

Patofyziologie, cytogenetika a jaderná topografie mnohočetného myelomu

Jana Krejčí, Eva Bártová, Andrea Harničarová, Stanislav Kozubek

Laboratoř molekulární cytologie a cytometrie
Biofyzikální ústav AV ČR, Brno

Mnohočetný myelom

Multiple myeloma

Plasmocytom

Kahlerova nemoc

- zhoubné nádorové onemocnění projevující se bolestmi kostí a zad, zlomeninami, sníženou odolností proti infekcím, poškozením ledvin, krvetvorby atd.
- vzniká z plazmatických buněk (B lymfocytů - bb. produkující protilátky), které se nekontrolovaně množí, zaplavují kostní dřeň, poškozují kost a produkují nadměrné množství jednoho typu bílkoviny (protilátky), které působí negativně na některé vnitřní orgány
- pomalu proliferující tumor s méně než 1% nádorových bb. syntetizujících DNA x v pozdní fázi onemocnění se syntéza DNA zrychluje
- příčina neznámá !!!
- prekanceróza - **Monoklonální gamapatie nejasného významu (Monoclonal gammopathy of unknown (undetermined) significance, MGUS)**

Nejčastější projevy nemoci

Jednotliví pacienti s mnohočetným myelomem se od sebe výrazně odlišují příznaky nemoci

V době stanovení diagnózy obvykle přicházejí s některým ze čtyř hlavních projevů nemoci:

- bolesti kostí
- často se opakující a (nebo) dlouhodobé infekce
- anémie
- poškození funkce ledvin

-pouze jeden nebo více příznaků současně

-někteří nemocní jsou dlouho bez projevů nemoci a diagnóza je nezřídka odhalena při náhodném vyšetření krve nebo rentgenovém vyšetření indikovaném z jiného důvodu

-možné další, méně obvyklými příznaky (kožní, koagulační a jiná)

Diagnostická kritéria MM

Kritéria mnohočetného myelomu dle Durieho a Salmona, 1975.

Velká kritéria

- 1) plazmocytom (histologie tkáně)
- 2) počet plazmocytů v kostní dřeni > 30 %
- 3) sérové koncentrace monoklonálního imunoglobulinu (M-Ig): M-IgG > 35 g/l,
M-IgA > 20 g/l
nebo množství lehkých řetězců v moči
za 24 hodin > 1 g

Malá kritéria

- a) v kostní dřeni 10 - 30 % plazmocytů
- b) koncentrace M-Ig nižší než v bodě 3
- c) přítomna osteolytická ložiska
- d) snížení ostatních fyziologických imunoglobulinů IgM < 0,5 g/l, IgA < 1,0 g/l, IgG < 6,0 g/l

Diagnóza mnohočetného myelomu je jasná, je-li přítomno jedno velké a jedno malé kritérium, anebo jsou-li přítomna kritéria a+b a dále kritérium c nebo d.

Diagnostická kritéria MM dle *International Myeloma Working Group*, 2003

Pro diagnózu mnohočetného myelomu je nutno splnit všechna tři kritéria:

1. Počet monoklonálních plazmatických buněk v kostní dřeni je > 10 % a (nebo) biopsie kostní dřene prokázala plazmocytom.
2. Je přítomen monoklonální imunoglobulin v krvi a (nebo) v moči
3. Je přítomná nejméně jedna dysfunkce či poškození orgánu způsobené mnohočetným myelomem:
 - (**C** - *calcium*) zvýšená hladina kalcemie nad 2,8 mmol/l či nad horní limit
 - (**R** - *renal*) Renální insuficience s kreatininem nad 176,8 mmol/l (2 mg/l)
 - (**A** - *anemia*) anémie, hemoglobin pod 100 g/l nebo 20 g/l pod dolní limit normy
 - (**B** - *bone*) osteolytické kostní destrukce nebo osteoporóza

Epidemiologie a incidence

Mnohočetný myelom je plazmocelulární maligní choroba

Incidence činí ve ČR 4/100 000.

Medián věku při stanovení diagnózy je 60-65 let. Méně než 2 % všech pacientů je ve věku do 40 let.

Vyšší incidence této nemoci je v afro-karibské skupině obyvatel než u populace kavkazské.

Menšina případů mnohočetného myelomu vzniká transformací z *monoklonální gamapatie nejasného významu (monoclonal gammopathy of unknown (undetermined) significance - MGUS) - prekanceróza*
- 1 % dospělé populace (u 1 % ročně se vyvine MM)

Ve většině případů MM se jedná o nově rozpoznané (vzniklé) onemocnění.

Průběh onemocnění a jeho léčba

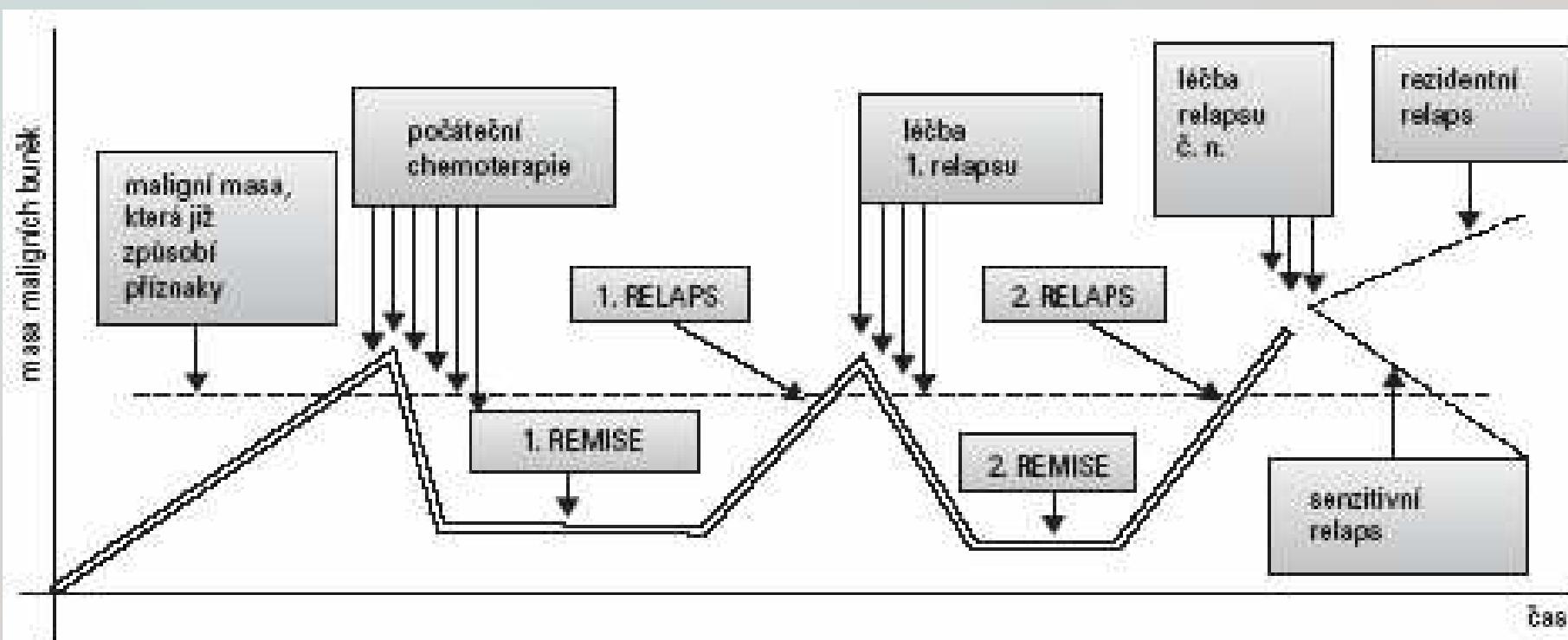
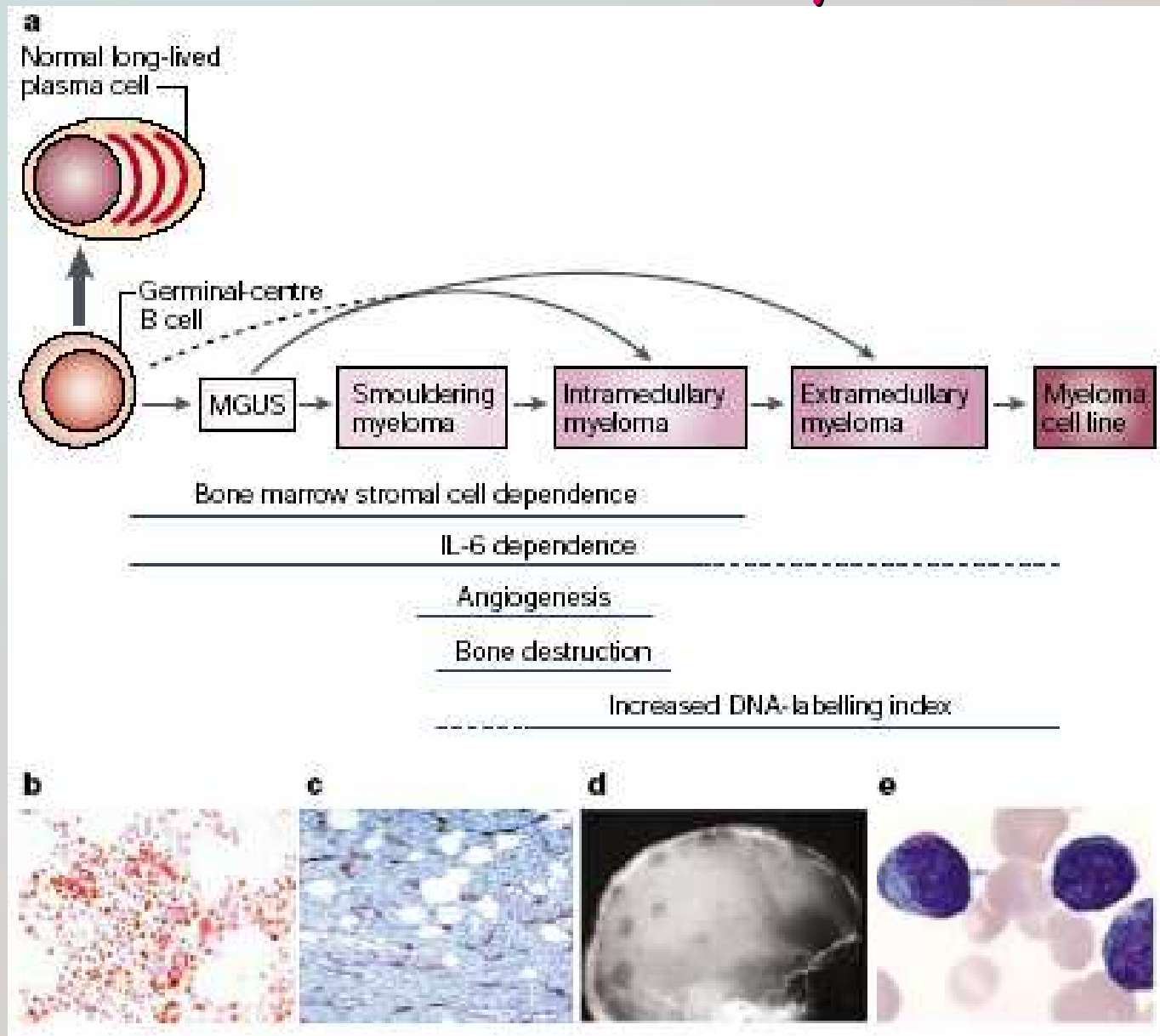


Schéma 6.1 Schéma léčby mnohočetného myelomu. Číslem n chceme vyjádřit, že nikdy dopředu nevíme, kolik relapsů bude, kolik jich bude zvládnuto chemoterapií a který relaps již nebude léčebně zvládnutelný.

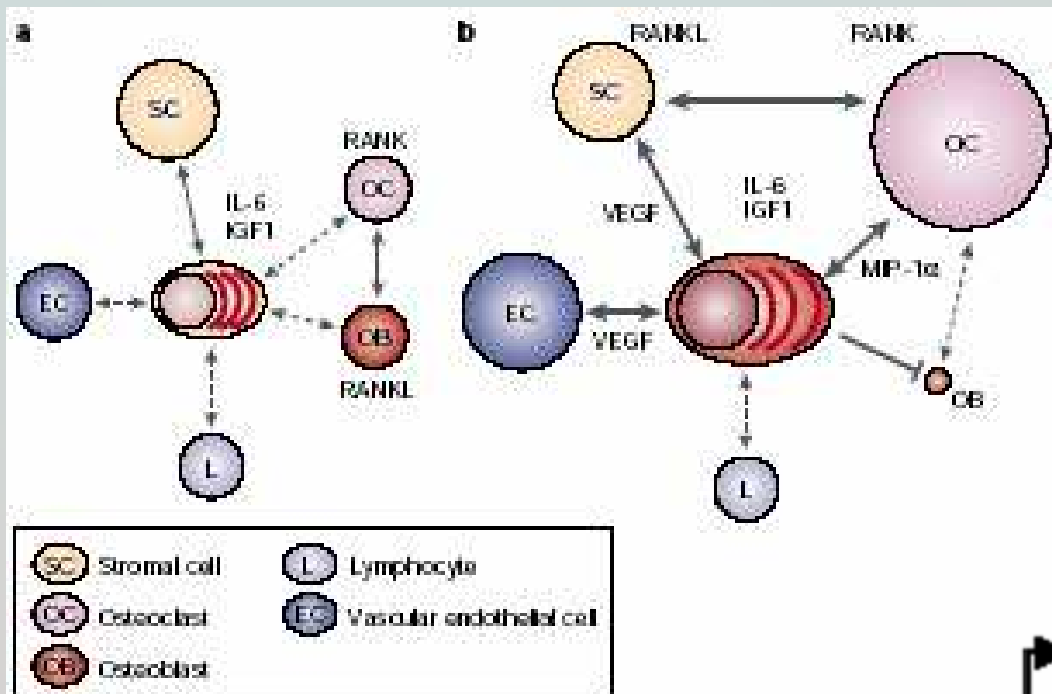
Adam et al., 2002

Stadia mnohočetného myelomu



Mikroprostředí v kostní dřeni

- plazmatická buňka normální a myelomová



Kuehl & Bergsagel, 2002

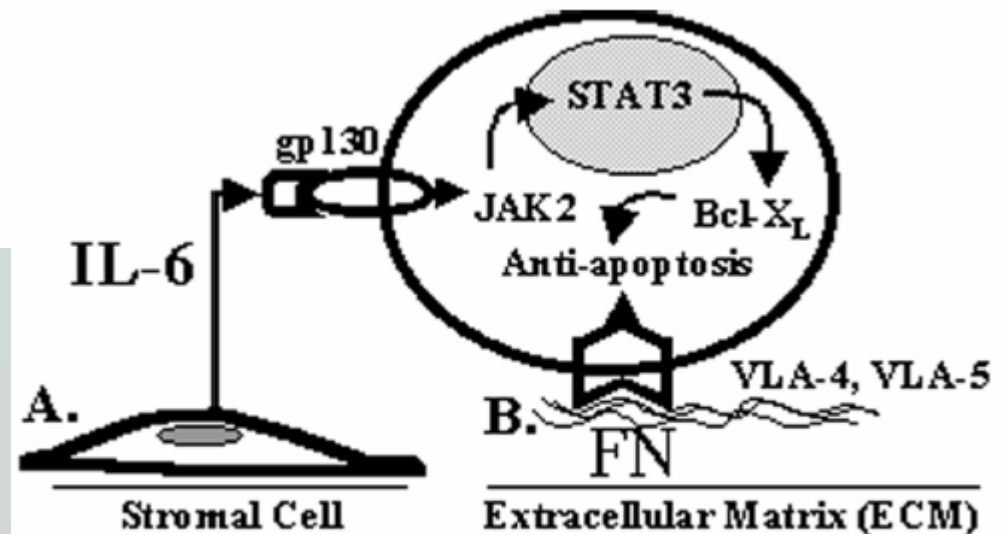


Figure 7. A. Soluble tumor micro-environment interactions (IL-6). B. Direct interaction with tumor micro-environment fibronectin (FN).

Dalton et al., 2001.

Myelomové bb. jsou CD138+

Exprese CD138 nejčasnějšími MM buňkami a buňkami MM linií je využívána pro purifikaci MM buněk z klinických vzorků ~ z kostní dřeně pacientů jsou separovány **CD138 pozitivní buňky - využívají se k cytogenetickému vyšetření**

CD138 alias **Syndecan-1** - transmembránový heparan-sulfátový proteoglykan

- v průběhu vývoje exprimován na povrchu pre-B buněk, ztrácí se během jejich dozrání, silně reexprimován ve zralých plamatických buňkách
- zprostředkovává specifickou adhezi MM buněk ke kolagenu I, invazi do kolagen I gelů a adhezi buňka-buňka mezi MM buňkami
- v kultuře se uvolňuje z povrchu buněk a inhibuje růst MM buněk *in vitro*
- ovlivňuje diferenciaci buněk kostní dřeně -> B-buňky overexprimují inhibitor DKK1 (dráha Wnt) -> je inhibována diferenciaci osteoblastů -> vznikají osteolytické léze. **Osteoblasty -> osteoklasty**: osteoclast-activating factor (OAF), cytokiny: IL-6, IL-1b, TNF a, aj.

Molekulární patogeneze mnohočetného myelomu

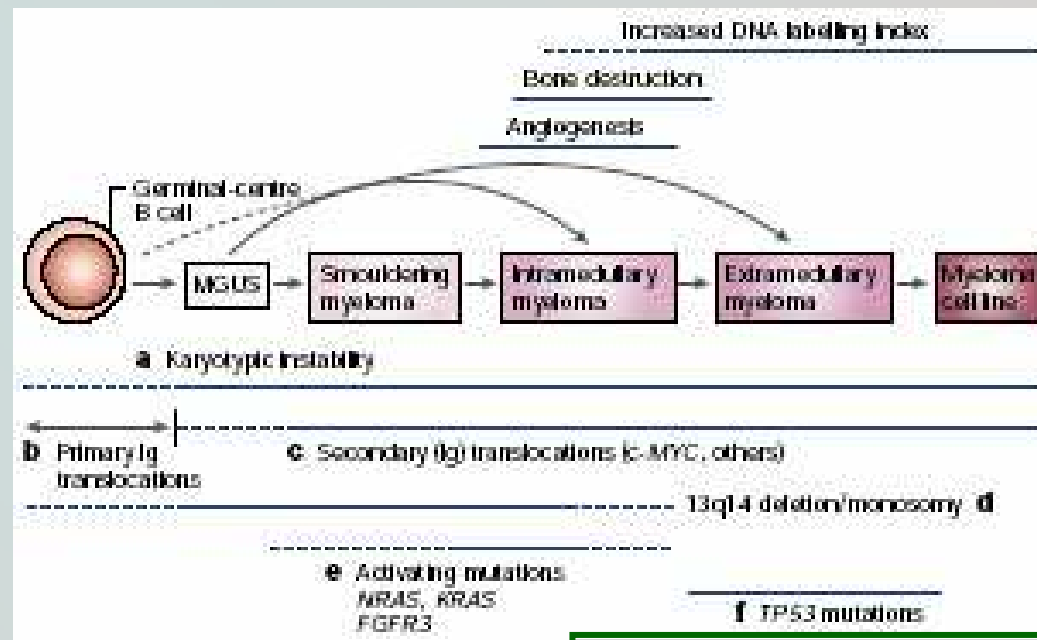


Table 1 | Characteristics of primary versus secondary translocations

Characteristics	Primary	Secondary
Timing	Early (initiation)	Late (progression)
B-cell-specific mechanism	Usually	No; off in normal or tumour plasma cell
Breakpoint in/near J or switch regions	Usually	Rarely
Ig locus associated*	Usually	Less often
Present in MGUS	Yes	Rarely
Heterogeneity in tumour population	No	Sometimes
Type of karyotypic abnormality†	Simple	Usually complex

Table 2 | Recurrent Ig translocations in multiple myeloma

Locus	Oncogene product	Approximate incidence*
11q13	Cyclin D1	15–20%
6p21	Cyclin D3	5%
4p16.3	FGFR3 and MMSET	12%
16q23	c-MAF	5–10%
8q24	c-MYC	<10%
6p25	MUM1/IRF4	5%
20q11	MAFB	5%
1q21	IRTA1/IRTA2	Rare
1q11	?	Rare
2p23	NMYC	Rare
3q21	?	Rare
9p13	PAX5?	Rare
11q23	MLL1?	Rare
12p13	Cyclin D2?	Rare

IgH lokus - translokace 14q32

více než 50 % pacientů s MGUS a 90 %
pacientů s MM,
jiný zdroj: přibližně 1/3 MM pacientů nemá
detekovatelnou karyotypovou 14q32
abnormalitu

- velmi promiskuitní translokační partner
- 3 skupiny

1. cykliny **D1** (11q13), **D3** (6p21), snad i **D2** (12p13) (20 - 25 % tumorů)
2. 2 proteiny kódované v **4p16** (nukleární protein **MMSET**, transkripční faktor **FGFR3** (~15 %)
3. transkripční faktory **c-MAF** (16q23), **MAFB** (20q11) (~10 %)

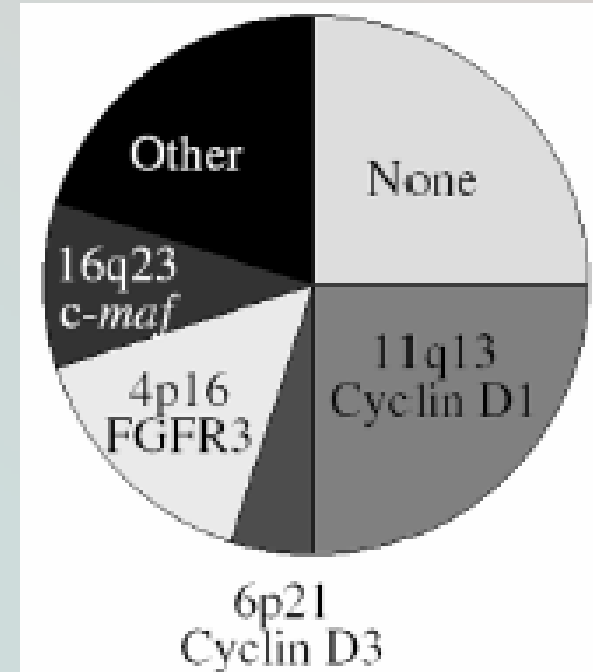
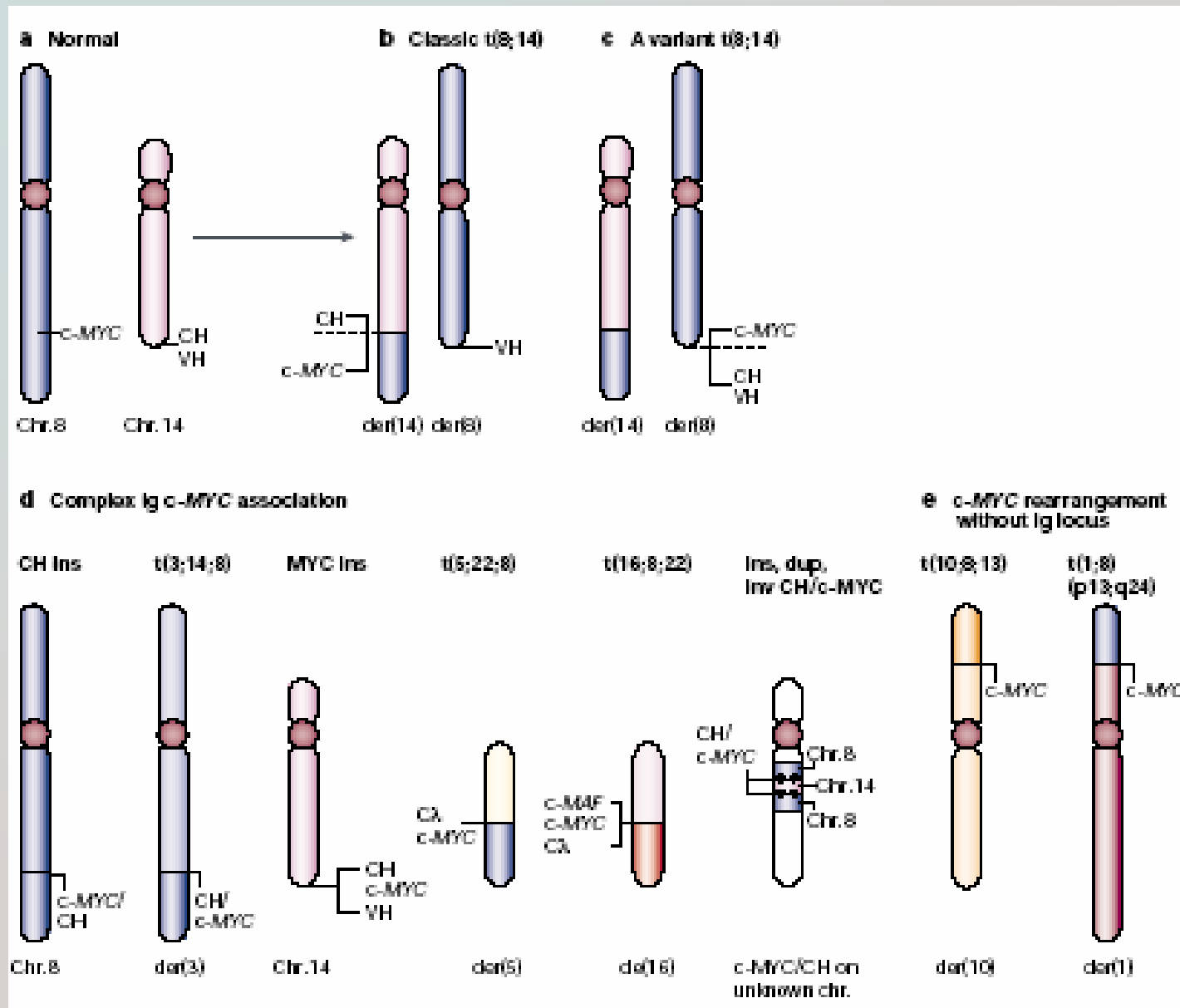


Figure 3. Frequency of IgH translocation in multiple myeloma. See text for additional details.

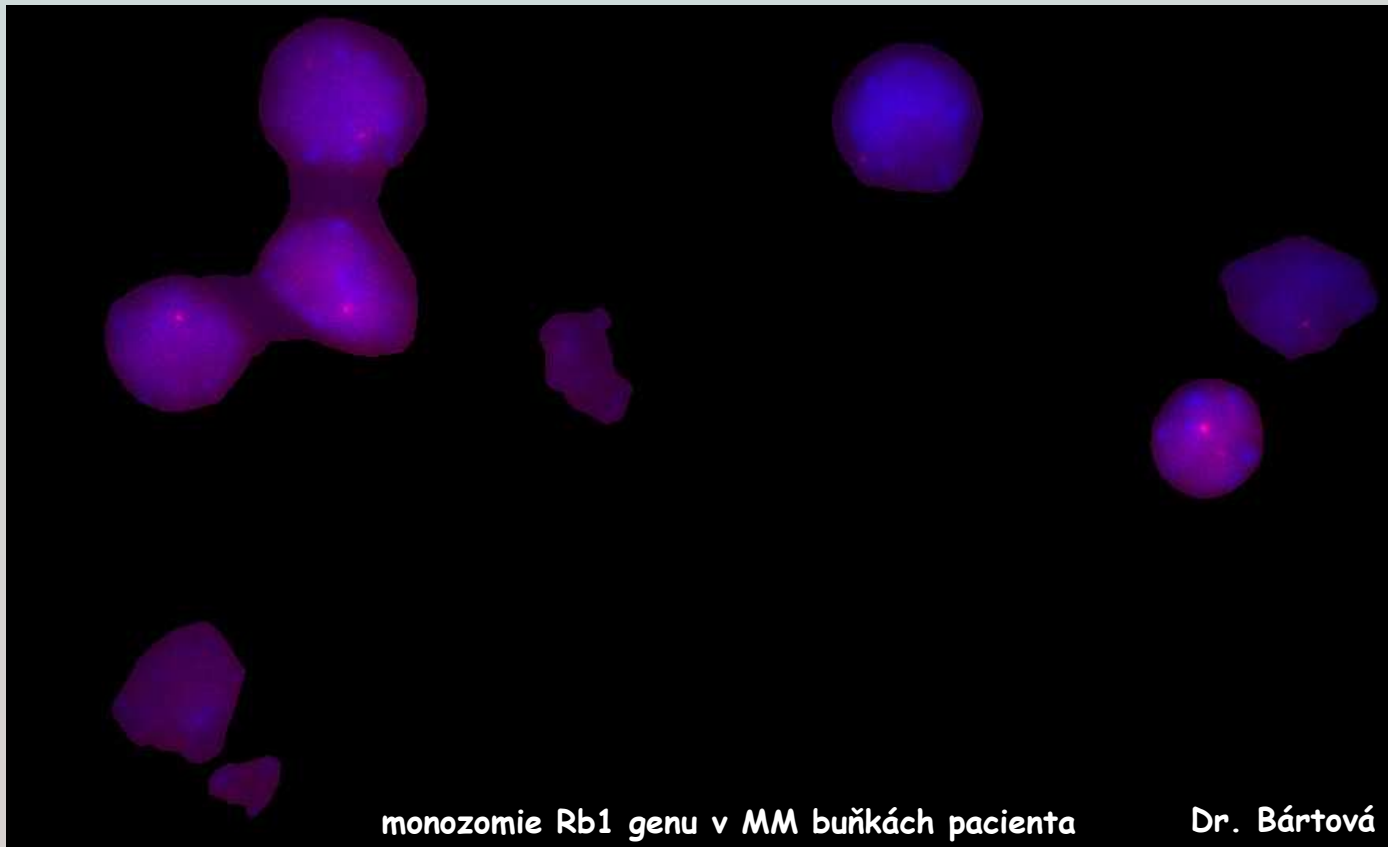
Dalton et al., 2001.

... primární translokace (objevují se časně, možná spouštějí tumorigenezi)

Příklady jednoduchých a komplexních translokací u mnohočetného myelomu



Sekundární translokace - objevují se během progresse
nádorového onemocnění
dysregulace *c-MYC*
monosomická ztráta **13q** (ztráta jedné kopie tumorsupresorového
proteinu **Rb**) (20 % MGUS, 70 % MM)
mutace **p53**, aj.



monozomie Rb1 genu v MM buňkách pacienta

Dr. Bártová

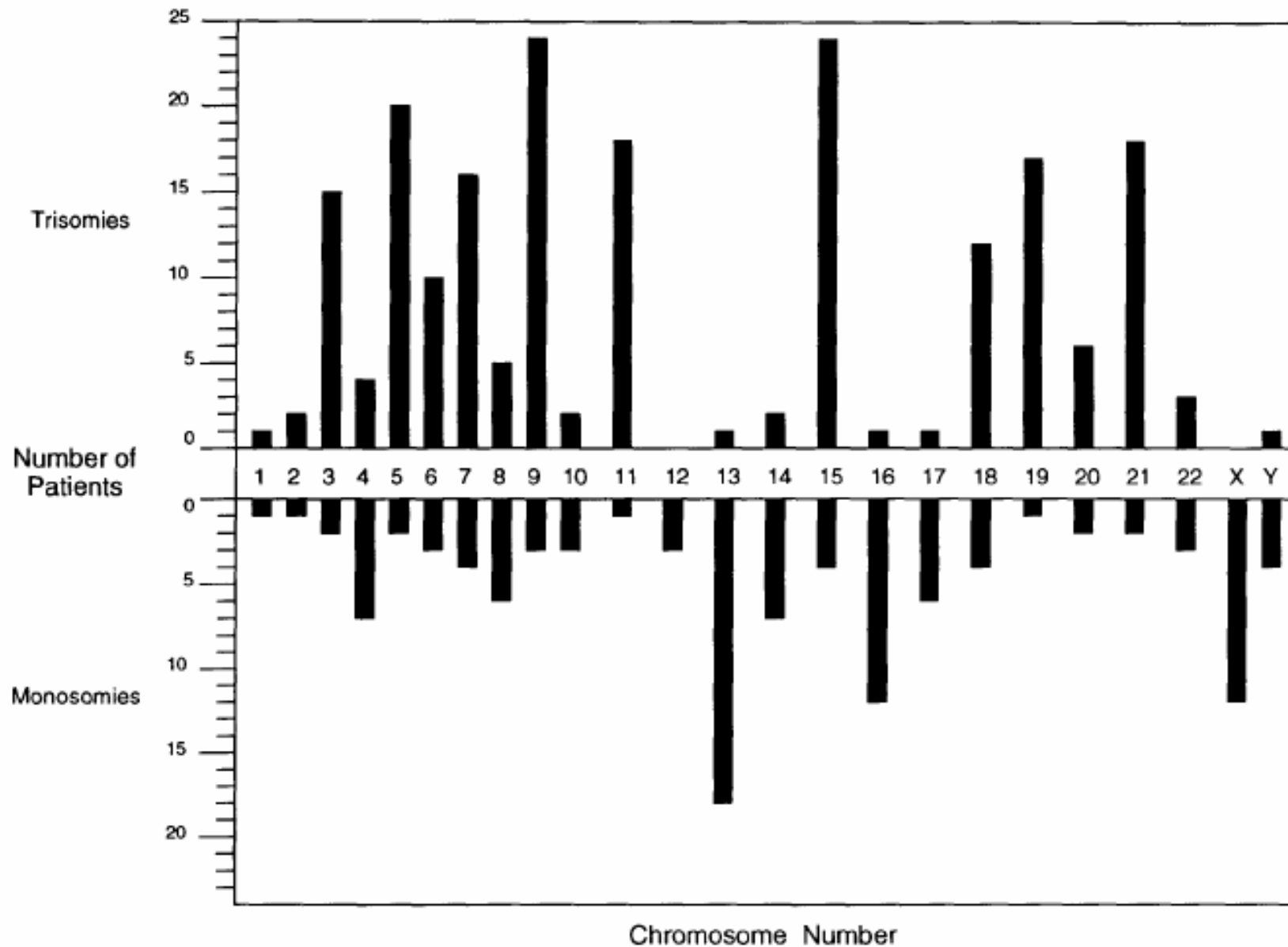
Karyotyp buněk mnohočetného myelomu

- je složitý, velice podobný karyotypům nacházejícím se v epiteliální tumorech a v blastické fázi CML
- frekvence a stupeň karyotypových abnormalit koreluje se stadiem, trváním nemoci a odpovědí na léčbu
Př. delece 13q, změny počtu chromosomů, případně translokace lokalizované na chromozomech 1, 3, 7, 8, 11, 12, 16, 17, 18, X

Prognóza

- je složitý, velice podobný karyotypům nacházejícím se v epiteliální tumorech a v blastické fázi CML
- frekvence a stupeň karyotypových abnormalit koreluje se stadiem, trváním nemoci a odpovědí na léčbu
Př. delece 13q, změny počtu chromosomů, případně translokace lokalizované na chromozomech 1, 3, 7, 8, 11, 12, 16, 17, 18, X

Figure 1 Frequency of numerical anomalies from a group of 63 abnormal karyotypes. The number of chromosomal trisomies is represented on top, while the monosomies are represented below.



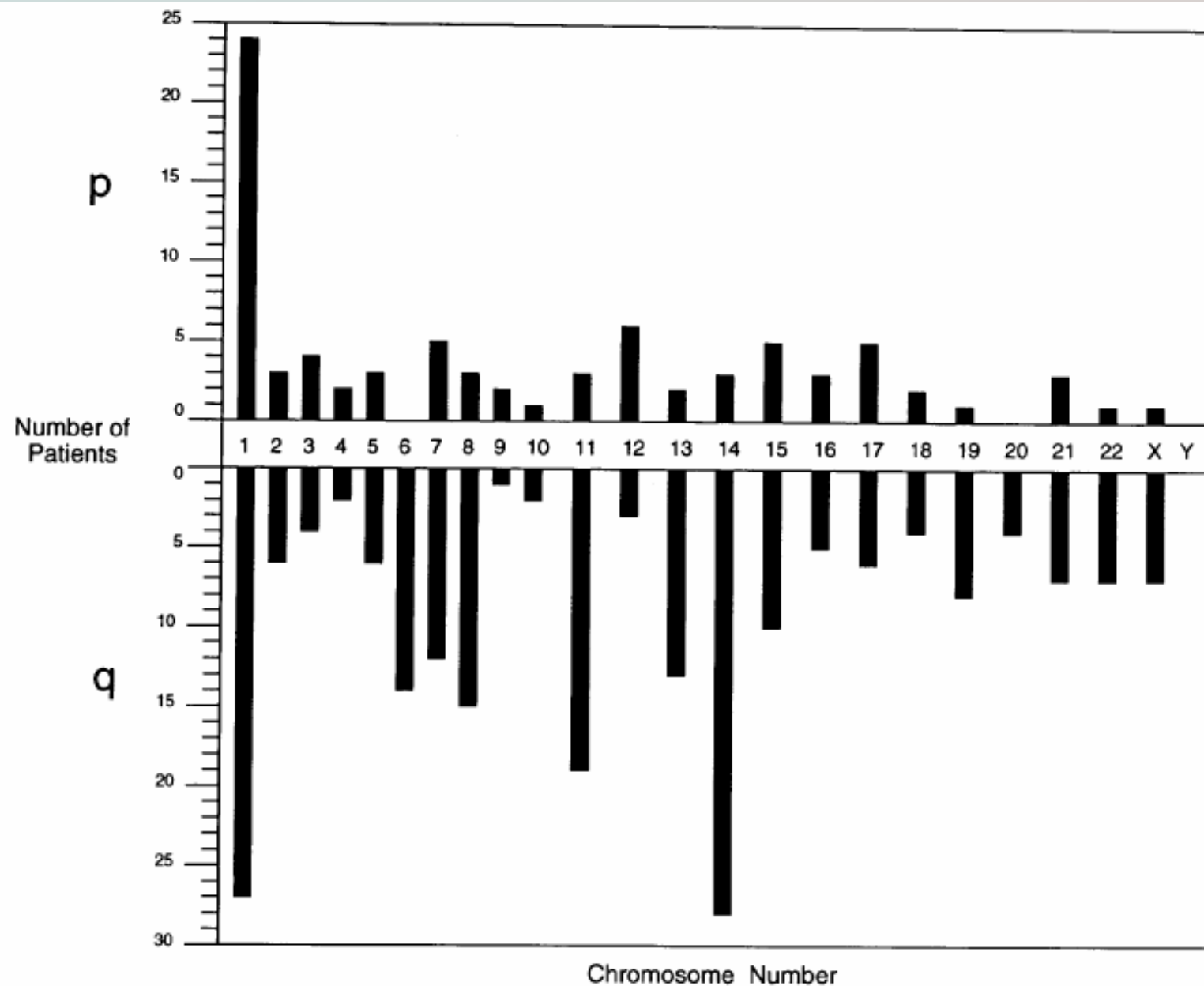
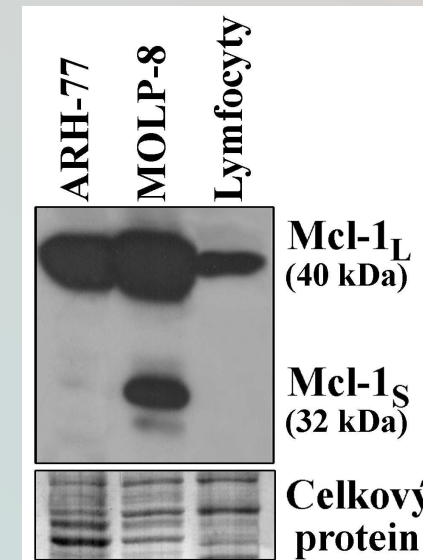
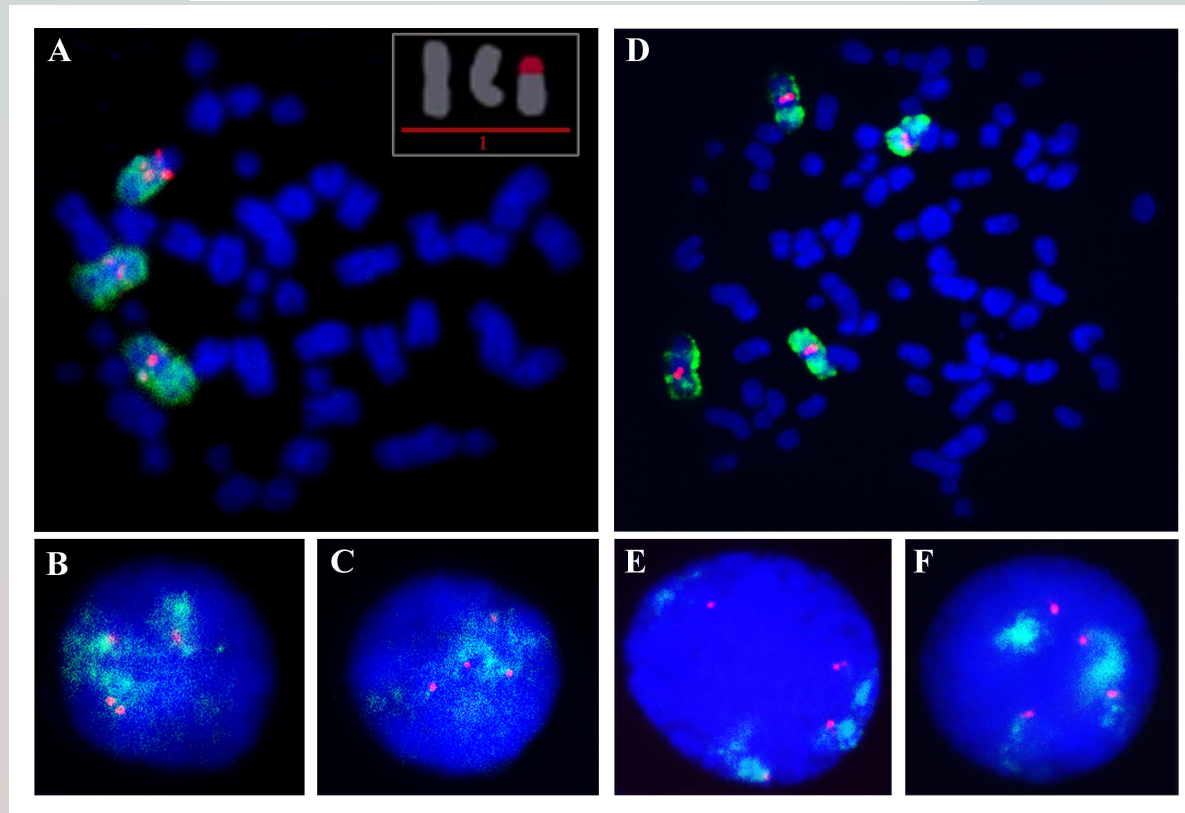
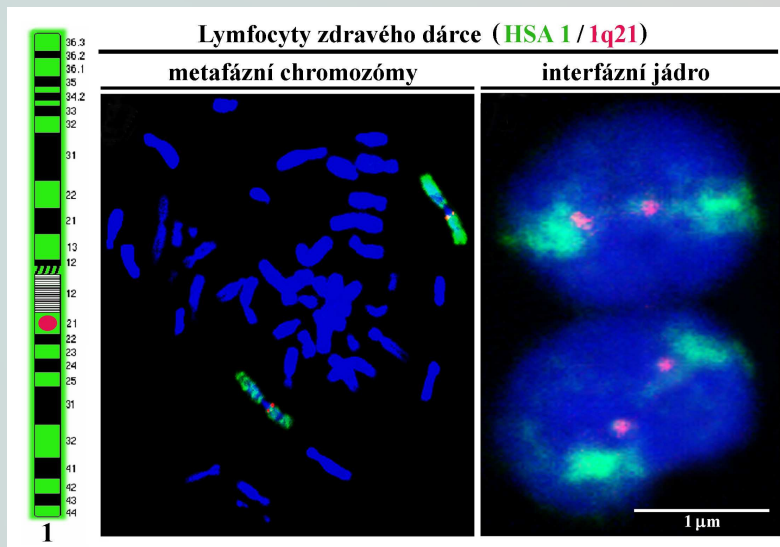


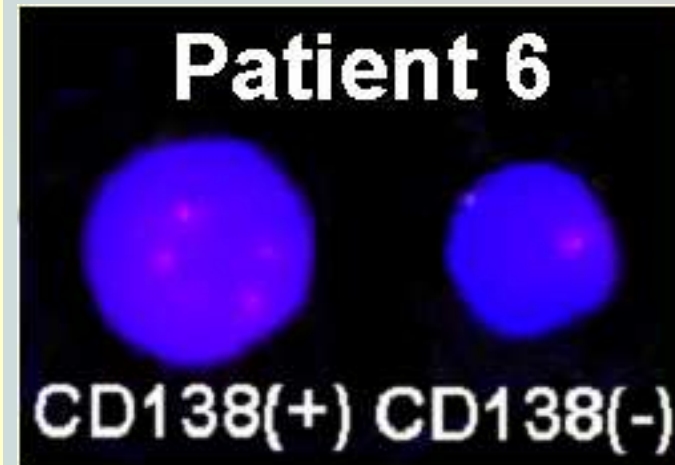
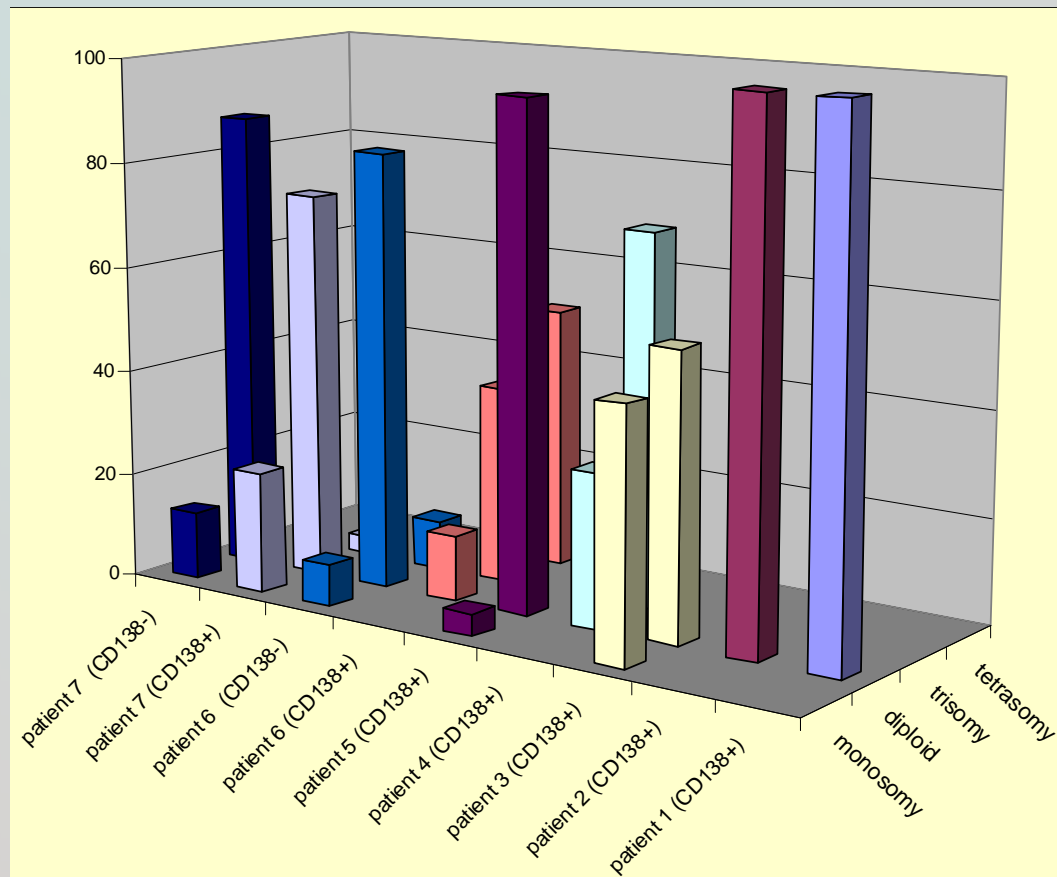
Figure 2 Frequency of structural anomalies from a group of 63 abnormal karyotypes. The structural aberrations occurring in the short arm (p) are represented on top while the long arm (q) aberrations are represented below.



Separace CD 138+ buněk z bone marrow

Používaná cytostatika

- Kortikoid DEXAMETHAZON - v koktejlech cytostatik se až z 80 % podílí na inhibici růstu nádorových buněk
- Alkylační cytostatikum MELFALAN - cross-linking DNA na guaninu v pozici N₇
- Antimyelomový efekt THALIDOMIDU - v 60. letech používán jako sedativum, dnes identifikován jeho antimyelomový, antiangiogenní a imunomodulační efekt
- Inhibitor proteozomů VELCADE - proteozomy štěpí proteiny, kt. dokončily svoji fci -> mohou pokračovat další děje v buňce. Inhibitory přerušují tento proces -> apoptóza myelomové buňky. Navíc brání vazbě MM buňky na okolní stromální buňky. (NF- κ B, IL-6, signální dráhy pro růst b., apoptózu, inhibice exprese adhezivních molekul, aj.)
- „ γ -záření“



Numerical aberrations of *CCND1* gene in CD138 positive/negative cells of MM patients.

Role epigenetických modifikací hematopoetických malignit, resp. u MM

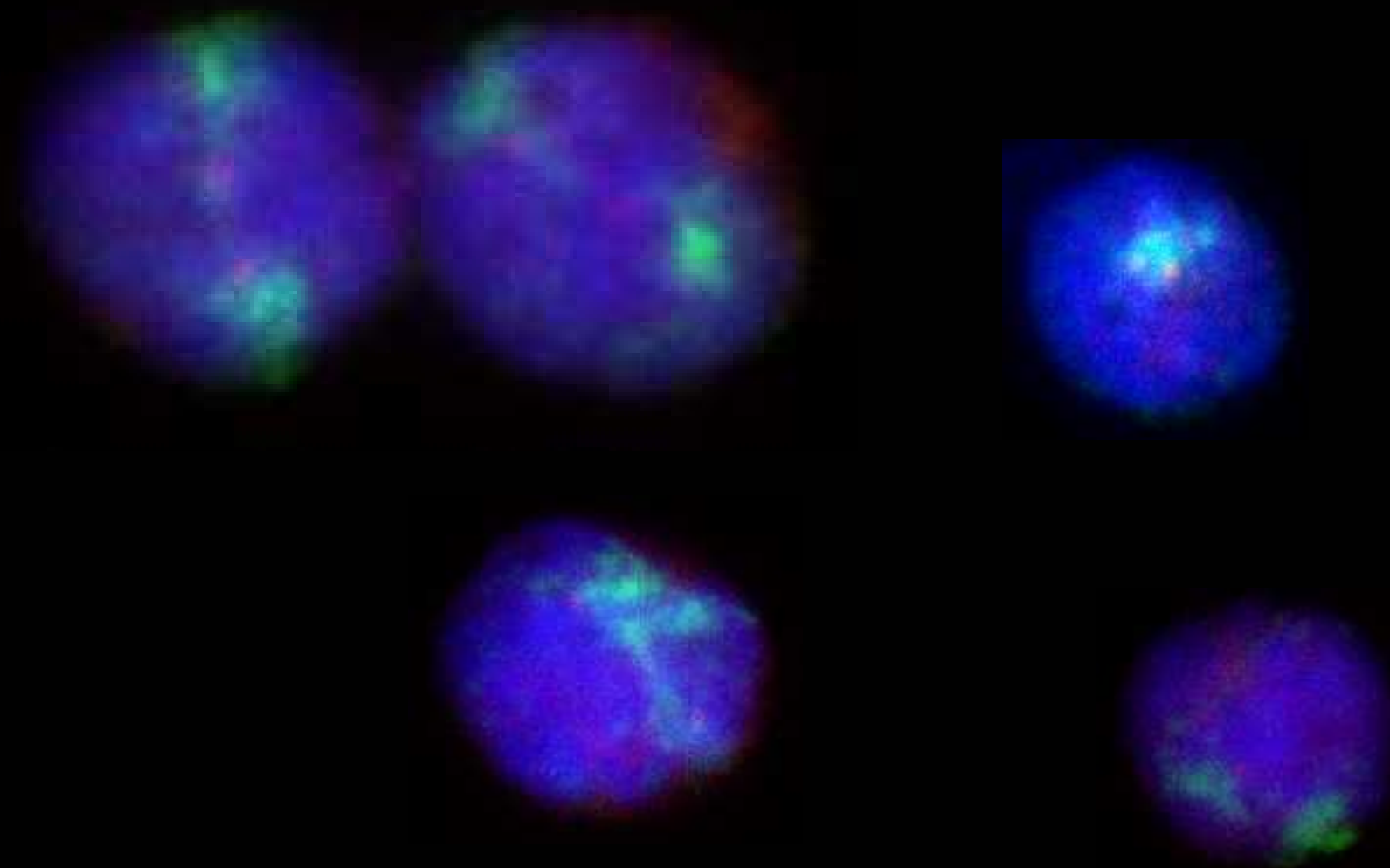
Table 1 Pathways disrupted by aberrant CpG island methylation associated with gene silencing in human cancer.

Pathway	Genes
Cell cycle control	Rb, p14, p15, p16, p73
Cell invasion and adhesion	E-cadherin, APC, TIMP-3, VHL
Regulation of apoptosis	DAP kinase 1, caspase 8, TMS-1
DNA damage repair	O ⁶ MGMT, hMLH1, BRCA1, GST π
Growth-factor response	RAR β 2, CRBP1, SOCS-1, SOCS-3, ER

Table 2 Genes frequently methylated in hematopoietic malignancies.

Tumor subtype	Genes
Non Hodgkin's lymphoma	DAP kinase 1, p57, p16, O ⁶ MGMT, GST π , RAR β 2, CRBP1
Multiple myeloma	p16, SOCS-1, E-cadherin, p73, DAP kinase 1
Chronic myelogenous leukemia	p15, abl
Acute lymphocytic leukemia	E-cadherin, p16, p15, p73, DAP kinase 1, O ⁶ MGMT
Acute myelogenous leukemia	p15, E-cadherin, SOCS-1, p73, DAP kinase 1, HIC1, RAR β 2, CRBP1

Galm et al., 2006



Děkuji za pozornost