

## Vztah hladin molekul BAFF a APRIL k vybraným ukazatelům mnohočetného myelomu

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

<sup>1</sup>Hematoonkologická klinika, LF UP a FN Olomouc

<sup>2</sup>Ústav imunologie, LF UP a FN Olomouc

<sup>3</sup>Oddělení klinické biochemie, FN Olomouc

<sup>4</sup>Ústav lékařské biofyziky, LF UP Olomouc

### SOUHRN

**Úvod:** Mikroprostředí kostní dřeně ve vztahu k infiltraci myelomovými buňkami je charakterizováno rozsáhlou cytokinovou sítí a vzájemnými mezibuněčnými interakcemi. Řada biologických parametrů zastává úlohu aktivačních a proliferačních faktorů. Cílem naší studie bylo porovnání vztahu hladin molekul APRIL a BAFF k vybraným biologickým ukazatelům mnohočetného myelomu.

**Soubor a metody:** Vyšetřený soubor tvořilo 195 pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem. Pro stanovení sérových hladin molekul BAFF (ng/l) a APRIL (μg/l) bylo užito kvantitativní sendvičové ELISA metody (R&D Systems). Získané hodnoty byly korelovány se sérovými hladinami β<sub>2</sub>-mikroglobulinu (β<sub>2</sub>m), thymidinkinázy (TK), laktátdehydrogenázy (LDH), kreatininu (kr), albuminu, hodnotami hemoglobinu a trombocytů. Pro posouzení vztahu k pokročilosti onemocnění byly hladiny molekul BAFF a APRIL porovnávány mezi jednotlivými stádii dle stážovacích systémů dle Durieho – Salmona a International Staging System. S ohledem na technické limity testovacích souprav pro molekulu APRIL bylo pro statistickou analýzu zvoleno intervalové rozpětí hladin <3 a ≥3 μg/l.

**Výsledky:** Statistická analýza v případě molekuly BAFF zjistila pozitivní korelace s hladinami LDH (r = 0,223; p = 0,002), albuminu (r = 0,208; p = 0,004), β<sub>2</sub>m (r = 0,175; p = 0,020) a TK (r = 0,189; p = 0,015). V případě analýzy hladin molekuly APRIL byla zjištěna pozitivní korelace vyšších hodnot (≥ 3 μg/l) s hladinami kreatininu (p = 0,027), LDH (p = 0,028) a β<sub>2</sub>m (p = 0,040).

**Závěr:** Molekuly BAFF a APRIL jsou důležitou součástí cytokinové sítě mnohočetného myelomu mající intimní vztah k patogenезi mnohočetného myelomu a jeví se jako potenciální ukazatele maligní evoluce a progresu onemocnění. Naše analýza potvrdila vztah hladin obou parametrů k vybraným ukazatelům pokročilosti MM.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, BAFF, APRIL, biologické ukazatele.

### SUMMARY

**Pika T., Heřmanová Z., Lochman P., Minařík J., Krhovská P., Zapletalová J., Ščudla V.: The relationship of serum BAFF and APRIL levels to selected biomarkers of multiple myeloma**

**Introduction:** Bone marrow microenvironment in relation to the infiltration of myeloma cells is characterized by a wide cytokine network and intercellular interactions. A number of biological parameters are playing important role of activation and proliferation factors. The aim of our study was to compare the relationship of serum levels of APRIL and BAFF molecules to selected biological indicators of multiple myeloma.

**Material and methods:** The examined group consisted of 195 patients with newly diagnosed multiple myeloma. To determine the serum levels of BAFF molecules (ng/L) and APRIL (μg/L) quantitative sandwich ELISA (R & D Systems) was used. The obtained values were correlated with serum β<sub>2</sub>-microglobulin (β<sub>2</sub>m), thymidine kinase (TK), lactate dehydrogenase (LDH), creatinine (Cr), albumin, hemoglobin, and platelet levels. To assess the relation to the stage of the disease, BAFF and APRIL levels were compared between the stages of staging systems according to Durie - Salmon and International Staging System. With regard to the technical limitations of test kits for APRIL, for statistical analysis margin interval levels <3 and ≥3 μg/L were selected.

**Results:** In the case of BAFF molecules, statistical analysis found positive correlation with levels of LDH (r = 0.223; p = 0.002), albumin (r = 0.208; p = 0.004), β<sub>2</sub>m (r = 0.175; p = 0.020) and TK (r = 0.189; p = 0.015). In the case of APRIL analysis, we found a positive correlation of higher values (≥ 3 ng/mL) with serum levels of creatinine (p = 0.027), LDH (p = 0.028) and β<sub>2</sub>m (p = 0.040).

**Conclusion:** BAFF and APRIL molecules are important components of cytokine network of multiple myeloma having an intimate relationship to the pathogenesis, and appear as potential indicators of malignant evolution and disease progression. Our analysis confirmed the relationship of the levels of both parameters to selected indicators of MM advancement.

**Keywords:** multiple myeloma, BAFF, APRIL, biomarkers.

### Úvod

Mnohočetný myelom (MM) je zhoubné hematologické onemocnění charakterizované nekontrolovanou proliferací a akumulací neoplasticky transformovaných plaz-

mocytů, produkcí monoklonálního imunoglobulinu (Mlg) detekovatelného v séru a/nebo v moči a v různém stupni vyjádřeném orgánovým postižením (hyperkalcemie, renální insuficience, osteolytické kostní léze, anémie, imunodeficit) [1-3]. Mikroprostředí kostní dřeně při pato-

logické plazmocelulární infiltraci je charakterizováno velmi rozsáhlou sítí mezibuněčných a cytokinových interakcí mezi stromálními buňkami kostní dřeně, kostními elementy a samotnými nádorovými buňkami, majícími intimní vztah k vlastním biologickým vlastnostem onemocnění. Celá řada sledovatelných biochemických působků se jeví jako možné ukazatele neoplastické transformace potencionálně maligní monoklonální gamapatie nejistého významu (MGUS) a jejího odlišení od počátečních stádií MM, ale také jako ukazatele pokročilosti, progresu a sledování léčebné odpovědi u nemocných s mnohočetným myelomem. Je známo, že proces maligní evoluce MM je rovněž ovlivňován modifikovanou či patologicky zvýšenou produkcí působků, jež jsou za běžných podmínek součástí fyziologických procesů regulujících diferenciaci a vyžívání imunokompetentních buněk [4-7]. Náplní předložené studie je porovnání vztahu sérových hladin molekul BAFF a APRIL k vybraným ukazatelům mnohočetného myelomu u nemocných vyšetřených v době stanovení diagnózy onemocnění.

## Metody

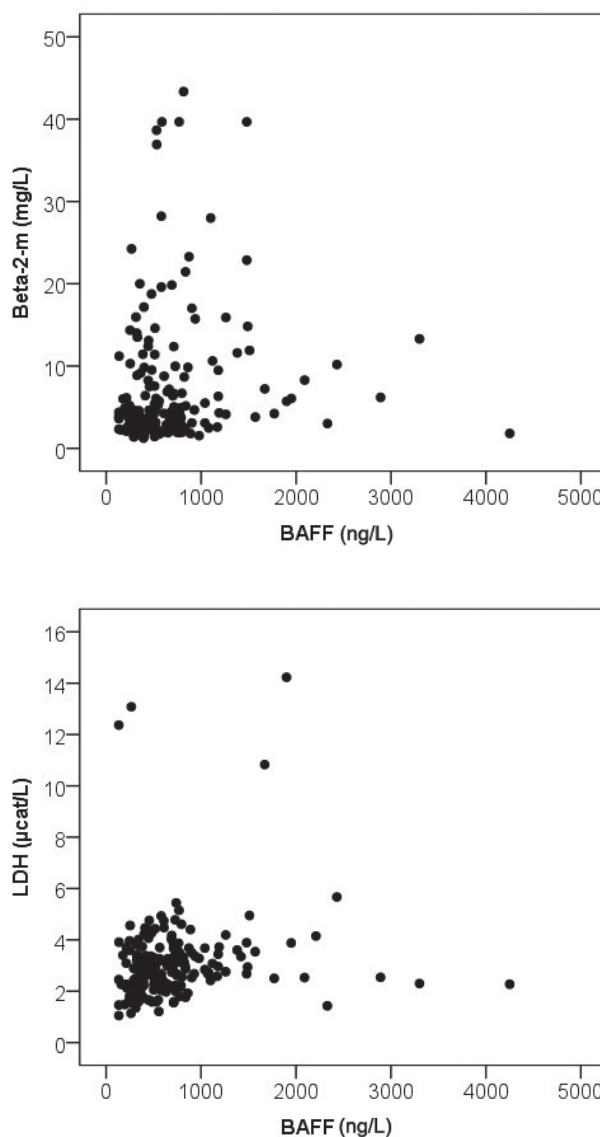
Vyšetřený soubor tvořilo 195 pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem, splňujících IMWG kritéria onemocnění [2, 3]. Popisné charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 1. Pro stanovení sérových hladin molekul BAFF (ng/l) a APRIL (μg/l) bylo užito kvantitativní sendvičové ELISA metody (R&D Systems). Získané hodnoty byly korelovány se sérovými hladinami β<sub>2</sub>-mikroglobulinu (β<sub>2</sub>m), thymidinkinázy (TK), laktátdehydrogenázy (LDH), kreatininu (kr), albuminu, hodnotami hemoglobinu a trombocytů. Pro posouzení vztahu k pokročilosti onemocnění byly hladiny molekul BAFF a APRIL porovnávány mezi jednotlivými stádii dle stážívacích systémů dle Durieho – Salmona (DS) a International Staging System (ISS) [8, 9]. S ohledem na technické limity testovacích souprav pro molekulu APRIL bylo pro statistickou analýzu zvoleno intervalové rozpětí hladin <3 a ≥3 μg/l. Pro statistické hodnocení bylo užito Spearmanovy korelační analýzy, U testu dle Manna-Whitneyeho a Kruskal-Wallisova testu.

**Table 1.** Patient characteristics (n = 195)

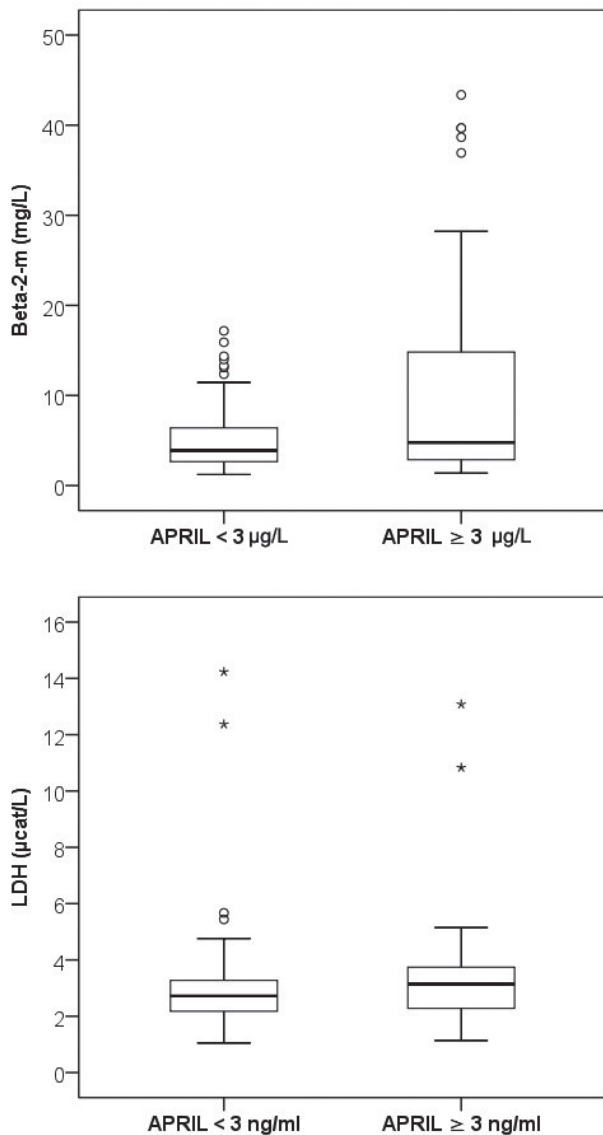
Male:Female	85/110
Age (years)	median 68 (29 – 90)
<b>Isotype</b>	
IgG	106 (54 %)
IgA	37 (19 %)
LC only	29 (15 %)
Other	23 (12 %)
<b>Stage</b>	
<b>Durie – Salmon</b>	
Stage I/II/III	29/68/98 (15/35/50 %)
Stage A/B	152/43 (78/22 %)
<b>ISS</b>	
stage 1/2/3	63/54/78 (32/28/40 %)

## Výsledky

Statistická analýza v případě molekuly BAFF zjistila pozitivní korelace s hladinami LDH ( $r = 0,223$ ;  $p = 0,002$ ), albuminu ( $r = 0,208$ ;  $p = 0,004$ ), β<sub>2</sub>m ( $r = 0,175$ ;  $p = 0,020$ ) a TK ( $r = 0,189$ ;  $p = 0,015$ ) (obr. 1). Naopak nebyl zjištěn rozdíl v hladinách mezi jednotlivými stádii stážívacích systémů dle Durieho – Salmona i ISS. V případě analýzy hladin molekuly APRIL byla zjištěna pozitivní korelace vyšších hodnot (≥ 3 μg/l) s hladinami kreatininu ( $p = 0,027$ ), LDH ( $p = 0,028$ ) a β<sub>2</sub>m ( $p = 0,040$ ) (obr. 2). Identicky jako v případě molekuly BAFF nebyly zjištěny rozdíly v hladinách mezi jednotlivými stádii onemocnění, vyjma podstádia B systému dle Durieho – Salmona, označujícího nemocné s pokročilou renální nedostatečností, která byla spojena s vyššími hladinami (≥ 3 μg/l) molekuly APRIL (62,8 % vs. 33,6 % v případě podstádia A;  $p = 0,001$ ).



**Fig. 1.** Correlation between serum BAFF levels and β<sub>2</sub>-mikroglobulin ( $r = 0.175$ ;  $p = 0.020$ ) and lactatdehydrogenase ( $r = 0.223$ ;  $p = 0.002$ ).



**Fig. 2.** Comparison of serum APRIL levels and  $\beta_2$ -microglobulin ( $p = 0.040$ ) and lactate dehydrogenase ( $p = 0.028$ ).

## Diskuse

Vzájemné interakce mezi buňkami a extracelulárními složkami mají vliv na diferenciaci, migraci, proliferaci a přežívání myelomových buněk v mikroprostředí kostní dřeně. Stejně tak i řada patofyziologických pochodů má spolu s cytogenetickými změnami vliv na vznik lékové rezistence buněčných linií. Studium jednotlivých složek mikroprostředí kostní dřeně ve vztahu k nádorové infiltraci nadále představuje objekt zájmu řady vědeckých týmů. Molekula BAFF (synonymum Blys, THANK-1 a TALL-1) je transmembránový protein patřící do TNF (tumor necrosis factor) superrodiny. BAFF je produkován řadou buněk imunitního systému – monocyty, makrofágy, dendritickými buňkami, osteoklasty a některými podtřídami T-lymfocytů [10]. Bylo prokázáno, že myelomové elementy rovněž variabilně secernují BAFF, nicméně produkce BAFF v mikroprostředí kostní dřeně je 100násobně vyšší nežli v případě purifikovaných myelomových buněk [11, 12]. Expres

se BAFF může být zvýšena některými cytokiny jako např. IFN- $\gamma$ , IL-10 či aktivací Toll-like receptorů. APRIL (TRDL-2, TALL-2), další člen z TNF superrodiny, je transmembránový protein vykazující 30% homologii s BAFF, a se kterým může tvořit heterotrimery. Místo produkce je identické jako v případě BAFF. BAFF i APRIL jsou za fyziologických podmínek zodpovědné za vyžívání, aktivaci a přežívání B-lymfocytů a plazmatických buněk [12, 13]. Rozlišujeme dva receptory pro BAFF a APRIL – BCMA/TNFRSF17 (B-cell maturation antigen) a TACI/TNFRSF13B (transmembránový aktivátor) a receptor BAFF-R/BR3/TNFRSF13C pouze pro vazbu BAFF. Defekty jednotlivých receptorů jsou spojeny s různým stupněm postižení imunitního systému (v případě BAFF-R – B lymfopenie; BCMA – zkrácené přežívání plazmatických buněk) či vznikem autoimunitních onemocnění spojených s polyklonální proliferací a produkcí imunoglobulinů, podobných např. systémovému lupus erythematosus (TACI) [12]. V případě myelomových buněk je exprese BCMA a BAFF-R variabilní, avšak vyšší nežli u fyziologických plazmacytů. Exprese TACI receptoru je rovněž variabilní, nicméně schopnost vázat BAFF a zvýšení míry exprese TACI je známkou progresu onemocnění s častým extramedulárním postižením [12 – 14]. Vazba BAFF na receptory je spojena s aktivací NF- $\kappa$ B signální dráhy ať již kanonickou či nekanonickou cestou, vedoucí ke zvýšení exprese antiapoptotických proteinů a deregulaci proapoptotických signálních drah. Aktivace BAFF signální dráhy je dominantně parakrinní, cestou mikroprostředí kostní dřeně. Nicméně myelomové elementy schopné autokrinní produkce BAFF jsou naopak schopny vymáhat se ze závislosti na prostředí kostní dřeně [12, 15]. Řada studií prokázala vztah hladin BAFF a řady biologických ukazatelů mnohočetného myelomu – interleukinu 6, 10 a 15, CRP, ale i LDH a  $\beta_2$  mikroglobulinu, což je v souladu s našimi výsledky [16 – 18]. Naše analýza navíc prokázala pozitivní vztah BAFF k hladinám sérové thymidinkinázy, která rovněž představuje méně obvyklý proliferativní - prognostický ukazatel. Vyšší hladiny  $\beta_2$ m a vyšší aktivita LDH a thymidinkinázy v séru jsou spojeny s pokročilým, aktivním onemocněním. Další studie rovněž potvrdily vztah hladin BAFF a ukazatelů neoangiogenezy v kostní dřeni (VEGF, mikrovaskulární denzita) či ukazatelů proliferace (Ki-67) [18]. Některé práce potvrdily vztah hladin BAFF k jednotlivým stádiím dle ISS systému, což však v případě naší analýzy potvrzeno nebylo [12]. Identicky v případě molekuly APRIL byl naší analýzou potvrzen vztah hladin k hladinám  $\beta_2$ m i aktivitě LDH v séru, tedy parametrům pokročilosti onemocnění. Druhým důležitým aspektem naší studie byl zjištěný vztah hodnot APRIL a míry renální nedostatečnosti definované hladinami kreatininu. Tento vztah byl potvrzen i významným rozdílem v hladinách mezi podstadii A a B stážovacího systému dle Durieho - Salmona.

Molekuly APRIL a BAFF se tedy ukazují jako jedny z hlavních cytokinů účastnících se procesů maligní evoluce a proliferace myelomových plazmacytů. V současnosti probíhají klinické studie fáze I a II u MM, hodnotící možný léčebný přínos protilátek proti BCMA

receptoru konjugovaných s monometyl auristatinem F (GSK2857916) či protilátek přímo inhibujících BAFF (tabalumab) [12].

## Závěr

Molekuly BAFF a APRIL jsou důležitou součástí cytokinové sítě mnohočetného myelomu mající intimní vztah k patogenezi mnohočetného myelomu. Jeví se jako potenciální ukazatele maligní evoluce a progresu onemocnění. Naše analýza potvrdila vztah hladin obou parametrů k vybraným ukazatelům pokročilosti MM. K definitivnímu posouzení významu BAFF a zejména přínosu terapeutického ovlivnění BAFF – mediované signální dráhy je potřeba dalších studií.

## Literatura

1. **Kyle, R. A., Rajkumar, S. V.** Multiple myeloma. *Blood* 2009; 111: 2962-2972.
2. **International myeloma working group.** Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Brit. J. Haematol.* 2003, 121, p. 749-757.
3. **Rajkumar, S. V.** Myeloma today: disease definitions and treatment advances. *Am. J. Hematol.* 2015, doi: 10.1002/ajh.24236.
4. **Lauta, V. M.** A review of the cytokine network in multiple myeloma. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer* 2003, 97, p. 2440 – 2452.
5. **Ščudla, V., Budíková, M., Pika, T. et al.** Srovnání sérových hladin vybraných biologických ukazatelů u monoklonální gamapati nejistého významu a mnohočetného myelomu. *Vnitř. Lék.* 2006, 52(3), p. 232- 240.
6. **Ščudla, V., Pika, T., Budíková, M. et al.** Příspěvek k hodnocení vztahu angiogenních cytokinů a vybraných biologických ukazatelů k prognostickým faktorům mnohočetného myelomu. *Cas. Lek. Ces.* 2006, 145, p. 929-935.
7. **Bačovský, J., Ščudla, V.** Cytokinová síť u mnohočetného myelomu. *Vnitř. Lék.* 1994, 40, p. 517 – 520.
8. **Durie, B. G. M., Salmon, S. E.** A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer* 1975, 36, p. 842-854.
9. **Greipp, P. R., Miguel, J. S., Durie, B. G. M. et al.** International staging system for multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, p. 3412-3420.
10. **Chang, S. K., Arendt, B. K., Darce, J. R., Wu, X., Jelinek, D. F.** A role for BLys in the activation of innate immune cells. *Blood* 2006, 108, p. 2687 – 2694.
11. **Novak, A.J., Darce, J.R., Arendt, B.K. et al.** Expression of BCMA, TACI a BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood* 2004, 103, p. 689 – 694.
12. **Hengeveld, P. J., Kersten, M. J.** B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy? *Blood Cancer J.* 2015, 5: e282.
13. **Tai, Y. T., Li, X. F., Breitkreutz, I. et al.** Role of B-cell-activating factor in adhesion and growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer Res.* 2006, 66, p. 6675 – 6682.
14. **Ju, S., Wang, Y., Ni, H. et al.** Correlation of expression levels of BLys and its receptors with multiple myeloma. *Clin. Biochem.* 2009, 42, p. 387 – 399.
15. **Moureaux, J., Sprynski, A-C, Dillon, S. et al.** APRIL and TACI interact with syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop. *Eur. J. Hematol.* 2009, 83, p. 119 – 129.
16. **Alexandrakis, M. G., Roussou, P., Pappa, C. A. et al.** Relationship between circulating BAFF serum levels with proliferating markers in patients with multiple myeloma. *Biomed. Res. Int.* 2013, 2013, 389579. doi: 10.1155/2013/389579.
17. **Heřmanová, Z., Pika, T., Lochman, P., Ščudla, V.** Stanovení proteinu BAFF u pacientů s monoklonálními gamapatiemi - první zkušenosti. *Klin. Biochem. Metab.* 2012, 20, p. 79 – 83.
18. **Fragioudaki, M., Tsirakis, G., Pappa, C. A. et al.** Serum BAFF levels are related to angiogenesis and prognosis in patients with multiple myeloma. *Leukemia Res.* 2012, 36, p. 1004 – 1008.

Vychází s podporou grantu NT 12451/5, NT 14400.

Do redakce došlo 29. 2. 2016

Adresa pro korespondenci  
MUDr. Tomáš Pika, Ph.D.  
Hematoonkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc  
I. P. Pavlova 6, 779 00 Olomouc  
Email: tomas.pika@seznam.cz