

ROZLIŠENÍ NÁDOROVÝCH KLONÁLNÍCH A FYZIOLOGICKÝCH POLYKLONÁLNÍCH PLAZMATICKÝCH BUNĚK POMOCÍ FLOWCYTOMETRIE

FLOW CYTOMETRIC DISCRIMINATION BETWEEN NEOPLASTIC CLONAL AND PHYSIOLOGICAL POLYCLONAL PLASMA CELLS

KOVÁŘOVÁ L.^{1,2,5}, BUREŠOVÁ I.^{1,2}, SUSKÁ R.^{1,2}, PERUTKA T.¹, PENKA M.⁴, MICHÁLEK J.^{2,5,6}, HÁJEK R.^{1,2,3,5}

¹ UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

² LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

³ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

⁴ ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO, PMDV

⁵ UNIVERZITNÍ CENTRUM BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (UCBI), LF MU BRNO

⁶ I. DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FN BRNO, PDM

Souhrn

Východiska: Vícebarevná průtoková cytometrie je užitečným nástrojem k analýze plazmatických buněk, jelikož s dostatečnou senzitivitou dovoluje stanovení jejich počtu a zejména rozlišení na fyziologické a patologické. Typ studie a soubor: V této studii jsme sledovali zastoupení plazmocytů na souboru 25 pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu a 78 osob s mnohočetným myelomem, s cílem nalézt rozdíly v počtu a fenotypu jejich plazmocytů a případně také definovat potenciální parametr, který by obě nemoci od sebe odlišil. Metody a výsledky: Flowcytometrická analýza plazmocytů byla prováděna ve vzorcích kostních dřeni s využitím povrchových markerů CD38, CD138, CD45, CD56 a CD19. Při srovnání s mnohočetným myelomem je pro monoklonální gamapatií nejasného významu příznačné vyšší zastoupení reziduálních CD19⁺ plazmocytů ($p < 0,001$) a nižší zastoupení patologických CD56⁺ plazmocytů ($p = 0,004$) v kostní dřeni. Závěry: Relativní počet CD19⁺ plazmocytů se jeví jako jednoznačný parametr pro odlišení monoklonální gamapatie nejasného významu od všech klinických stádií mnohočetného myelomu. Analýzou plazmocytů a jejich fenotypového profilu můžeme napomoci při diferenciální diagnostice onemocnění. Do budoucna předpokládáme také možný význam analýzy plazmocytů v kostní dřeni pro prognózu hodnocených osob a pro studium minimální reziduální choroby.

Klíčová slova: plazmatické buňky, mnohočetný myelom, monoklonální gamapatie nejasného významu, flowcytometrie.

Summary

Backgrounds: Multicolor flow cytometry is a sensitive tool for the analysis of plasma cell population. It can differentiate between normal and malignant plasma cells and enables their quantification. Design and Subjects: We have used flow cytometry for quantification and immunophenotyping of plasma cells from 25 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance and 78 those with multiple myeloma aiming to identify and characterize markers that distinguish between the two conditions. Methods and Results: The expression of surface antigens CD38, CD138, CD45, CD56 and CD19 was analysed on bone marrow plasma cells. As compared to MM patients, MGUS patients had higher proportion of residual CD19⁺ plasma cells ($p < 0,001$) and lower counts of pathologic CD56⁺ plasma cells ($p = 0,004$) in the bone marrow. Conclusions: The number of CD19⁺ plasma cells appeared to be an unequivocal marker that distinguishes monoclonal gammopathy of unknown significance from all stages of multiple myeloma. Immunophenotyping of plasma cell can thus contribute to the differential diagnosis of both diseases. It has also been suggested that flow cytometric analysis should be useful for prognostic evaluation and for the study of minimal residual disease.

Key words: plasma cells, multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, flow cytometry.

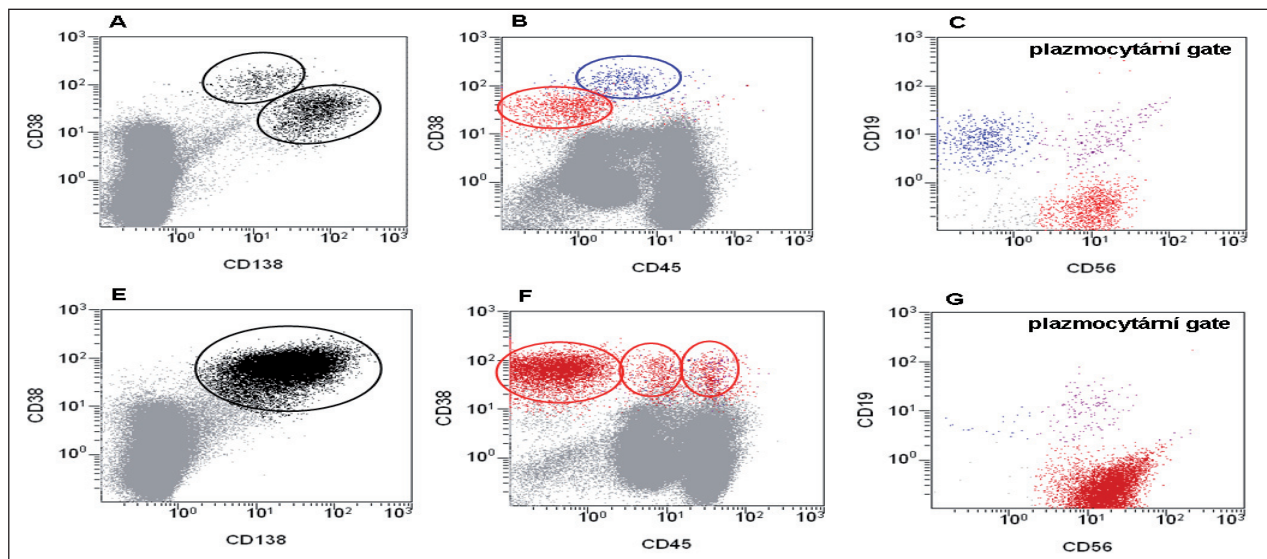
Úvod

V průběhu studia plazmocytů (PC) bylo zjištěno, že fyziologické PC vykazují častěji pozitivitu na znak CD19 a u naopak maligních PC je nalézán znak CD56 (11, 10, 7). V literatuře je uváděno, že kostní dřev pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) obsahuje většinu normálních polyklonálních PC (CD19⁺CD56⁻), ale také část klonálních PC s aberantním fenotypem (CD19⁺CD56⁺, CD19⁻CD56⁺, CD19⁻CD56⁻), zatímco u mnohočetného myelomu (MM) je nalézána naprostá převaha CD56⁺ aberantních PC (5, 14, 13). U pacientů s MM se však mohou též vyskytovat PC, které

neexprimují znak CD56 (20-30%), jejich přítomnost se pojí s horší prognózou při léčbě konvenční chemoterapií, avšak při podstoupení autologní transplantace nebyl nalezen rozdíl v celkovém přežití mezi CD56 pozitivními či CD56 negativními myelomy (1).

Jelikož populace plazmatických buněk v periferní krvi (PK) i kostní dřeni (KD) je poměrně heterogenní a může obsahovat i méně zralé formy B lymfocytů, předpokládá se, že sledování její proměnlivosti může přinést další informace o charakteru PC jednotlivých osob (13). Analýzou znaků CD38 a CD138, spolu s dalšími znaky, tak můžeme identifikovat množství a typ PC v PK i KD a na-

příklady využití



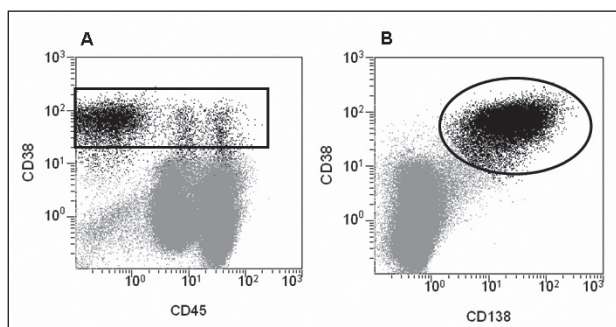
Obrázek č. 2: Srovnání fenotypu vzorků KD. (A, B, C) Osoba s MGUS s patrnými 2 populacemi plazmocytů, které se liší intenzitou exprese znaků CD38, CD45 a CD138. Modře jsou vyznačeny CD19⁺ PC, které můžeme považovat za potenciálně fyziologické polyklonální PC, naopak červeně vyznačené CD56⁺ PC jsou patologické klonální PC. (D, E, F) Osoba s MM, u které jsou patrné subpopulace PC lišící se expresí znaku CD45, celkově naprosto převažují aberantní CD38⁺⁺⁺CD45⁻CD56⁺ PC.

pomocí určení diagnózy hodnocené osoby, navíc ze získaných hodnot usuzovat na její prognózu či vývoj onemocnění a případně též sledovat minimální reziduální nemoc po léčbě (9).

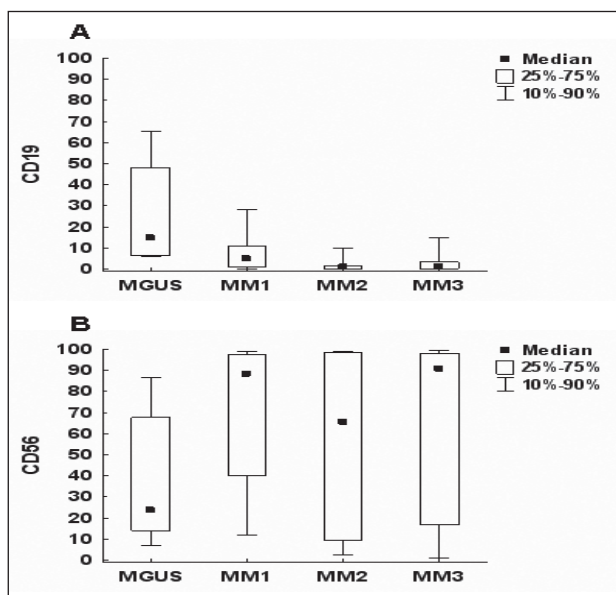
Soubor nemocných a metody

Soubor vzorků: Celkem bylo v období leden 2006 - říjen 2007, v rámci pravidelných kontrol, zhodnoceno 25 pacientů s MGUS a 78 nově diagnostikovaných neléčených pacientů s MM. Všechny hodnocené osoby pocházely z ambulance či z oddělení Interní hematologické kliniky FN Brno a jejich onemocnění bylo klasifikováno dle kritérií Durie-Salmon. Skupina pacientů s MM dále zahrnovala 19 pacientů v I. klinickém stádiu onemocnění (MM I), 14 pacientů v II. klinickém stádiu onemocnění (MM II) a 45 pacientů v III. klinickém stádiu onemocnění (MM III). Kostní dřeň byla, s informovaným souhlasem pacientů, odebrána do EDTA a tentýž den zpracována pro analýzu na průtokovém cytometru.

Metodika: KD byla inkubována s následujícími monoklonálními protilátkami (MoAb): CD38-FITC, CD138-PE, CD45-ECD, CD56-PC5, CD19-PC7 a lyzována pomocí Verzalysy (vše Immunotech, Marseille, France) či chloridu amonného. Vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru FC500 Cytomics (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA). Počet analyzovaných buněk KD se pohyboval mezi 250-500 tisíci, přičemž minimální počet analyzovaných plazmocytů překračoval 100 událostí. Hodnoceno bylo procentuální zastoupení CD38⁺CD138⁺ a CD38⁺CD45⁻ PC a navíc byla na populaci CD38⁺⁺⁺CD45⁻ nebo CD38⁺⁺⁺CD138⁺ dále sledována exprese znaků CD19 a CD56. Výsledek zastoupení PC v KD je, v souladu s doporučením European Myeloma Network (EMN), udáván jako poměr normálních či abnormálních plazmatických buněk ku všem plazmatickým buňkám, a tedy jako procentuální zastoupení CD19⁺ (N-PC) a CD56⁺ (A-PC) buněk v rámci všech PC. Pro hodnocení jsme také použili a sle-



Obrázek č. 1: Stanovení plazmatických buněk. (A) Identifikace PC jako CD38⁺⁺⁺CD45⁻ buněk. (B) Identifikace PC jako CD38⁺⁺⁺CD138⁺⁺⁺ buněk.



Obrázek č. 3: Grafické znázornění rozdílu v expresi znaků CD19 a CD56 na PC u jednotlivých diagnóz a jejich klinických stádií. Znázorněny jsou mediány exprese s vybranými decily a kvartily: (A) pro znak CD19, (B) pro znak CD56.

příklady využití

dovali bezrozměrný parametr n/a, který představuje poměr normálních a abnormálních PC (N-PC/A-PC).

Statistika: Při analýze rozdílů mezi jednotlivými diagnózami byl využit neparametrický Mann-Whitney test pro testování hypotézy, že mezi 2 skupinami není rozdíl v hodnotách sledovaných parametrů. Hypotézu je možné zamítnout na hladině významnosti 0,05 pro p-hodnoty nižší než 0,05. Kruskal-Wallis ANOVA byla použita pouze pro otestování hypotézy nerozdílnosti parametrů mezi 3 skupinami.

Výsledky:

Množství plazmocytů v kostní dřeni

V případě MGUS bylo flowcytometricky stanovené zastoupení populace PC (medián 0,4%; rozsah 0,0-4,2) významně nižší ($p<0,001$) než u osob s MM (3%; 0,0-47,7), a to včetně jednotlivých klinických stádií, což odpovídá diagnostickým kritériím těchto onemocnění (viz Tabulka č.1, č.2 a č.3). Srovnáním jednotlivých stádií MM mezi sebou byl nalezen významný rozdíl v počtu CD38⁺CD138⁺ PC pouze mezi MM I a MM III ($p=0,014$). Sledováním populace CD38⁺CD45⁺ je také možno odhalit přítomné zralé plazmocyty, přičemž tyto jsou nalézány ve významně vyšší četnosti ($p<0,001$) u všech osob s MM (2,2%; 0,0-47,1) nežli u osob s MGUS (0,2%; 0,0-3,8).

Analýza plazmocytů dle exprese CD19 a CD56

Pro odhalení „normálních a klonálních“ PC byly zvoleny znaky CD19 a CD56. Studium jejich exprese na populaci CD38⁺CD138⁺ PC bylo zjištěno, že reziduální CD19⁺ PC v KD jsou statisticky významně častější ($p<0,001$) nalézány u osob s MGUS (15%; 1,9-75,6) nežli u celé skupiny osob s MM (1,2%; 0,0-79,4), což platí i pro srovnání MGUS s jednotlivými klinickými stádii MM. Přestože u 9 osob s MGUS měly CD19⁺ PC jednoznačnou převahu nad populací CD56⁺ PC, celkově u námi hodnocených osob s MGUS převažovaly CD56⁺ PC (23,6% ; 6,3-91,8).

U celé skupiny osob s MM byly většinou nalézány CD56⁺ PC (88,3%; 0,1-99,8), a to ve významně vyšším množství ($p=0,04$) než u osob s MGUS, což je v souladu s literaturou (Greipp et al., 2005). Při statistické analýze bylo dále zjištěno, že množství CD56⁺ PC není významně rozdílné při srovnání jednotlivých klinických stádií MM a také při porovnání MGUS s MM II. Při analýze n/a poměru je statisticky významný rozdíl mezi MGUS (0,5%; 0,0-9,4) a MM II (0,0%; 0,0-11,0) nalezen ($p=0,003$). Zastoupení reziduálních CD19⁺ PC je u MM nízké a dle předpokladu je nejvyšší u MM I (4,7%; 0,2-54,8) ($p=0,048$), avšak mezi klinickými stádii MM II a MM III se významně neliší. V případě nálezů CD19⁺ PC u 2 pacientů s MM, byly tyto PC také CD45⁺, a tedy se zřejmě jednalo o nezralé aberantní PC, které dosud neztratily povrchový marker B lymfocytů.

Parametr (%)	MGUS (n=25)	MM (n=78)	MM I (n=19)	MM II (n=14)	MM III (n=45)
138 ⁺ 38 ⁺ KD	0,4 (0,0-4,2)	3,0 (0,0-47,7)	1,0 (0,0-14,6)	3,7 (0,2-18,7)	4,7 (0,0-47,7)
38 ⁺ 45 ⁺ KD	0,2 (0,0-3,8)	2,2 (0,0-47,1)	0,5 (0,0-14,1)	2,9 (0,2-16,7)	2,6 (0,0-47,1)
CD19 ⁺ PC	15,0 (1,9-75,6)	1,2 (0,0-79,4)	4,7 (0,2-54,8)	0,8 (0,0-79,4)	0,9 (0,0-73,8)
CD56 ⁺ PC	23,6 (6,3-91,8)	88,6 (0,1-99,8)	88,3 (0,5-99,4)	65,5 (0,5-99,7)	90,6 (0,1-99,8)
n/a	0,5 (0,0-9,4)	0,0 (0,0-11,0)	0,1 (0,0-3,0)	0,0 (0,0-11,0)	0,0 (0,0-5,9)

Tabulka č. 1: Flowcytometrické hodnocení počtu plazmocytů v kostní dřeni, uvedeny jsou mediány a rozsahy získaných hodnot. Pacienti s MM jsou zhodnoceni jednak jako celek, ale také dle klinických stádií MM I-III.

Parametr	MGUS vs. MM	MGUS vs. MM I	MGUS vs. MM II	MGUS vs. MM III
138 ⁺ 38 ⁺ KD	$p<0,001$	$p<0,05$	$p<0,001$	$p<0,001$
38 ⁺ 45 ⁺ KD	$p<0,001$	$p<0,05$	$p<0,001$	$p<0,001$
CD19 ⁺ PC	$p<0,001$	$p<0,01$	$p<0,001$	$p<0,001$
CD56 ⁺ PC	$p<0,01$	$p=0,001$	n.s.	$p<0,05$
n/a	$p<0,001$	$p=0,001$	$p<0,01$	$p<0,001$

Tabulka č. 2: Statistická analýza vybraných markerů při srovnání MGUS s klinickými stádii MM (tučně jsou znázorněny statisticky významné rozdíly, n.s. – statisticky nevýznamný rozdíl).

Parametr	MM I vs. MM II vs. MM III	MM I vs. MM II	MM I vs. MM III	MM II vs. MM III
138 ⁺ 38 ⁺ KD	$p<0,05$	n.s.	$p<0,05$	n.s.
38 ⁺ 45 ⁺ KD	n.s.	n.s.	$p<0,05$	n.s.
CD19	$p<0,05$	$p<0,05$	$p<0,05$	n.s.
CD56	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
n/a	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabulka č. 3: Statistická analýza vybraných markerů při srovnání klinických stádií MM (tučně jsou znázorněny statisticky významné rozdíly, n.s. – statisticky nevýznamný rozdíl).

U osob s MGUS vždy alespoň část PC vykazovala pozitivitu na znak CD19 nebo CD56, avšak u 12 osob s MM byly nalezeny též CD19⁺CD56⁺ PC, přičemž počet osob s CD19⁺CD56⁺ PC rostl se stupajícím klinickým stádiem onemocnění (1x MM I, 2x MM II, 9x MM III). U těchto osob byly také v 11 případech nalezeny cirkulující PC.

Diskuze

V této studii jsme se pokusili zhodnotit množství a fenotyp plazmocytů u osob s MGUS a MM. Zefektivnili jsme flowcytometrickou analýzu pro získání maximálního množství informací z jediné zkumavky a ověřili jsme senzitivitu vybraného přístupu při analýze PC u osob s nízkou infiltrací KD. Povedlo se nám také identifikovat možné parametry využitelné v diferenciální diagnostice monoklonálních gamapatií.

Dle našeho očekávání bylo zastoupení PC nižší u pacientů s MGUS ve srovnání se zastoupením PC pacientů s MM. U vyšších klinických stádií MM (II, III) bylo zjištěno nejvyšší zastoupení počtu CD38⁺CD45⁺ PC, což svědčí o tom, že značná část jejich PC je již v terminálním stupni zralosti. Intenzita exprese znaku CD38 je na CD45⁺ PC různá (CD38⁺-CD38⁺⁺). Nezralé plazmocyty CD45⁺-CD45⁺⁺ jsou zároveň CD38⁺⁺, avšak bez analýzy dalších markerů nelze zjistit, zda-li se jedná o normální či patologické plazmocyty.

V kostní dřeni osob s MGUS jsme našli 2 populace PC lišící se jednak intenzitou exprese znaků CD38, CD45 a CD138, ale zejména rozdílnou expresí znaků CD19 a CD56. Normální PC si zachovávají expresi CD19, což je B lymfocytární marker exprimovaný již ve stádiu raných pre-B lymfocytů a mizející ve stádiu terminálně diferencovaných PC (15). Přestože fyziologický význam chybění CD19 na myelomových buňkách nebyl dosud objasněn, existuje předpoklad, že jeho ztráta se může podílet na vzniku proliferativní výhody klonu maligních PC (3). Jak bylo prokázáno, je právě poměr imunofenotypicky normálních CD19⁺ PC ku všem PC jedinečným parametrem umožňujícím rozlišení MGUS od MM, což na základě získaných výsledků můžeme potvrdit (5; 14). Tento parametr má uplatnění též při hodnocení populace PC po prodělané léčbě (13). Další kolektiv autorů se

zabýval analýzou aberantních CD56⁺ PC, kdy stanovení cut-off hodnoty 95% dovoluje u osob s MGUS a doutnající myelomem jejich rozdělení na 2 skupiny s různým rizikem progresu do MM (6). V našem případě parametr CD56⁺ PC dovoluje jednoznačné rozlišení mezi MGUS a I. klinickým stádiem MM, zatímco II. klinické stádium MM od MGUS již pomocí tohoto parametru nelze odlišit. Síla parametru n/a se projevila pouze při porovnávání MGUS s jednotlivými stádii MM, v rámci mnohočetného myelomu samotného neposkytuje možnost rozlišení klinických stádií, obdobně jako parametr CD56⁺ PC. Děje se tak zřejmě z důvodu možné absence CD56 na části PC. Význam chybění znaku CD56 na PC může být objasněn až po delším sledování souboru pacientů, přestože v literatuře můžeme nalézt údaje o agresivnější formě onemocnění spojeného s absencí znaku CD56 (12). Prozatím lze jen předběžně usuzovat, že vysoká exprese CD56 u osob s MGUS může znamenat riziko přechodu do MM, případnou cut off hodnotu pro stanovení možnosti přechodu do vyšších klinických stádií MM budeme schopni získat až po delším sledování souboru.

Získaná data a metodické postupy při analýze plazmocytů hodláme uplatnit pro stanovení prognózy pacientů a také při studiu minimální reziduální choroby u pacientů po

konvenční léčbě či po prodělané autologní transplantaci kmenových buněk. Bylo totiž prokázáno, že přítomnost aberantních PC je spojena s horším přežíváním pacientů, a po jejich nalezení tedy může být včas zahájena buď primární či následná léčba (13, 8, 4, 6).

Závěr

V naší studii jsme potvrdili, že patologické plazmocyty jsou ve zvýšené míře nalézány již u pacientů s MGUS, avšak v případě MM tvoří naprostou většinu plazmocytů infiltrujících kostní dřeň. Prostřednictvím exprese CD19 a CD56 na PC je možno odlišit MGUS od MM. Je zřejmé, že studium všech tří parametrů: CD19⁺ PC, CD56⁺ PC a n/a je nezbytné v diferenciální diagnostice myelomatózních onemocnění.

Poděkování

Poděkování patří jednak personálu Laboratoře flowcytometrie při OKH-LEHABI, dále manažerce myelomových vzorků a také sestrám a lékařům České myelomové skupiny při IHOK.

Podpořeno projekty: MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

Literatura

- Chang H, Samiee S, Yi QL. Prognostic relevance of CD56 expression in multiple myeloma: a study including 107 cases treated with high-dose melphalan-based chemotherapy and autologous stem cell transplant. *Leuk Lymphoma*. 2006 Jan;47(1):43-47
- Greipp PR, San Miguel J, Durie BG et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005 May 20;23(15):3412-3420
- Ishikawa H, Tsuyama N, Mahmoud MS et al. CD19 expression and growth inhibition of tumours in human multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2002 Mar;43(3):613-616
- Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D et al. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2276-2279
- Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J et al. 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 Jun;152(6):1655-1665
- Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2586-2592
- Mateo G, Castellanos M, Rasillo A et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2005 May 15;11(10):3661-3667
- Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood*. 2002 Nov 1;100(9):3095-3100
- Rawstron AC, Orfao A, Beksac M et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008 Mar;93(3):431-438
- Rawstron AC, Owen RG, Davies FE et al. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol*. 1997 Apr;97(1):46-55
- Van Camp B, Durie BG, Spier C et al. Plasma Cells in Multiple Myeloma Express a Natural Killer Cell-Associated Antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood*. 1990 Jul 15;76(2):377-382
- Sahara N, Takeshita A. Prognostic significance of surface markers expressed in multiple myeloma: CD56 and other antigens. *Leuk Lymphoma*. 2004 Jan;45(1):61-65
- San Miguel JF, Almeida J, Mateo G et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood*. 2002 Mar 1;99(5):1853-1856
- Sezer O, Heider U, Zavrski I, Possinger K. Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica*. 2001 Aug;86(8):837-843
- Zhou LJ, Smith HM, Waldschmidt TJ et al. Tissue-specific expression of the human CD19 gene in transgenic mice inhibits antigen-independent B-lymphocyte development. *Mol Cell Biol*. 1994 Jun;14(6):3884-3894