

### STANOVENÍ DIAGNÓZY PLAZMOCELULÁRNÍ LEUKÉMIE V PRAXI

#### DIAGNOSTICS OF PLASMA CELL LEUKEMIA

KOVÁŘOVÁ L.<sup>1,3</sup>, ZAHRAĐOVÁ L.<sup>2</sup>, KISSOVÁ J.<sup>4</sup>, POUR L.<sup>2,3</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>2</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

<sup>3</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>4</sup> ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO, PMDV

#### Souhrn

Plazmocelulární leukémie je vzácnou chorobou definovanou počtem plazmatických buněk v periferní krvi. Na Interní hematologické klinice FN Brno byli během posledních dvou let diagnostikováni tři pacienti s plazmocelulární leukémií. Na případech 2 pacientů ukazujeme zásadní roli průtokové cytometrie v diagnostice tohoto onemocnění.

**Klíčová slova:** plazmatické buňky, leukémie, průtoková cytometrie.

#### Summary

Plasma cell leukemia is a rare disease defined by the presence of circulating malignant plasma cells in the peripheral blood. Three patients were diagnosed with plasma cell leukemia in our center from 2005 to 2007. Here we report two cases of plasma cell leukemia to demonstrate the use of flow cytometry as an important tool in the diagnostic assessment of the disease.

**Keywords:** plasma cells, leukemia, flow cytometry.

#### Úvod

Plazmocelulární leukémie (plasma cell leukemia, PCL) je vzácné krevní nádorové onemocnění vycházející z plazmatických buněk (11). Incidence PCL je 2-4% ze všech mnohočetných myelomů (MM). Jsou rozlišovány 2 formy tohoto onemocnění, jednak primární „de novo“ PCL s akutní a rychle progredující leukemickou fází (60% ze všech PCL) a dále sekundární PCL, která se vyvíjí leukemickou transformací z mnohočetného myelomu (MM) a zpravidla jde o fatální konečnou fázi u pacientů s refrakterním MM (16). Diagnostickým kritériem PCL je absolutní (více než  $2 \times 10^9/l$ ) nebo relativní (více než 20%) počet maligních plazmocytů v periferní krvi (11).

Literární údaje o charakteru leukemizovaných plazmocytů nejsou četné, spíše se jedná o jednotlivé kazuistiky (2, 12, 4, 7). Zatím není zcela jasné jakým mechanismem je PCL spouštěna, přestože je známo, že nalézané plazmatické buňky vycházejí z kostní dřeně, přičemž jejich morfolgie je různá - od zralých forem plazmocytů až po formy blastické (9).

U pacientů s PCL je většinou nalézána vyšší nádorová nálož s přítomnou anémií, trombocytopenií, vysokými hodnotami laktátdehydrogenázy (LDH), sérového vápníku (Ca) a  $\beta 2$ -mikroglobulinu (3). Symptomaticky se PCL projevuje obdobně jako vyšší stádia MM (11). Odpověď na léčbu je obecně u primární PCL lepší než u sekundární PCL, kde většinou pacienti nereagují na léčbu a medián přežití je nižší než 2 měsíce. Předpokládá se, že pPCL i sPCL tvoří rozdílné typy onemocnění, s možným odliš-

ným fenotypovým profilem, vyžadující cílenou léčbu na bázi transplantace a použití nových léčiv (8, 1, 10, 21).

Při diagnostice PCL se s úspěchem využívá flowcytometrie, pomocí které lze velmi rychle stanovit množství i typ plazmocytů. Z hlediska fenotypizace jsou jedinečnými markery plazmatických buněk, podobně jako u MM, značky CD38 a CD138. Není známa informace, že by fenotyp plazmablastů či plazmocytů u PCL souvisel s dobou přežití pacientů. Flowcytometrie slouží prozatím pouze k rychlému stanovení jejich počtu v periferní krvi.

#### Kazuistika č. 1

Žena, 66 let, s mnohočetným myelomem IgG lambda, dg. stanovena v srpnu 2004, vstupně klinické stádium podle Durieho-Salmona III.A. Pacientka byla léčena chemoterapií VID (vinkristin, idarubicin, dexametazon) a vysokodávkovanou chemoterapií s podporou autologního štěpu periferních kmenových buněk s komplikovaným průběhem. Léčebná odpověď po autologní transplantaci byla parciální remise. Byly podány 2 cykly konsolidační léčby CED (cyklofosfamid, etoposid, dexametazon) dle protokolu klinické studie CMG 2002. Před třetím cyklem CED, 11 měsíců po autologní transplantaci, byl zjištěn agresivní relaps onemocnění s nárůstem paraproteinu z 3g/l na 47 g/l během jednoho měsíce. Z laboratorních výsledků (02/2006): celková bílkovina 124,9 g/l; kreatinin 66  $\mu\text{mol/l}$ ; LDH 21,93  $\text{Ukat/l}$ ; Ca 2,2  $\text{mmol/l}$  a  $\beta 2$ -mikroglobulin 8,3  $\mu\text{g/l}$ ; hemoglobin (Hb) 110g/l; leukocyty (WBC)  $15,1 \times 10^9/l$ ; trombocyty (PLT)  $18,8 \times 10^9/l$ . Mikroskopická

analýza nátěru periferní krve potvrdila přítomnost 23% plasmacytoidních elementů, některé byly mladšího vzhledu. Dle flowcytometrie v periferní krvi nález 55% plasmocytů fenotypu CD45<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> se střední intenzitou exprese znaku CD38 (CD38<sup>dim+</sup>), což může odpovídat mladším formám plasmocytů. Kostní dřeň dle morfologického vyšetření se sekundární redukcí ostatních krvetvorných řad, s přítomností 90% plazmatických buněk charakteru proplasmocytů, částečně i plazmablastů. Dle flowcytometrického vyšetření kostní dřeň obsahovala 45% plasmocytů CD45<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD20<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> opět s CD38<sup>dim+</sup> expresí. Při analýze proliferativního indexu zjištěno v periferní krvi 3,1% a v kostní dřeni 7,6% proliferujících plasmocytů diploidního charakteru, přičemž experimentálně určená norma proliferace plasmocytů v kostní dřeni je do 3% (20; 13). Nález byl uzavřen jako sekundární PCL.

Vzhledem k hematologickým parametrům, které neumožňovaly podání standardní léčby, a agresivité relapsu byl podán vysokodávkovaný melfalan v redukované dávce (100mg/m<sup>2</sup>) s podporou autologního štěpu, následovala konsolidace režimem CTD (cyklofosfamid, thalidomid, dexametazon) s efektem velmi dobré parciální remise (M-Ig 0 g/l, pozitivní imunofixace). Poté byla po podávání udržovací léčba thalidomidem v monoterapii, která musela být přerušena po 2 měsících pro nežádoucí účinky ve smyslu kožní reakce a polyneuropatie.

Po 3 měsících od ukončení udržovací léčby a 15 měsících po 2. autologní transplantaci byl zjištěn 2. relaps onemocnění (7/2007) na základě nárůstu hodnoty paraproteinu na 22 g/l a nález extramedulárního ložiska v oblasti bederní páteře. Byla provedena 3. autologní transplantace, přípravný režim melfalan v redukované dávce 100mg/m<sup>2</sup> a bortezomib (Velcade) s efektem velmi dobré parciální remise (M-Ig 0 g/l, pozitivní imunofixace). Po uchycení štěpu byla zahájena chemoterapie Velcadem v režimu CVD (cyklofosfamid, Velcade, dexametazon), která musela být v průběhu 5. cyklu přerušena pro bolestivou polyneuropatii.

Za 8 měsíců po 3. autologní transplantaci pacientka přichází z důvodu zhoršení bolestí zad. Zobrazovacími vyšetřeními bylo zjištěno extramedulární ložisko v obratli S3, tedy 4. extramedulární relaps onemocnění, který byl řešen radioterapií na uvedenou oblast.

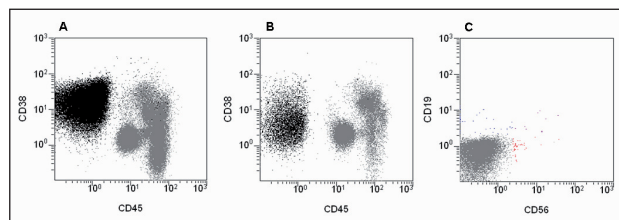
V současné době (03/2008) flowcytometricky stanovená nízká zastoupení (0,1%) cirkulujících CD45<sup>+</sup> plasmocytů v periferní krvi. Morfologicky kostní dřeň bez přesvědčivých známek základního onemocnění, flowcytometrický nález nízkého zastoupení převážně CD19<sup>+</sup> PC (0,1%), a tedy pravděpodobně fyziologických PC.

## Kazuistika č. 2

Jedná se o ženu ve věku 54 let, diagnóza mnohočetného myelomu IgA kappa byla stanovena v listopadu 2006, vstupně klinické stádium podle Durieho-Salmona III.A. Pacientka absolvovala indukční léčbu VAD (vinkristin, doxorubicin, dexametazon) a vysokodávkovanou chemoterapii s podporou autologního štěpu periferních kmenových buněk s komplikovaným průběhem. Léčebná odpověď po autologní transplantaci byla parciální remise. Šest měsíců po transplantaci (10/2007) byl konstatován relaps onemocnění na podkladě nálezů extramedulárního ložiska

ka v pánvi a morfologického vyšetření kostní dřene. Ve dřeni zjištěna redukce ostatních krvetvorných řad a výrazné zmnožení plazmatických buněk s nálezem také jejich mladších forem (celkem 35% plasmocytů). Flowcytometricky v kostní dřeni nalezeno 8,1% CD56<sup>+</sup> PC; v periferní krvi 1,3% cirkulujících plasmocytů. Hodnota paraproteinu v séru 0g/l; v moči nárůst na 1,3 g/l; celková bílkovina 63,4 g/l; kreatinin 122 umol/l; LDH 12,86 ukat/l; Ca 2,11 mmol/l a β2-mikroglobulin 5,58 ug/l. V krevním obraze: Hb 89g/l; WBC 4,8x10<sup>9</sup>/l; PLT 221,0x10<sup>9</sup>/l. Byla zahájena kombinovaná léčba s Velcade v režimu CVD (cyklofosfamid, Velcade, dexametazon), zároveň radioterapie na extramedulární ložisko. Léčba byla ztížena infekčními komplikacemi s nutností redukce dávek.

V průběhu druhého cyklu léčby (11/2007) dochází k dalšímu klinickému zhoršení stavu, laboratorně zhoršení renálních funkcí: (kreatinin 281 umol/l); LDH 13,81 ukat/l; Ca 2,6 mmol/l; celková bílkovina 80,1 g/l; β2-mikroglobulin 4,43 ug/l. V krevním obraze: Hb 81,4g/l; WBC 8,97x10<sup>9</sup>/l; PLT 56,8x10<sup>9</sup>/l a dle analyzátoru nález blastů. Flowcytometricky došlo v periferní krvi ke zvýšení počtu cirkulujících plasmocytů z 8,1% na 21% s fenotypem CD45<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>kappa<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> s velmi nízkou expresí CD38, pravděpodobně se tedy jednalo mladší formy plasmocytů. Stav byl na základě flowcytometrického nálezů hodnocen jako sPCL. Byla podána kombinovaná léčba s Velcade, kortikosteriody a níže dávkovaným melfalanem s podporou autologního štěpu, opět s komplikovaným průběhem. Krátce po propuštění z hospitalizace se však pacientka vrací pro opětovné zhoršení klinického stavu s dominujícími bolestmi, laboratorně dominuje zhoršení renálních parametrů (kreatinin 481 umol/l) a po několika dnech pacientka umírá a to měsíc od stanovení diagnózy sekundární PCL.



**Obrázek č.1: Fenotypizace plasmocytů v periferní krvi.** Zvýrazněny jsou CD138<sup>+</sup> plasmocyt, intenzita exprese znaku CD38 je u PCL snižena ve srovnání se zdravými osobami, které vykazují vysokou intenzitu exprese CD38 (CD38<sup>++</sup>, CD38<sup>high</sup>). (A) Střední exprese CD38 (CD38<sup>+</sup>, CD38<sup>dim+</sup>). (B) Nízká exprese CD38 (CD38<sup>+/+</sup>, CD38<sup>low</sup>). (C) Plazmatické buňky CD138<sup>+</sup> neexprimují znaky CD19 ani CD56.

## Diskuze

Vzácnost výskytu plazmocelulární leukémie znemožňuje její detailnější studium, a není proto zcela zřejmé, které mechanismy stojí za jejím vznikem. Morfologicky jsou nalézány plasmocytů spíše mladšího charakteru, ale nelze takto odlišit plasmocytů odpovídající pPCL od sPCL či MM. Nález CD138<sup>+</sup> plazmablastů jsme u našich pacientů flowcytometricky nepotvrdili, avšak snížená exprese CD38 pravděpodobně odpovídá mladším formám plasmocytů. Přestože určité množství cirkulujících plasmocytů je možno nalézt také u MM, teprve překročení uvedené hranice pro jejich absolutní (více než 2x10<sup>9</sup>/l)

i relativní počty (více než 20%) je spojováno s termínem PCL. Je pravděpodobné, že klonálním plazmocytům je umožněno vycestovat z kostní dřeně v důsledku ztráty exprese adhezivní molekuly CD56, která ve většině případů exprimována na maligních plazmocyttech (19, 17). Tuto skutečnost potvrzujeme i našimi nálezy. Je prozatím nezodpovězenou otázkou, zda-li ztráta exprese CD56 v kostní dřeni může předpovídat vznik PCL, zejména tedy vznik sPCL u pacientů s MM. Kromě znaku CD56, zodpovídajícího za interakce plazmocytů s mikroprostředím KD, byly v případě PCL studovány také další znaky (CD86, CD126, CD40, solubilní CD95) s nálezem změněné exprese na klonálních plazmocyttech ve srovnání s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) a MM (18). Co se týče analýz fenotypu plazmocytů, lze narazit na rozporuplné informace, kdy bylo zjištěno, že znak CD27 je u pPCL exprimován více než u MM, přičemž signalizace pomocí jeho ligandu CD70 inhibovala apoptózu takovýchto CD27<sup>+</sup> plazmocytů (6). Opačná informace pak byla získána v případě imunohistochemického hodnocení znaku CD27, kdy tento u pPCL téměř nebyl exprimován a v případě sPCL byla jeho exprese nižší než u MM (15). Nicméně je známo, že ztráta genu pro CD27 je nalézána u progresu MM, tudíž lze předpokládat, že znak CD27 by neměl být u sPCL exprimován

(14). Skupina ze Salamancy nalezla v případě pPCL - ve srovnání s MM - častější expresi znaku CD20 (50% pacientů s pPCL a 17% MM) a nižší expresi znaku CD56 (70% u MM a 45% u pPCL). U pacientů s pPCL byly také, ve srovnání s plazmocytty u MM, nalezeny většínou diploidní plazmocytty s vyšším stupněm proliferace (5). Nedávno byl též prokázán rozdíl v expresi HLA-DR a CD117 v rámci MM, pPCL a sPCL (1).

Z uvedených dat je zřejmé, že prověření fenotypového profilu u pacientů s PCL může přispět k poznání charakteru plazmocytů a případně i ke stanovení míry agresivity onemocnění.

### Závěr

Flowcytometrické vyšetření umožňuje jednoznačné stanovení cirkulujících plazmocytů v periferní krvi a stanovení diagnózy plazmocelulární leukémie. Lze předpokládat, že studium exprese dalších znaků plazmocytů (CD20, CD27, CD28, CD117 aj.) by, obdobně jako u MM, mohlo přinést nové poznatky v charakterizaci plazmocelulárních leukémií.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

### Literatura

1. Cha CH, Park CJ, Huh JR et al. Significantly better prognosis for patients with primary plasma cell leukemia than for patients with secondary plasma cell leukemia. *Acta Haematol.* 2007;118(3):178-182
2. Demirkan F, Özsan GH, Özcan MA et al. *Turk J Haematol* 2001;18(4):275-279
3. Dimopoulos MA, Palumbo A, Delasalle KB, Alexanian R. Primary plasma cell leukaemia. *Br J Haematol.* 1994 Dec;88(4):754-759
4. Finnegan K. Circulating plasma cell leukemia. *Lab Med.* 2004 Mar;35(3):166-169
5. García-Sanz R, Orfão A, González M et al. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood.* 1999 Feb 1;93(3):1032-1037
6. Guikema JE, Vellenga E, Abdulahad WH et al. CD27-triggering on primary plasma cell leukaemia cells has anti-apoptotic effects involving mitogen activated protein kinases. *Br J Haematol.* 2004 Feb;124(3):299-308
7. Jameel A. Plasma cell leukemia: case report of a rare and aggressive variant of multiple myeloma. *J Pak Med Assoc.* 2005 Oct;55(10):452-453
8. Jiménez-Zepeda VH, Domínguez VJ. Plasma cell leukemia: a rare condition. *Ann Hematol.* 2006;85: 263-267
9. Johnson MR, Del Carpio-Jayo D, Lin P et al. Primary plasma cell leukemia: morphologic, immunophenotypic, and cytogenetic features of 4 cases treated with chemotherapy and stem cell transplantation. *Ann Diagn Pathol.* 2006 Oct;10(5):263-268
10. Katodritou E, Verrou E, Gastari V et al. Response of primary plasma cell leukemia to the combination of bortezomib and dexamethasone: Do specific cytogenetic and immunophenotypic characteristics influence treatment outcome? *Leuk Res.* 2007 Dec 14 [Epub ahead of print]
11. Kyle RA, Maldonado JE, Bayrd ED. Plasma cell leukemia. Report on 17 cases. *Arch Intern Med* 133:813, 1974
12. Lee CK, Ma ES, Shek TW et al. Plasmablastic transformation of multiple myeloma. *Hum Pathol.* 2003 Jul;34(7):710-714
13. Minarik J, Scudla V, Ordeltová M et al. Evaluation of plasma cell propidium-iodide and annexin-V indices: their relation to prognosis in multiple myeloma. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005 Dec;149(2):271-274
14. Moreau P, Robillard N, Jégo G et al. Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome. *Br J Haematol.* 2006 Jan;132(2):168-170
15. Morgan TK, Zhao S, Chang KL et al. Low CD27 expression in plasma cell dyscrasias correlates with high-risk disease: an immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol.* 2006 Oct;126(4):545-551
16. Noel P, Kyle RA. Plasma cell leukemia: an evaluation of response to therapy. *Am J Med.* 1987 Dec;83(6):1062-1068
17. 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
18. Pérez-Andrés M, Almeida J, Martín-Ayuso M et al. Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia.* 2005 Mar;19(3):449-455
19. 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
20. San Miguel JF, García-Sanz R, González M, Orfão A. DNA cell content studies in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 1996 Sep;23(1-2):33-41
21. Tiedemann RE, Gonzalez-Paz N, Kyle RA et al. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia.* 2008 Jan 24; [Epub ahead of print]