

Srovnání sérových hladin vybraných biologických ukazatelů u monoklonální gamapatie nejistého významu a mnohočetného myelomu

V. Ščudla¹, M. Budíková², T. Píka¹, J. Minařík¹, M. Zemanová¹, J. Bačovský¹, V. Heincová³, Česká myelomová skupina

¹ III. interní klinika Lékařské fakulty UP a FN, Olomouc, přednosta prof. MUDr. Vlastimil Ščudla, CSc.

² Klinika nukleární medicíny Lékařské fakulty UP a FN, Olomouc, přednosta doc. MUDr. Miroslav Mysliveček, CSc.

³ Hematologické a transfúzní oddělení Slezské nemocnice, Opava, přednostka prim. MUDr. Vladimíra Heincová

Souhrn: Cíl práce: Předložená práce je zaměřena na vyhodnocení rozdílů sérových hladin vybraných biologických ukazatelů u monoklonální gamapatie nejistého významu (MGNV) a mnohočetného myelomu (MM), a to především z pohledu potenciálního přínosu pro klinickou praxi. Soubor nemocných a metodika: Analyzovaná sestava 96 nemocných sestávala ze 30 jedinců s MGNV a 66 nemocných s MM vyšetřených při diagnóze nemoci před nasazením léčby. K vyšetření sérových hladin hodnocených parametrů byla použita radioenzymatická metoda (thymidinkináza), radioimunoanalýza (β_2 -mikroglobulin, ICTP, PINP), metoda enzymoimunoeseje (sIL-6R, sVCAM-1, sICAM-1, sOPG a sRANKL) a technika kvantitativní sendvičové enzymatické imunoeseje (sHGF, sVEGF, bFGF, syndekan-1/CD₁₃₈ a sFas). Statistické šetření bylo prováděno s použitím Pearsonova a Fischerova testu, χ^2 -testu, případně nonparametrického U testu dle Manna-Whitneye ($p < 0,05$). Výsledky: Statisticky významné rozdíly byly zjištěny mezi MGNV a MM v případě srovnání sérových hladin sIL-6R ($p = 0,02$), ICTP ($p = 0,001$), sHGF ($p = 0,001$) a syndekanu-1/sCD₁₃₈ ($p = 0,001$), zatímco v případě sVCAM-1, sICAM-1, PINP, sOPG, sVEGF a sFas statisticky významné rozdíly nebyly přítomny. Z analýzy frekvence výskytu abnormálních hodnot v souboru MM a MGNV byly shledány významné rozdíly nejen v případě standardních parametrů, jakými jsou β_2 -mikroglobulin, thymidinkináza, kreatinin a albumin, ale i v případě sIL-6R, ICTP, sHGF a syndekanu-1, nikoliv však při srovnání hladin sVCAM-1, sICAM-1, PINP, sOPG, sVEGF a sFas. Snaha o vyšetření sérových hladin sRANKL a solubilní formy bFGF se nesetkala s úspěchem vzhledem k naměřením velmi nízkých hodnot. Závěr: Z analýzy chování 10 parametrů, majících vesměs intimní vztah k biologickým vlastnostem klonálních plazmatických buněk nebo ke změnám mikroprostředí kostní dřeně, se z hlediska přínosu pro odlišení MGNV od MM jeví v účelném světle pouze sérové hladiny sIL-6R, ICTP, sHGF a syndekanu-1 (sCD₁₃₈), tj. ukazatelé s prokázaným významem pro hodnocení prognózy MM.

Klíčová slova: mnohočetný myelom – monoklonální gamapatie nejistého významu – angiogenní cytokiny – ukazatelé kostního obratu – syndekan-1 – sFas

Úvod

Problematicke etiopatogeneze a diferencovaného klinického přístupu k jednotlivým typům monoklonálních gamapatií (MG) je věnována v posledních letech zvýšená pozornost. Dokladem je nejen koncepce „multistep“ etiopatogenezy mnohočetného myelomu (MM), popisující postupné změny, ke kterým dochází v průběhu vývoje od normálního plazmocytu zárodečného centra přes klonální nezhoubnou plazmocelulární proliferaci charakteru monoklo-

nální gamapatie nejistého významu (MGNV), až k monoklonální proliferaci neoplasticky transformovaných plazmocytů u MM [19,51], ale i řada diagnostických „guidelines“ včetně recentních kritérií MGNV a MM vydaných v roce 2003 IMWG (International Myeloma Working Group) [21]. Nelze pominout, že současná kritéria, sloužící k vymezení MGNV od rozvinuté formy MM jsou víceméně deskriptivní a založená na stanovení limitních hodnot monoklonálního imunoglobulinu (MIG) v séru

(30 g/l) nebo odpadu lehkých řetězců imunoglobulinu močí (1 g/24 hod), zastoupení plazmocytů v kostní dřeni (10 %) a chybění specifických orgánových změn typu „CRAB“ (hyperkalcemie, renální insuficience, anémie a myelomové kostní nemoci, tj. „bone disease“) [2,21]. Je nasnadě, že tato víceméně arbitrálně stanovená, kvantitativně laděná kritéria, vyjadřující vesměs jen velikost nádorové masy, neumožňují spolehlivé odlišení preneoplastických od neoplastických stavů a od situací, tvořících při-

Comparison of serum levels of selected biological parameters in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma

Summary: *Purpose of study:* The study focuses on evaluation of differences in serum levels of selected biological indicators in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and multiple myeloma (MM), primarily from the viewpoint of potential asset to clinical practice. Patients and methodology: The analyse set of 96 patients consisted of 30 individuals with MGUS and 66 patients with MM examined in the context of the disease diagnosis before therapy commencement. Serum levels of the assessed parameters were examined with the help of radio-enzymatic method (thymidinkinase), radioimmunoanalysis (β_2 -micro-globulin, ICTP, PINP), enzymoimmunoassay method (sIL-6R, sVCAM-1, sICAM-1, sOPG and sRANKL) and the technique of quantitative sandwich enzymatic immunoassay (sHGF, sVEGF, bFGF, syndecan-1/CD₁₃₈ and sFas). Statistical examination was performed by Pearson and Fischer test, χ^2 -test, or nonparametric U-test pursuant to Mann-Whitney ($p < 0.05$). *Results:* Statistically significant differences were found between MGUS and MM in the case of serum level comparisons of sIL-6R ($p = 0.02$), ICTP ($p = 0.001$), sHGF ($p = 0.001$) and syndecan-1/sCD₁₃₈ ($p = 0.001$), while no statistically significant differences were present in the case of sVCAM-1, sICAM-1, PINP, sOPG, sVEGF and sFas. During the analysis of frequency of occurrence of abnormal values in the MM and MGUS groups, significant differences were found not only in the case of standard parameters, such as β_2 -microglobulin, thymidinkinase, creatinin and albumin, but also in the case of sIL-6R, ICTP, sHGF and syndecan-1, but not in comparisons of the levels of sVCAM-1, sICAM-1, PINP, sOPG, sVEGF and sFas. Attempts at examination of serum levels of sRANKL and soluble form of bFGF failed as too low values were measured. *Conclusion:* The analysis of behaviour of the 10 parameters, mostly intimately related to biological properties of clonal plasmatic cells or to changes of microclimate of bone marrow, effectively contributed to distinction between MGUS and MM only in the case of serum levels of sIL-6R, ICTP, sHGF and syndecan-1 (sCD₁₃₈), i.e. indicators with demonstrable relevance for MM prognosis assessment.

Key words: multiple myeloma – monoclonal gammopathy of undetermined significance – angiogenic cytokines – indicators of bone turnover – syndecan-1 – sFas

rozený vývojový mezistupeň v linii transformačního procesu, tj. „evolving“ MGNV, a nezabraňují proto zcela možnosti diagnostických nepřesností i terapeutických chyb [5]. Základním nedostatkem současných konvenčních diagnostických kritérií MGNV a MM je především nezařazení ukazatelů vyjadřujících vnitřní biologické vlastnosti plazmatických buněk a změn probíhajících v podmínkách mikroprostředí kostní dřeně. Především poznání a využití specifických biologických znaků by mohlo lépe nežli dosavadní standardní kritéria podstatně obohatit možnosti diferenciální diagnostiky MGNV a MM a přispět tak i k včasnému podchycení případného nástupu maligní transformace MGNV.

Náplní předložené studie je srovnání rozdílů sérových hladin vybraných solubilních působků cytokinové sítě (sIL-6R), angiogenezy (sHGF – „hepatocyte growth factor“, sVEGF – „vascular endothelial growth factor“ a solubilní formy bFGF – „basic fibroblast growth factor“), některých ukazatelů kostního obratu (ICTP – „intercellular C-terminal telopeptide collagen-1“, PINP – „N-terminal peptide procollagen-1“, sOPG – osteopro-

tegerin, sRANKL – „receptor activator of nuclear factor κ -B ligand“), cytoadhezivních molekul (sVCAM-1 – „vascular cell adhesion molecule-1“ a sICAM-1 „intercellular cell adhesion molecule-1“) a dalších ukazatelů majících intimní vztah k biologickým vlastnostem klonálních plazmocytů, tj. syndecan-1 (sCD₁₃₈) a k apoptóze, tj. sFas antigen (Apo-1/CD₉₅), a to především z pohledu možného využití v klinické praxi. Je nasnadě, že předložené spektrum analyzovaných parametrů představuje jen velmi omezený výčet z široké škály v současnosti diskutovaných působků, i tak však zaujímá poměrně širokou paletu ukazatelů odrážejících biologickou podstatu a chování plazmocelulárního klonu, případně i vlastnosti mikroprostředí kostní dřeně (KD) u MGNV a rozvinuté formy MM.

Soubor nemocných a metody vyšetření

Analyzovanou sestavu 96 nemocných tvořilo 30 jedinců s MGNV splňujících IMWG kritéria [21] a 66 pacientů s MM splňujících SWOG (South West Oncology Group) i IMWG kritéria nemoci vyšetřených při diagnóze před zahájením cytostatické léčby [2,13,21]. Věkový medián v souboru

MGNV byl 61 (36–78) let, poměr M/Ž byl 1,0 : 1,1, imunochemický typ IgG byl zastoupen v 83 % ($n = 25$), IgA ve 13 % ($n = 4$) a IgM ve 3 % ($n = 1$), lehký řetězec κ se vyskytoval v 57 % ($n = 17$) a λ ve 43 % ($n = 13$). V souboru nemocných s MM byl věkový medián 63 (35–81) let, poměr M/Ž byl 1,0 : 1,3, imunochemický typ IgG byl zastoupen v 58 % ($n = 38$), IgA ve 27 % ($n = 18$), Bence-Jonesův typ ve 12 % ($n = 8$), IgD a nesekretorický typ shodně v 1,5 % ($n = 1$ a 1); výskyt lehkého řetězce κ a λ byl 70 % ($n = 46$) a 29 % ($n = 19$), nesekretorický typ 1,5 % ($n = 1$). Při hodnocení stupně pokročilosti nemoci s pomocí klinického stážovacího systému dle Durieho-Salmona [13] bylo stadium I zastoupeno v 6 % ($n = 4$), stadium II ve 38 % ($n = 25$) a stadium III v 56 % ($n = 37$). K vyšetření hladiny thymidinkinázy v séru (S-TK – normální rozmezí 0–9 IU/l) byla použita radioenzymatická metoda (REA kit, Immunotech, Praha), beta₂-mikroglobulinu (S-B₂M – 0,9–2,4 mg/l) metoda radioimmunoanalýzy (RIA kit, Immunotech, Praha). Sérové hladiny sIL-6R (10 až 90 ng/ml), sVCAM-1 (395–714 ng/ml) a sICAM-1 (269–691 ng/ml) byly měřeny metodou enzymoimmunoeseje (ki-

Tab. 1. Srovnání rozdílů sérových hladin vybraných biologických ukazatelů mezi souborem nemocných s mnohočetným myelomem vyšetřeném při diagnóze před nasazením léčby a souborem jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu.

Soubor		sVCAM-1	sICAM-1	ICTP	PINP	sOPG
MM	n	61	59	61	60	34
	medián	931	612	8,2	58,5	5,7
	(rozmezí)	(330–2 500)	(289–1 600)	(2,9–616)	(12–157)	(1,2–24,4)
	$\bar{x}$	1 048	644,4	23,6	65,9	7,0
	SD	(498,5)	233,7	78,7	32,5	(4,8)
MGNV	n	30	29	30	30	17
	medián	889	615	5,0	55,5	5,0
	(rozmezí)	(607–2 500)	(414–1 600)	(3–16)	(22–164)	(2,0–8,0)
	$\bar{x}$	975,3	657,3	6,5	61,5	4,9
	SD	(369,7)	(211,3)	(3,1)	(29,8)	(1,7)
Stat. sig.		NS	NS	0,001	NS	NS
Soubor		sHGF	sVEGF	Syndecan-1	sFas	
MM	n	57	58	38	57	
	medián	1 577	241	129,2	7 961	
	(rozmezí)	(535–8 000)	(50–1 990)	(2,5–256)	(3 241–20 000)	
	$\bar{x}$	2 396	325,4	142,6	8 549	
	SD	(2,043)	(319,9)	(97,5)	(3 027)	
MGNV	n	27	27	20	27	
	medián	963	323	17	7 299	
	(rozmezí)	(445–3 466)	(38–1 969)	(2,5–126,7)	(4 858–9 363)	
	$\bar{x}$	1 120	401,5	33,5	7 191	
	SD	(591)	(380)	(37,6)	(1 025)	
Stat. sig.		0,001	NS	0,001	NS	

MM – mnohočetný myelom, MGNV – monoklonální gamapatie nejistého významu, sVCAM-1 – solubilní vaskulární cytoadhezivní molekula typu 1, sICAM – solubilní intercelulární cytoadhezivní molekula typu 1, ICTP – C-terminální telopeptid kolagenu typu I, PINP – N-terminální peptid prokolagenu typu I, sOPG – solubilní osteoprotegerin, sHGF – solubilní forma hepatocytárního růstového faktoru, sVEGF – solubilní vaskulární endotelový růstový faktor

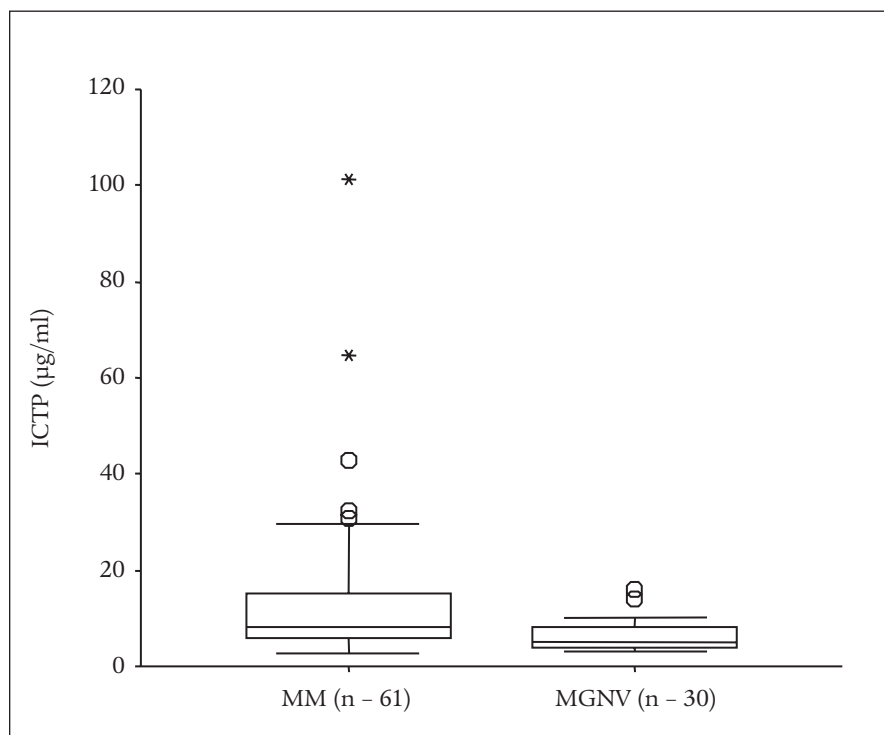
ty ELISA, Immunotech, Praha), zatímco ICTP (M – 2,1–5,0, Ž – 2,1–5,6 µg/l) a PINP (M – 21–78 µg/l a Ž – 19 až 102 µg/l) metodou radioimunoanalýzy (RIA kit, Orion Diagnostica, Espoo, Finland), sOPG (3,7–4,4 µmol/l) a sRANKL (0–50 pmol/l) metodou enzymoimunoeseje (ELISA kit, Biomedica Gruppe, Wien), a sHGF (671 až 1992 pg/ml), sVEGF (62–707 pg/ml), bFGF (bez vymezení normálních hodnot, pg/ml), syndekan-1/sCD138 (37–123 ng/ml) a sFas (4792–17150 pg/ml) technikou kvantitativní sendvičové enzymatické imunoeseje (kit Quantikine RD, Minneapolis). Ke statistickému hodnocení byl použit v případě sIL-6R χ^2 -test dle

Pearsona a Fischerův exaktní test, při hodnocení ostatních ukazatelů byl použit χ^2 -test a nonparametrický U test dle Manna-Whitneye na hranici významnosti $p < 0,05$.

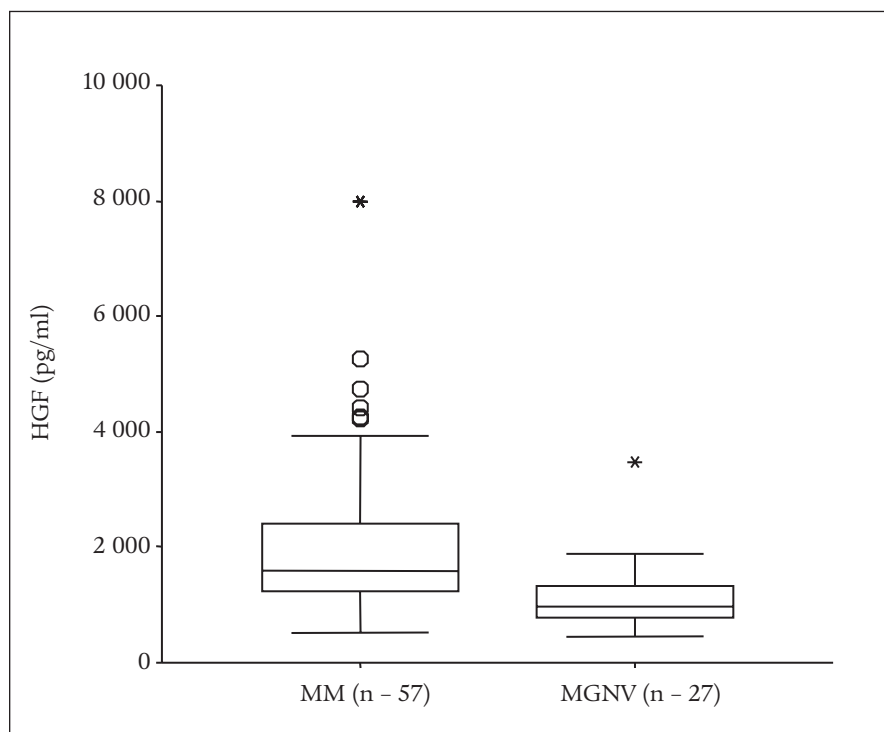
Výsledky

Z provedené analýzy vyplynulo, že jedinci s MGNV se od nemocných s nově stanovenou diagnózou MM odlišují vyšší hladin některých z aktuálně vyšetřených solubilních biologických působků, zatímco v případě sérových hladin některých jiných ukazatelů nebyly shledány významné rozdíly. Jak patrné z tabelárního, a zčásti i z grafického vyjádření byly shledány statisticky významné rozdí-

ly jedinců s MGNV vs MM v případě sérových hladin ICTP (tab. 1, graf 1), sHGF (tab. 1, graf 2) a solubilní formy syndekanu-1 (sCD₁₃₈) (tab. 1, graf 3). V analyzované sestavě nebyly shledány statisticky významné rozdíly mezi oběma porovnávanými soubory (MGNV vs MM) v případě hodnocení výšky sérových hladin sVCAM-1, sICAM-1, PINP, sOPG, sVEGF a sFas (tab. 1). Hlubší analýza zjistila podstatné rozdíly při srovnání frekvence výskytu zvýšených sérových koncentrací mezi skupinami jedinců s MGNV vs nemocných s MM v případě konvenčních ukazatelů (S-B₂M, S-TK, S-kreatinin a S-albumin), zejména však při analýze parametrů zařaze-



Graf 1. Grafické vyjádření rozdílů v sérových hladinách ICTP (C-terminální telopeptid kolagenu typu I) pomocí bilogaritmického souřadnicového systému mezi souborem 61 nemocných s mnohočetným myelomem (MM) vyšetřeném při diagnóze nemoci a souborem 30 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGNV), $p = 0,001$.



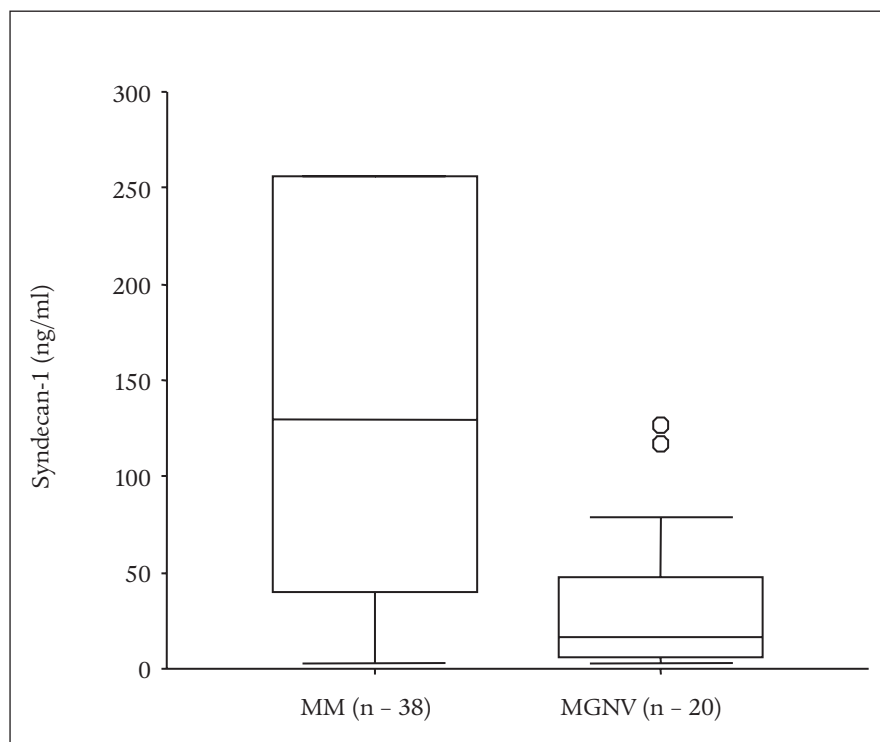
Graf 2. Grafické vyjádření rozdílů v sérových hladinách HGF (hepatocytárního růstového faktoru) pomocí bilogaritmického souřadnicového systému mezi souborem 57 nemocných s mnohočetným myelomem (MM) vyšetřeném při diagnóze nemoci a souborem 27 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGNV), $p = 0,001$.

ných do „designu“ studie, tj. sIL-6R, ICTP, sHGF a solubilní formy syndekanu-1, nikoliv ale při srovnání sVCAM-1, sICAM-1, PINP, sOPG, sVEGF a sFas (tab. 2). Vzhledem k velkému rozptylu hodnot sIL-6R byly hodnoceny vysoké hladiny tohoto cytokinu souborně zařazením do 2 skupin s diskriminační hodnotou 100 IU/l. V souboru 58 nemocných s MM byl výskyt hodnot sIL-6R < 100 IU/l zaznamenán u 22 (38 %) nemocných, zatímco hodnoty > 100 IU/l u 36 (62 %) pacientů. V souboru 30 jedinců s MGNV byly hodnoty sIL-6R < 100 IU/l zjištěny u 22 (73 %) a > 100 IU/l u 8 (27 %) nemocných. Statistická analýza zjistila významný rozdíl mezi oběma skupinami jak pomocí Pearsonova testu ($p = 0,02$), tak i pomocí Fischerova exaktního testu ($p = 0,03$). Snaha o vyšetření sérových hladin sRANKL v souboru s MM se nesetkala s úspěchem, neboť u 10 z 11 vyšetřených nemocných byly hodnoty sRANKL < 0,08 pmol/l. Stejně rozpačitě vyzněla i snaha o vyhodnocení sérové hladiny solubilní formy bFGF, neboť u všech 26 takto vyšetřených nemocných s MM byla zjištěna hodnota < 3 pg/ml.

Diskuse

Zkušenosti z klinické praxe nasvědčují, že rozlišení MGNV a mnohočetného myelomu může být někdy dosti obtížné a ani v současnosti neexistuje samostatný ukazatel, který by v hraničních situacích umožňoval spolehlivé odlišení obou klinicky a prognosticky tak odlišných stavů [24,25]. Zatímco MGNV je benigní, resp. premaligní diskrétní klonální expanze plazmocelulární populace stabilizující se ještě před vývinem klinických projevů, a nevyžadující tudíž specifickou léčbu, je MM i v současnosti, a to přes výrazné pokroky v terapii, stále uniformně fatálním onemocněním [17]. Mezi běžně dostupné, avšak jen omezeně spolehlivé předpovědní faktory neoplastické transformace MGNV, tj. stavu s rizi-

kem zhoubné konverze u 1–1,5 % jedinců za rok, patří v současnosti zvýšené hodnoty M-proteinu v séru a/nebo v moči, suprese normálních imunoglobulinů, pokles hodnoty Hb, morfologické odchylky a zvýšené zastoupení plazmocytů v kostní dřeni, stupeň kostní remodelace vyhodnocené s pomocí kvantitativní histomorfometrie a některých ukazatelů kostního obratu, zvýšený počet cirkulujících plazmocytů v obvodové krvi, vyšší proliferační aktivita plasmatických buněk, abnormální poměr hladin volných lehkých řetězců v séru (κ/λ koeficient) a zejména pozitivní výsledky vyšetření skeletu s pomocí MR, CT a FDG-PET, případně i $^{99}\text{TcMIBI}$, umožňující odhalení konvenční radiografií nepodchytilitelných změn [3,6,14,24,25,35]. Recentní studie naznačují, že nadějným příspěvkem k rozlišení MGNV a MM může být srovnání výskytu normálních/polyklonálních plazmocytů v kostní dřeni [32], buněčná exprese



Graf 3. Grafické vyjádření rozdílů v sérových hladinách syndekanu-1 (sCD_{138}) s pomocí bilogaritmického souřadnicového systému mezi souborem 38 nemocných s mnohočetným myelomem (MM) vyšetřeném při diagnóze nemoci a souborem 20 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGNV), $p = 0,001$.

Tab. 2. Srovnání výskytu abnormálních hodnot sérových hladin vybraných biologických ukazatelů mezi souborem nemocných s mnohočetným myelomem vyšetřeném při diagnóze před nasazením léčby a souborem jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu.

		MM – diagnóza					MGNV				
		norm. hodnoty		patol. hodnoty				norm. hodnoty		patol. hodnoty	
Ukazatel	n	(%)	n	(%)	n	n	n	(%)	n	(%)	
B ₂ M	66	3	(5)	63	(95)	30	8	(27)	22	(73)	
TK	66	25	(38)	41	(62)	30	23	(77)	7	(23)	
Kreatinin	63	42	(67)	21	(33)	30	29	(97)	1	(3)	
Albumin	56	36	(64)	20	(36)	30	28	(93)	2	(7)	
sIL-6R	65	20	(31)	45	(69)	30	17	(57)	13	(43)	
sVCAM-1	61	14	(23)	47	(77)	29	6	(21)	23	(79)	
sICAM-1	59	38	(65)	21	(35)	29	20	(69)	9	(31)	
ICTP	61	9	(15)	52	(85)	29	18	(62)	11	(38)	
PINP	60	49	(82)	11	(18)	30	24	(80)	6	(20)	
sOPG	34	8	(24)	26	(76)	17	5	(29)	12	(71)	
sHGF	66	45	(68)	21	(32)	27	26	(96)	1	(4)	
sVEGF	66	63	(95)	3	(5)	27	25	(92)	2	(8)	
sSyn-1	60	24	(40)	36	(60)	19	19	(100)	0	(0)	
sFas	65	64	(98,5)	1	(1,5)	27	27	(100)	0	(0)	

MM – mnohočetný myelom, MGNV – monoklonální gamapatie nejistého významu, B₂M – β_2 -mikroglobulin, TK – thymidinkináza, sIL-6R – solubilní receptor interleukinu-6, sVCAM-1 – solubilní vaskulární cytoadhezivní molekula typu 1, sICAM – solubilní intercelulární cytoadhezivní molekula typu 1, ICTP – C-terminální telopeptid kolagenu typu I, PINP – N-terminální peptid prokolagenu typu I, sOPG – solubilní forma osteoprotegerinu, sHGF – solubilní hepatocytární růstový faktor, sVEGF – solubilní vaskulární endotelový růstový faktor, sSyn-1 – solubilní syndecan-1 (sCD_{138})

N-CAM/CD56 („neural cell adhesion molecule“) případně i hladiny s-NCAM v séru [15], zvýšená aktivita telomerázy [56] či exprese IGF-1 („insulin growth factor-1“). Molekulární mechanismy, vedoucí k přechodu MGNV v MM, zůstávají přes dílčí pokroky stále do značné míry neobjasněny [51]. V současnosti proto i nadále zůstává rozhodujícím, naneštěstí ale retrospektivním kritériem reálného odlišení MGNV od MM, dlouhodobá klinicko-laboratorní stabilita stavu [17].

Předložená analýza potvrdila všeobecně přijatou zkušenost, že B₂M je v diferenciální diagnostice MGNV a MM přes vcelku odlišnou frekvenci výskytu abnormálních hodnot pro svou nespecifitu a značné překrývání sérových hladin nepoužitelný [24]. V poněkud příznivějším světle se jevílo vyhodnocení hladin S-TK, neboť patologické hodnoty byly přítomny při diagnóze MM v 62 %, zatímco u MGNV pouze ve 23 %. Reálnému přínosu pro klinickou praxi však brání nejen nález zvýšených hodnot u 1/5 nemocných s MGNV, ale i chybějící specifita s ovlivněním hladin různými zánětlivými a imunopatologickými procesy. Je nasnadě, že k odlišení MGNV od MM nelze použít z dobře známých příčin i hodnoty S-kreatininu a S-albuminu, i když se jejich výskyt u obou srovnávaných stavů zřetelně lišil.

Hodnocení sIL-6R bylo zařazeno do studie vzhledem ke klíčovému významu IL-6 v patogenezi MM, kdy v rámci sekvenční interakce se specifickým transmembránovým receptorem IL-6R α dochází prostřednictvím komplexu IL-6/IL-6R k interakci se signální molekulou gp130, spouštějící aktivaci intracytoplazmatických dějů, majících úzký vztah ke stupni proliferace a apoptózy myelomových buněk [4]. Nebyl opomenut ani prokázaný vztah mezi výškou S-sIL-6R ke stupni pokročilosti, aktivitě, délce léčebné odezvy a celkové prognózy nemocných s MM [26,28]. Ukázalo

se, že v námi vyhodnoceném souboru nemocných s MM byly zjištěny patologické hodnoty sIL-6R v séru podstatně častěji, nežli v předchozí studii (69 % vs 47 %) [47]. V souladu se závěry zveřejněných prací byla hodnota S-sIL-6R zvýšena u MM podstatně častěji a vyznačovala se i významně vyššími hladinami nežli v souboru MGNV [28,45]. Přes zjištění významných rozdílů je ale nutno přistupovat k posuzování sérových hladin sIL-6R pro malou specifitu v diferenciální diagnostice MG velmi obezřetně.

Cytoadhezivní molekuly typu VCAM-1 a ICAM-1, exprimované širokou škálou buněk mikroprostředí kostní dřene (KD), se významně uplatňují v patogenezi MM a to v rámci osídlování KD myelomovými buňkami a jejich vazby na stromální a endotelové buňky, ale i v důsledku ovlivňování proliferčních vlastností myelomových plazmocytů a jejich přežívání v mikroprostředí KD [7,51]. Homofilní interakce myelomových elementů vede v důsledku vazby LFA-1 s ICAM-1 k jejich místnímu nakupení [22]. V souladu se závěry naší předchozí studie byly zjištěny abnormální hodnoty sVCAM-1 v séru u více nežli 2/3 nemocných, v případě sICAM-1 u třetiny nemocných [48]. Ukázalo se, že frekvence výskytu patologických hodnot i statistické srovnání sérových hladin sVCAM-1 a sICAM-1 vyznělo při porovnání MGNV s MM nevýznamně. Mezi příčiny je možno uvést rozmanitost vlivů modifikujících uvolňování obou CAM z povrchu buněk a zřejmě i odlišné chování solubilních forem v porovnání s formami VCAM-1 a ICAM-1 exprimovaných na buněčných membránách. Naše studie se tedy zcela neztotožnila se závěry předchozích prací, uvádějících, že zvýšené hodnoty CAM jsou výrazem odezvy organismu na přítomnost a rozsáhlost nádorového procesu [7,16].

Naprostě zřejmá odlišnost MGNV od MM jsou radiografické, případně

MR či ^{99m}TcMIBI projevy myelomové kostní nemoci [14] jako výslednice disharmonie většinou snížené osteoblastické formace a vystupňované osteoklastické resorpce, přičemž klíčovou příčinou je dysbalance osy RANKL/OPG [18,37]. Je známo, že myelomové elementy přispívají ke zvýšení exprese RANKL a k poklesu dostupnosti OPG v mikroprostředí KD, což vede k vystupňované osteoklastogenezi. Citlivým indikátorem rozdílnosti kostní resorpce u MGNV a iniciační fáze MM (stadium I dle D-S) je ICTP [37,49]. Sérová hladina tohoto ukazatele je zvýšena u většiny nemocných s MM, koreluje s velikostí nádorové masy a má inverzní vztah k prognóze nemoci. S údaji o přínosu vyšetření ICTP v diferenciální diagnostice MGNV a MM se ztotožnily i výsledky naší analýzy. Využití ICTP v rámci individuálního hodnocení je ale na závalu přítomnost zvýšených hodnot u bezmála 40 % jedinců s MGNV s překrýváním zejména v oblasti nízkých sérových hodnot u MM. V souladu s představou, že v rozvinuté fázi MM dochází k útlumu aktivity osteoblastů, a tím i syntézy kostní matrix vyznělo i námi provedené hodnocení hladin PINP, tj. ukazatele rychlosti syntézy kolagenu I. typu. Ukázalo se, že hladiny PINP byly v normálním rozmezí a v obdobné koncentraci u většiny jedinců s MGNV i s MM (80 a 82 %). Ke stejnému poznání dospěly i obdobně zaměřené studie vycházející z měření sérových hodnot PICP [1]. Z hlediska závěru předchozích studií je zatím nepřehledná situace v hodnocení sérových koncentrací sOPG u MGNV a MM. Z některých analýz vyplynulo, že u MM jsou sérové hodnoty sOPG sníženy [38,50], a to v souladu se závěry imunohistochemicky orientovaných studií prokazujících snížení exprese OPG v osteoblastech kostní trámčiny [18]. Odlišně ale vyznívají závěry jiných autorů, nacházejících zvýšené hodnoty sOPG u MGNV i u MM oproti kontrolní skupině

[8,23,33], přičemž mezi hladinami sOPG u MGNV a MM nebyl významný rozdíl [8]. Není tedy překvapením, že i v naší studii nebyly zjištěny odlišné výše hladin sOPG u MGNV a u MM se souhlasným zvýšením sérového sOPG u 3/4 obou stavů. Z uvedených poznatků vyplývá, že stanovení cirkulující, solubilní formy OPG neodráží spolehlivě aktivitu OPG v mikroprostředí KD, neboť sérový sOPG má i jiné zdroje, včetně vaskulární kapilární sítě (OPG je antiapoptotickým faktorem endotelových buněk). Mezi další příčiny tohoto stavu je možno přiřadit i malou srovnatelnost používaných metodik, způsobenou hodnocením odchylných forem OPG [8]. K zamýšlenému hodnocení indexu RANKL/OPG v naší studii nedošlo vzhledem k naměření velmi nízkých koncentrací cirkulujícího sRANKL v iniciálně analyzovaném souboru 11 nemocných, od dalšího vyšetřování tohoto markeru bylo proto upuštěno.

Mezi významné nálezy, odlišující MGNV od MM patří i hustota kapilární sítě v KD, neboť MGNV je považována za „preangiogenní“ zatímco MM za stav „vaskulární“ [36,52,53]. Zvýšená neoangiogeneza KD je u MM vyvolána zejména nadměrnou produkcí potentních proangiogenních cytokinů typu VEGF, HGF a bFGF samotnými klonálními plazmocytů [6,34,36,53], stimulačními vaskulogenní diferenciací CD34+ buněk a migrací i proliferací endotelových buněk [19,42]. Z dosavadních zkušeností vyplývá, že vztah sérových hladin sVEGF a sHGF ke stupni pokročilosti a k prognóze MM nevznívá vždy souhlasně, neboť existují sdělení popisující pozitivní [12,36,52] i chybějící vztah [42], přičemž nejasná situace je i při porovnání poměrů u MGNV a MM. Z naší analýzy vyplynulo, že sérové hladiny sHGF byly zvýšeny u 32 % nemocných s MM, tedy obdobně jako ve studii Seidelové nacházející zvýšení sHGF v séru u 43 % myelomů [40].

Vzhledem k výskytu zvýšených hodnot sHGF pouze u 4 % nemocných s MGNV naší sestavy a statistické významnosti nálezů s přítomností dvojnásobně zvýšených hodnot u MM oproti MGNV lze tento ukazatel považovat za další parametr, rozšiřující dosavadní mozaiku testů sloužících potenciálně k odlišení MGNV od MM. Nutno ale zdůraznit, že pro diagnózu MM má praktický význam pouze nález zvýšených hodnot sHGF, nikoliv normální hodnota. Nepochybným zklamáním byl nález chybějící rozdílnosti ve výši hladin sVEGF v souborech MGNV a MM, přičemž průměrná hladina VEGF byla u MGNV dokonce vyšší nežli u MM. Vedle úlohy zvolené analytické metody se může na tomto úkazu podílet i možnost dalších zdrojů, ovlivňujících výši sérové koncentrace sVEGF. Budoucí analýza se tedy bude muset zaměřit mj. i na srovnání hladin sVEGF v krevním séru a v séru získaném z aspirátu KD [34]. Nelze pominout, že širší našeho pohledu na roli dominantních proangiogenních působků byla oslabena chybějícím hodnocením sérových hladin solubilní formy bFGF, poněvadž v analyzovaném souboru 26 nemocných s MM byly naměřeny jen velmi nízké koncentrace a od analýzy dalších nemocných bylo proto upuštěno. Z uvedených výsledků vyplývá, že v klinicky použitelném světle se jeví v případě MG především vyšetřování hladiny sHGF, které lze využít navíc nejen v monitorování průběhu, ale i při hodnocení celkové prognózy nemocných s MM [40].

Syndekan-1 (CD₁₃₈) je transmembránový proteoglykan, aktivně uvolňovaný u MM z povrchu neoplastických plazmocytů. Jde o jednu z ústředních regulačních molekul v patobiologii myelomu, neboť se podílí na vazbě komponent extracelulární matrix, v modulaci aktivit řady cytokinů v KD, především však bFGF, a na zpětném ovlivňování chování samotných myelomových buněk i na

stimulaci aktivity osteoblastů a útlumu osteoklastů [10,11,30,39]. Jde především o marker viabilních myelomových plazmocytů (CD38+ CD45- i CD38+ CD45+), jehož exprese se rychle vytrácí v průběhu apoptózy. V naší studii byly zjištěny zvýšené hodnoty solubilní formy syndekanu-1 v séru u 60 % nemocných, což odpovídá spíše závěrům studie Seidelové [40], která zaznamenala zvýšené hodnoty v 79 % nežli studie Dhodapkara, který našel patologické koncentrace solubilního syndekanu-1 pouze ve 35 % [10]. Velmi příznivě vyznělo srovnání hladin sCD₁₃₈ u MGNV oproti MM, neboť žádný z jedinců s MGNV neměl sérovou hladinu tohoto ukazatele zvýšenou zatímco nemocní s MM měli průměrnou hladinu 4krát vyšší. Uvedené zjištění se ale neztotožňuje se závěry studie Witziga, který sice považuje syndekan-1 za excelentní marker plazmocytů, nepřispívající ale k rozlišení MGNV od MM [55]. Ze závěru naší studie i většiny obdobně zaměřených prací je zřejmé, že sérové hladiny solubilní formy syndekanu-1 (sCD₁₃₈) lze považovat za velmi přínosný ukazatel, obohacující dosavadní algoritmus testů používaných v diagnostice MGNV a MM a mající podle předchozích studií úzký vztah i ke stěžejním prognostickým faktorům MM, např. k výšce M-komponenty, S-B₂M, ke klinickému stadiu a k celkové prognóze nemoci [10,29,30,39].

Fas (Apo-1/CD95) je transmembránový receptor, uplatňující se v případě zkřížené vazby s Fas ligand (FasL) na indukci programové smrti buněk [27,31]. Systém Fas/FasL je jedním ze 2 primárních mechanismů buněčně zprostředkované cytotoxicity [27]. Většina myelomových buněk exprimuje na svém povrchu proapoptický Fas antigen, takže porucha jeho funkce např. v důsledku bodové mutace, pozorované u 10 % nemocných, se může uplatňovat v progresi MM [27,44]. Je známo, že solubilní

forma Fas antigenu (sFas) se uplatňuje i v podmínkách in vivo na ochraně myelomových buněk před apoptózou, přispívá tedy k jejich immortalitě, a tím vlastně i k progresi MM [20]. Přes výše uvedená východiska naše studie neodhalila prozatím žádný prakticky použitelný výsledek měření sérových hladin sFas. Ukázalo se, že u všech jedinců s MGNV a u 98,5 % nemocných s MM byly sérové hladiny sFas v pásmu normálních hodnot a nelišily se dokonce ani průměrné sérové hladiny sFas u obou srovnávaných souborů, tj. u MGNV a MM.

Závěr

Z předložené práce vyplynulo, že nalezení nových ukazatelů, které by podstatným způsobem rozšířily naše současné možnosti diskriminace MGNV od iniciálních fází MM, je nesmírně obtížný úkol. Z analýzy chování 10 parametrů, majících vesměs intimní vztah k biologickým vlastnostem klonálních plazmatických buněk nebo mikroprostředí kostní dřene, se z hlediska reálného přínosu pro odlišení MGNV od MM jeví v účelném světle pouze sérové hladiny ICTP a solubilní formy HGF a syndekanu-1 (sCD₁₃₈), zčásti i solubilní forma IL-6R, zatímco hodnocení působků typu sVCAM-1, sICAM-1, PINP, sOPG, sVEGF a sFas vyznělo nepřínosně. Nelze se nezmínit, že rozšíření iniciálního vyšetřovacího algoritmu MGNV a MM o čtyři vytypované ukazatele nenavýšuje náklady příliš podstatně a pohybuje se na úrovni 1,5–2,0 tisíce korun. Je nasnadě, že všeobecná platnost předložených závěrů vyžaduje ověření na rozsáhlejších souborech nemocných i na posouzení v podmínkách běžné klinické praxe.

Podpora grantu IGA MZ ČR NC-7503 a VVZ MSM 619895205.

Literatura

- Abildgaard N, Bentzen SM, Nielsen JL et al. Serum markers of bone metabolism in multiple myeloma: Prognostic value of the carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP). *Brit J Haematol* 1997; 96: 103–110.
- Adam Z, Česká myelomová skupina a Myelomová sekce ČHS pro diagnostiku a léčbu mnohočetného myelomu: Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. *Transf Hematol dnes* 2005; 11(Suppl 1): 3–51.
- Bataille R, Chappard D, Basle MF. Quantifiable excess of bone resorption in monoclonal gammopathy is an early symptom of malignancy: A prospective study of 87 bone biopsies. *Blood* 1996; 87: 4762–4769.
- Bataille R, Jourdan M, Zhang XG et al. Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *J Clin Invest* 1989; 84: 2008–2011.
- Bladé J. On the „Significance“ of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Mayo Clin Proc* 2004; 79: 855–856.
- Cesana C, Klersy C, Barbarano L et al. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1625–1634.
- Cook G, Dumbiar M, Franklin IM. The role of adhesion molecules in multiple myeloma. *Acta Haematol* 1997; 97: 81–89.
- Corso A, Dovio A, Rusconi C et al. Osteoprotegerin serum levels in multiple myeloma and MGUS patients compared with age- and sex-matched healthy controls. *Leukemia* 2004; 18: 1555–1557.
- Dankbar B, Padró 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.
- Dhodapkar MV, Kelly T, Theus A et al. Elevated levels of shed syndecan-1 correlate with tumour mass and decreased matrix metalloproteinase-9 activity in the serum of patients with multiple myeloma. *Brit J Haematol* 1999; 99: 368–371.
- Dhodapkar MV, Abe E, Theus A et al. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood* 1998; 91: 2679–2688.
- Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo GA et al. Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. *Haematologica* 2000; 85: 800–805.
- Durie BGM, Salmon SE, Moon TE. Pretreatment tumour mass, cell kinetics and prognosis in multiple myeloma. *Blood* 1980; 55: 364–372.
- Durie BGM, Waxman AD, D'Agnoletto A et al. Advances in the diagnosis and staging of multiple myeloma. *Multiple Myeloma* 2004; April 22–24, Torino: 75–77.
- Ely SA, Knowles DM. Expression of CD56/neural cell adhesion molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance and lymphomas with plasmacytoid differentiation. *Am J Pathol* 2002; 160: 1293–1299.
- Faid L, Van Riet I, De Waele M et al. Adhesive interactions between tumour cells and bone marrow stromal elements in human multiple myeloma. *Eur J Haematol* 1996; 57: 349–358.
- Fonseca R, Barlogie B, Bataille R et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res* 2004; 64: 1546–1558.
- Giuliani N, Calla S, Rizzoli V. New insight in the mechanism of osteoclast activation and formation in multiple myeloma: Focus on the receptor activator of NF-κB ligand (RANKL). *Exp Hematol* 2004; 32: 685–691.
- Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl MW et al. Advances in biology of multiple myeloma: Clinical applications. *Blood* 2004; 104: 607–618.
- Cheng J, Zhong T, Liu C et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1995; 263: 1759–1761.
- International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003; 121: 749–757.
- Kawano MM, Huang N, Tanaka H et al. Homotypic cell aggregations of human myeloma cells with ICAM-1 and LFA-1 molecules. *Brit J Haematol* 1991; 79: 538–548.
- Kraj M, Centkowski P, Kruk B. Osteoprotegerin and sRANKL serum levels in multiple myeloma patients. *Haematol J* 2003; 4: S157.

24. Kyle RA, Rajkumar V. Monoclonal gammopathies of undetermined significance: a review. *Immunol Rev* 2003; 194: 112–139.
25. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002; 346: 564–569.
26. Kyrtsenis MC, Dedoussis G, Zervas C et al. Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R), a new prognostic factor in multiple myeloma. *Brit J Haematol* 1996; 93: 398–400.
27. Landowski TH, Qu N, Buyuksal I et al. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 1997; 90: 4266–4270.
28. Lauta VM. A review of the cytokine network in multiple myeloma. *Cancer* 2003; 97: 2440–2452.
29. Maisnar V, Toušková M, Tichý M et al. The significance of soluble CD138 in diagnosis of monoclonal gammopathies. *Neoplasma* 2006; (manuscript).
30. Maisnar V, Toušková M, Malý J et al. Význam vybraných laboratorních ukazatelů pro diferenciální diagnostiku a sledování aktivity mnohočetného myelomu. *Vnitř Lék* 2002; 48: 290–297.
31. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449.
32. Ocqueteau M. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients: implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol* 1998; 152: 1655–1665.
33. Paliton M, Terpos E, Anagnostopoulos A et al. Role of receptor activator of nuclear factor – kappa B ligand (RANKL), osteoprotegerin and macrophage protein 1-alpha (MIP-1a) in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Brit J Haematol* 2004; 126: 686–689.
34. Pour L, Hájek R, Buchler T et al. Angiogeneze a antiangienní terapie u nádorů. *Vnitř Lék* 2004; 50: 930–938.
35. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM et al. Presence of monoclonal free light chains in the serum predicts risk of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Brit J Haematol* 2004; 127: 308–310.
36. Rajkumar SV. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2210–2216.
37. Roux S, Meignin V, Quillard J et al. RANK and RANKL expression in multiple myeloma. *Brit J Haematol* 2002; 117: 86–92.
38. Seidel C, Hjertner O, Abildgaard N et al. Nordic Myeloma Study Group serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood* 2001; 98: 2269–2271.
39. Seidel C, Sundan A, Hjorth M et al. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood* 2000; 95: 388–392.
40. Seidel C, Borset M, Turesson I et al. For the Nordic Myeloma Study Group. Elevated serum concentrations of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma. *Blood* 1998; 91: 806–812.
41. Seidel C, Borset M, Hjertner O et al. High levels of soluble syndecan-1 in myeloma-derived bone marrow: modulation of hepatocyte growth factor activity. *Blood* 2000; 96: 3139–3146.
42. 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.
43. Sezer O, Niemöller K, Jakob C et al. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol* 2000; 79: 574–577.
44. Shima Y, Nishimoto N, Ogata A et al. Myeloma cells express Fas antigen/APO-1 (CD₉₅) but only some are sensitive to anti-Fas antibody resulting in apoptosis. *Blood* 1995; 85: 757–764.
45. Stasi R, Brunetti M, Parma A et al. The prognostic value of soluble interleukin-6 receptor in patients with multiple myeloma. *Cancer* 1998; 82: 1860–1866.
46. Ščudla V, Bačovský J, Papajík T et al. Tymidinkináza séra u mnohotného myelomu. I. Vztah k vybraným laboratorním ukazatelům nemoci. *Vnitř Lék* 1994; 40: 151–156.
47. Ščudla V, Kubalová D, Bačovský J et al. Příspěvek k vyšetření solubilního receptoru interleukinu-6 v séru u mnohočetného myelomu. *Čas Lék Čes* 1996; 135: 719–722.
48. Ščudla V, Budíková M, Bačovský J et al. Vztah hladin solubilních cytoadhezivních molekul VCAM-1 a ICAM-1 k vybraným klinickým a laboratorním ukazatelům mnohočetného myelomu. *Vnitř Lék* 1999; 45: 583–590.
49. Špička I, Cieslar P, Procházka B et al. Prognostické faktory a markery aktivity u mnohočetného myelomu. *Čas Lék Čes* 2001; 139: 208–212.
50. Terpos E, Szydlo R, Apperley JF et al. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand – osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood* 2003; 102: 1064–1069.
51. Urashima M, Chen BP, Chen S et al. The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow. *Blood* 1997; 90: 754–765.
52. Vacca A, Ribatti D, Roccaro AM et al. Bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. *Sem Oncol* 2001; 28: 543–550.
53. 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.
54. Vejlgard T, Abildgaard N, Jans H et al. Abnormal bone turnover in monoclonal gammopathy of undetermined significance: analyses of type I collagen telopeptide, osteocalcin, bone-specific alkaline phosphatase and propeptides of type I and type III procollagens. *Eur J Haematol* 1997; 58: 104–108.
55. Witzig TE, Kimlinger T, Stenson M et al. Syndecan-1 expression on malignant cells from the blood and marrow of patients with plasma cell proliferative disorders and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998; 31: 167–175.
56. Xu D. Telomerase activity in plasma cell dyscrasias. *Br J Cancer* 2001; 84: 621–625.

prof. MUDr. Vlastimil Ščudla, CSc.
www.fnol.cz
e-mail: vlastimil.scudla@fnol.cz

Doručeno do redakce: 14. 12. 2005
Přijato po recenzii: 29. 12. 2005