

## Analýza parametrů signálních drah myelomové kostní nemoci u mnohočetného myelomu

Krhovská P.<sup>1</sup>, Heřmanová Z.<sup>2</sup>, Petrová P.<sup>3</sup>, Zapletalová J.<sup>4</sup>, Pika T.<sup>1</sup>, Bačovský J.<sup>1</sup>, Ščudla V.<sup>1</sup>, Minařík J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

<sup>2</sup> Ústav imunologie, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

<sup>3</sup> Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

<sup>4</sup> Ústav lékařské biofyziky, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

### SOUHRN

*Cíl studie:* Cílem naší studie bylo srovnat sérové hladiny vybraných markerů kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně s aktivitou mnohočetného myelomu (MM).

*Typ studie:* prospektivní analýza

*Materiál a metody:* Naš soubor 94 jedinců sestával z: 58 pacientů s aktivním mnohočetným myelomem (AMM), 12 s doutnajícími myelomem (SMM) a 24 jedinců s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS). Byly hodnoceny tyto parametry mikroprostředí kostní dřeně a kostního metabolismu: Hepatocytární růstový faktor (HGF), Syndekan-1 (SYN-1), Osteoprotegerin (OPG), Makrofágový zánětlivý protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), Aktivin A, Annexin A2, Sklerostin, Matrixová metaloproteináza 9 (MMP 9), Dickkopf protein 1 (DKK 1). Jejich hladiny byly korelovány s aktivitou onemocnění. Pro účely statistiky jsme použili Mann-Whitney U test s Bonferroniho korekcí při hladině významnosti  $p < 0,05$ .

*Výsledky:* Při srovnání MM a MGUS bylo zjištěno, že u pacientů s AMM jsou signifikantně vyšší sérové hladiny HGF (medián = M 2997 vs 1748 ng/l,  $p = 0,0002$ ), MIP-1 $\alpha$  (M 25,5 vs 22,4 ng/l,  $p = 0,018$ ), SYN-1 (M 67,1 vs 21,1  $\mu$ g/l,  $p < 0,0001$ ) a DKK-1 (M 3303 vs 2733 ng/l,  $p = 0,029$ ). Při srovnání AMM a SMM byla u AMM signifikantně vyšší hodnota sérové hladiny DKK-1 (M 3303 vs 2196 ng/l,  $p = 0,042$ ) a annexinu A2 (M 37,5 vs 26,5  $\mu$ g/l,  $p = 0,015$ ).

Při porovnání MGUS a SMM bylo shledáno, že u SMM jsou vyšší hladiny SYN-1 (M 67,1 vs 33,1  $\mu$ g/l,  $p = 0,023$ ).

*Závěr:* Byl prokázán vztah vybraných ukazatelů kostního metabolismu k aktivitě mnohočetného myelomu. Jako nejvíce perspektivní se jeví sérové hladiny těchto ukazatelů: HGF, MIP-1 $\alpha$ , SYN-1, DKK-1 a annexinu A2.

Jejich hodnocení naznačuje potenciální přínos k odlišení počátku transformace onemocnění z MGUS do aktivního mnohočetného myelomu či z doutnajícího myelomu do aktivního onemocnění.

*Klíčová slova:* mnohočetný myelom – myelomová kostní nemoc - ukazatele mikroprostředí kostní dřeně.

### SUMMARY

**Krhovská P., Heřmanová Z., Petrová P., Zapletalová J., Pika T., Bačovský J., Ščudla V., Minařík J.: Analysis of parameters of signal pathway of myeloma bone disease in multiple myeloma**

*Objective:* Our aim was to compare serum levels of selected markers of bone metabolism and bone marrow microenvironment to the activity of multiple myeloma (MM).

*Material and methods:* Our 94 patients' cohort consisted of 58 patients with active multiple myeloma (AMM), 12 with smoldering myeloma (SMM) and 24 individuals with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS).

Following parameters of bone marrow microenvironment and bone metabolism were assessed: Hepatocyte growth factor (HGF), Syndecan-1 (SYN-1), Osteoprotegerin (OPG), Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), Activin A, Annexin A2, Sclerostin, Matrix metalloproteinase 9 (MMP9), Dickkopf-related protein 1 (DKK-1), and compared within AMM, SMM and MGUS.

For statistics we used Mann-Whitney U test with Bonferroni correction at  $p < 0.05$ .

*Results:* In comparison of MM and MGUS we found in MM significantly higher serum levels of HGF (median = M 2997 vs 1748 ng/L,  $p=0.0002$ ), MIP-1 $\alpha$  (M 25.5 vs 22.4 ng/L,  $p=0.018$ ), SYN-1 (M 67.1 vs 21.1  $\mu$ g/L,  $p<0,0001$ ) and DKK-1 (M 3303 vs 2733 ng/L,  $p=0.029$ ). In comparison of AMM and SMM we found in AMM higher serum levels of DKK-1 (M 3303 vs 2196 ng/L,  $p=0.042$ ) and Annexin A2 (M 37.5 vs 26.5  $\mu$ g/L,  $p=0.015$ ). In comparison of MGUS and SMM we found in SMM higher levels of SYN-1 (M 67.1 vs 33.1  $\mu$ g/L,  $p=0.023$ ).

*Conclusion:* Analysis of serum levels of parameters of bone marrow microenvironment and bone metabolism showed their relationship to activity of monoclonal gammopathies, especially in the case of HGF, MIP-1 $\alpha$ , SYN-1, DKK-1 and Annexin A2.

*Keywords:* multiple myeloma; myeloma bone disease; parameters of bone marrow microenvironment.

## Úvod

Mnohočetný myelom (MM) je zhoubné onemocnění, způsobené nekontrolovanou proliferací a akumulací patologicky změněných plazmatických buněk s produkcí monoklonálního imunoglobulinu (MIG) detekova-

telného v séru a/nebo v moči, doprovázené přítomností MDE (myeloma defining events) – tedy buď přítomné orgánové dysfunkce CRAB (C-hyperkalcemie, R-renální postižení, A-anémie, B-postižení skeletu resp. „bone disease“) nebo zjištěním tzv. „biomarkerů malignity“ (zastoupení klonálních plazmatických buněk v kostní

dřeni  $\geq 60$  %, poměr dominantního a nedominantního lehkého řetězce  $>100$ ,  $>1$  fokální léze větší než 5 mm na magnetické rezonanci) [1].

Jedním z nejdůležitějších projevů onemocnění je myelomová kostní nemoc, která je největší příčinou morbidity i mortality nemocných [2]. Její rozsah je velmi variabilní, kolísá od osteoporózy až po výrazné difúzní postižení skeletu lytickými ložisky, nezřídka i s přítomností patologických fraktur. Základní příčinou vzniku je nerovnováha mezi osteoresorpcí a kostní novotvorbou zprostředkovaná množstvím chemokinů a cytokinů [3].

Historickým zlatým standardem mezi vyšetřovacími metodami postižení skeletu bylo rentgenové zobrazení (RTG). Novější techniky zahrnují celotělová vyšetření pomocí magnetické rezonance (WB-MR), nízkodávkové výpočetní tomografie (low-dose computed tomography, LD-CT) či pozitronové emisní tomografie s výpočetní tomografií (positron emission tomography/computed tomography, PET/CT) [4,5].

Ke zhodnocení rozsahu kostního postižení přispívá také hodnocení parametrů kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřene. Rozeznáváme tři základní signální dráhy, podílející se na vzniku MKN: První je dráha RANK/RANKL, která hodnotí poměr mezi aktivátorem receptoru nukleárního faktoru kappa B (receptor activator of nuclear factor kappa B, RANK) a jeho ligandem (ligand aktivátoru nukleárního faktoru kappa B, RANKL). Dále se jedná o dráhu makrofágového zánětlivého proteinu (macrophage inflammatory protein, MIP), která souvisí především s buněčnou adhezí a migrací a také indukuje efekt RANK tím, že posiluje jeho navázání na ligand, což vede k aktivaci osteoklastů. Poslední je tzv. „Wingless“ (Wnt) dráha, která je hlavní signální dráhou osteoblastů. Za fyziologických podmínek se Wnt glykoproteiny vážou na Wnt receptor, čímž stimulují osteoblastickou přestavbu. Tato dráha je inhibována proteiny ze skupiny Dickkopf (DKK) [6-8].

Naším cílem bylo analyzovat vybrané biologické působky mikroprostředí kostní dřene a srovnat je s aktivitou onemocnění. Naší snahou bylo diferencovat ukazatele, které by již v době diagnózy vyčlenily pacienty s rizikovým onemocněním.

## Pacienti a metody

Analýzovaným souborem bylo 94 jedinců s monoklonální gamapatií. Celkem bylo v souboru 58 pacientů s aktivním mnohočetným myelomem (AMM), 12 s doutnajícím myelomem (SMM) a 24 jedinců s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS). Věkový medián nemocných byl 69 let (38-90 let), poměr M/Ž = 1,04:1. Z hlediska pokročilosti MM bylo dle klasifikace Durie-Salmon stádium I zastoupeno v 17 % ( $n = 16$ ) pacientů, stádium II v 20 % ( $n = 19$ ) a stádium III v 37 % ( $n = 35$ ), pod-stádium B bylo zastoupeno v 5 % ( $n = 5$ ) [9]. Prognostická stratifikace MM dle mezinárodního prognostického indexu (ISS) měla následující zastoupení: stádium 1 v 17 % ( $n = 16$ ), stádium 2 v 33 % ( $n = 31$ ) a stádium 3 v 50 % ( $n = 47$ ).

Ze sérových ukazatelů myelomové kostní nemoci byly posuzovány: Hepatocytární růstový faktor (HGF), Zánětlivý makrofágový faktor 1  $\alpha$  (MIP-1  $\alpha$ ), Dickkopf protein 1 (DKK 1), Aktivin A, Annexin A2, Syndekan-1/CD138 (SYN), Matrixová metaloproteináza 9 (MMP 9) a Sklerostin metodou kvantitativní sendvičové enzymatické imunoeseje (kity Quantikine RD, Minneapolis), Osteoprotegerin (OPG) metodou enzymoimunoeseje (kitem ELISA Bio Vendor GmbH). Veškerá měření byla prováděna podle doporučení výrobce.

K analýze dat byl použit statistický software IBM SPSS Statistics 22 (USA).

Ke statistickému hodnocení byl použit Mann-Whitney U test s Bonferroniho korekcí. Testy byly korelovány na hladině významnosti  $p < 0,05$ .

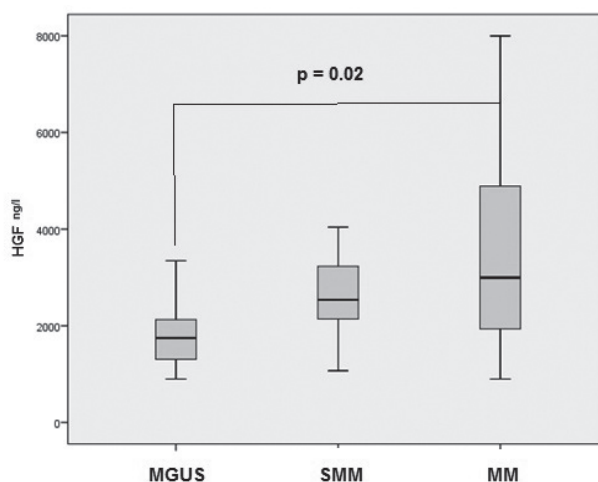
## Výsledky

Při srovnání sérových hladin u AMM a MGUS bylo zjištěno, že u pacientů s AMM jsou vyšší sérové hladiny HGF (medián = M 2997 vs 1748 ng/l,  $p = 0,0002$ ), MIP-1  $\alpha$  (M 25,5 vs 22,4 ng/l,  $p = 0,018$ ), SYN-1 (M 67,1 vs 21,1  $\mu\text{g/l}$ ,  $p < 0,0001$ ) a DKK-1 (M 3303 vs 2733 ng/l,  $p = 0,029$ ), (obr. 1-4).

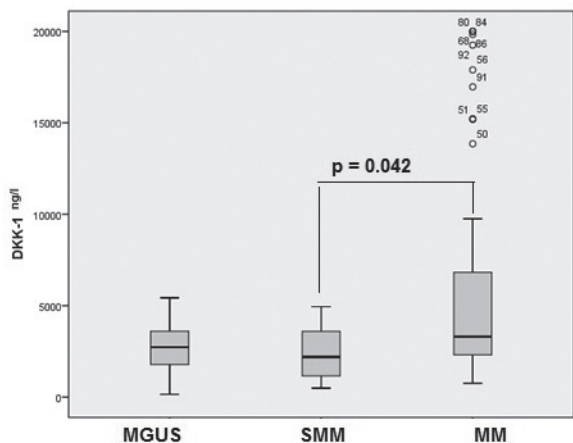
Při srovnání AMM a SMM byla u AMM nalezena signifikantně zvýšená hladina DKK-1 (M 3303 vs 2196 ng/l,  $p = 0,042$ ) a Annexinu A2 (M 37,5 vs 26,5  $\mu\text{g/l}$ ,  $p = 0,015$ ), (obr. 2).

Při srovnání MGUS a SMM bylo zjištěno, že u SMM jsou vyšší hladiny SYN-1 (M 67,1 vs 33,1  $\mu\text{g/l}$ ,  $p = 0,023$ ), (obr. 4).

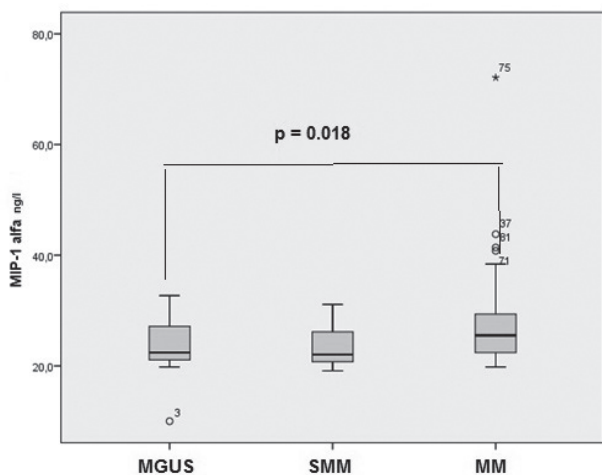
U ostatních pozorovaných parametrů nebyla prokázána signifikantní korelace ve vztahu k aktivitě onemocnění.



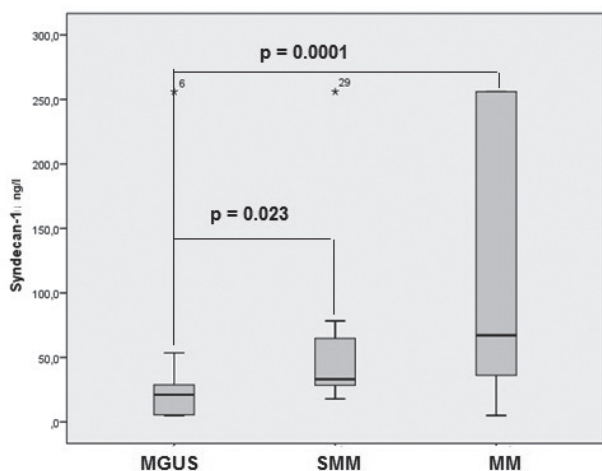
**Figure 1.** Results of comparison of serum levels of hepatocyte growth factor (HGF) in patient with multiple myeloma (MM) against individuals with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering myeloma



**Figure 2.** Results of comparison of serum levels of Dickkopf-related protein 1 (DKK-1) in patient with multiple myeloma (AMM) against patient with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering myeloma (SMM)



**Figure 3.** Results of comparison of serum levels of macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP 1 $\alpha$ ) in patients with multiple myeloma (AMM) against patient with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering myeloma (SMM)



**Figure 4.** Results of comparison of serum Syndecan 1 in patient with multiple myeloma (AMM) against patient with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering myeloma (SMM).

## Diskuse

Myelomová kostní nemoc (MKN) patří mezi hlavní příčiny morbidity ale i mortality u pacientů s mnohočetným myelomem [2]. Časná diagnostika a stanovení rozsahu postižení jsou důležité i z hlediska indikace k zahájení léčby MM. Zatímco monoklonální gamapatie nejasného významu je stav nevyžadující léčbu, mnohočetný myelom je maligní onemocnění, vyžadující již od stanovení diagnózy vhodný léčebný přístup. Odlišení časného stádia mnohočetného myelomu od monoklonální gamapatie nejasného významu či fáze doutnajícího myelomu je v klinické praxi někdy obtížné, nalezení dalších spolehlivých pomocných ukazatelů, které by pomohly diferencovat tyto jednotky, se jeví perspektivní k usnadnění rozhodování o zahájení terapie.

Pochopení buněčných interakcí, odehrávajících se uvnitř postižené kosti, je také rozhodující pro vývoj nových léků, s cíleným ovlivněním myelomových buněk či mikroprostředí KD. S postupným poznáváním patogenese myelomu tak nabývá na významu hodnocení ukazatelů mikroprostředí kostní dřeně a kostního metabolismu.

V naší práci jsme analyzovali devět biomarkerů, které se významně uplatňují v patogenezi myelomové kostní nemoci. U šesti z nich byl pozorován signifikantní rozdíl sérových hladin ve vztahu k aktivitě, resp. při srovnání MGUS, SMM a AMM.

Ze stanovovaných markerů byly v našem souboru u AMM nejvýznamněji zvýšeny parametry, které souvisejí se signální dráhou MIP, především MIP-1 $\alpha$ . Tento chemokin má významný osteoklastogenní efekt, který je nezávislý na dráze RANK/RANKL, nicméně posiluje účinek této dráhy na aktivaci osteoklastů [10]. Kromě hladin MIP-1 $\alpha$  byly pozorovány vyšší hladiny i dalších proangiogenních působků (VEGF, angiogenin), což podporuje hypotézu o neovaskularizaci u nemocných s MM [11]. Naše výsledky jsou v souladu i s dalšími studii, které prokázaly signifikantně vyšší hladiny MIP-1 $\alpha$  u pacientů s MM oproti pacientům s MGUS [10,11]. MM se od MGUS mimo jiné odlišuje vyšším zastoupením patologických plazmocytů přítomných v kostní dřeni. MIP-1 $\alpha$  je tvořen především právě těmito patologickými plazmocyty, což je zřejmě důvodem vyšších hladin MIP-1 $\alpha$  u AMM.

Hepatocytární růstový faktor (HGF) je cytokin, jehož hlavní úlohou je stimulace růstu epiteliálních buněk. Je také významným induktorem neovaskularizace, a kromě toho také potencuje osteoklastogenezi [12,13]. Je dokladováno, že vyšší hladina HGF v době diagnózy může být negativním prediktivním faktorem přežití a odpovědí na léčbu [14,15], byť i v některých z našich předešlých hodnocení nebyl jednoznačně vztah k léčebnému efektu potvrzen [16]. Předložené výsledky navíc prokázaly signifikantně vyšší hladinu HGF u pacientů s MM oproti pacientům s MGUS, což může být dokladem vyšší hustoty kapilární sítě v kostní dřeni u AMM.

V našem souboru, byla nalezena pozitivní korelace mezi aktivitou MM a hladinou DKK-1. Wnt dráha je inhibována proteiny ze skupiny DKK (Dickkopf). Proteiny



skupiny DKK jsou nadměrně produkovány u pacientů s mnohočetným myelomem v důsledku parakrinní stimulace a potencují tedy rozvoj osteolytického kostního postižení [17,18]. DKK-1 reguluje remodelaci kosti v důsledku suprese osteoblasty, hraje také významnou roli v proliferaci a diferenciaci těchto buněk [19]. Byla prokázána produkce DKK-1 patologickými plazmocytami, zatímco fyziologické plazmocytomy tento protein nevytvářejí [20]. Několik zahraničních studií prokázalo souvislost mezi hladinou DKK-1 a rozsahem kostního postižení [19-22]. Za poměrně významnou považujeme skutečnost, že signifikantně vyšší hladiny DKK-1 byly zjištěny u nemocných s AMM oproti pacientům ve fázi doutnajícího myelomu. Tyto výsledky se zdají být slibnými prediktory rozvoje kostního postižení u MM.

Dalším z ukazatelů, který prokázal signifikantní vztah k aktivitě onemocnění, byl Syndekan-1. Byl nalezen rozdíl mezi jeho hladinami u pacientů s aktivním mnohočetným myelomem a MGUS a také u pacientů s myelomem doutnajícím oproti jedincům s monoklonální gamapatií nejasného významu, což je ve shodě s předchozími studiemi [23,24]. Syndekan-1 (CD 138) je člen rodiny transmembránových glykoproteinů buněčného povrchu heparansulfátu (HS). Během vývoje B-buněk se exprese se zrání B lymfocytů ztrácí, ale u zralých plazmocytů je opět re-exprimován. Zprostředkovává specifickou adhezi myelomových buněk, ovlivňuje i diferenciaci kostních buněk, kdy potencuje vývoj osteoblastů a inhibuje tvorbu osteoklastů [25]. Syndekan-1 je exprimován pouze na myelomových buňkách v kostní dřeni a na povrchu maligních plazmatických buněk v periferní krvi u pacientů s mnohočetným myelomem. Proto také je tento působek využíván v průtokové cytometrii k identifikaci patologických plazmocytů [26-28].

Posledním posuzovaným ukazatelem, který prokázal souvislosti s aktivitou onemocnění je Annexin A2. Annexin A2 je členem rodiny 20 proteinů, které se váží na povrch aniontových fosfolipidů v přítomnosti vápníku. Každý annexin má unikátní N-terminální sekvenci aminokyselin C konce [29]. Annexin A2 funguje jednak jako intracelulární protein, kdy je zapojen v procesu endocytózy i exocytózy [30,31] i jako extracelulární protein, kdy funguje jako potenciální receptor pro aktivátor tkáňového plazminogenu a podílí se na buněčné adhezi. Bylo také zjištěno, že annexin A2 stimuluje růst a proliferaci myelomových buněk a naopak inhibuje apoptózu [32]. Ovšem v kostní dřeni se vyskytuje i za fyziologických podmínek, kdy hraje určitou úlohu ve fyziologickém kostním obratu a také zřejmě má vliv na délku přežití fyziologických plazmocytů [33]. I v naší práci byl prokázán vztah mezi aktivitou MM a hladinou Annexinu A2, kdy u AMM byla signifikantně vyšší hladina než u SMM. To je zřejmě dáno faktem, že výše hladiny Annexinu A2 souvisí s mírou infiltrace KD.

Z předložené práce vyplynulo, že ukazatele mikroprostředí kostní dřeni mají jistý potenciál k lepšímu pochopení biologických pochodů u myelomové kostní nemoci. Byl prokázán vztah vybraných ukazatelů mikroprostředí KD k aktivitě mnohočetného myelomu – s aktivitou onemocnění narůstají sérové hladiny těchto ukazatelů. Tento vztah naznačuje potenciální přínos

k odlišení počátku progresu onemocnění z MGUS do aktivního mnohočetného myelomu či z doutnajícího myelomu do myelomu aktivního. Výsledky mají také slibný potenciál k odlišení nemocných s časnou formou kostní nemoci, a tedy i k indikaci antiresorpční terapie. K posouzení reálného přínosu je ale třeba další analýzy.

## Literatura

1. **Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A. et al.** International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*, 2014, 15: p. 538-548.
2. **Sezer, O.** Myeloma bone disease: recent advances in biology, diagnosis, and treatment. *Oncologist*, 2009; 14:276-283.
3. **Ščudla, V., Budíková, M., Petrová, P. et al.** Analýza sérových hladin vybraných biologických ukazatelů u monoklonální gamapatií nejasného významu a mnohočetného myelomu. *Klin Onkol*, 2010, 23: p. 171-181.
4. **Dimopoulos, M., Terpos, E., Comenzo, R. L. et al.** International Myeloma Working Group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple myeloma. *Leukemia*, 2009, 23: p. 1545-1556.
5. **Minařík, J., Hrbek, J., Krhovská, P. et al.** Racionální algoritmus zobrazovacích vyšetření u mnohočetného myelomu v podmínkách České republiky, *Transfuze Hematol. dnes*, 2015, 4: p. 200-205.
6. **Roodman, G. D.** Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia*, 2009, 23: p. 435-441.
7. **Mundy, G. R., Raisz, L. G., Cooper, R. A. et al.** Evidence for the secretion of an osteoclast stimulating factor in myeloma. *New Engl J Med*, 1974, 291: p. 1041-1046.
8. **Ščudla, V., Petrová, P., Pika, T. et al.** Analysis of serum levels of Dickkopf-1 (DKK-1) in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Čas. lék. čes.*, 2015, 154: p. 181-188.
9. **Durie, B. G., Salmon, S. E.** A clinical staging system for multiple myeloma, Correlation of Measured Myeloma Cell Mass with Presenting. *Cancer*, 1975, 36: p. 842-854.
10. **Terpos, E., Politou, M., Viniou, N. et al.** Significance of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1α) in multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*, 2005, 46: p. 1699-1707.
11. **Terpos, E., Tasidou, A., Roussou, M. et al.** Increased expression of macrophage inflammatory protein-1 alpha on trephine biopsies correlates with advanced myeloma, extensive bone disease and elevated microvessel density in newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Haematologica*, 2009, 94: p. 146-146.
12. **Bussolino, F., Di Renzo, M. F., Ziche, M. et al.** Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol*, 1992, 119: p. 629-41.
13. **Sato, T., Hakeda, Y., Yamaguchi, Y. et al.** Hepatocyte growth factor is involved in formation of osteoclast-like cells mediated by clonal stromal cells (MC3T3-G2/PA6). *J Cell Physiol.*, 1995, 164: p. 197-204.
14. **Seidel, C., Borset, M., Turesson, I. et al.** Elevated serum concentrations of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma. *Blood*, 1998, 91: p. 806-812.

15. **Pour, L., Švachová, H., Adam, Z. et al.** Levels of angiogenic factors in patients with multiple myeloma correlate with treatment response. *Ann of hemat*, 2010, 89: p. 385-389.
16. **Minařík, J., Pika, T., Bačovský, J. et al.** Prognostic value of hepatocyte growth factor, syndecan-1, and osteopontin in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Scientific W. J.*, 2012, Article ID 356128, 6 pages
17. **Giuliani, N., Morandi, F., Tagliaferri, S. et al.** Production of Wnt inhibitors by myeloma cells: potential effects on canonical Wnt pathway in the bone microenvironment. *Cancer Res*, 2007, 67: p. 7665-7674.
18. **Oshima, T., Abe, M., Asano, J. et al.** Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. *Blood*, 2005, 106: p. 3160-3165.
19. **Heider, U., Kaiser, M., Mieth, M. et al.** Serum concentrations of DKK-1 decrease in patients with multiple myeloma responding to anti-myeloma treatment. *Eur J. Haematol*, 2009, 82: p. 31-38.
20. **Haaber, J., Abildgaard, N., Knudsen, L. M. et al.** Myeloma cell expression of 10 candidate genes for osteolytic bone disease. Only overexpression of DKK-1 correlates with clinical bone involvement at diagnosis. *Brit. J. Haematol*, 2007, 140: p. 25-35.
21. **Tian, E., Zhan, F., Walker, R. et al.** The role of the Wnt-signaling antagonist DKK-1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *New Engl. J. Med.*, 2003, 349: p. 2483-2494.
22. **Qiang, Y. W., Barlogie, B., Rudikoff, S. et al.** DKK-1 induced inhibition of Wnt signaling in osteoblast differentiation is an underlying mechanism of bone loss in multiple myeloma. *Bone*, 2008, 42: p. 669-680.
23. **Dhodapkar, M. V., Kelly, T., Theus, A. et al.** Elevated levels of shed syndecan-1 correlated with tumour mass and decreased matrix metalloproteinase-9 activity in the serum of patients with multiple myeloma. *Brit J Haematol*, 1997, 99: p. 368-37.
24. **Kyrtsonis, M. C., Vassilakopoulos, T. P., Siakan-taris, M. P. et al.** Serum syndecan-1, basic fibroblast growth factor and osteoprotegerin in multiple myeloma patients at diagnosis and during the course of the disease. *Eur J Haematol*, 2004, 72: p. 252-258.
25. **Dhodapkar, M. V., Abe, E., Theus, A. et al.** Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood*, 1998, 91: p. 2679-2688.
26. **Seidel, C., Sundan, A., Hjorth, M. et al.** Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood*, 2000, 95: p. 388-392.
27. **Wijdenes, J., Vooijs, W. C., Clement, C. et al.** A plasma-selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Brit. J. Haematol.*, 1996, 94: p. 318-323.
28. **Witzig, T. E., Kimlinger, T., Stenson, M. et al.** Syndecan-1 expression on malignant cells from the blood and marrow of patients with plasma cell proliferative disorders and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 1998, 51: p. 167-175.
29. **Fey, M. F., Moffat, G. J., Vik, D. P. et al.** Complete structure of the murine p36 (annexin II) gene. Identification of mRNAs for both the murine and the human gene with alternatively spliced 5' noncoding exons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1996, 1306: p. 160-170.
30. **Waisman, D. M.** Annexin II tetramer: structure and function. *Signal Transd Mech*, 1995, p. 301-322.
31. **Davis, R. G., Vishwanatha, J. K.** Detection of secreted and intracellular annexin II by a radioimmunoassay. *J of Immun. Meth*, 1995, 188: p. 91-95.
32. **Kwon, M., MacLeod, T. J., Zhang, Y. et al.** S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors. *Front. Biosci.*, 2005, 10: p. 300-325.
33. **Seckinger, A. et al.** Clinical and prognostic role of annexin A2 in multiple myeloma. *Blood*, 2012, 120.5: p. 1087-1094.

Za podpory grantu IGA\_LF\_2016\_001, IGA NT14 393

Do redakce došlo: 15. 7. 2016

Adresa pro korespondenci  
MUDr. Petra Krhová  
Hemato-onkologická klinika  
Fakultní nemocnice Olomouc  
I. P. Pavlova 6  
779 00 Olomouc  
e-mail: petra.krhovska@fnol.cz