





Multipl Myelomlu Hastalarda KIM1 ve NGAL Ekspresyonu ve Klinikopatolojik Önemi

Dudu Solakoğlu Kahraman 
Güliden Diniz 
Özge Kaya 
Cengiz Ceylan 

KIM1 and NGAL Expression in Patients with Multiple Myeloma and Clinicopathological Significance

ÖZ

Amaç: Böbrek yetmezliği, multipl myelomlu (MM) hastaların sık görülen bir komplikasyonudur. MM'lu hastalarda serum ve idrarda nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL) ve böbrek hasarı molekülü-1(KIM1), akut böbrek yetmezliğini erken aşamada saptamada, faydalı olan iki yeni renal hasar biyobelirleyicileridir. Çalışmamızla, kemik iliği biyopsisinde MM tanısı alan hastalarda, dokuda KIM1 ve NGAL protein ekspresyon varlığını araştırmak ve klinik önemini değerlendirmeyi amaçladık.

Yöntem: Çalışma serimizi, hastanemiz patoloji bölümünde 2010-2017 yılları arasında multipl myelom tanısı almış 67 hasta oluşturmaktadır. Klinik olarak böbrek yetmezliği olan hastalar belirlenmiştir. Hastaların parafin blok kesitlerinde, immunohistokimyasal olarak NGAL ve KIM1 protein ekspresyon varlığı değerlendirilmiştir.

Bulgular: Hastaların 29'u (%43,3) kadın, 38'i (%56,7) erkekti. Yaşları 35 ile 87 arasında olup, ortalama 65,4±10 yıl idi. Hastaların büyük kısmında kemik ve vücut ağrıları, halsizlik sık görülen yakınmaydı. Hastalarda %64,2 gibi yüksek oranında akut böbrek hasarına bağlı semptomlar vardı. MM hastalarının hiçbirinde neoplastik hücrelerde NGAL ve KIM1 ekspresyonu saptanmadı. Ancak dört olguda tümörde NGAL pozitif myeloid hücreleri gözlemlendi.

Sonuç: Bu iki biyobelirteç, serum ve idrarda MM'lu hastalarda akut böbrek hasarını erken aşamada saptamada yararlıdır. Neoplastik hücrelerdeki yokluğu, tümörün bu belirteçleri ekspresyon etmediğini gösterebilir. Ancak bu ön gözlemin doğrulanması için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: NGAL, KIM1, multipl myelom

ABSTRACT

Objective: Renal failure is a common complication of patients with multiple myeloma (MM). In patients with MM, serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and kidney injury molecule-1 (KIM-1) are two new renal injury biomarkers useful for detecting acute renal failure at an early stage. In our study, we aimed to investigate the presence of KIM-1 and NGAL expression in tissue in patients with bone marrow biopsy and to evaluate their clinical significance.

Methods: Our study series consisted of 67 patients diagnosed as multiple myeloma in the pathology department of our hospital between 2010-2017. Clinically, patients with renal failure were identified. The presence of NGAL and KIM-1 protein expression was evaluated immunohistochemically in paraffin block sections of patients.

Results: Of the patients, 29 (43.3%) were female and 38 (56.7%) were male. They were between 35 and 87 years of age and the mean age was 65.4±10 years. Most of the patients had complaints of bone and body aches, and weakness. 64.2% of the patients had symptoms due to acute kidney injury. NGAL and KIM-1 expression were not detected in any of the neoplastic cells in MM patients. But NGAL- positive neutrophils were detected in the tumors of four cases.

Conclusion: These two biomarkers are useful in detecting acute renal injury at an early stage which increase in serum and urine of the patients with MM. Absence of them in neoplastic cells may indicate that the tumor does not express these markers. However further studies are needed to validate these preliminary observation.

Keywords: NGAL, KIM1, multiple myeloma

Alındığı tarih: 18.12.2018
Kabul tarihi: 17.04.2019
Yayın tarihi: 30.05.2019

Dudu Solakoğlu Kahraman
S.B.Ü. İzmir Tepecik EAH
Patoloji Bölümü
Güney Mah. 1140/1 Sok. No: 1
Yenişehir - Konak 35430
İzmir - Türkiye
✉ dudusolakoglu@hotmail.com
ORCID: 0000-0002-4126-5326

G. Diniz 0000-0003-1512-7584
İzmir Demokrasi Üniversitesi
Patoloji Bölümü
İzmir - Türkiye

Ö. Kaya 0000-0001-6887-0553
S.B.Ü. İzmir Tepecik EAH
Patoloji Bölümü
İzmir - Türkiye

C. Ceylan 0000-0001-9245-324X
S.B.Ü. İzmir Tepecik EAH
Hematoloji Bölümü
İzmir - Türkiye

GİRİŞ

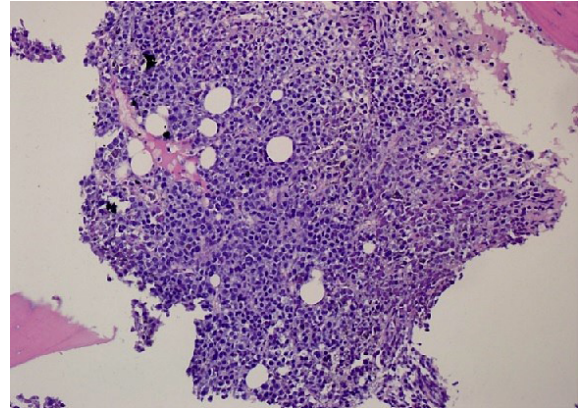
Multipl myelom (MM) hastalarının çoğunluğu, geri dönüşü olmayan akut böbrek hasarına sahiptir. Bu durum olumsuz prognozla ilişkilidir ⁽¹⁾. Erken aşamada böbrek disfonksiyonu riski altındaki bireylerin tanınması, kalıcı renal hasarın önlenmesi ve tedavinin zamanında başlatılması için kritik öneme sahiptir ⁽²⁾. Bu nedenle böbrek bozukluklarında çeşitli renal disfonksiyon belirteçleri kullanılmıştır. Son yıllarda birçok yeni böbrek hasarı biyobelirleyicisi ortaya çıkmıştır ⁽³⁾.

Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL), böbrek hasarına yanıt olarak proksimal tübüler hücreler tarafından aşırı üretilen bir protein iken, böbrek hasarı molekülü-1 (KIM1), iskemik veya toksik yaralanma sonrası farklılaşmış proksimal tübül epitelyal hücrelerinde aşırı eksprese edilen tip 1 transmembran glikoproteindir. Pro-matriks metaloproteinaz-9 (Pro-MMP-9) / NGAL düzeyleri meme, beyin ve mide tümörlerinde dokularda, idrarda ve kanda saptanabilir. Hastalık şiddeti ve kötü sağkalım ile anlamlı derecede ilişkilidir ⁽⁴⁻⁶⁾. Multipl myelom hücreleri pro-MMP-9 ve pro-MMP-9 / NGAL kompleksi üretir. Plazmada NGAL varlığı yalnızca böbrek fonksiyonlarının hassas bir biyobelirteci değil, aynı zamanda MM'lu hastalarda tümör yükünü yansıtan yararlı bir belirteç de olabilir ^(7,8). Multipl myelom hastalığında NGAL ve / veya pro-MMP-9 / NGAL kompleksinin ekspresyon paternleri hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır. Pro-matriks metaloproteinaz-9 ve NGAL söylemi, diğer hematolojik malignitelerde de tespit edilmiş ve düşük sağkalımla ilişkili bulunmuştur ⁽⁹⁻¹²⁾.

Multipl myelomlu hastalarda, NGAL ve KIM1'in serum ve idrarda varlığı saptanmış iken, dokuda ekspresyonu ile ilgili literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, yeni tanı almış MM'lu hastalarda erken dönemde NGAL ve KIM1'in akut böbrek hasarı markırı olarak kullanılıp kullanılamayacağını değerlendirmektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

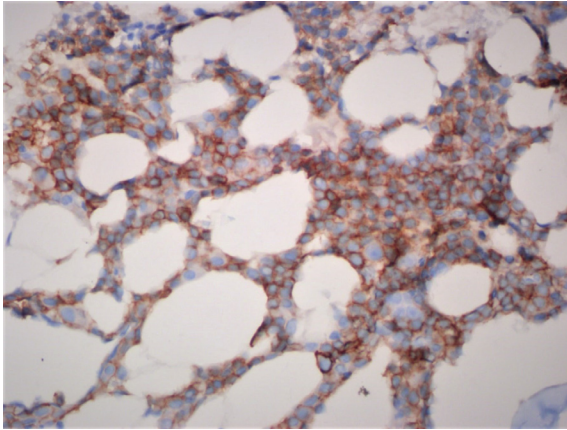
2010-2017 yılları arasında kemik iliği biyopsi ve aspirasyon yayma preparatlara göre MM tanısı almış 67 hasta retrospektif olarak analiz edildi. Hastaların demografik özellikleri ve klinik olarak akut böbrek hasarı olanları belirlendi. Patoloji arşivinden kemik iliği biyopsisine ait raporları ve hematoksilen eozin (Resim 1), histokimyasal ve immünohistokimyasal boyalı preparatları çıkartılarak tekrar değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak daha önce çalışılmış ve pozitif olan hafif ve ağır zincir immünglobulinleri belirlendi. Hastaların kemik iliği parafin blok kesitlerinden immünohistokimyasal olarak, NGAL ve KIM1 çalışıldı.



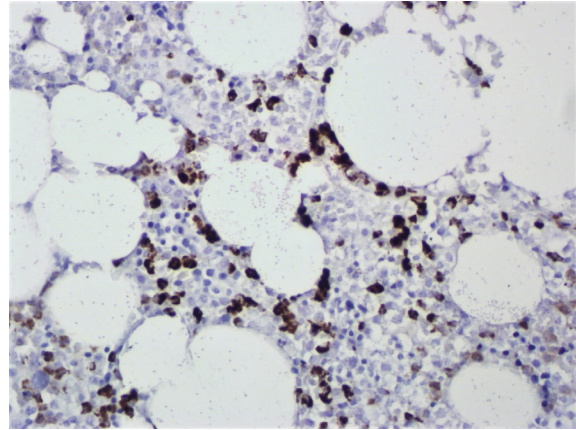
Resim 1. Multipl myelom H-E x 100.

İmmünohistokimyasal metod olarak streptavidin biotin peroksidaz metodu (Invitrogen, Camarillo, 85-9043) kullanıldı. Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (Novus Biologicals, Littleton, USA, NDP1- 90331, 1:300 dilüe) pürifiye monoklonal mouse antikor ve KIM-1 (Bioss, Philadelphia, USA, HAVCR1, 1: 300 dilüe) monoklonal antikorlar kullanıldı. Böbrek hasarı molekülü-1 için akut tübüler nekroz içeren böbrek dokusu ve NGAL için dalak dokusu pozitif kontrol olarak kullanıldı. Böbrek hasarı molekülü-1 için sitoplazmik, NGAL için sitoplazmik ve membranöz boyanma pozitif boyanma olarak kabul edildi.

Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin ve KIM1 ekspresyon varlığı ve böbrek yetmezliği bulunan hastalarla ara-



Resim 2. Neoplastik plazma hücrelerinde CD138 pozitifliği.



Resim 3. NGAL pozitif miyeloid hücreler.

sındaki ilişkiye bakıldı.

İstatiksel olarak SPSS 15.0 ile Spearman korelasyon analizi, Mann-Whitney U, ki-kare ve Kaplan-Meier yaşam analiz testi kullanıldı. P değeri <0,05 olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Hastaların 29'u (%43,3) kadın, 38'i (%56,7) erkekti. Yaşları 35 ile 87 arasında olup, ortalama $65,4 \pm 10$ yıl idi.

Hastaların büyük kısmında kemik ve vücut ağrıları, hâlsizlik sık görülen yakınmaydı. Yüzde 64,2'sinde (43 hasta) akut böbrek hasarına bağlı semptomlar vardı.

İmmünohistokimyasal olarak, neoplastik plazma hücrelerinde CD138 pozitifliği (Resim 2). Otuz dört hastada (%50,7) kappa, 33 hastada (%49,3) lambda hafif zincir globülin ekspresyonu saptanmıştır. Altmış yedi hastanın 58'ine immünohistokimyasal olarak ağır zincir immünglobulinleri (Ig G, A, D, M) çalışılmış, IgG %72,4 (n=42)'lük yüksek oranda pozitif saptanmıştır. Kemik iliği biyopsisinde, neoplastik plazma hücrelerinde KIM1 ve NGAL protein ekspresyonu görülmedi. Yalnızca 4 hastada NGAL ile miyeloid prekürsör hücrelerde boyanma izlendi (Resim 3). NGAL ekspresyonu pozitif miyeloid hücreler saptanan 4 olgu, diğerleriyle karşılaştırıldığında, bazı farklar içeriyordu. Bu

hastaların ortalama yaşı diğerlerine göre biraz daha genç (ortalama yaş 57) idi ve çoğu kadındı (%75). Diğer hastalarda hafif kappa baskınlığı varken, 4 hastanın 3'ünde (%75) lambda pozitifliği görüldü. İmmünglobülin dağılımları genel grupta benzer bulunmakla birlikte, IgG ekspresyonu 4 hastanın tümünde pozitif. NGAL pozitif miyeloid hücre izlenen olgularda böbrek yetmezliği oranı daha düşüktü (%50). Benzer şekilde tüm olgular içinde ölüm oranı %65,7 iken, bu 4 olguda %50 bulundu. Ancak istatistiksel analizlerde anlamlı farklılık saptanmadı.

TARTIŞMA

Şimdiye kadar NGAL, inflamatuvar bir faktör olarak ve böbrek hasarının bir belirteci olarak araştırılmıştır⁽¹³⁾. Bununla birlikte, yeni çalışmalar NGAL'in kanser gelişiminde potansiyel rolleri olduğunu ve NGAL'nin onkojenik veya anti-onkojenik fonksiyonlara sahip olabileceğini göstermiştir^(5,14,15). Son zamanlarda, NGAL ve hücre yüzey reseptörü olan NGALR'nin çeşitli tümörlerde kritik rol oynadığı bildirilmiştir. Ancak, MM da ekspresyon paterni ve biyolojik ilişkisi belirsizliğini korumaktadır^(6,16).

Normal olgunlaşmamış CD34 pozitif kemik iliği progenitör hücreleri NGAL eksprese eder^(17,18). Granülosit prekürsörlerinin kemik iliğindeki olgunlaşması sırasında NGAL neredeyse tamamen miyelositler ve metamyelositler tarafından sentezlenir⁽¹⁹⁾.

Çalışmamızda hastaların yalnızca 4'ünde kemik iliği miyeloid seri hücrelerinde NGAL pozitifliği saptanmıştır. Bu hastalar diğer hastalara göre daha genç yaşta ve kadın hasta idi. Böbrek yetmezliği oranı da daha düşüktü. Ancak her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Bu durum miyelositler tarafından NGAL sentezlense de, immünohistokimyasal olarak, her zaman protein ekspresyonunun saptanamadığını düşündürmüştür. Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin, ayrıca insan eritroid hücrelerinde de eksprese edilir ⁽¹⁸⁾. Çalışmamız literatürde bu konu ile ilgili ilk örneği olup, MM'lu hastaların kemik iliği biyopsi myelom hücrelerinde NGAL ve KIM1 protein ekspresyonunun olmadığı görülmüştür.

Akciğer adenokarsinomlarında, NGAL ekspresyon oranı yüksekliği ile ortalama yaşam süresi arasında ters bir ilişki saptanmıştır. NGAL'in evreden bağımsız bir prognostik faktör olduğu öne sürülmüştür ^(14,18). Mesane, kolorektal, karaciğer, akciğer, over ve pankreas dâhil olmak üzere 6 kanser tipi için, NGAL'in hem NGAL mRNA gen ekspresyonu düzeyinde hem de immünohistokimyasal protein ekspresyon düzeyinde birbiri ile uyumlu, anlamlı yükseklik saptanmıştır. Fakat hematolojik malignitelerin çoğunda, NGAL mRNA ve protein ekspresyonu arasında bir uyumsuzluk görülmüştür. Protein ekspresyonunun daha düşük oranda varlığı saptanmıştır ^(14,20,21).

Literatürde böbrek hasarı açısından yüksek riskli hastalarda, erken belirleme ve daha sonra doğrulanması için iki taraflı belirleyici olarak kanda ve/veya idrarda NGAL ve KIM1'in kullanılması gerektiği ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır ^(1,7,13). Fakat, multipl myelomlu hastaların kemik iliği biyopsisinde, neoplastik plazma hücrelerinde NGAL ve KIM1 ekspresyon varlığı ve prognostik önemine dair bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda, pozitif ekspresyon olmadığından prognostik önemi konusunda bir değerlendirme yapılamamıştır.

SONUÇ

Multipl myelomda, dokuda NGAL ve KIM1 ekspres-

yon paternleri hakkında az sayıda veri bulunmaktadır. Bu çalışma ile NGAL ve KIM1 myelomdaki ekspresyon varlığı ile ilgili bilgi verilmiş ve akut böbrek hasarlanmasının erken aşamada saptanmasında klinik ve laboratuvar önemli biyobelirteçlere katkısının olup olmayacağı değerlendirilmiştir. Tümör hücreleri arasında NGAL eksprese eden miyeloid hücre varlığı saptanan olgularda hem böbrek yetmezliği, hem de ölüm oranının daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ancak serinin az sayıda olgu içermesi nedeniyle istatistiksel anlamlı veri elde edilememiştir. Daha geniş bir seride bu ön bulguların doğrulanması gerektiği düşünülmüştür.

Etik Kurul Onayı: Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Karar No. 21, karar tarihi 19/03/2015).

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Finansal destek yoktur.

Ethics Committee Approval: Approval was obtained from the Local Ethics Committee of Tepecik Education and Research Hospital (decision no: 21, decree 19/03/2015).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: No funding.

KAYNAKLAR

1. Mussap M and Merlini G. Pathogenesis of renal failure in multiple myeloma: Any role of contrast media? *Biomed Res Int.* 2014;2014:167125. <https://doi.org/10.1155/2014/167125>
2. Papassotiriou GP, Kastiris E, Gkatzamanidou M, Christoulas D, Eleutherakis-Papaiakovou E, Migkou M, et al. Neutrophil gelatinase--associated lipocalin and cystatin C are sensitive markers of renal injury in patients with multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2016 Jan;16(1):29-35. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2015.10.003>
3. Dimopoulos MA, Christoulas D, Kastiris E, Gkatzamanido M, Margeli A, Kanellias N, et al. Tubular damage is ubiquitous in newly-diagnosed patients with multiple myeloma: Comparison of three urinary and two serum markers of kidney injury. *Blood*

- 2012120(21):2919.
4. Yang J, Moses MA. Lipocalin 2: A multifaceted modulator of human cancer. *Cell Cycle*. 2009;8:2347-52. <https://doi.org/10.4161/cc.8.15.9224>
 5. Bolignano D, Donato V, Lacquaniti A, Fazio MR, Bono C, Coppolino G, Buemi M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: A new protein enters the scene. *Cancer Lett*. 2010;288:10-6. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.027>
 6. Bouchet S and Bauvois B. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), pro-matrix metalloproteinase-9 (pro-MMP-9) and their complex Pro-MMP-9/NGAL in leukaemias. *Cancers (Basel)*. 2014; Jun; 6(2):796-812. <https://doi.org/10.3390/cancers6020796>
 7. Chae H, Ryu H, Cha K, Kim M, Kim Y, Min CK. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of renal impairment in patients with multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015 Jan;15(1):35-40. Epub 2014 Aug 1. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2014.07.014>
 8. Du W, Shen T, Li H, Liu Y, He L, Tan L, Hu M. Urinary NGAL for the diagnosis of the renal injury from multiple myeloma. *Cancer Biomark*. 2017;18(1):41-6. <https://doi.org/10.3233/CBM-160672>
 9. Barille S, Akhoundi C, Collette M, Mellerin MP, Rapp MJ, Harousseau JL, et al. Metalloproteinases in multiple myeloma: Production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), activation of proMMP-2, and induction of MMP-1 by myeloma cells. *Blood*. 1997;90:1649-1655.
 10. Kelly T, Borset M, Abe E, Gaddy-Kurten D, Sanderson RD. Matrix metalloproteinases in multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma*. 2000;37:273-81. <https://doi.org/10.3109/10428190009089428>
 11. Sakata K, Satoh M, Someya M, Asanuma H, Nagakura H, Oouchi A, Nakata K, et al. Expression of matrix metalloproteinase 9 is a prognostic factor in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 2004;100:356-65. <https://doi.org/10.1002/cncr.11905>
 12. Vande Broek I, Asosingh K, Allegaert V, Leleu X, Facon T, Vanderkerken K, van Camp B, van Riet I. Bone marrow endothelial cells increase the invasiveness of human multiple myeloma cells through upregulation of MMP-9: Evidence for a role of hepatocyte growth factor. *Leukemia*. 2004;18:976-82. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403331>
 13. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, Buemi M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. *Am J Kidney Dis*. 2008;52:595-605. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2008.01.020>
 14. Candido S, Maestro R, Polesel J, Catania A, Maira F, Signorelli SS, McCubrey JA and Libra M. Roles of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human cancer *Oncotarget*. 2014;5:1576-94. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1738>
 15. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem*. 2001;276:37258-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106089200>
 16. Liu F, Li N, Yang W, Wang R, Yu J, Wang X. The expression analysis of NGAL and NGALR in clear cell renal cell carcinoma. *Gene*. 2018 Nov 15;676:269-78. Epub 2018 Aug 20. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.08.060>
 17. Miharada K, Hiroyama T, Sudo K, Danjo I, Nagasawa T, Nakamura Y. Lipocalin 2-mediated growth suppression is evident in human erythroid and monocyte/macrophage lineage cells. *J Cell Physiol* 2008;215:526-37. <https://doi.org/10.1002/jcp.21334>
 18. Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Matsuzaki A, Hashmi HR, Larratt LM, Boshkov LM, Turner AR, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and -2) in acute myelogenous leukaemia blasts: Comparison with normal bone marrow cells. *Br J Haematol*. 1999;105:402-11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1999.01352.x>
 19. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997;89:3503-21.
 20. Ruiz-Morales JM, Dorantes-Heredia R, Arrieta O, Chávez-Tapia NC, Motola-Kuba D. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) prognostic value in lung adenocarcinoma. *Tumour Biol*. 2015 May;36(5):3601-10. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2997-3>
 21. Tong Z, Kunnumakkara AB, Wang H, Matsuo Y, Diagaradjane P, Harikumar KB, Ramachandran V, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel suppressor of invasion and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2008;68:6100-8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0540>