

Received: 2004.04.27  
Accepted: 2004.09.16  
Published: 2004.10.07

## Rola zaburzeń apoptozy i cytokin prozapalnych w patogenezie niedokrwistości w przebiegu szpiczaka plazmocytoowego

### Involvement of apoptosis and proinflammatory cytokines in the pathogenesis of anemia in multiple myeloma

Norbert Grząsko

Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku Akademii Medycznej w Lublinie

#### Streszczenie

Szpiczak plazmocytoowy jest chorobą rozrostową układu krwiotwórczego stanowiącą około 10% wszystkich nowotworów krwi. Niedokrwistość jest częstym objawem szpiczaka plazmocytoowego, zwłaszcza u pacjentów z bardziej zaawansowaną chorobą, a jej nasilenie ściśle koreluje z klinicznym stadium choroby. W patogenezie niedokrwistości u chorych na szpiczaka plazmocytoowego odgrywa rolę kilka czynników: nacieczenie szpiku przez nowotworowe komórki plazmatyczne, niedobór lub niedostateczna odpowiedź na erytropoetynę (EPO), skrócenie czasu przeżycia krwinek czerwonych, zaburzenia gospodarki żelazowej, zahamowanie czynności krwiotwórczej przez cytokiny oraz interakcja pomiędzy erytroblastami i złośliwymi plazmocytoami. Wyniki badań z ostatnich lat wskazują na ważną rolę apoptozy w regulacji prawidłowej erytropoezy. W warunkach fizjologicznych część erytroblastów ulega apoptozie, a w jej indukowaniu biorą udział białka należące do rodziny TNF: Fas (CD95) i FasL (CD95L) oraz TRAIL (TNF-related apoptosis inducing-ligand) i jego receptory – DR4 (death receptor 4), DR5 (death receptor 5). Obecność Fas, DR4 i DR5 wykryto na powierzchni błony komórkowej erytroblastów niezależnie od stadium, natomiast ekspresję FasL i TRAIL wykazano tylko na bardziej dojrzałych erytroblastach. W wyniku interakcji erytroblastów bardziej dojrzałych (FasL+/TRAIL+) z mniej dojrzałymi (FasL–/TRAIL–) dochodzi do apoptozy komórek FasL–/TRAIL–, co stanowi naturalny ujemnie zwrotnie sprzężony mechanizm regulacyjny. Ekspresja powyższych białek zaangażowanych w regulację erytropoezy podlega regulacji przez EPO, która zmniejsza wrażliwość erytroblastów na FasL i TRAIL oraz zapobiega ich apoptozie po stymulacji tymi ligandami. Natomiast IFN- $\gamma$  i TNF, zwiększając ekspresję Fas na erytroblastach, sprzyjają ich apoptozie. Nowotworowe komórki plazmatyczne wykazują zwiększoną ekspresję FasL i TRAIL oraz zmniejszoną ekspresję Fas, dzięki czemu są mniej wrażliwe na sygnały apoptotyczne. Plazmocyty FasL+/TRAIL+ odgrywają też istotną rolę w patogenezie niedokrwistości powodując apoptozę erytroblastów. Nowotworowe komórki szpiczaka wytwarzają także wiele cytokin, które w sposób autokryny stymulują wzrost komórek szpiczakowych oraz pobudzają angiogenezę, a także przyczyniają się do pogłębiania niedokrwistości.

**Słowa kluczowe:** szpiczak plazmocytoowy • niedokrwistość • FasL • TRAIL • cytokiny prozapalne

#### Summary

Multiple myeloma is a neoplastic disease of the hematopoietic system which constitutes about 10% of all hematological proliferations. Anemia is a common symptom of myeloma, especially in patients with advanced disease, and its severity correlates with the clinical stage of myeloma.

There are several factors involved in the pathogenesis of anemia in multiple myeloma: infiltration of the bone marrow with monoclonal plasma cells, inadequate secretion of erythropoietin, shortened erythrocyte survival time, dysregulated iron metabolism, impaired marrow function due to proinflammatory cytokine secretion, and interaction between erythroblasts and malignant plasma cells. Recent findings indicate an important function of apoptosis in regulating physiological erythropoiesis. In physiological conditions some erythroblasts undergo apoptosis, which is induced by proteins belonging to the TNF family, i.e. Fas(CD95), FasL(CD95L), and TRAIL (TNF-related apoptosis inducing-ligand) with its receptors – DR4 (Death Receptor 4), and DR5 (Death Receptor 5). Expression of Fas, DR4, and DR5 is detected on the cell membrane of erythroblasts in all stages, whereas FasL and TRAIL are present only in more mature erythroblasts. Interaction of mature erythroblast FasL+/TRAIL+ with immature erythroblast FasL-/TRAIL- results in apoptosis of the immature cell, which contributes to the down-regulation of physiological erythropoiesis. The expression of proteins involved in erythropoiesis regulation is controlled by erythropoietin (EPO), which decreases erythroblast susceptibility to FasL and TRAIL stimulation and prevents apoptosis. On the other hand interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor (TNF) increase Fas expression on erythroid cells and enhance their apoptosis. Malignant plasma cells show increased expression of FasL and TRAIL and decreased expression of Fas, which make them more resistant to apoptotic signals. FasL+/TRAIL+ plasmocytes are involved in anemia pathogenesis in multiple myeloma patients by inducing apoptosis of erythroid cells. Monoclonal plasmocytes also secrete numerous cytokines involved in plasma cell growth, bone marrow neovascularisation and anemia.

**Key words:** multiple myeloma • anemia • FasL • TRAIL • proinflammatory cytokines

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_58/6420.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/6420.pdf)

**Word count:** 2276

**Tables:** –

**Figures:** 2

**References:** 49

**Adres autora:** Lek. med. Norbert Grząsko, Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku AM, ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin; e-mail: [norbert\\_grzasko@poczta.onet.pl](mailto:norbert_grzasko@poczta.onet.pl)

## WSTĘP

Szpiczak plazmocytowy jest nieuleczalną chorobą rozrostową układu krwiotwórczego stanowiącą prawie 10% wszystkich nowotworów krwi. Główne objawy szpiczaka są związane z wzrostem monoclonalnych plazmacytów w szpiku lub rzadziej w innych tkankach, obecnością białka monoclonalnego w surowicy i moczu oraz zmianami osteolitycznymi spowodowanymi naciekami z komórek plazmatycznych. Niedokrwistość często towarzyszy zaawansowanym postaciom szpiczaka plazmocyтового korelując z klinicznym stadium choroby [12].

## ROLA APOPTOZY I CYTOKIN W PATOGENEZIE SZPICZAKA PLAZMOCYTOWEGO

Apoptoza, określana także jako programowana śmierć komórkowa, jest obok nekrozy jednym z możliwych sposobów śmierci komórki. Jest to powszechny proces fizjologiczny prowadzący do eliminacji zbędnych komórek. Wykazano, że stosunek apoptozy i indeksu mitotycznego w guzach nowotworowych ma istotne znaczenia prognostyczne [2]. Nieprawidłowa regulacja apoptozy i zachwianie równowagi pomiędzy proliferacją nowotworowych plazmacytów a ich apoptozą stanowi istotny element w patogenezie szpiczaka plazmocyтового.

Ważną rolę w powstawaniu zaburzeń apoptozy w szpiczaku plazmocytowym odgrywają białka z rodziny TNF, takie jak Fas (CD95), jego ligand FasL (CD95L), TRAIL (TNF-related apoptosis inducing-ligand) i jego receptory – DR4 (death receptor 4), DR5 (death receptor 5). Połączenie FasL z receptorem błonowym Fas powoduje aktywację kaspaz i apoptozę [17,41]. TRAIL wykazuje strukturalne oraz funkcjonalne podobieństwo do FasL i jego połączenie z receptorami DR4 i DR5 także indukuje procesy apoptozy [27,47]. Dowiedziono, że liczne komórki nowotworowe wykazują nadekspresję FasL, co pozwala im unikać odpowiedzi układu immunologicznego [45]. Nowotworowe komórki plazmatyczne wykazują nadekspresję FasL oraz zmniejszoną ekspresję Fas, dzięki czemu są mniej wrażliwe na sygnały apoptotyczne i unikają odpowiedzi układu immunologicznego [39,44]. Wykazano, że taka zwiększona ekspresja FasL, a także wydzielanie rozpuszczalnej postaci FasL (sFasL) przez nowotworowe plazmocyty świadczy o dużej złośliwości i wiąże się z upośledzoną apoptozą oraz zdolnością do proliferacji w warunkach braku interleukiny 6 (IL-6), stanowiącej główny czynnik wzrostu plazmacytów [13]. Wykazano także, że pomimo obecności Fas na nowotworowych komórkach plazmatycznych tylko część z nich odpowiada apoptozą na stymulację tego receptora [37]. Podobne spostrzeżenia poczyniono również w stosunku do TRAIL, którego ekspresja jest znacząco zwiększona u chorych z zaawansowaną postacią szpiczaka plazmocyтового [38].

Nowotworowe komórki szpiczaka wytwarzają wiele cytokin, które w sposób auto- i parakryny stymulują wzrost komórek szpiczakowych oraz pobudzają angiogenezę, a także przyczyniają się do pogłębiania niedokrwistości. Należą do nich m.in. interleukiny 1 i 6 (IL-1 i IL-6), czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor – TNF), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), czynnik wzrostu komórek śródbłonna (vascular endothelial growth factor – VEGF), kwaśny i zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (acid and basic fibroblast growth factor – aFGF i bFGF) [22,40]. IL-6 i TNF stanowią najważniejsze czynniki wzrostu komórek plazmatycznych w szpiczaku [20,23,24]. IL-6 bierze udział w kontrolowaniu wytwarzania przeciwciał przez dojrzałe komórki plazmatyczne [33], natomiast w szpiczaku plazmocytozom stymuluje podziały komórkowe i hamuje apoptozę nowotworowych plazmacytów [49]. TNF stymuluje wzrost komórek szpiczakowych, a stężenie tej cytokiny jest u chorych na szpiczaka plazmocytozom istotnie zwiększone [20]. Cytokiny proangiogenne, takie jak VEGF, bFGF i HGF występują u chorych na szpiczaka plazmocytozom w zwiększonych stężeniach i ich poziom koreluje ze stadiem choroby – jest wyższy w chwili rozpoznania choroby i w czasie nawrotów, a niższy po leczeniu i w okresach remisji [4,11,18,36]. Dowiedziano także, że stopień nasilenia neowaskularyzacji w szpiku w przebiegu szpiczaka plazmocytozom koreluje z zaawansowaniem choroby [43].

#### APOPTOZA W REGULACJI PRAWIDŁOWEJ ERYTROPOEZY

Najwcześniej poznany sposób regulacji erytropoezy jest stymulujący wpływ erytropoetyny (EPO) wytwarzanej przez nerki w odpowiedzi na hipoksję. Jednak mechanizmy, za pośrednictwem których EPO kontroluje wytwarzanie krwinek czerwonych długo pozostawały nieznane.

Wyniki badań z ostatnich lat wskazują na ważną rolę receptorów przekazujących sygnały apoptotyczne w regulacji prawidłowej erytropoezy. W warunkach fizjologicznych część erytroidalnego ulega apoptozie, o czym świadczą obserwowane procesy fragmentacji DNA [25]. W badaniach *in vitro* wykazano, że w erytroidalnych komórkach progenitorowych zachodzą procesy fragmentacji DNA z wytworzeniem oligosomów podobnych do obserwowanych w procesie apoptozy. Pod wpływem EPO nasilenie procesów rozpadu DNA zmniejsza się, a erytroidalne komórki progenitorowe przeżywają i różnicują się do erytroidalnego, a następnie retikulocytów. Dowiedziano w ten sposób, że EPO nie tylko stymuluje proliferację i różnicowanie erytroidalnych komórek progenitorowych, ale także podtrzymuje ich przeżycie. Opisane procesy i działanie EPO stwierdza się zarówno w przypadku erytropoezy ostatecznej, zachodzącej u osób dorosłych, jak i w czasie wytwarzania prymitywnych embrionalnych erytrocytów [21]. Faza erytropoezy zależna od EPO trwa od co najmniej stadium CFU-E (colony forming unit – erythroid) do rozpoczęcia syntezy hemoglobiny przez erytroidalnego zasadochłonne [26]. Natomiast bardziej dojrzałe komórki szeregu erytroidalnego nie wykazują zależności od EPO i są zdolne do przeżycia oraz dalszego różnicowania także bez jej obecności.

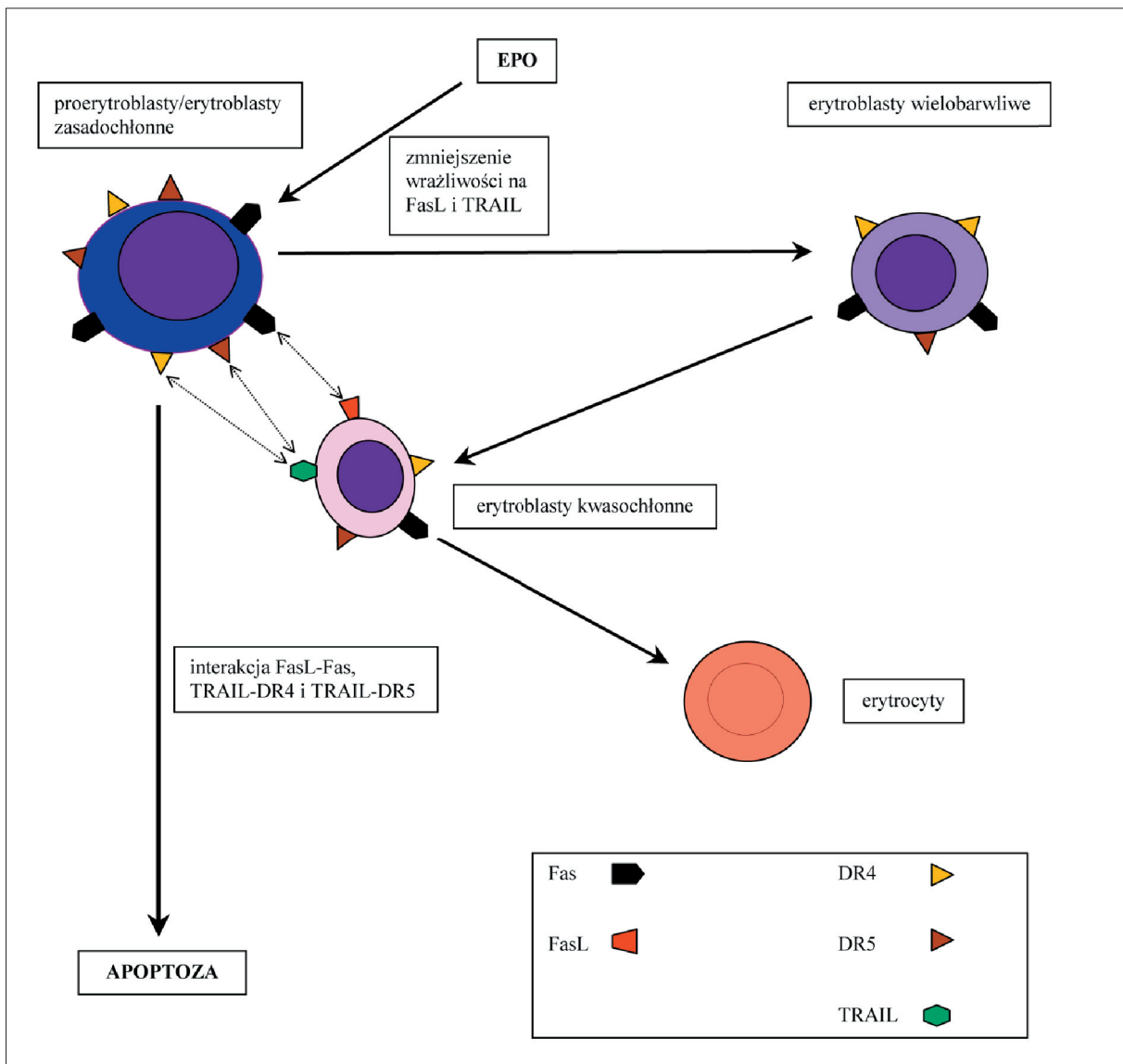
W późniejszych badaniach wykazano, w jaki sposób EPO zwiększa żywotność oraz powoduje proliferację i różni-

cowanie erytroidalnego [15]. Wykazano, że zahamowanie apoptozy erytroidalnego komórek progenitorowych przez EPO odbywa się poprzez indukcję białka BCL-XL należącego do rodziny BCL-2 [32]. Białko BCL-XL jest inhibitorem apoptozy, a jego ekspresja jest bardzo mała we wczesnym stadium erytropoezy i stopniowo narasta w pośrednich i późnych erytroidalnym, co wiąże się z malejącą zależnością tych komórek od EPO.

Wykazano, że w indukowaniu fizjologicznej apoptozy erytroidalnego bierze udział mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego, w który zaangażowany jest Fas, receptor należący do rodziny TNF i jego ligand FasL [8,9]. Uważa się, że erytroidalnego bardziej dojrzałe dostarczają negatywnych sygnałów komórkom młodszym i w ten sposób biorą udział w regulacji fizjologicznej erytropoezy. Stwierdzono, że w warunkach *in vivo* erytroidalnego wykazują ekspresję Fas i FasL. U ponad 90% erytroidalnego występuje Fas, natomiast FasL jest obecny u około 60–70% tych komórek i są to tylko małe dojrzałe erytroidalnego wielobarwliwe i kwasochłonne. Ponadto w badaniach *in vitro* wykazano, że interakcja młodych komórek erytroidalnego Fas(+)/FasL(–) z bardziej dojrzałymi erytroidalnymi Fas(+)/FasL(+) powoduje apoptozę tych pierwszych i proces ten może odgrywać główną rolę w kontrolowaniu erytropoezy w prawidłowym szpiku poprzez programowaną śmierć komórkową. Niedojrzałe erytroidalnego są EPO-zależne i bardziej podatne na apoptozę w warunkach małego stężenia EPO. Komórki te wykazują ekspresję Fas i ulegają apoptozie w obecności dojrzałych erytroidalnego Fas-L(+), a chroni je przed tym procesem wysoki poziom EPO. Niekorzystny wpływ dojrzałych erytroidalnego na erytropozę pełni rolę regulacyjną w warunkach małego zapotrzebowania na nowe erytrocyty i towarzyszącemu temu niewielkiemu wytwarzaniu EPO. Wiadomo także, że duża ekspresja Fas-L na dojrzałych erytroidalnym pełni ważną rolę patogenetyczną w chorobach objawiających się niedokrwistością, a IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  nasilają ekspresję Fas na komórkach CD34(+) i niedojrzałych erytroidalnym zwiększając w ten sposób ich wrażliwość na apoptozę.

Innym białkiem regulującym erytropozę w warunkach fizjologicznych jest TRAIL [10,48] i pobudzane przez niego receptory DR4 i DR5, których stymulacja prowadzi do apoptozy. TRAIL obok FasL odgrywa rolę negatywnego regulatora erytropoezy i podobnie jak w przypadku FasL jedynie niedojrzałe komórki erytroidalnego ulegają apoptozie pod wpływem TRAIL, natomiast w starszych erytroidalnym nie dochodzi do indukowania tego procesu. Dojrzałe komórki z szeregu erytroidalnego wykazują ekspresję TRAIL i są zdolne do indukowania śmierci komórkowej niedojrzałych prekursorów erytroidalnego wykazujących ekspresję DR4 i DR5. Podobnie jak w przypadku układu Fas/FasL wrażliwość na stymulację DR4 i DR5 przez TRAIL utrzymuje się do stadium erytroidalnego wielobarwliwego. Kolejnym podobieństwem do funkcjonowania układu Fas/FasL jest działanie EPO, która hamuje apoptozę indukowaną przez TRAIL.

Jednym z procesów, które są związane z pobudzeniem receptorów śmierci na erytroidalnym jest degradacja czynnika transkrypcyjnego GATA-1 w tych komórkach [10]. Czynnik ten jest niezbędny do końcowego różnicowania erytroidalnego komórek progenitorowych, które przestają



**Ryc. 1.** Udział białek z rodziny TNF w regulacji prawidłowej erytropoezy. W warunkach fizjologicznych część erytroblastów ulega apoptozie. W indukowaniu apoptozy erytroblastów bierze udział mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego, w który są zaangażowane białka z rodziny TNF: Fas, FasL, TRAIL i jego receptory DR4 i DR5. Ekspresję Fas, DR4 i DR5 stwierdza się na erytroblastach niezależnie od stadium, natomiast FasL i TRAIL są obecne tylko na erytroblastach dojrzałych, które dostarczają negatywnych sygnałów komórkom młodszym, powodując ich apoptozę. EPO zmniejsza wrażliwość erytroblastów na FasL i TRAIL oraz zapobiega ich apoptozie, przy czym jedynie niedojrzałe erytroblasty są EPO-zależne

się różnicować i ulegają apoptozie w przypadku niedoboru czynnika GATA-1 [46].

Ekspresja Fas, DR4 i DR5 na erytroblastach oraz ich wrażliwość na stymulację przez ligandy podlega regulacji, w której biorą udział liczne cytokiny, między innymi EPO, czynnik wzrostu komórek pnia (stem cell factor – SCF), insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (insulin-like growth factor – IGF-1), TNF (tumor necrosis factor) i interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). EPO zmniejsza wrażliwość erytroblastów na FasL i TRAIL oraz zapobiega ich apoptozie po stymulacji tymi ligandami przez zwiększenie ekspresji antyapoptotycznych białek BCL-2 i BCL-XL oraz hamowanie aktywności kaspaz [9,10]. Podobne działanie wykazują także SCF i IGF-1 [30]. Natomiast IFN- $\gamma$  i TNF zwiększają wrażliwość erytroblastów na sygnały apopto-

tyczne przez nasilenie ekspresji Fas [8,9]. Ponadto IFN- $\gamma$  powoduje aktywację kaspaz, co jest skutkiem zmniejszenia ekspresji receptorów erytropoetynowych i zwiększenia ekspresji Fas [7].

Oprócz samych erytroblastów, które w mechanizmie ujemnego sprzężenia zwrotnego regulują erytropoezę, w procesie tym uczestniczą też prawdopodobnie monocyty i makrofagi wykazujące ekspresję FasL i TRAIL [16,31]. Schemat regulacji fizjologicznej erytropoezy przedstawiono na rycinie 1.

#### MECHANIZMY NIEDOKRWISTOŚCI W SZPICZAKU PLAZMOCYTOWYM

Niedokrwistość jest bardzo częstym objawem szpiczaka plazmocytozowego, zwłaszcza u pacjentów z zaawansowaną postacią choroby. Wykazuje ona wiele wspólnych cech

z niedokrwistością chorób przewlekłych (anemia of chronic disease – ACD), która jest powikłaniem związanym ze zwiększoną sekrecją cytokin prozapalnych, takich jak TNF, IFN- $\gamma$ , interleukina 1 (IL-1) lub z aktywacją komórek immunokompetentnych i występuje w przebiegu przewlekłych zakażeń, chorób tkanki łącznej i chorób nowotworowych.

Do przyczyn niedokrwistości występującej w przebiegu szpiczaka plazmocytozowego należą: 1) wyparcie układu erytroidalnego przez nowotworowe komórki plazmatyczne, 2) nieadekwatne do stopnia niedokrwistości wydzielanie EPO, 3) skrócenie czasu przeżycia krwinek czerwonych, 4) zaburzenia gospodarki żelazowej, 5) bezpośredni wpływ nowotworowych plazmocytozów na erytropoezę i 6) działanie prozapalnych cytokin. W świetle aktualnych badań szczególnie istotne wydają się dwie ostatnie przyczyny prowadzące do zahamowania proliferacji i dojrzewania szeregu erytroidalnego także u chorych bez dużego nacisku nowotworowego w szpiku.

Jak wspomniano poprzednio nowotworowe plazmocyty wykazują ekspresję FasL, który obok progresji choroby przyczynia się także w sposób istotny do rozwoju niedokrwistości powodując apoptozę erytroblastów [39]. Wykazano, że u pacjentów w stadium III szpiczaka plazmocytozowego z głęboką niedokrwistością odsetek komórek szpiczakowych Fas-L(+) i prekursorowych komórek erytroidalnych Fas(+) jest znacząco zwiększony w porównaniu z chorymi bez niedokrwistości lub chorymi z gammapatią monoklonalną o nieokreślonym znaczeniu (MGUS). W wyniku interakcji Fas-L(+) komórek szpiczakowych i Fas(+) erytroblastów komórki szeregu erytroidalnego ulegają apoptozie, co wykazano zarówno w warunkach *in vitro* podczas hodowli erytroblastów w obecności komórek szpiczakowych Fas-L(+) lub rozpuszczalnej postaci Fas-L, jak i *in vivo* u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytozowym [39]. W erytroblastach ulegających procesowi apoptozy wykazano znacznie zwiększoną liczbę aktywnych postaci kaspazy CPP32 (kaspaza 3) i FLICE (kaspaza 8), związanych z apoptozą indukowaną przez Fas, a także umiarkowaną aktywację kaspazy ICE (kaspaza 1), związanej z apoptozą indukowaną przez TNF-receptor. Kolejny mechanizm niedokrwistości w szpiczaku plazmocytozowym jest związany z obecnością TRAIL na monoklonalnych plazmocytach. Wykazano, że u chorych na szpiczaka z towarzyszącą niedokrwistością komórki plazmatyczne oprócz FasL wykazują również zwiększoną ekspresję TRAIL w porównaniu z chorymi na szpiczaka bez niedokrwistości oraz z chorymi z MGUS [38]. W obecności FasL(+)/TRAIL(+) plazmocytozów erytroblasty ulegają apoptozie, czego wynikiem jest niedokrwistość. W następstwie tego układ erytroidalny u pacjentów ze szpiczakiem i niedokrwistością jest ubogo reprezentowany w szpiku i składa się głównie z niedojrzałych erytroblastów i niewielkiej liczby dojrzałych erytroblastów, co jest wynikiem apoptozy we wczesnym stadium rozwoju. Natomiast u pacjentów bez anemii i u chorych z MGUS stwierdza się stosunkowo większą liczbę erytroblastów dojrzałych. Dane wskazujące na to, że złożliwe plazmocyty FasL(+)/TRAIL(+) promują apoptozę erytroblastów przez bezpośrednią cytotoksyczność zostały także potwierdzone przez wzrost FLICE (kaspaza 8) w niedojrzałych erytroblastach świeżo izolowanych od chorych ze szpiczakiem plazmocytozowym. Ponadto stwierdzono, że u pacjentów z ciężką anemią towarzyszą-

cą szpiczakowi czynnik transkrypcyjny GATA-1 niezbędny do przeżycia i różnicowania prekursorów erytroidalnych ulega niezwykle silnej negatywnej regulacji. Odkrycia te wskazują, że postępująca destrukcja układu erytroidalnego w agresywnym szpiczaku plazmocytozowym jest powodowana mechanizmem cytotoksycznym opartym na nadekspresji FasL i TRAIL w komórkach szpiczakowych. Również ekspresja receptorów śmierci (Fas, DR4, DR5) na erytroblastach jest zmieniona i istotnie wyższa w grupie chorych na szpiczaka z niedokrwistością w porównaniu z pacjentami bez tego powikłania.

Na istotną rolę układu Fas/FasL w rozwoju niedokrwistości wskazują także obserwacje poczynione w innych chorobach hematologicznych, między innymi w zespołach mielodysplastycznych, gdzie stwierdzono zwiększoną ekspresję Fas na komórkach CD34(+) [14].

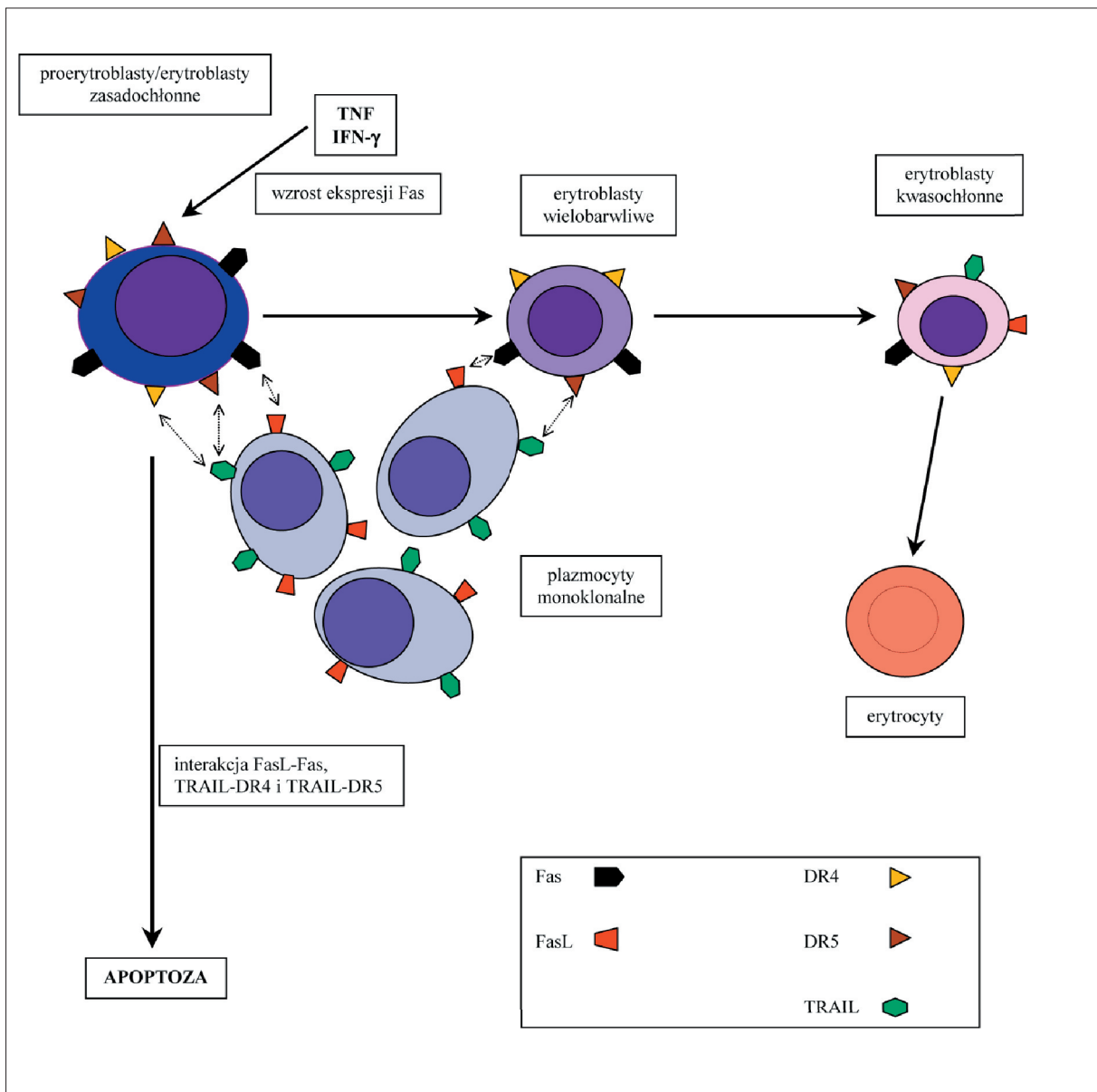
Wśród cytokin zaangażowanych w patogenezę szpiczaka plazmocytozowego największe znaczenie w rozwoju niedokrwistości wydają się mieć TNF i IFN- $\gamma$ . TNF jest cytokiną o pleiotropowych właściwościach i szerokim zakresie biologicznej aktywności. Dotychczas publikowano sprzeczne dane o jego działaniu, dotyczy to zwłaszcza jego wpływu na komórki hematopoetyczne. Opisano zarówno stymulujący jak i hamujący wpływ TNF na wielopotencjalne komórki progenitorowe [3,34], chociaż większość autorów skłania się do stwierdzeń o jego hamującym wpływie na układ czerwonekrwinkowy [19]. Korzystne działanie TNF zaobserwowano głównie w odniesieniu do komórek progenitorowych granulocytów-makrofagów (CFU-GM), których wzrost jest zależny również od IL-3, natomiast w tych samych stężeniach TNF hamuje proliferację erytroidalnych komórek progenitorowych, co wskazuje, że może on działać dwukierunkowo przy tym samym stężeniu [35]. Niekorzystny wpływ TNF na erytropoezę wykazano zarówno w warunkach hodowli *in vitro*, gdzie zaobserwowano zależne od dawki zahamowanie wzrostu ludzkich erytroidalnych komórek progenitorowych [1,29], jak i w eksperymentach na zwierzętach *in vivo* [1,19].

Interferon gamma w sposób zależny od dawki hamuje wzrost erytroidalnych komórek progenitorowych [5] i wykazuje synergizm z TNF [6]. Działanie IFN- $\gamma$  na erytroidalne komórki progenitorowe zwiększa ich wrażliwość na sygnały apoptotyczne, co odbywa się poprzez nasilenie ekspresji Fas na erytroblastach [8] oraz aktywację kaspazy 3 i 8 związanych z pobudzeniem układu Fas/FasL [7]. Ponadto wykazano, że IFN- $\gamma$  powoduje zmniejszenie liczby receptorów erytropoetynowych na erytroidalnych komórkach progenitorowych [42], a negatywne działanie IFN- $\gamma$  na erytropoezę jest znoszone przez EPO, prawdopodobnie w mechanizmie zmniejszenia ekspresji receptora IFN- $\gamma$  na CFU-E [28].

Uproszczony mechanizm patogenetyczny niedokrwistości w przebiegu szpiczaka plazmocytozowego przedstawiono na rycinie 2.

## PODSUMOWANIE

W regulacji fizjologicznej erytropoezy istotną rolę odgrywają procesy apoptozy i zaangażowane w ich indukowanie białka z rodziny TNF – FasL, Fas, TRAIL, DR4



**Ryc. 2.** Nieefektywna erytropoeza w szpiczaku plazmocytowym. Nowotworowe plazmocyty wykazują ekspresję FasL i TRAIL, które powodują apoptozę erytroblastów i przyczyniają się do rozwoju niedokrwistości. Interakcja FasL-Fas i TRAIL-DR4 i TRAIL-DR5 z erytroblastami powoduje apoptozę komórek erytroidalnych i w efekcie zahamowanie ich proliferacji i dojrzewania oraz niedokrwistość. TNF i IFN- $\gamma$ , których stężenie jest istotnie zwiększone w szpiczaku, nasilają ekspresję receptorów śmierci na erytroblastach powodując ich większą podatność na apoptozę

i DR5. Zwiększanie się ekspresji FasL i TRAIL na erytroblastach towarzyszące ich dojrzewaniu stanowi naturalny mechanizm regulacyjny o charakterze ujemnego sprzężenia zwrotnego. Jednocześnie nadmierne przekazywanie sygnałów apoptotycznych przez powyższe białka może prowadzić do rozwoju niedokrwistości. W szpiczaku plazmocytowym monoklonalne plazmocyty wykazujące ekspresję

FasL i TRAIL wywołują procesy apoptozy erytroblastów, co stanowi bardzo istotny mechanizm patogenetyczny niedokrwistości, oprócz niewystarczającego wytwarzania EPO. Jednocześnie duża ekspresja FasL i TRAIL na nowotworowych plazmocytach przyczynia się do unikania przez te komórki odpowiedzi ze strony układu immunologicznego i tym samym do progresji choroby

#### PIŚMIENNICTWO

[1] Akahane K., Hosoi T., Urabe A., Kawakami M., Takaku F.: Effects of recombinant human tumor necrosis factor (rhTNF) on normal human and mouse hemopoietic progenitor cells. *Int. J. Cell Cloning*, 1987; 5: 16–26

[2] Arends M.J., McGregor A.H., Wyllie A.H.: Apoptosis is inversely related to necrosis and determines net growth in tumors bearing constitutively expressed myc, ras and HPV oncogenes. *Am. J. Pathol.*, 1994; 144: 1045–1057

- [3] Backx B., Broeder L., Bot F.J., Lowenberg B.: Positive and negative effects of tumor necrosis factor on colony growth from highly purified normal human progenitors. *Leukemia*, 1991; 5: 66–70
- [4] Bellamy W.T., Richter L., Frutiger Y., Grogan T.M.: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res.*, 1999; 59: 728–733
- [5] Broxmeyer H.E., Lu L., Platzer E., Feit C., Juliano L., Rubin B.Y.: Comparative analysis of the influences of human gamma, alpha and beta interferons on human multipotential (CFU-GEMM), erythroid (BFU-E) and granulocyte-macrophage (CFU-GM) progenitor cells. *J. Immunol.*, 1983; 131: 1300–1305
- [6] Broxmeyer H.E., Williams D.E., Lu L., Cooper S., Anderson S.L., Beyer G.S., Hoffmann R., Rubin B.Y.: The suppressive influences of human tumor necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donors and patients with leukemia: synergism of tumor necrosis factor and interferon gamma. *J. Immunol.*, 1986; 136: 4487–4495
- [7] Dai C., Krantz S.B.: Interferon- $\gamma$  induces upregulation and activation of caspases 1, 3 and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells. *Blood*, 1999; 93: 3309–3316
- [8] Dai C., Price J.O., Brunner T., Krantz S.B.: Fas-ligand is present in human erythroid colony-forming cells and interacts with Fas induced by interferon- $\gamma$  to produce erythroid cell apoptosis. *Blood*, 1998; 91: 1235–1242
- [9] De Maria R., Testa U., Luchetti L., Zeuner A., Stassi G., Pelosi E., Riccioni R., Felli N., Samoggia P., Peschle C.: Apoptotic role of Fas/Fas-ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood*, 1999; 93: 796–803
- [10] De Maria R., Zeuner A., Eramo A., Domenichelli C., Bonci D., Grignani F., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Testa U., Peschle C.: Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, 1999; 401: 489–493
- [11] Di Raimondo F., Azzaro M.P., Palumbo G.A., Bagnato S., Guistolisi G., Floridia P.M., Sortino G., Guistolisi R.: Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. *Haematologica*, 2000; 85: 800–805
- [12] Durie B.G.M., Salmon S.E.: A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatments and survival. *Cancer*, 1975; 36: 842–854
- [13] Frassanito M.A., Silvestris F., Silvestris N., Cafforio P., Camarda G., Iodice G., Dammacco F.: Fas/Fas ligand (FasL)-deregulated apoptosis and IL-6 insensitivity in highly malignant myeloma cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 1998; 114: 179–188
- [14] Gersuk G.M., Beckham C., Loken M.R., Kiener P., Anderson J.E., Farrand A., Trout A.B., Ledbetter J.A., Deeg J.: A role of tumour necrosis factor alpha? Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.*, 1998; 103: 176–188
- [15] Gregoli P.A., Bondurant M.C.: The Roles of Bcl-XL and Apopain in the Control of Erythropoiesis by Erythropoietin. *Blood*, 1997; 90: 630–640
- [16] Griffith T.S., Wiley S.R., Kubin M.Z., Sedger L.M., Maliszewski C.R., Fanger N.A.: Monocyte-mediated Tumoricidal Activity via the Tumor Necrosis Factor-related Cytokine TRAIL. *J. Exp. Med.*, 1999; 189: 1343–1354
- [17] Itoh N., Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S., Sameshima M., Hase A., Seto Y., Nagata S.: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, 1991; 66: 233–243
- [18] Iwasaki T., Hamano T., Ogata A., Hashimoto N., Kitano M., Kakishita E.: Clinical significance of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, 2002; 116: 796–802
- [19] Johnson R.A., Waddelow T.A., Caro J., Oliff A., Roodman G.D.: Chronic exposure to Tumor Necrosis Factor *in vivo* preferentially inhibits erythropoiesis in nude mice. *Blood*, 1989; 74: 130–138
- [20] Jourdan M., Tarte K., Legouffe E., Brochier J., Rossi J.F., Klein B.: Tumor necrosis factor is a survival and proliferation factor for human myeloma cells. *Eur. Cytokine Netw.*, 1999; 10: 65–70
- [21] Kimura T., Sonoda Y., Iwai N., Satoh M., Yamaguchi-Tsukio M., Izui T., Suda M., Sasaki K., Nakano T.: Proliferation and cell death of embryonic primitive erythrocytes. *Experimental Hematology*, 2000; 28: 635–641
- [22] Klein B.: Growth factors in the pathogenesis of multiple myeloma. In: Multiple myeloma. Eds.: Gahrton G., Durie B., Arnold, 1996; 73–82
- [23] Klein B., Zhang X.G., Jourdan M., Content J., Houssia V.F., Aarden L., Piechaczyk M., Bataille R.: Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*, 1989; 73: 517–526
- [24] Klein B., Zhang X.G., Lu Z.Y., Bataille R.: Interleukin-6 in multiple myeloma. *Blood*, 1995; 85: 863–872
- [25] Koury M.J., Bondurant M.C.: Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science*, 1990; 248: 378–381
- [26] Koury M.J., Bondurant M.C.: Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells. *J. Cell. Physiol.*, 1988; 137: 65–74
- [27] Mariani S.M., Krammer P.H.: Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur. J. Immunol.*, 1998; 28: 973–982
- [28] Means R.T., Krantz S.B.: Inhibition of human erythroid colony-forming units by gamma interferon can be corrected by recombinant human erythropoietin. *Blood*, 1991; 78: 2564–2567
- [29] Murase T., Hotta T., Saito H., Ohno R.: Effect of recombinant human tumor necrosis factor on the colony growth of human leukemia progenitor cells and normal hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 1987; 69: 467–472
- [30] Muta K., Krantz S.B.: Apoptosis of human erythroid colony-forming cells is decreased by stem cell factor and insulin-like growth factor I as well as erythropoietin. *J. Cell. Physiol.*, 1993; 156: 264–271
- [31] Oyaizu N., Adachi Y., Hashimoto F., McCloskey T.W., Hosaka N., Kayagaki N., Yagita H., Pahwa S.: Monocytes express Fas ligand upon CD4 cross-linking and induce CD4+ T cells apoptosis: a possible mechanism of bystander cell death in HIV infection. *J. Immunol.*, 1997; 158: 2456–2463
- [32] Reed J.C.: Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*, 1997; 387: 773–776
- [33] Roldan E., Rodriguez C., Navas G., Parra C., Brieve J.A.: Cytokine network regulating terminal maturation of human bone marrow B cells capable of spontaneous and high rate Ig secretion *in vitro*. *J. Immunol.*, 1992; 149: 2367–2371
- [34] Rusten L.S., Jacobsen F.W., Lesslauer W., Loetscher H., Smeland E.B., Jacobsen S.E.: Bifunctional effects of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) on the growth of mature and primitive human hematopoietic progenitor cells: involvement of p55 and p75 TNF receptors. *Blood*, 1994; 83: 3152–3159
- [35] Rusten L.S., Jacobsen S.E.: Tumor necrosis factor (TNF)-alpha directly inhibits human erythropoiesis *in vitro*: role of p55 and p75 TNF receptors. *Blood*, 1995; 85: 989–996
- [36] Seidel C., Borset M., Turesson I., Abildgaard N., Sundan A., Waage A.: Elevated serum concentration of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma. *Blood*, 1998; 91: 806–812
- [37] Shima Y., Nishimoto N., Ogata A., Fujii Y., Yoshizaki K., Kishimoto T.: Myeloma cells express Fas antigen/APO-1 (CD95) but only some are sensitive to anti-Fas antibody resulting in apoptosis. *Blood*, 1995; 85: 757–764
- [38] Silvestris F., Cafforio P., Tucci M., Dammacco F.: Negative regulation of erythroblast maturation by Fas-L+/TRAIL+ highly malignant plasma cells: a major pathogenetic mechanism of anemia in multiple myeloma. *Blood*, 2002; 99: 1305–1313
- [39] Silvestris F., Tucci M., Cafforio P., Dammacco F.: Fas-L up-regulation by highly malignant myeloma plasma cells: role in the pathogenesis of anemia and disease progression. *Blood*, 2001; 97: 1155–1164
- [40] Sjak-Sha N.N., Vescio R.A., Berenson J.R.: Recent advances in multiple myeloma. *Curr. Opin. Hematol.*, 2000; 7: 241–246
- [41] Suda T., Nagata S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1994; 179: 873–879
- [42] Taniguchi S., Dai C.H., Price J.O., Krantz S.B.: Interferon- $\gamma$  Downregulates Stem Cell Factor and Erythropoietin Receptors But Not Insulin-Like Growth Factor-I Receptors in Human Erythroid Colony-Forming Cells. *Blood*, 1997; 90: 2244–2252
- [43] Vacca A., Ribatti D., Presta M., Minischetti M., Iurlaro M., Ria R., Albini A., Bussolino F., Dammacco F.: Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood*, 1999; 93: 3064–3073
- [44] Villunger A., Egle A., Marschitz I., Kos M., Bock G., Ludwig H., Geley S., Kofler R., Greil R.: Constitutive expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand on multiple myeloma cells: a potential mechanism of tumor-induced suppression of immune surveillance. *Blood*, 1997; 90: 12–20

- [45] Walker P.R., Saas P., Dietrich P.Y.: Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J. Immunol.*, 1997; 158: 4521–4524
- [46] Weiss M.J., Orkin S.H.: Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 9623–9627
- [47] Wiley S.R., Schooley K., Smolak P.J., Din W.S., Huang C.P., Nicholl J.K., Sutherland G.R., Smith T.D., Rauch C., Smith C.A.: Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995; 3: 673–682
- [48] Zamai L., Secchiero P., Pierpaoli S., Bassini A., Papa S., Alnemri E.S., Guidotti L., Vitale M., Zauli G.: TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood*, 2000; 95: 3716–3724
- [49] Zhang X.G., Bataille R., Widjenes J., Klein B.: Interleukin-6 dependence of advanced malignant plasma cell dyscrasias. *Cancer*, 1992; 69: 1373–1376