

EXPRES ANTIGENU CD56 NA MALIGNÍCH PLAZMOCYTECH A KOSTNÍ POSTIŽENÍ U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM

THE EXPRESSION OF CD56 ON MALIGNANT PLASMOCYTES AND BONE DISEASE IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

DOLEŽELOVÁ E.^{1*}, BÜCHLER T.^{1,2*}, FABIAN P.^{3,4*}, POUR L.¹, KŘEN L.³, MOULIS M.³, ADAM Z.¹, KREJČÍM L.¹, KRIVANOVÁ A.¹, HÁJEK R.^{1,2}

* první tři autoři přispěli k práci stejným dílem

¹ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, LF MU A FN BRNO

² ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO

³ PATOLOGICKO-ANATOMICKÝ ÚSTAV, LF MU A FN BRNO

⁴ ODDĚLENÍ PATOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

S PODPOROU VÝZKUMNÉHO ZÁMĚRU MZČR 6526 9705. PRÁCE BYLA PREZENTOVÁNA NA 48. STUDENTSKÉ VĚDECKÉ KONFERENCI LÉKAŘSKÉ FAKULTY MASARYKOVY UNIVERZITY.

Souhrn: Mezi hlavní příčiny morbidit u mnohočetného myelomu patří osteolytická ložiska a osteoporóza. Antigen CD56 (NCAM – neuronal cell adhesion molecule) se podílí na interakcích mezi buňkami navzájem i mezi buňkami a strukturami extracelulární matrix. Cílem práce bylo zhodnotit význam exprese antigenu CD56 na buňkách mnohočetného myelomu, především jeho korelaci s kostním postižením a biochemickými markery. Sledovaný soubor tvořilo 35 pacientů s nově diagnostikovaným onemocněním a 12 pacientů s relapsem nebo progresí. Exprese CD56 byla stanovena v kostní dřeni získané trepanobiopsií pomocí monoklonální protilátky. Pacienti s expresí antigenu CD56 tvořili 74,5 % našeho souboru. Skupiny CD56+ a CD56- byly ekvivalentní, co se týká hodnot vybraných biochemických markerů (beta 2-mikroglobulin, vápník, albumin), procenta infiltrace kostní dřene, věku, pohlaví, stádia dle Durie-Salmona, stádia dle IPI a typu myelomu. Pozitivita CD56 signifikantně korelovala s nálezem osteolytických ložisek na RTG ($p=0,0006$) a s kostním postižením (definováno jako patologická fraktura nebo kostní ložisko vyžadující paliativní ozaření či chirurgickou intervenci) ($p=0,0339$). CD56 je tedy užitečným markerem úzce korelujícím s přítomností kostního postižení u pacientů s mnohočetným myelomem. Na rozdíl od RTG a jiných zobrazovacích metod, které nám ukazují spíše výsledný obraz kostního postižení, CD56 predikuje určité biologické vlastnosti myelomových buněk, ze kterých můžeme odvozovat jejich chování a tak i průběh onemocnění.

Klíčová slova: mnohočetný myelom, CD56, NCAM, osteolytická ložiska

Summary: Osteolytic lesions and osteoporosis are among the principal causes of morbidity in multiple myeloma (MM). CD56 (NCAM – neuronal cell adhesion molecule) is a molecule that has a role in interactions among cells and between cells and extracellular matrix. The objective of this study was to evaluate the correlations between the expression of CD56, bone disease, and selected biochemical and clinical parameters in MM. The study included 35 patients with newly diagnosed MM and 12 patients with relapse or progression of the disease. The expression of CD56 was detected in bone marrow biopsies using a monoclonal antibody. Malignant plasma cells expressed CD56 in 74.5 % of the patients. No statistically significant differences in selected biochemical markers (beta2-microglobulin, calcium, albumin), bone marrow infiltration, age, gender, myeloma type and stage (Durie-Salmon and IPI) have been found between the CD56+ and CD56- groups. The expression of CD56 correlated significantly with the presence of osteolytic lesions detected by x-rays ($p=0.0006$) and with the occurrence of bone events (pathologic fracture or a bone lesion requiring palliative radiotherapy or surgical intervention) ($p=0.0339$). Thus, CD56 is a useful marker that closely correlates with the presence of bone disease in patients with MM. In contrast to standard imaging, the expression of CD56 is related to certain intrinsic properties of malignant plasmacytes and, therefore, can predict the clinical course of myeloma bone disease.

Key words: multiple myeloma, CD56, NCAM, osteolytic lesions

ÚVOD

Kostní postižení patří k hlavním příčinám morbidit pacientů s mnohočetným myelomem (MM) (1). Incidence MM v ČR je u 3,8/100 000 obyvatel. Je to onemocnění vyššího věku – mezi 20. až 40. rokem je tato nemoc vzácná, ale ve věkové kategorii 75-79 let je její incidence u mužů až 25/100 000 obyvatel (2).

Od normálních plazmatických buněk se maligní plazmocyty liší především nekontrolovanou proliferací a dlouhověkostí plazmocytů, ale mají také odlišný imunofenotyp. Vykazují aberantní expresi nejružnějších antigenních struktur, z nichž mnoho patří mezi adhezní molekuly, které slouží k interakcím mezi buňkami navzájem i mezi buňkami a strukturami extracelulární matrix. Ovlivňují tak migraci a homing myelomových buněk, regulují proliferační i apoptotickou aktivitu a sekreci cytokinů. Mezi tyto molekuly patří antigen CD56 (NCAM – neuronal cell adhesion molecule), transmembráno-

vý glykoprotein patřící do imunoglobulinové rodiny (3,4). NCAM má značný vliv na interakci myelomových buněk se stromatem kostní dřene a na jejich specifickém usídlení v kostech a koreluje s výskytem osteolytických ložisek. NCAM není exprimován na normálních plazmatických buňkách. U pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS), POEMS syndromem a plazmocelulární leukémií ho najdeme jen výjimečně (5,6). Je exprimován buňkami některých jiných tumorů, jako jsou neuroendokrinní tumory (včetně malobuněčného plicního karcinomu), neuroblastomy a osteosarkomy (3,4). Najdeme ho i na některých normálních buňkách, např. na Schwanových buňkách, gliálních buňkách, neuronech, na některých buňkách imunitního systému (NK buňky, část aktivovaných T-lymfocytů) a také na osteoblastech (3,4,6,7). Cílem naší studie bylo zjistit korelaci CD56 pozitivitu nebo negativitu s výskytem kostních ložisek a její vztah k ostatním markerům nádorové masy a prognózy u MM.

MATERIÁL A METODY
Pacienti

Sledovaný soubor tvořilo 47 pacientů – 35 pacientů s nově diagnostikovaným onemocněním a 12 pacientů s relapsem nebo progresí onemocnění. 32 pacientů s novou diagnózou, u kterých byla dostupná kompletní data, bylo hodnoceno detailně. Muži tvořili v této skupině 41 % a ženy 59%, medián věku v době diagnózy byl 61 let. Pacienti s expresí antigenu CD56 tvořili 74,5 % našeho souboru. Diagnóza a stadium onemocnění bylo stanoveno dle kritérií Durie-Salmona a podle systému IPI (1).

Sledování kostního postižení

Osteolytická ložiska byla zjišťována rentgenovým vyšetřením (RTG) lebky, cervikální, hrudní, lumbální a sakrální páteře, pánve, ramenních a stehenních kostí. Snímky byly popsány nezávisle na zjišťování CD56 pozitivitu. Kostní postižení bylo definováno jako patologická fraktura, nebo kostní ložisko vyžadující paliativní ozaření či chirurgickou intervenci.

Imunohistochemie

Vzorky kostní dřeně získané trepanobiopsií z lopaty kosti kyčelní byly fixovány a dekalcifikovány, dále zpracovány rutinní parafinovou metodou, 4 µm silné řezy barveny hematoxylinem a eosinem. Myelomové buňky byly prokazovány pozitivní reakcí s monoklonální myší protilátkou anti-CD138 (DAKO, Glostrup, Denmark), ředění 1:500. Antigen CD56 byl detekován monoklonální myší protilátkou anti-CD56 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), ředění 1:100. K detekci primární protilátky byl použit kit En Vision (DAKO) značený peroxidázou. Za pozitivní příkaz exprese NCAM byl považován stav, kdy nadpoloviční většina myelomových buněk vzorku reagovala zřetelnou membránovou pozitivitou. Jako pozitivní vnitřní kontrola sloužily osteoblasty lemuující povrch trámčů spongiózní kosti, které normálně výrazně exprimují CD56.

Statistická analýza

Data byla hodnocena pomocí standardních neparametrických testů (Mann-Whitney U test, Wilcoxonův test). Korelace mezi expresí CD56, nálezem osteolytických ložisek na RTG a klinickým postižením byly hodnoceny pomocí testu chi-square. Výpočty byly prováděny pomocí programu Statistica 6.1.

VÝSLEDKY

Mezi pacienty s novou diagnózou (n=35) byla exprese CD56 nalezena u 24 pacientů (69%), 11 pacientů (31%) bylo CD56-negativních. Mezi pacienty s relapsem nebo progresí (n=12) byla pozitivita CD56 nalezena u 11 pacientů (92%), pouze 1 pacient byl CD56-negativní. U pacientů s novou diagnózou byla provedena podrobná analýza vybraných klinických a laboratorních markerů. Skupiny CD56+ a CD56- byly ekvivalentní, co se týká hodnot vybraných biochemických markerů (beta 2-mikroglobulin, vápník, albumin), procenta infiltrace kostní dřeně, věku i pohlaví, stádia dle Durieho a Salmona, stádia dle IPI a typu myelomu (Tabulka 1). Osteolytická ložiska byla nalezena u 19 (59,4%) pacientů s novou diagnózou, u zbývajících 13 (40,6%) bylo RTG negativní. CD56 pozitivita signifikantně korelovala s pozitivním nálezem na RTG (p=0,0006). Expresí antigenu CD56 měla pro výskyt osteolytických ložisek podle RTG pozitivní pre-

Tabulka 1. Srovnání stádia a běžných biochemických a morfologických parametrů mezi pacienty s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem a expresí CD56 na plasmocytech a pacientů bez této exprese.

	CD56+	CD56-	P-value
Počet pacientů	21	11	–
Medián věku v době diagnózy (rozsah), roky	61(26-80)	61(33-68)	NS
Pohlaví Muži Ženy	10 11	3 8	NS
Stádium dle Durieho a Salmona I II III	7 4 10	6 1 4	NS
Subklasifikace dle Durieho a Salmona A B	21 0	10 1	NS
IPI stadium 1 2 3 Nezapočítání	12 7 1 1	6 5 0 0	NS
Medián beta 2-mikroglobulinu v séru (rozsah), mg/l	2,82(1,51-7,62)	2,64(1,16-5,31)	NS
Medián sérového kalcia (rozsah), mmol/l	2,44(2,19-2,75)	2,39(2,00-2,80)	NS
Medián infiltrace kostní dřeně (rozsah), %	21,8(0,8-60,0)	19,1(10,0-83,0)	NS
Medián sérového albuminu (rozsah), g/l	37,1(22,4-48,0)	38(16,9-43,0)	NS

Tabulka 2. Srovnání výskytu osteolytických ložisek detekovaných rentgenologicky a kostního postižení (definováno jako patologická fraktura, nebo kostní ložisko vyžadující paliativní ozaření či chirurgickou intervenci) u pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem a expresí CD56 na plasmocytech a pacientů bez této exprese.

	CD56+	CD56-	P-value
Počet pacientů	21	11	
Osteolytická ložiska dle RTG přítomná nepřítomná	17 4	2 9	0,0006
Kostní postižení přítomné nepřítomné	14 7	3 8	0,0339

diktivní hodnotu (PPV) 0,81 a negativní prediktivní hodnotu (NPV) 0,82. Kostní postižení, jak bylo definováno výše, mělo 17 pacientů (53%). CD56 pozitivita opět signifikantně korelovala s tímto nálezem (p=0,0339). PPV činila 0,67 a NPV 0,73 (Tabulka 2).

DISKUSE

Na rozdíl od jiných onemocnění s plasmocytoidní diferenciací (MGUS, některé non-Hodgkinské lymfomy) u MM dochází ke vzniku osteolytických ložisek (7). Osteolytická ložiska a osteoporóza jsou jedním z klinických příznaků MM a u pacientů s tímto onemocněním patří mezi hlavní příčiny morbiditu. Expresí molekuly CD56 je v poslední době zkoumána jako kauzální a prediktivní parametr osteolytického potenciálu MM (7). Některé studie (7) ukazují, že molekula CD56 zprostředkuje interakci mezi myelomovými buňkami a osteoblasty. Osteoblasty samy vykazují stabilně silnou expresi CD56 antigenu a slouží také jako pozitivní vnitřní kontrola kontrola při určování CD56 pozitivních plasmocytů při imunohistochemickém vyšetření kostní dřeně. Molekuly NCAM plasmocytů vytváří s NCAM molekulami osteoblastů homodimery, které mohou způsobovat transdukcí signálů vedoucí ke snížení tvorby kostní matrix (7,8). To je jeden z možných mechanismů, který vede ke snížení počtu i aktivity osteoblastů u MM, jak bylo proká-

záno u pacientů s osteolytickými ložisky (7). Maligní buňky však neerodují kostní tkáň přímo, ale působí parakrinní cestou různými cytokiny (lymfotoxin, interleukin-1, interleukin-6 a makrofágové kolonie stimulující faktor) na osteoklasty, které stimulují k resorpci kosti (9). U těchto pacientů je tedy nejen zvýšený počet i aktivita osteoklastů (k čemuž dochází i u jiných onemocnění kostní dřeně – např. MGUS, B-lymfocytární NHL), ale i snížený počet a aktivita osteoblastů. Křehká rovnováha mezi kostní resorpcí a novotvorbou kosti je tak porušena a může docházet ke vzniku osteolytických ložisek typických pro MM (7).

Ukazuje se, že chybějící exprese CD56 na myelomových buňkách může predisponovat k vývoji extramedulárních ložisek a plazmocelulární leukémií (6,10). V jedné studii se dokonce zjistilo, že pacienti s CD56-negativním myelomem léčení konvenční chemoterapií mají horší prognózu (10).

Existují i studie pojednávající o solubilním antigenu CD56 (3,11), který byl nalezen spolu s dalšími prognostickými mar-

kery (beta 2-mikroglobulin, kalcium, albumin) v séru pacientů s MM. Tyto studie poukazují na to, že difúzní osteoporóza, která postihuje některé pacienty s MM, by mohla být způsobena tímto sérovým glykopeptidem. Naznačují i jeho využitelnost jako markeru difúzní osteoporózy u MM a spolu s dalšími sérovými markery v diagnostice, stagingu a monitorování MM (3,11).

Z naší studie vyplývá, že exprese CD56 by mohla být nezávislým faktorem predikujícím výskyt osteolytických ložisek a kostního postižení u pacientů s mnohočetným myelomem. Na rozdíl od RTG a jiných zobrazovacích metod, které nám ukazují spíše výsledný obraz kostního onemocnění, exprese CD56 určuje jisté biologické vlastnosti myelomových buněk, a můžeme z ní odvozovat jejich chování a tak i průběh onemocnění. Je možné, že v budoucnu bude přítomnost antigenu CD56 na maligních plazmocycitech indikací k zahájení chemoterapie v časných stádiích MM v rámci prevence vzniku patologických fraktur.

Literatura

1. Durie BG, Kyle RA, Belch A, et al. Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. *Hematol J* 2003; 4: 379-98.
2. <http://www.uzis.cz>
3. Kaiser U, Oldenburg M, Jaques G, et al. Soluble CD56 (NCAM): a new differential-diagnostic and prognostic marker in multiple myeloma. *Ann Hematol* 1996; 73: 121-6.
4. Ong F, Kaiser U, Seelen PJ, et al. Serum neural cell adhesion molecule differentiates multiple myeloma from paraproteinemias due to other causes. *Blood* 1996; 87: 712-6.
5. 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; 76: 377-82.
6. Pellat-Deceunynck C, Barille S, Jego G, et al. The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma. *Leukemia* 1998; 12: 1977-82.
7. 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: 1293-9.
8. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, et al. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 1987; 236: 799-806.
9. Roodman GD. Role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1921-5.
10. Sahara N, Takeshita A, Shigeno K, et al. Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma. *Br J Haematol* 2002; 117: 882-5.
11. Poley S., Stieber P., Nussler V., et al. Evaluation of serum neural cell adhesion molecule as a prognostic marker in multiple myeloma *Anticancer Res* 1997; 17: 3021-4.