
Angiogeneze v kostní dřeni pacientů s plazmocytárním myelomem jako ukazatel biologického chování

Tichá V¹., Tichý M.¹, Ščudla V.², Kolář Z.¹

¹Ústav patologie LF UP, Olomouc

²III. interní klinika LF UP, Olomouc

Souhrn

Angiogeneze, tedy tvorba nových cév z preexistující vaskulární sítě, hraje jednu z klíčových rolí v rozvoji, progresi a rozsevu maligních solidních nádorů. Též u hematologických onkologických onemocnění poukazují výzkumy posledních let na korelaci angiogeneze a biologického chování. Naše práce byla zaměřena na vztah angiogeneze, stupně diferenciace nádorových plazmocytů a způsobu infiltrace v kostní dřeni nemocných s plazmocytárním myelomem (MM) před započítím léčby. Do studie bylo zahrnuto 55 pacientů, u nichž jsme v trepanobiopsických vzorcích z lopaty kosti kyčelní pomocí monoklonální protilátky CD34 znázornili mikrovazální hustotu s přepočtem na plochu 1 mm². Angiogeneze byla nejvyšší u nodulárního charakteru infiltrace u všech morfolo- gických typů MM. Korelovala jednoznačně s morfolo- gickým typem. Nižší stupeň diferenciace byl provázen výraznější angiogenezí. Největší intenzita angiogeneze byla u prognosticky nejhoršího plazmoblastického typu MM s nodulární infiltra- cí. U tohoto typu byl způsob infiltrace téměř vý- lučně nodulární. Nejnižší stupeň angiogeneze byl u G₁ morfolo- gické diferenciace s intersticiální to- pografií infiltrátu.

Klíčová slova: plazmocytární myelom – angiogeneze – kostní dřeň

Summary

Bone Marrow Angiogenesis in Patients with Multiple Myeloma as a Marker of Tumour Biological Behaviour

Angiogenesis, the creation of new blood vessels from preexisting vascular nets, plays a major role in the development, progression and dissemination of solid malignant tumors. Research over the last few years has shown a correlation of angiogenesis and the biological behaviour of haematologic malignancies. This study focused on the relation of vasoformation, stage of differentiation of tumour plasmocytes and type of bone marrow infiltration in patients with multiple myeloma (MM) prior to treatment. We evaluated trephine biopsy samples from 55 patients for microvessel density in 1 mm² field by monoclonal antibody anti CD34. Angiogenesis correlated with the type of infil- tration and with stage of morphological differentiation. It was highest in the nodular type of infil- tration with a low level of differentiation, and lowest in grade 1 differentiation with an interstitial type of infiltration.

Key words: multiple myeloma – angiogenesis – bone marrow

Čes.-slov. Patol., 42, 2006, No. 3, p. 115–119

Plazmocytární myelom (MM) byl mezi prvními hematologickými malignitami, kde byla angiogeneze ve vztahu k progresi one- mocnění podrobně studována (4, 8, 10, 11, 14, 16, 18).

Řada prací též poukazuje na korelaci angio- geneze s agresivitou choroby. Indukce angio- geneze s následnou progresí tumoru závisí na vy- váženosti angiogenních aktivátorů a inhibitorů v nádorovém mikroprostředí. Dosud je známo více jak 20 endogenních promotorů angiogeneze a poněkud menší počet faktorů s účinkem inhi- bujícím, jež jsou produkovány jak nádorovými

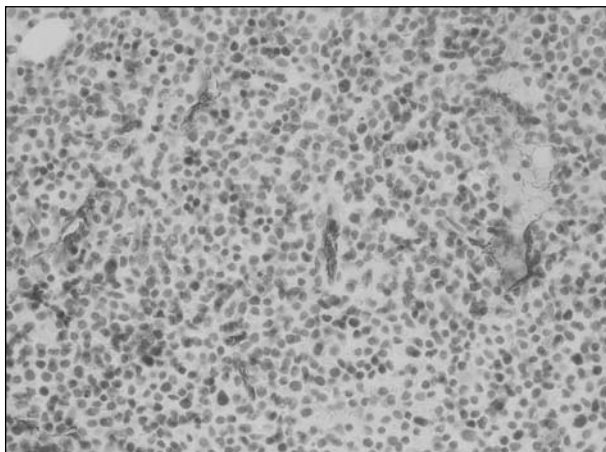
buňkami, tak elementy stromálními a zánětli- vými (2, 5, 7, 17). Přehled některých angio- genních faktorů uvádí tabulka 1.

Zdá se, že zásadní roli u MM sehrává VEGF (vascular endothelial growth factor), jehož se- krece myelomovými buňkami byla prokázána (3, 5, 6, 9, 12). Všechny izoformy VEGF mají tyro- zinkinázové receptory VEGFR (vascular endo- thelial growth factor receptor) 1, 2, 3, které mj. jsou exprimovány na povrchích endotelií krevních a lymfatických cév a progenitorových hemopo- etických buněk. Je pravděpodobné, že k vzestupu angiogeneze dochází na podkladě interakce

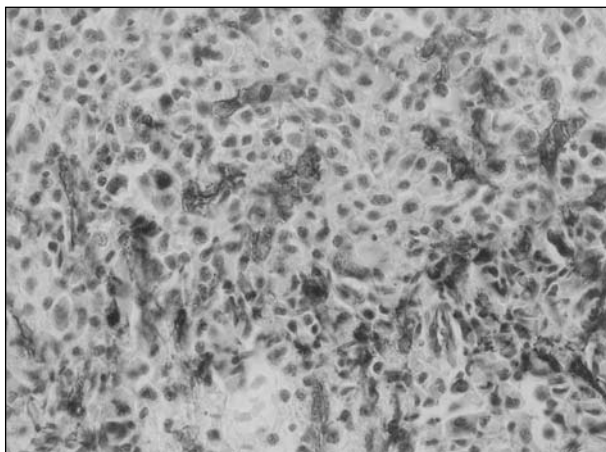
mezi maligními buňkami a endoteliemi parakrinní produkcí angiogenních faktorů.

Materiál a metodika

V rozmezí 8 let (1998–2005) byl vyšetřen soubor 55 pacientů s nově diagnostikovaným MM. Trepanobiopické vzorky z lopaty kosti kyčelní byly fixovány 10% formalinem, dekalifikovány 10% chelatonem a zality do parafinu. Řezy tloušťky 2–3 μm byly barveny HE a řadou speciálních barvení (Giemsa, PAS, Fe, Gomory, naftol – ASD-chloracetáteteráza). Vzorky byly dále podrobeny imunohistochemickému vyšetření s monoklonálními protilátkami CD138 (DAKO, klon MI-15), lehké řetězce Ig kappa (IMMUNOTECH, klon KP-53) a lambda (IMMUNOTECH, klon HP-6054) ke stanovení typu, kvantity a klonality infiltrace. Kapilární síť byla značena protilátkou anti CD-34 (DAKO, klon QBEnd 10). K vizualizaci byl použit set DAKO Cytomation En Vision + systém labelled Polymer – HRP.



Obr. 1. Plasmocytární myelom G₁ – nodulární infiltrace, CD34, 400krát



Obr. 2. Plasmocytární myelom G₃ – nodulární infiltrace, CD34, 400krát

Mikrovazální hustota byla hodnocena pomocí kalibrované mřížky při zvětšení 400krát na ploše 0,141 mm². Každý vzorek byl takto kvantifikován ve třech rozdílných lokalitách, které při přehledném zvětšení vykazovaly největší mikrovazální hustotu (tzv. „hot spots“). Průměrný počet cév byl pak přepočítán na plochu 1 mm². Histologický grading myelomových buněk byl proveden dle platných kritérií stanovených Bartlem a spol. (1) na G₁, G₂, G₃. Zhodnocen byl dále převažující typ infiltrace dřeně nádorovými plazmocytami. Ve vyšetřovaném souboru jsme pozorovali dva základní typy infiltrace – intersticiální a nodulární. Běžnou součástí nodulárních infiltrátů byla i infiltrace intersticiální, která však při posuzování denzity kapilární sítě nehrála zásadní roli, protože hustota kapilár zde byla vždy v pozadí ve srovnání s okrsky nodulárními.

Ke statistickému zpracování dat byl použit software SPSS, v.10.1 (SPSS Inc., Chicago, USA). Pro porovnání angiogeneze a stupně diferenciacie myelomových buněk byla použita analýza rozptylu s LSD post-hoc testy. Korelace angiogeneze s typem infiltrace byla hodnocena pomocí Studentova t-testu. Testy byly dělány na hladině signifikance 0,05. Statistická analýza byla provedena na Ústavu biofyziky LF UP.

Tab. 1. Přehled některých angiogenních faktorů

Endogenní promotory angiogeneze	Endogenní inhibitory angiogeneze
EGF	TIMP-1, TIMP-2
GCSF	PAI-1
HGF	p 53, p RB
PDGF	IL-10,12
VEGF	Angiopoetin-2
TNF α	Angiotenzin
Angiotropin	Caveolin-1, Caveolin-2
Angiogenin	Endostatin
MMP-2, MMP-9	Interferon A
uPA	Isoflavony
IL-1,6,8	Trombospondin-1
c-myc, ras, c-src, v-raf	Troponin-1
Angiopoetin -1	
Angiostatin - II	
Endotelin	
Erythropoetin	
Hypoxie	
Prostaglandin E	
Trombopoetin	

Vysvětlivky:

PDGF – plateled derived growth factor

VEGF – vascular endothelial growth factor

TNF α – tumor necrosis factor

MMP – matrix metaloproteáza

uPA – urokinase type plazminogen activator

IL – interleukin

TIMP – tkáňové inhibitory metaloproteáz

PAI-1 – inhibitor plazminogen aktivátoru

Výsledky

Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 2–10.

Tab. 2. Plazmocytární myelom G₁

	Pohlaví	Věk (r.)	Přepočet cév na 1 mm ²	Typ infiltrace
1	Ž	75	52,5	I
2	Ž	58	35,5	I
3	Ž	74	49,7	I
4	Ž	80	47,3	I
5	Ž	60	54,4	I
6	Ž	72	47,3	N
7	Ž	55	85,2	N
8	Ž	49	61,5	N
9	Ž	78	59,2	N
10	Ž	64	92,3	N
11	M	59	63	I
12	M	74	66,5	I
13	M	47	45	I
14	M	79	40,2	I
15	M	68	54,4	I
16	M	67	49,7	I
17	M	51	66,3	N
18	M	60	85,2	N
19	M	65	80,5	N

Vysvětlivky: I – intersticiální infiltrace
N – nodulární infiltrace

Tab. 3. Plazmocytární myelom G₁ intersticiální typ infiltrace

Pohlaví	Průměrný věk (r.)	Počet	Průměrný počet cév na 1 mm ²
Ž	69,4	5	47,9
M	65,6	6	53,1
celkem	67,5	11	50,7

Tab. 4. Plazmocytární myelom G₁ nodulární typ infiltrace

Pohlaví	Průměrný věk (r.)	Počet	Průměrný počet cév na 1 mm ²
Ž	63,6	5	69,1
M	58,6	3	53,3
celkem	61,1	8	63,2

Tab. 8. Plazmocytární myelom G₃

	Pohlaví	Věk (r.)	Přepočet cév na 1 mm ²	Typ infiltrace
1	M	32	108,5	I
2	M	76	85,2	N
3	M	63	111,2	N
4	M	53	123	N
5	M	71	135	N
6	Ž	76	130,5	N
7	Ž	56	144,5	N
8	Ž	65	101,8	N

Tab. 5. Plazmocytární myelom G₂

	Pohlaví	Věk (r.)	Přepočet cév na 1 mm ²	Typ infiltrace
1	M	65	73,5	I
2	M	81	108,5	I
3	M	60	106	I
4	M	63	98	I
5	M	69	59,2	I
6	M	54	68,6	I
7	M	80	75,8	I
8	M	48	119	N
9	M	65	110,5	N
10	M	55	89,9	N
11	M	77	71	N
12	M	57	92,3	N
13	M	62	85,2	N
14	M	76	82,8	N
15	M	61	82,8	N
16	M	57	101,8	N
17	M	63	80,5	N
18	M	52	108,9	N
19	M	81	87,6	N
20	M	78	111,2	N
21	M	50	82,8	N
22	M	69	61,5	N
23	Ž	46	97	N
24	Ž	72	80,5	N
25	Ž	63	63,9	N
26	Ž	57	85,2	N
27	Ž	64	85,2	N
28	Ž	63	120,7	N

Tab. 6. Plazmocytární myelom G₂ intersticiální typ infiltrace

Pohlaví	Průměrný věk (r.)	Počet	Průměrný počet cév na 1 mm ²
Ž	0	0	0
M	55,8	7	84,2

Tab. 7. Plazmocytární myelom G₂ nodulární typ infiltrace

Pohlaví	Průměrný věk (r.)	Počet	Průměrný počet cév na 1 mm ²
Ž	60,8	6	88,8
M	63,4	15	91,2
celkem	62,1	21	90,5

Tab. 9. Plazmocytární myelom G₃ intersticiální typ infiltrace

Pohlaví	Průměrný věk (r.)	Počet	Průměrný počet cév na 1 mm ²
Ž	0	0	0
M	32	1	108,5

Tab. 10. Plazmocytární myelom G₃ nodulární typ infiltrace

Pohlaví	Průměrný věk (r.)	Počet	Průměrný počet cév na 1 mm ²
Ž	65,6	3	125,6
M	65,7	4	113,6
celkem	65,7	7	118,8

V souboru 55 dosud neléčených pacientů s MM (první záchyt) převažovali muži (36) nad ženami (19). Průměrný věk mužů v době stanovení diagnózy byl 63, 5 roků (věkové rozpětí 32 až 81 let), žen 64, 6 roků (věkové rozpětí 46-80 let).

Z 55 nemocných 19 odpovídalo morfologií nízkému stupni malignity G_1 , 28 intermediárnímu stupni G_2 a 8 blastickému typu G_3 .

Ze studie vyplývá, že:

1. Angiogeneze koreluje se stupněm diferenciace nádorových plazmocytů. Čím nižší stupeň diferenciace, tím výraznější angiogeneze. Závěr je potvrzen analýzou rozptylu, s LSD post hoc testy ($G_1-G_2 < 0,0001$, $G_1-G_3 < 0,0001$, $G_2-G_3 < 0,0001$).
2. Angiogeneze koreluje s typem infiltrace v kostní dřeni. Statistické zhodnocení celého souboru pomocí dvouvýběrového Studentova testu prokázalo signifikantně vyšší hustotu kapilární sítě u nodulárního typu infiltrace (0,0002). Signifikantně vyšší hustota kapilár (0,006) byla prokázána u G_1 MM, zatímco u G_2 MM signifikantní rozdíl v hustotě kapilární sítě mezi nodulární a intersticiální infiltrací nebyl prokázán (0,414). Statistické zhodnocení u G_3 MM nebylo provedeno pro malý počet případů s intersticiálním typem infiltrace.
3. Nejvyšší hustota kapilární sítě byla u G_3 MM s nodulárním typem infiltrace.
4. Nejnižší hustota kapilár byla u G_1 MM s intersticiálním typem infiltrace a dosahovala přibližně poloviční hodnoty ve srovnání s G_3 MM nodulárním typem infiltrace.
5. G_3 typ se téměř výlučně manifestoval nodulárním způsobem infiltrace dřene.
6. Nenašli jsme žádný vztah mezi stupněm morfologické diferenciace, topografií infiltrátů a pohlavím či věkem nemocných.

Diskuse

Ve snaze zpřesnění o předpovědi nemocných se zhoubnými novotvarami se studují stále nové faktory, které by mohly přinést v tomto smyslu cenné poznatky. Jedním z morfologických faktorů, kterému je v posledních letech věnována značná pozornost, je sledování angiogeneze nejen u solidních nádorů, ale i u malignit hematologických včetně MM. Většina studií řešících tuto problematiku ukazuje na obdobu se solidními nádory, tj., že histologicky méně diferencované, tedy biologicky agresivnější tumory jsou charakterizovány vyšším stupněm vaskulární hustoty (8, 10, 11, 13, 14, 18).

Předložená práce na souboru dosud neléčených pacientů ukazuje na úzký vztah angiogene-

ze, morfologické diferenciace a typu infiltrace kostní dřene nemocných s MM. V souhlase s jinými autory (14, 18) jsme pozorovali, že hustota kapilární sítě narůstá jak se ztrátou diferenciace myelomových buněk, tak s typem infiltrace kostní dřene. Pravidelně nejhustější síť kapilár byla vytvořena v nodulárních infiltrátech plazmoblastického myelomu (G_3) a naopak nejmenší neovaskularizace byla přítomná v dobře diferencovaných (G_1) plazmocytárních myelomech infiltrujících intersticiem kostní dřene. Tato souvislost byla v námi pozorovaných případech jednoznačná. Domníváme se, že hustota vaskulární sítě je víceméně rovnocenným morfologickým znakem stupně diferenciace myelomových buněk a z tohoto hlediska i cenným prognostickým ukazatelem. Nevýhodou semikvantitativního hodnocení angiogeneze je časová náročnost, která omezuje jeho použití v rutinní praxi.

Poděkování

Autoři děkují Mgr. J. Zapletalové, Ph.D. za provedení statistické analýzy.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR č. NC 7503-3/2003.

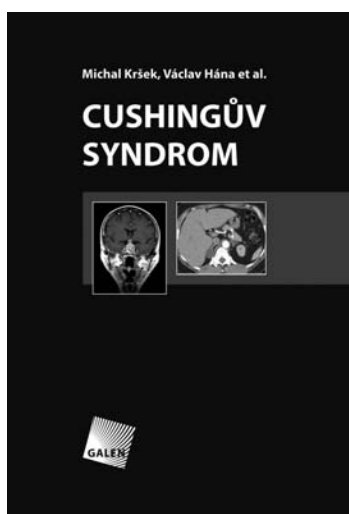
Literatura

1. Bartl, R., Frisch, B., Fateh-Moghadam, A. et al.: Histologic classification and staging of multiple myeloma. A retrospective and prospective study of 674 cases. *Am. J. Clin. Pathol.*, 87, 1987, s. 342-355.
2. Bellamy, W. T., Richter, L., Frutiger, Y., Grogan, T.M.: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Canc. Res.*, 59, 1999, s. 728-733.
3. Dankbar, B., Padro, T., Leo, R. et al.: Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood*, 95, 2000, s. 2630-2636.
4. Kumar, S., Fonseca, R., Dispenzieri, A. et al.: Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: effect of therapy. *Br. J. Haematol.*, 119, 2002, s. 665-671.
5. Kumar, S., Witzig, T. E., Timm, M. et al.: Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells. *Leukemia*, 17, 2003, s. 2025-2031.
6. Lauta, V. M.: A review of the cytokine network in multiple myeloma: diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Cancer*, 97, 2003, s. 2440-2452.
7. Mangi, M. H., Newland, A.: Angiogenesis and angiogenic mediators in hematological malignancies. *Br. J. Haematol.*, 111, 2000, s. 43-51.
8. Munski, N. C., Wilson, C.: Increased bone marrow microvessel density in newly diagnosed multiple myeloma carries a poor prognosis. *Semin. Oncol.*, 28, 2001, s. 565-569.
9. Podar, K., Tai, Y. T., Davies, F. E. et al.: Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood*, 98, 2001, s. 428-435.
10. Pruneri, G., Ponzoni, M., Ferrari, A. S. et al.: Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. *Br. J. Haematol.*, 118, 2002, s. 817-820.
11. Rajkumar, S. V., Leong, T., Roche, P. C. et al.: Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.*, 6, 2000, s. 3111-3116.
12. Ria, R., Roccaro, A.M., Merchionne, F. et al.: Vascular endothelial growth factor

and its receptors in multiple myeloma. *Leukemia*, 17, 2003, s. 1961–1966. 13. **Ryška, A., Hovorková, E., Ludvíková, M.**: Angiogeneze v nádorech. Část II. Metody a význam kvantifikace; angiogeneze jako prognostický ukazatel a cíl možných léčebných postupů. *Čes.-slov. Patol.*, 36, 2000, s. 71–80. 14. **Sezer, O., Niemoller, K., Encker, J. et al.**: Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Ann. Hematol.*, 79, 2000, s. 574–577. 15. **Vacca, A., Ribatti, D., Roccaro, A.M. et al.**: Bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. *Semin. Oncol.*, 28, 2001, s. 543–550. 16. **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*, 88,

2003, s. 176–185. 17. **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*, 93, 1999, s. 3064–3073. 18. **Vacca, A., Ribatti, D., Runcali, L. et al.**: Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, 87, 1994, s. 503–508.

MUDr. Vlastislava Tichá, CSc.
Ústav patologie LF UP
Hněvotínská 3
775 15 Olomouc
tel.: 585 632 453
E-mail: tichym@tunw.upol.cz



CUSHINGŮV SYNDROM

Michal Kršek, Václav Hána et al.

Cushingův syndrom je onemocnění známé již více než 70 let. Má velmi různorodou etiologii a pestrý a variabilní klinický obraz. Kvůli těmto vlastnostem, charakteru sekrece kortisolu a aktivity celé regulační osy hypothalamus–hypofýza–kůra nadledvin a zároveň nedostatečné senzitivitě a specifitě laboratorních testů, které jsou k dispozici, jde o jedno z nejkomplicovanějších onemocnění v klinické endokrinologii. Každý pacient s Cushingovým syndromem je pro endokrinologa vždy novou výzvou a často přináší různá překvapení, úskalí a nečekané komplikace na cestě od správné diagnózy k definitivní terapii. Z uvedených důvodů patří péče o pacienty s Cushingovým syndromem na specializovaná pracoviště, mající

odpovídající personální a laboratorní vybavení a spolupracující s dalšími odborníky a pracovišti. Tato monografie shrnuje současný stav poznání problematiky a využívá zkušenosti endokrinologů z III. interní kliniky 1. LF UK v Praze, kterou prošly řádově stovky pacientů s Cushingovým syndromem a která má v České republice s uvedenou problematikou největší zkušenosti. To však neznamená, že je kniha určena pouze úzkému okruhu endokrinologů, protože s diagnostikou a diferenciální diagnostikou Cushingova syndromu se setkává řada dalších lékařů, zejména internistů, obezitologů, diabetologů, ale i dalších odborností.

Vydal Galén v roce 2006, ISBN 80-7262-399-0, formát 155 x 225 mm, váz., barevná příl., 144 str., cena 390 Kč.

Objednávku můžete poslat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz