologica* 2003; 88(5):529-37.
 28. Chang H, Qi C, Yi QL, Reece D, Stewart AK. p53 gene deletion by fluorescence in situ hybridisation is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Blood* 2005; 105(1):358-60.
 29. Liu S, Bishop RW, Dasmahapatra B, Wang Y. Pharmacogenomic of the p53 tumor suppressor and its role in cancer chemoresistance. *Drug Dev Res* 2004; 62:254-72.
 30. Drach J, Ackermann J, Fritz E, et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 1998; 92(3):802-9.

THE EXPRESSION OF p53 PROTEIN IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

Olivera MARKOVIĆ¹, Dragomir MARISAVLJEVIĆ¹, Vesna ČEMERIKIĆ², Maja PERUNIČIĆ², Milica ČOLOVIĆ²

¹Medical Training Center "Bežanijska kosa", Belgrade; ²Institute of Hematology, Clinical Center of Serbia, Belgrade

Introduction Although mutations of p53 are one of the most often acquired genetic changes in malignant tumors, these mutations are rare events in patients with newly diagnosed multiple myeloma (MM). Moreover, there are a few literature data about clinical significance of p53 overexpression in multiple myeloma.

Objective The aim of our study was to evaluate the clinical significance of p53 immunoreexpression in multiple myeloma.

Method A total of 58 patients with newly diagnosed MM (26 females and 32 males, mean age 62 years) were enrolled in the study. The diagnosis of MM was made according to criteria of Chronic Leukemia-Myeloma Task Force. Clinical staging was done according to Durie and Salmon classification (4 patients had disease stage I, 15 patients stage II and 39 patients stage III). The histological grade and histological stage were determined according to predominant plasma cell morphology and volume of myeloma infiltration, respectively. Standard immunohistochemical analysis with p53 antibody in B5-fixed and paraffin-embedded bone marrow specimens was used to evaluate the expression of p53 in myeloma cells. The specimens were considered positive when $\geq 5\%$ of plasma cells exhibited clear nuclear positivity.

Results Out of 58 patients, p53 expression was detected in 9 (15.52%). No significant correlation was found between p53

expression and clinical stage (I+II vs. III), β_2 -microglobulin level (≤ 6 mg/L vs. >6 mg/L), histological grade (I vs. II+III), histological stage ($<20\%$ vs. $21-50\%$ vs. $>50\%$) and the extent of osteolytic lesions (≤ 3 vs. >3 lesions). Median survival of patients with p53 immunoreactivity in $\geq 5\%$ of plasma cells was 10 months, whilst median survival of patients with p53 immunoreactivity in $<5\%$ of plasma cells was 36 months. However, such difference was not significant ($p=0.2$).

Conclusion The frequency of p53 immunoreexpression in our group of newly diagnosed MM was relatively low. Although p53 immunoreexpression was not associated with clinical and histological features of more aggressive disease, or with shorter survival, further investigations of larger group of patients will lead to final conclusions.

Key words: multiple myeloma; p53; immunohistochemistry; clinical significance; prognosis

Olivera MARKOVIĆ
Kliničko-bolnički centar „Bežanijska kosa“
Auto put bb, 11080 Zemun
Tel.: 011 559 896
Faks: 011 699 937
E-mail: dragano@ptt.yu