

METODY POUŽÍVANÉ V HODNOCENÍ ANGIOGENEZE A JEJICH VÝZNAM U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

METHODS USED FOR EVALUATION OF ANGIOGENESIS AND THEIR SIGNIFICANCY FOR MULTIPLE MYELOMA

POUR L.^{1,2}, ŠVÁCHOVÁ H.^{2,3}, SLANÝ M.^{2,3}, HÁJEK R.^{1,2,4}

¹ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

² UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

³ ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

⁴ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

Souhrn

Je již jednoznačně prokázáno, že míra angiogeneze (novotvorba cév) je zvýšena i u krevních nádorových onemocnění. Jedná se o velmi složitý proces, ve kterém je zapojeno obrovské množství genů a produktů těchto genů z nádorových i normálních tkání. Angiogeneze zřejmě v patogenezi a progresi myelomu hraje dvě role: 1) zajišťuje adekvátní zásobení myelomových buněk kyslíkem a živinami, 2) angiogenní cytokiny, stimulují migraci a proliferaci myelomových buněk. Mnohočetný myelom je prvním krevním nádorovým onemocněním, u kterého byl prokázán prognostický význam angiogeneze v kostní dřeni, a to dvěma metodami: 1) měřením mikrovaskulární denzity v kostní dřeni 2) stanovením koncentrací proangiogenních cytokinů.

Klíčová slova: mnohočetný myelom, angiogeneze, MVD, ELISA, cytokiny, HGF.

Summary

It is confirmed that angiogenesis is increased not only in solid tumor but in hemtological malignancies too. Angiogenesis is complicated procedure, where lot of factor s are influenced. Probably, angiogenesis plays two roles in myeloma developement new born vessels 1st. provide adequate nutrition of tumor cells, 2nd. Angiogenic cytokines stimulare migration and growth of myeloma cells. Measurement of angiogenesis degree is possible according to MVD and by measurement of cytokine levels developed in angiogenesis.

Keywords: multiple myeloma, angiogenesis, MVD, ELISA, cytokines, HGF.

Úvod

Angiogeneze je novotvorba cév fyziologicky se vyskytující při embryogenezi, v ovariích a endometriu v průběhu menstruačního cyklu a při reparačních procesech v organismu. Souvislost nádorového bujení a angiogeneze byla popsána Folkmanem et al. v roce 1971. Za další čtvrtstoletí byla hodnocena angiogeneze u krevních nádorových onemocnění a u většiny z nich byla potvrzena zvýšená angiogenní aktivita (4). Mnohočetný myelom je prvním krevním nádorovým onemocněním, u kterého byl prokázán prognostický význam angiogeneze v kostní dřeni, a to dvěma metodami: 1) stanovením koncentrací proangiogenních cytokinů 2) měřením mikrovaskulární denzity (MVD) v kostní dřeni (30).

Angiogeneze u MM je složitý děj, ve kterém je zapojeno značné množství buněk i humorálních faktorů, které se uplatňují jak angiogenním, tak i antiangiogenním působením. Porozumění mechanismům angiogeneze a jejich ovlivnění bude pravděpodobně jedním z pilířů tzv. „targeted therapy“ (cílené léčby). K účelnému zapojení antiangiogenní léčby do terapeutických algoritmů v onkologii je klíčové změřit míru angiogeneze a její ovlivnění léčbou.

MVD-historie

Jako první použil tuto imunocytochemickou metodu Srivastava et al. pro hodnocení vaskularity u primárních melanomů (25). V roce 1991, Weidner et al. použil pro značení endoteliálních buněk nádoru prsu fVIII-RA/vWF (factor VIII-related antigen/von Willebrand factor) s využitím standardní imunoperoxidázové techniky. Potvrdil téměř lineární vztah mezi počtem cév a oblastí nejrozsáhlejší vaskularizace – „hot spots“ – a tím i metastatický potenciál každého nádoru. Později bylo zjištěno, že faktor VIII-RA není univerzálním angiogenním markerem, protože je exprimován převážně na velkých krevních cévách a také cévách lymfatických. Nezávislé patologické studie prokázaly, že monoklonální protilátka CD-31 je schopna značit mnohem větší počet cév než faktor VIII-RA (16, 32, 6). Další studie u difúzního velkobuněčného lymfomu a myelodysplastického syndromu zjistily, že značení pomocí monoklonální protilátky CD-34 vykazuje mnohem větší citlivost ve srovnání s VIII-RA a CD-31 (23). V souladu s těmito výsledky byla i další práce, která hodnotila angiogenezi u pacientů s MM. Výsledky potvrdily vysokou citlivost markeru CD-34 pro endoteliální buňky a schopnost morfologického rozlišení malých cév (23).

Standardní imunohistochemické metody pro hodnocení MVD u MM využívají v současnosti převážně monoklonální protilátku CD-34 a vWF (12).

První prací, která potvrdila významné zvýšení MVD u MM vzhledem k MGUS, byla publikována v roce 1994 (31). Autoři předložili hypotézu, že progresse z MGUS do MM je spojena se zvýšením MVD. Rajkumar et al. dále potvrdil, že progresivní zvýšení MVD se vyskytuje v celém spektru onemocnění postihujících plazmatické buňky (primární amyloidóza, MGUS, doutnající i aktivní MM) (21).

Princip hodnocení MVD

Nejčastěji se používá hodnocení pomocí protilátky anti CD34 (29). Hodnocení probíhá z válečku spongiosní kosti získaného trepanobiopsií. Získané bioptické vzorky kostní dřevě v délce 5-20 mm jsou fixovány v Löwyho fixačním a dekalcifikačním roztoku na 20-24 hodin. Po odvápnění a promytí v 70% alkoholu následuje odvodnění a zalití do parafínu. Posléze je zhotovena sada sériových preparátů zahrnující barvení: hematoxylin-eozin, May-Grünwald-Giemsa (MGG), PAS, průkaz chloracetátesterázy, Perlsovo barvení na průkaz trojmočného železa a impregnace retikulinových vláken dle Gömöriho. Následuje deparafinace řezů a tepelné demaskování antigenů. Následně aplikace primární protilátky antiCD34.

Při vyšetřování mikrovaskulární denzity používáme optické hodnocení ve světelném mikroskopu. Preparáty s imunohistochemickým průkazem anti CD34 jsou nejprve celkově zhodnoceny při přehledném zvětšení 100x nebo 200x a pokud možno, jsou vybrány tři oblasti s nejvyšším počtem patrných cév, tzv. „hot spots“. Celkově je tedy v každém vzorku hustota cév zjišťována v 9 zorných polích. Jsou hodnoceny vždy jen cévy, jejichž stěna je tvořena pouze jednou vrstvou endotelií a neobsahovaly ve stěně hladkou svalovinu.

ELISA - historie

Jednoduchou metodou pro hodnocení koncentrace cirkulujících angiogenních faktorů v kostní dřevě a v periferní krvi se stala ELISA (enzym-linked immunosorbent essay). ELISA je jednou z nejpoužívanějších biochemických metod sloužící k detekci protilátek nebo antigenů ve vzorku. Metoda je vysoce citlivá a díky její jednoduchosti a rychlosti se stala celosvětově používaným rutinním nástrojem ve zdravotnictví pro hodnocení celé řady analytů v tělních tekutinách. Princip ELISA metody spolu s EIA (enzyme-immunoassay) byly poprvé publikovány v roce 1971 dvěma nezávislými skupinami, skupina Petera Perlmana a Evy Engvallové ze Stockholmské university ve Švédsku a skupina Antona Schurse a Baude van Weemena z Nizozemí. Tyto metody nahradily zdraví ohrožující radioassay (RIA) (10).

Princip ELISA

ELISA test je založen na schopnosti proteinů (antigenů; Ag/protilátky; Ab) vázat se na pevný povrch (obvykle 96-jamková polystyrenová mikrodestička) buď nespecificky adsorpci na povrch, nebo specificky uchycením pomocí další protilátky specifické k antigenu – sandwichová ELISA. Po navázání antigenů je přidán roztok (sérum,

supernatant) obsahující specifickou protilátku. Protilátka označená enzymem (alkalická fosfatáza, křenová peroxidáza) se váže k antigenu a v konečné kroku se přidává substrát, který přeměňuje enzym na určitý detekovatelný signál. Na základě intenzity signálu lze pak stanovit množství antigenů ve vzorku (13, 27).

Pro měření koncentrace antigenů existují dvě základní metody: sendvičová ELISA a kompetitivní ELISA. Sendvičová ELISA je rychlá a přesná metoda a za použití čistého standardního antigenů může test prokázat absolutní množství antigenů v neznámém vzorku. Toto hodnocení používá dvě protilátky, které se vážou na povrch antigenů. Jedna z protilátek se váže na povrch destičky a současně k Ag; druhá Ab se váže k Ag a k sekundární protilátce značené enzymem. Po přidání substrátu dojde k chromogenní reakci, která se projeví vznikem barevného produktu.

Kompetitivní ELISA je použita v případě, když nejsou dostupné dvě protilátky vázající se na cílový Ag. Další výhodou je, že metoda nevyžaduje purifikovanou primární protilátku. Metoda má různé modifikace, ale základní princip je založen na tom, že Ab se naváže na povrch destičky, přidá se směs Ag a Ab dochází ke kompetici (k soutěžení) mezi Ab volnou v roztoku a Ab vázanou na destičce o vazbu na Ag. Následuje promytí destičky a přidání sekundární protilátky značené enzymem. V případě kompetitivní metody platí nepřímá úměra, tzn. čím vyšší je koncentrace Ag v neznámém vzorku, tím slabší je chromogenní signál (13).

Vstupní materiál MVD

Vstupním materiálem jsou válečky spongiosní kosti získané z trepanobiopsie lopaty kosti kyčelní. Bioptické vzorky jsou následně uzavřeny do parafinových bločků (viz. Princip metody).

ELISA

Vstupní materiál pro hodnocení cirkulujících angiogenních a anti-angiogenních faktorů je sérum z periferní krve nebo plazma kostní dřevě. Sérum a EDTA plazma lze skladovat 24 hod při +2°C do +8°C a několik měsíců při -18°C do -20°C. Vzorky séra a plazmy by neměly být opakovaně zamrazeny a rozmrazeny. Vzorky by měly být chráněny před světlem.

Specifická nastavení u MM MVD

Vzhledem k prokázané nižší citlivosti monoklonálních protilátek CD-31 a vWF, je doporučeno používat pro hodnocení MVD u MM anti-CD-34 (23). Dále se nedoporučujeme standardní provádění měření MVD po léčbě. Doporučení vyplývá ze závěrů rozsáhlé práce, která na velkém souboru pacientů neprokázala rozdíl v MVD před léčbou a po léčbě a to ani po agresivní léčbě vysokodávkovaným melfalanem a autologní transplantací (1, 9).

ELISA

Je přesnější hodnotit koncentrace cytokinů v plazmě než v séru, neboť trombocyty obsahují poměrně značné množství těchto faktorů a při procesu srážení dochází k jejich uvolnění a zkreslení výsledků (7). V případě hodnocení angiogenních aktivátorů je nezbytné provádět měření vždy v prvním prvním mililitru odebrané kostní dřevě. Jak prokázaly naše výsledky, měření prováděné v různých

fázích odběru kostí dřeně se projevilo významným rozdílem v hladinách HGF a trombospodinu (17).

Specifické problémy

MVD

Nevýhoda této metody spočívá v její malé objektivnosti, která je závislá na zkušenostech patologa hodnotícího daný histologický preparát. Omezující je také časová a technická náročnost přípravy preparátu, která snižuje její rutinní využití. Metoda nemůže být zatím použita ani k hodnocení účinnosti léčby. Předpokládá se, že MVD není odrazem závislosti nádoru na angiogenezi či odrazem angiogenní aktivity, ale spíše odrazem metabolické aktivity nádorových buněk a jejich vztahu k buňkám mikroprostředí kostní dřeně (6; 8).

ELISA

Nevýhodou této metody je její relativně vysoká cena, velká spotřeba substrátu a dalších složek. Potenciálním problémem může být dlouhý vyvíjecí čas a, především u malých molekul, nízký lineární dynamický rozsah. Navíc účinnost ELISA testu může být ovlivněna nízkou specifikou protilátek, což se projeví zvýšeným pozadím či falešnou pozitivitou. Vysoké koncentrace vzorku mohou vyvolávat „hook efekt“ a ovlivnit tak stanovené hodnoty. Nevýhodou sendvičové metody je omezené množství vhodných monoklonálních protilátek, které se vážou k vhodnému epitopu Ag, aniž by došlo ke sterickému efektu (13).

Ukázka reprezentativního výsledku (viz Obrázek MVD)

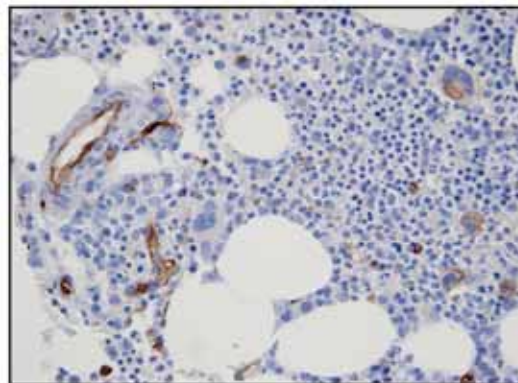
V naší studii jsme na základě semikvantitativního hodnocení MVD rozdělili pacienty s MM do tří skupin. MVD hodnocena jako nízká, když je nalezeno 10 kapilár v zorném poli, střední 10-20 kapilár v zorném poli a vysoká, kdy je přítomno více než 20 kapilár v zorném poli. Typický příklad histologického obrazu jednotlivých stupňů mikrovaskulární denzity je uveden na Obrázku č.1, č.2 a č.3. Bylo opakovaně prokázáno, že pacienti s vysokým stupněm mikrovaskulární denzity mají zásadně horší prognózu onemocnění než pacienti se střední a nízkou hustotou kapilární sítě v kostní dřeni (20).

Význam metody u MM stávající

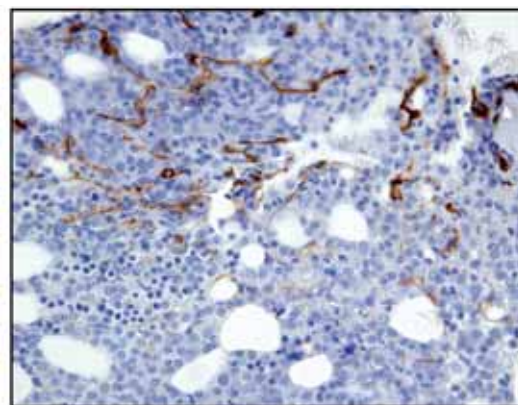
Hodnocení míry angiogeneze u pacientů s mnohočetným myelomem je v současné době pomocným faktorem v hodnocení agresivity onemocnění a jeho prognózy. Avšak zejména hodnocení mikrovaskulární denzity v spongiosní kosti získané z trepanobiopsického vyšetření je vhodným doplněním histopatologického vyšetření. A umožní patologovi vyjádřit se o mnoho lépe k prognóze onemocnění, protože tak nepopíše jenom samotné plasmocyty, ale i vlastnosti mikroprostředí kostní dřeně, které je v patogenezi myelomu zcela klíčové.

Hodnocení hladin jednotlivých faktorů je zatím pouze experimentální metodou. Většina prací hodnotících koncentrace angiogenních faktorů pomocí ELISA se zabývá VEGF (vascular endothelial growth factor, růstový faktor pro cévy a endotelie), bFGF (basic fibroblast growth factor, zásaditý růstový faktor pro fibroblasty), HGF (hepatocyte growth factor, hepatocytární růstový faktor) a to jak v plasmě periferní krve tak plasmě kostní dřeně (15, 26). Vliv vyso-

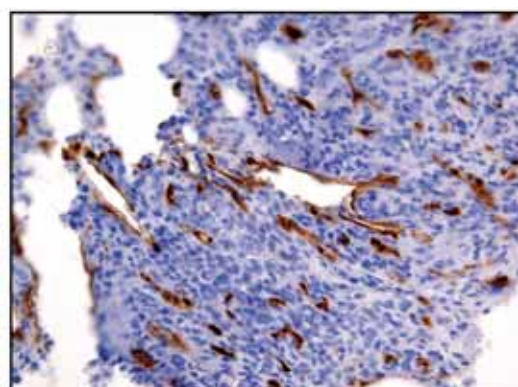
kých hladin všech těchto aktivátorů na agresivitu choroby byl opakovaně popsán (2, 7, 22). Naše výsledky v souladu s citovanou literaturou prokázaly, že klíčovým aktivátorem angiogeneze je u mnohočetného myelomu HGF, kde jsou výsledky nejednoznačnější (9, 20, 31).



Obrázek č. 1: Mikroskopický obraz kostní dřeně u pacienta s nízkou MVD.



Obrázek č. 2: Mikroskopický obraz kostní dřeně u pacienta se střední MVD.



Obrázek č. 3: Mikroskopický obraz kostní dřeně u pacienta s vysokou MVD.

Význam metody u MM očekávaný

MVD

Zvýšená mikrovaskulární denzita v kostní dřeni je u MM významným negativním prognostickým faktorem (9, 14, 20, 28). Na základě zmíněných prací lze konstatovat, že čím více se vytvoří nových cév, tím je onemocnění agresivnější. Hodnocení angiogeneze měřením mikrovaskulární denzity je významným prognostickým faktorem a se zaváděním nových antiangiogenních léků se může stát i významným faktorem prediktivním.

ELISA

Potenciální význam ELISA metody spočívá v rychlém stanovení prognózy a odpovědi na anti-angiogenní léčbu na základě hodnocení angiogenních cytokinů v periferní krvi, resp. séru či plasmě. Metoda nevyžaduje biopsie kostní dřeně, separaci CD138+ buněk, ani řadu časově i finančně nákladných metod. Jako nejvhodnější faktor ze skupiny aktivátorů pro monitoring angiogeneze se jeví HGF, protože jeho hladiny jsou při stanovení diagnózy u pacientů, kteří dosáhli nejméně velmi dobré parciální remise, statisticky nižší než u pacientů s horší léčebnou odpovědí a to jak v plasmě periferní krve, tak v plasmě kostní dřeně. U ostatních faktorů výsledky nejsou zcela jednoznačné a není zcela zřejmé, který z uvedených faktorů má jednoznačně největší vliv na patogenezu a prognózu u mnohočetného myelomu (9, 18, 20, 31).

Závěr

Angiogeneze je velmi složitý proces, ve kterém je zapojeno obrovské množství genů a produktů těchto genů z nádorových i normálních tkání. Podle výsledné převahy jednotlivých zapojených faktorů je angiogeneze tlumena nebo aktivována (3). Hlavním cílem je definovat diagnostický a prognostický potenciál jednotlivých faktorů v patogenezi MM a na základě jednoduchých laboratorních testů zvolit vhodnou léčbu. Pochopení mechanismu angiogeneze a jeho ovlivnění se tak v budoucnu stane základem cílené individualizované léčby.

Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

Literatura

- Adam Z., Hájek R., Mayer J. et al. Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Masarykova univerzita, 1999
- Alexandrakis MG, Passam FH, Sfiridaki A, et al. Elevated serum concentration of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma: correlation with markers of disease activity. *Am J Hematol* (United States), Apr 2003, 72(4) p229-33
- Brehm, S.: Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial. *Cancer Control*, 6, 1999, s. 436-458
- Di Raimondo F. Angiogenesis in hematology: a field of active research. *Leuk Res*. 2003 Jul;27(7):571-3.
- Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.*, 18, 1971, s.1182-1186
- Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol*. 1995 Mar;13(3):765-82
- Iwasaki T. Predicting treatment responses and disease progression in myeloma using serum vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor levels. *Leuk Lymphoma*. 2003 Aug;44(8):1347-51.
- Jakob C, Sterz J, Zavrski I. Angiogenesis in multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006 Jul;42(11):1581-90. Epub 2006 Jun 23.
- Kumar S, Fonseca R, Dispenzieri A, et al. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: effect of therapy. *Br J Haematol* (England), Dec 2002, 119(3) p665-71
- Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
- Clin Chem*. 2005 Dec;51(12):2415-8
- Martin SK, Dewar AL, Farrugia AN. Tumor angiogenesis is associated with plasma levels of stromal-derived factor-1alpha in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2006 Dec 1;12(23):6973-7.
- (http://www.millipore.com/drugdiscovery/dd3/elisa_kits)
- Munshi NC, Wilson C. Increased bone marrow microvessel density in newly diagnosed multiple myeloma carries a poor prognosis. *Semin Oncol* (United States), Dec 2001, 28(6) p565-9
- Orpana A.: Angiogenic and lymphangiogenic molecules in hematological malignancies. *Leukemia and lymphoma*, 2002 Feb;43(2):219-24.
- Parums DV, Cordell JL, Micklem K, et al. JC70: A new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 43:752-757, 1990
- Pour L, Hájek R, Maisnar V et al. Angiogeneze a antiangiogenní terapie u nádorů. *Vnitr Lek*. 2004 Dec;50(12):930-8. Review.
- Pour L., Kovarova L., Büchler T. Evaluation of hepatocyte growth factor and endostatin in the bone marrow of patients with multiple myeloma and the effect of peripheral blood admixture. 10th International Myeloma Workshop, Sydney, Australia, 10-14 April 2005, Abstract in: *Haematologica* 90, 2005, Suppl. 1, 170, PO 914
- Pruneri G, Ponzoni M, Ferreri AJ, et al. Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. *Br J Haematol* (England), Sep 2002, 118(3) p817-20
- Rajkumar SV, Leong T, Roche PC, et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* (United States), Aug 2000, 6(8) p3111-6
- Rajkumar SV, Mesa RA, Fonseca R et al. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res*. 2002 Jul;8(7):2210-6.
- 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* (Denmark), Feb 2001, 66(2) p83-8
- Sezer O, Niemöller K, Eucker J, et al. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol* (Germany), Oct 2000, 79(10) p574-7
- Sezer O, Niemöller K, Jakob C, Heider U. Angiogenesis in multiple myeloma. *Leuk Res*. 2001 Aug;25(8):639-45.
- Srivastava A, Laidler P, Davies R et al. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. *Am J Pathol* 133:419-423, 1988
- Ščudla V. et al. Comparison of serum levels of selected biological parameters in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Vnitr Lek*. 2006 Mar;52(3):232-40. Czech.
- Tijssen P. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Elsevier, Amsterdam, 1985.
- Vacca A, Ribatti D. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1994 Jul;87(3):503-8.
- Vacca A., Ribatti D., Roccaro, AM. et al. Bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. *Semin Oncol.*, 28, 2001, s. 543-550
- Vacca A, Ribatti D. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia*. 2006 Feb;20(2):193-9.
- Vacca A, Ria R, Ribatti D, et al. A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. *Haematologica* (Italy), Feb 2003, 88(2) p176-85
- Wang JM, Kumar S, Pye D, et al. Breast carcinoma: Komparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 86:386-388, 1994
- Weidner N, Semple SP, Welch WR, et al: Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324:1-8. 1991