

LÉKAŘSKÁ FAKULTA
UNIVERZITY PALACKÉHO V OLOMOUCI
HEMATO-ONKOLOGICKÁ KLINIKA

**Analýza parametrů drah metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně a jejich vztah
k vybraným klinicko-laboratorním ukazatelům mnohočetného myelomu**

Dizertační práce

MUDr. Petra Krhovská

Olomouc

2022

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně a všechny zdroje informací, které jsem využila, jsou uvedeny v seznamu literatury a pramenů.

V Doloplazích dne 5.1.2022

.....
MUDr. Petra Krhová

Ráda bych touto cestou poděkovala všem, kteří mi byli nápomocni při psaní této dizertační práce.

Především bych chtěla upřímně poděkovat svému školiteli, doc. MUDr. et Mgr. Jiřímu Minaříkovi, PhD., za cenné rady a připomínky, odborné vedení, důslednost a především trpělivost.

Za pomoc taktéž děkuji všem členům Olomoucké myelomové skupiny, kteří mne uvedli do problematiky mnohočetného myelomu a bděli nad mými prvními „myelomovými“ krůčky.

Své sestře Radce za podporu a trpělivost. V neposlední řadě taktéž děkuji Andree a Evě, že mě nenechaly polevit. Plukovníkovi za to, že mi byl oporou.

Některé kapitoly byly podpořeny z grantů: ČR – RVO (FNOI, 00098892), IGA_LF_2021_001

Petra Krhovská

OBSAH

1. Předmluva
2. Přehled použitých zkratk
3. Souhrn
 - 3.1. Souhrn dizertační práce
 - 3.2. Přehled klíčových slov
4. Cíle dizertační práce
5. Úvod do řešené problematiky
 - 5.1. Charakteristika mnohočetného myelomu
 - 5.2. Epidemiologie
 - 5.3. Etiologie a patogeneze
 - 5.4. Klinické projevy
 - 5.5. Diagnostika mnohočetného myelomu
 - 5.6. Klasifikace a stážování
 - 5.7. Léčba mnohočetného myelomu
6. Myelomová kostní nemoc
 - 6.1. Fyziologický kostní metabolismus
 - 6.2. Etiologie a patogeneze myelomové kostní choroby
 - 6.3. Klinické projevy
 - 6.4. Diagnostika myelomové kostní choroby
 - 6.5. Léčba myelomové kostní choroby
7. Praktická část
8. Souhrn nálezů
9. Závěry dizertační práce
10. Literatura

Předmluva

Mnohočetný myelom (MM) je zhoubné onemocnění způsobené nekontrolovanou proliferací a akumulací patologicky změněných terminálně diferencovaných B lymfocytů (plazmatických buněk) s produkcí monoklonálního imunoglobulinu (MIG) detekovatelného v séru a/nebo v moči. [1]

Typickým projevem mnohočetného myelomu je přítomnost myelomové kostní nemoci (MKN). MKN je hlavní příčinou morbidity a mortality u pacientů s MM a má velký vliv na kvalitu života pacientů. V době diagnózy je detekována u ~80v% pacientů a ~20% z nich má přítomné patologické zlomeniny. [2, 3]

V průběhu onemocnění se osteolytické léze vyvinou až u ~90v% pacientů, nezdědka s dalšími komplikacemi. Přítomnost nových komplikací bývá označována jako tzv. skeletal related events (SRE) a zahrnuje: patologické fraktury, komprese míchy, rozvoj hyperkalcémie a nutnost ozařování či operačního zákroku. [4, 5]

Rozsah MKN je velmi heterogenní, kolísá od osteoporózy po difúzní postižení osteolytickými lézemi včetně patologických fraktur, které obvykle postihují dlouhé kosti a páteř. [2] Rozsah MKN typicky koreluje s prognózou; přítomnost patologické zlomeniny zvyšuje riziko smrti o více než 20 %. [6]

Výzkum zabývající se etiologií a patogenezí myelomové kostní nemoci proto v posledních letech nabývá na významu i s ohledem na možnosti nových cílených léčebných přístupů.

Cílem této práce je kromě shrnutí poznatků o myelomové kostní chorobě, a především zhodnocení přínosu vyšetření vybraných ukazatelů kostního metabolismu a parametrů mikroprostředí kostní dřeně.

1. Přehled použitých zkratk

ADC	Difúzní koeficient; Apparent Diffusion Coefficient
APRIL	Ligand indukující proliferaci
ASCT	Autologní transplantace periferních krvetvorných buněk
BAFF	Aktivační faktor B-buněk
BMP 2	Bone Morphogenetic Protein 2
BSF	Bisfosfonáty
CLO	Klodronat
CRAB	Hyperkalcémie, renální insuficience, anémie, kostní postižení
CT	Počítačová tomografie
DCE	Dynamické kontrastní vyšetření MR; Dynamic contrast enhanced
DKK 1	Dickkopf protein 1
DS	Durie-Salmon klasifikace
DW-MR	Zobrazení difuze pomocí magnetické rezonance
HGF	Hepatocytární růstový faktor
HGF	Hepatocytární růstový faktor
ICTP	Karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I
IL- 6	Interleukin-6
IL-11	Interleukin-11
IL-3	Interleukin-3

ISS	International staging system
LD-CT	Nízkodávková výpočetní tomografie
LDH	Laktátdehydrogenáza
MDE	Myeloma defining events
MGNV	Monoklonální gamapatie nejistého významu
MIP-1 α	Makrofágový zánětlivý protein 1 α
MIP-1 α	Zánětlivý makrofágový faktor 1 α
MKN	Myelomová kostní nemoc
MKN	Myelomová kostní nemoc
MM	Mnohočetný myelom
MR	Magnetická rezonance
NDMM	Nově diagnostikovaný mnohočetný myelom
OB	Osteoblasty
OC	Osteoklasty
OPG	Osteoprotegerin
OS	Overall survival = celkové přežití
PAM	Pamidronat
PET/CT	Pozitronová emisní tomografie s výpočetní tomografií
PFS	Progression free survival
PINP	Terminalní propeptid prokolagenu typu I

PTH	Parathormon
RANK	Aktivátor receptoru nuklearního faktoru kappa B
RANKL	Ligand aktivátoru receptoru nuklearního faktoru kappa B
R-ISS	Revised International staging systém
RT	radioterapie
RTG	Konvenční radiografie
SMM	Doutňající myelom
SRE	Skletal related events
SYN-1	Syndekan-1
TGF	Taktor transformující růst
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TRAP	Tartát rezistentní kyselá fosfatáza
TTP	Time to progression

VCAM-1	Adhezní molekuly cévních buněk 1
VLA-4	Very late antigen 4
WNT	Wingless dráha
ZA	Kyselina zoledronová
β -2-m	β -2-mikroglobulin

3 Souhrn

3.1 Souhrn dizertační práce

Předložená práce se zabývá problematikou posuzování parametrů mikroprostředí kostní dřeně a kostních osteomarkerů u pacientů s mnohočetným myelomem (MM). V teoretické části je zachycen současný přehled informací o epidemiologii, klinických obtížích, diagnostice a léčbě MM.

Větší pozornost je věnována především charakteristice myelomové kostní nemoci (MKN), její etiopatogenezi, diagnostice a léčbě. Podstatnou část tvoří souhrn současných poznatků o regulačních mechanismech fyziologického kostního metabolismu a následně poukázání patogenezi MKN se zaměřením na funkci jednotlivých drah podílejících se na rozvoji osteolytického postižení.

Část hodnotící klinickou diagnostiku rozsahu MKN je zpracována především s důrazem na zobrazovací techniky. Je rozvedena základní charakteristika jednotlivých technik, zvážení jejich přínosů a naopak limitací. Blíže jsou popsány tři nejdůležitější techniky, tedy pozitronová emisní tomografie s výpočetní tomografií (positron emission tomography/computed tomography, PET/CT), magnetická rezonance (MR) a nízkodávková výpočetní tomografie (low-dose computed tomography, LD-CT).

Část hodnotící léčbu MKN popisuje léčebné možnosti, které jsou v podmínkách České republiky k dispozici. Zabývá se farmakoterapií, chirurgickou léčbou i radioterapií. Jednotlivé modality jsou podrobněji rozvedeny s důrazem na recentní doporučení. Jsou taktéž nastíněny nežádoucí účinky jednotlivých přístupů a jiná omezení použití. Blíže jsou popsány léčebné preparáty používané v rutinní praxi.

Vlastní praktická část dizertační práce je tematicky rozdělena do čtyř samostatných kapitol. V první části věnující se vztahu mezi ukazateli signálních drah myelomové kostní nemoci a rozdílnosti hladin u nemocných s aktivním mnohočetným myelomem, s doutnajícím myelomem (SMM) a s monoklonální gamapatií nejasného významu

byla prokázána významná korelace sérových hladin vybraných ukazatelů a aktivitou onemocnění. U nemocných s MM byly oproti SMM a MGNV zjištěny signifikantně vyšší hladiny těchto ukazatelů: hepatocytární růstový faktor (HGF), makrofágový zánětlivý protein 1 α (MIP-1 α), syndekan-1 (SYN-1), Dickkopf protein-1 (DKK-1) a annexin A2. Tento vztah naznačuje potenciální přínos k odlišení počátku progresse onemocnění z MGNV do aktivního mnohočetného myelomu či z doutnajícího myelomu do myelomu symptomatického.

Druhá část popisuje vztah sérových hladin vybraných ukazatelů MKN a přínos zobrazovacích vyšetření. Byla prokázána signifikantní korelace mezi sérovými hladinami karboxyterminálního telopeptidu kolagenu typu I (ICTP) a rozsahem onemocnění detekovaným celotělovou magnetickou rezonancí (WB-MR). Rozsáhlejší strukturální změny zachytitelné i pomocí konvenční radiografie korelovaly se sérovými hladinami ICTP, N-terminalního propeptidu prokolagenu typu I (PINP) a osteopontinu. V rámci srovnání jednotlivých zobrazovacích technik byla popsána největší výtěžnost u WB-MR a též u LD-CT, které zachytily podstatně rozsáhlejší změny oproti vyšetření RTG, v některých případech dokonce nebyly diagnostické změny podchytitelné konvenční radiografií vůbec.

Cílem třetí kapitoly bylo posoudit možný vztah sérových hladin vybraných markerů metabolismu kostí a mikroprostředí kostní dřeně s potenciálně podmiňujícími cytogenetickými změnami. Analýza souboru pacientů ukázala, že některé cytogenetické změny, zejména del*RB1*, t(14;16) a 1q21gain, ovlivňují složky cytokinové sítě u mnohočetného myelomu.

V poslední kapitole byl zkoumán vliv sérových hladin ukazatelů MKN k prognóze nemocných s aktivním MM. Iničiální analýza prokázala signifikantní korelace mezi dobou přežití bez progresse (progression free survival, PFS) a sérovými hladinami ukazatelů signálních drah myelomové kostní nemoci u HGF a MIP-1 α . Jedinci s vysokými sérovými hladinami HGF a MIP-1 α měli horší medián PFS než nemocní s nižšími hladinami (M 19 vs 45m; $p = 0,047$) Nebyl prokázán vztah mezi ukazateli

přežití a expresí vybraných ukazatelů hodnocených přímo na plazmatických buňkách. Nemocní s vysokými hladinami MIP-1 α (22,7 pg/ml) v séru měli signifikantně kratší medián PFS oproti nemocným s hladinou < 22,7 pg/ml (M 16m vs 67m, p = 0,0001). Z předložených analýz vyplývá, že hodnocení kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně u nemocných s plazmocelárními dyskraziemi má praktický význam při hodnocení aktivity onemocnění, odlišení potenciálně maligních stavů od již aktivního onemocnění a rovněž rozsahu kostního onemocnění. Výsledky mají také slibný potenciál k odlišení nemocných s časnou formou kostní nemoci.

Summary

The presented thesis is aimed at the assessment of the parameters of bone marrow microenvironment and markers of bone turnover in patients with multiple myeloma (MM). The theoretical part provides current overview on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and treatment of MM.

The main part of the theoretical introduction focuses on the characteristics of myeloma bone disease (MBD), its etiopathogenesis, diagnosis and treatment. A substantial part is a summary of current knowledge about the regulatory mechanisms of physiological bone metabolism, and subsequent pathogenesis of MBD with a focus on the function of individual signaling pathways involved in the development of MBD.

The clinical diagnostics of MBD is aimed at the description of imaging techniques.

The characteristic features of individual imaging methods are described including their contributions and limitations. Three major imaging techniques are described in detail, positron emission tomography with computed tomography (PET/CT), magnetic resonance imaging (MRI) and low-dose computed tomography, (LD-CT).

The part evaluating the treatment of MBD describes the treatment options that are available in the Czech Republic. We assess all, pharmacotherapy, surgical treatment and radiotherapy. The individual modalities are described in detail with an emphasis on recent recommendations. Pitfalls of each approach and other limitations are also outlined. Therapeutic drugs used in routine practice are described in more detail.

The practical part of the thesis is divided into four separate chapters. The first part is dealing with the relationship between myeloma bone disease signaling pathways' parameters in patients with active multiple myeloma, smoldering myeloma (SMM) and monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). A significant correlation of serum levels of several serum cytokines and disease activity was demonstrated. Significantly higher levels of the following indicators were found in patients with MM compared to SMM and MGUS: hepatocyte growth factor (HGF), macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α), syndecan-1 (SYN-1), Dickkopf

protein-1 (DKK-1) and Annex A2. This relationship suggests potential contribution of these cytokines for the differentiation of initial stage of the transformation from MGUS to active multiple myeloma or from smoldering myeloma to symptomatic multiple myeloma.

The second part describes the relationship between serum levels of selected MBD parameters and the benefits of individual imaging techniques. We found a significant correlation between serum levels of carboxyterminal telopeptide collagen type I (ICTP) and the extent of disease detected by whole body magnetic resonance imaging (WB-MRI). Larger structural changes detectable by conventional radiography significantly correlated with serum levels of ICTP, N-terminal procollagen type I propeptide (PINP) and osteopontin. Within the comparison of individual imaging techniques, the highest yields were described for WB-MR, which captured significantly larger changes compared to X-ray examination, in some cases the diagnostic changes were not detectable by conventional radiography at all.

The aim of the third chapter was to assess the possible relationship between serum levels of selected markers of bone metabolism and bone marrow microenvironment with cytogenetic changes. Analysis of the patient population showed that some cytogenetic changes, especially delRB1, t (14; 16) and 1q21 gain, affect cytokine network components in multiple myeloma.

The last chapter examined the impact of serum levels of MBD parameters on the prognosis of patients with active MM. The initial analysis showed a significant correlation between progression free survival (PFS) and serum levels of hepatocyte growth factor (HGF) and macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α). Patients with high serum levels of HGF and MIP-1 α had a worse outcomes with lower median PFS than patients with lower (normal) levels (M 19 vs 45m; $p = 0.047$). Patients with high serum MIP-1 α levels (22.7 pg / ml) had a significantly shorter median PFS compared to patients with < 22.7 pg / ml (M 16m vs 67m, $p = 0.0001$).

The presented analyses show that the evaluation of serum levels of the parameters of bone metabolism and bone marrow microenvironment in patients with plasma cell dyscrasias is of practical importance, and is helpful in the evaluation of the disease activity. Some of the selected parameters have promising potential to differentiate patients with early evolution of myeloma bone disease.

3.2 Přehled klíčových slov

Mnohočetný myelom – monoklonální gamapatie nejasného významu – doutnající myelom – myelomová kostní choroba – mikroprostředí kostní dřeně – zobrazovací vyšetření – prognóza

4. Cíle dizertační práce

- 4.1. Zhodnocení přínosu stanovení sérových hladin vybraných markerů kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně ve srovnání s aktivitou mnohočetného myelomu
- 4.2. Zhodnocení přínosu stanovení ukazatelů signálních drah myelomové kostní nemoci a jejich korelace s rozsahem onemocnění hodnoceného pomocí zobrazovacích vyšetření
- 4.3. Analýza parametrů kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně a jejich korelace s cytogenetickými změnami
- 4.4. Zhodnocení přínosu stanovení ukazatelů signálních drah myelomové kostní nemoci a jejich vliv na prognózu nemocných s mnohočetným myelomem

5. Úvod do řešené problematiky

5.1. Charakteristika mnohočetného myelomu

Mnohočetný myelom (MM) patří mezi maligní plazmocelulární dyskrázie. Je charakterizován proliferací a akumulací neoplasticky transformovaných plazmatických buněk (terminálně diferencované B-lymfocyty) s produkcí monoklonálního imunoglobulinu (MIG) a/nebo jeho částí (volných lehkých řetězců) detekovatelných v séru a/nebo v moči. Diagnostika aktivního onemocnění je založena na přítomnosti $\geq 10\%$ klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni spolu s přítomností tzv. MDE (myeloma defining events). MDE zahrnují projevy orgánového postižení CRAB (hyperkalcémie, renální insuficience, anémie, kostní postižení) a/nebo přítomnost alespoň jednoho tzv. biomarkeru malignity, tj. přítomnost $\geq 60\%$ klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni, poměr dominantního a nedominantního lehkého řetězce v séru ≥ 100 a přítomnost > 1 lytické léze (> 5 mm) při zobrazování magnetickou rezonancí (MR). [1]

5.2 Epidemiologie

Mnohočetný myelom je 2. nejčastější hematologická malignita. Incidence se v roce 2014 pohybovala kolem 4,8 nových případů na 100 000 obyvatel. V roce 2014 podle poslední velké epidemiologické analýzy bylo v České republice (ČR) celkem nově diagnostikováno 504 případů. Ve stejném roce byla prevalence nemocných v ČR 1982 nemocných. [7]

5.3 Etiologie a patogeneze

Etiologie mnohočetného myelomu není ani v dnešní době zcela objasněná. Lze předpokládat, že onemocnění má multifaktoriální etiologii v důsledku nahromadění nepříznivých vlivů v průběhu života. V některých pracích byl prokázán vliv faktorů zevního prostředí, jako jsou herbicidy, insekticidy či organická rozpouštědla. [8, 9] Zkoumal se účinek faktorů životního stylu jako je obezita, způsob stravování, kouření

či alkohol. Výsledky však nejsou zcela jednoznačné. Ač podrobně zkoumán, dědičný výskyt až na ojedinělá jednotlivá sdělení, nebyl pozorován. [10]

K ozřejmění patofyziologie vzniku mnohočetného myelomu je nutno pochopit fyziologii maturace a diferenciaci B-lymfocytů, prekurzorů plazmatických buněk. Nezralé B-lymfocyty se po vycestování z kostní dřeně zahnízdí v germinálních centrech lymfatických uzlin. Zde vyčkávají na antigenní stimul, na jehož pokyn tvoří specifické protilátky. Na základě sekvenování variabilní oblasti imunoglobulinového těžkého řetězce (IgH) myelomových buněk se první pro-onkogenní inzult odehrává právě v germinálním centru, pravděpodobně během procesů somatické hypermutace. [11] Bylo zjištěno, že pacienti s MGNV a SMM nesou shodně tyto úvodní mutace IgH, což naznačuje, že jsou nezbytné, avšak nikoliv dostatečné k malignizaci plazmatických buněk. Další mutace vedoucí ke vzniku typických patologických plazmocytů již probíhají v kostní dřeni. Další důležitou úlohu mají adhezivní molekuly v patologii diferenciaci myelomových buněk. [12] Myelomové buňky exprimují specifický receptor pro interleukin-6 (IL-6), což je hlavní faktor růstu a přežití MM buněk. Interleukin-6 je produkován buňkami v mikroprostředí kostní dřeně. [13] Poté dochází k aktivaci stromálních buněk a extracelulární matrix, které poté produkují další cytokiny (IL-6, TNF- α), které následně vedou k další diferenciaci a adhezi nádorových buněk. Jsou tedy důležité pro zrání, migraci a růst myelomových buněk. [12] Postupně dochází k akceleraci proliferace a akumulace patologických plazmocytů v kostní dřeni a následně klinické manifestaci nemoci.

5.4 Klinické projevy

Klinické projevy mnohočetného myelomu můžeme rozdělit do několika skupin podle postižené orgánové soustavy:

5.4.1 Postižení kostní dřeně

Zvýšenou proliferací klonálních plazmocytů dochází k útlaku ostatních řad manifestující se především jako normocytární, normochromní anémie, méně často

pak leukopenie či trombocytopenie. Další, méně častým symptomem bývají protrahované infekce. [14]

5.4.2 Postižení skeletu

Až 80% pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem přichází s bolestí zad. Rozsah postižení často kolísá od osteoporózy až po patologické fraktury obratlů s míšním útlakem. [3] Blíže viz kapitola 6.

5.4.3 Postižení ledvin

Poškození ledvin je v určité míře přítomno až u 20-50% nemocných, z toho přibližně 10% vyžaduje hemodialýzační podporu. [15] Hlavní příčinou je vznik tzv. odliktové nefropatie způsobené ukládání odliktů volných lehkých řetězců, které reagují s Tamm-Horsfallovým proteinem v distálních tubulech ledvin. Celý tento proces vede k rozvoji akutní tubulární nekrózy. [16] Alterace renálních parametrů má i prognostický význam. Bylo prokázáno, že přítomnost renální insuficience je spojena s horší léčebnou odpovědí, a tedy i kratším přežitím nemocných. [17]

5.4.3.1 Postižení vyplývající z vysoké hodnoty paraproteinu

Hyperviskózní syndrom je fenomén vznikající v důsledku zvýšené viskozity krve, v důsledku vysokých hladin paraproteinu. Viskozita jako taková má vliv především na průtok krve kapilárami. Při vysokých hladinách paraproteinu (nad 20 - 30g u IgM subtypu, 40-50 g/l u IgG a nad 70g/l u IgA) dochází ke stagnaci krve v mikrocirkulaci a ke zhoršenému prokrvení orgánů s následnou ischemií. [18, 19]

5.5 Diagnostika mnohočetného myelomu

5.5.1 Diagnostická kritéria

Zásadní v diagnostice monoklonálních gamapatií je odlišení mnohočetného myelomu v symptomatické či doutnající fázi, od jejich premaligní fáze, monoklonální gamapatie nejasného významu (MGNV) či jiných plazmocelulárních dyskrázií (AL amyloidóza, Waldenströмова makroglobulie).

V roce 2014 byla vydána nová, revidována kritéria pro diagnostiku mnohočetného myelomu. [1] Jejich shrnutí je v Tab 1. Další diagnostická kritéria vznikla v roce 2021 (ESMO) týkající se především léčby a nijak nemění doporučení pro diagnostiku z roku 2014. [20]

I nadále zůstává nejdůležitějším bodem stanovení přítomnosti klonálních plazmocytů v kostní dřeni. V případě MM je stěžejní průkaz ≥ 10 % plazmatických buněk či histologický verifikovaný plazmocytom. Nově se již k těmto klasickým diagnostickým kritériím přidává potvrzení klonality na podkladě kappa či lambda restrikce. [1] Jsou také zohledněny nejnovější poznatky na poli zobrazovacích vyšetření (viz Tab. 1), kdy byla zařazena možnost průkazu osteolytických lézí pomocí CT, PET/CT či MRI.

Tab. 1 Diagnostická kritéria mnohočetného myelomu [21, 22]

<p>Počet klonálních ¹plazmatických buněk v kostní dřeni $\geq 10\%$ nebo biopticky potvrzený kostní nebo extramedulární plazmocyty a přítomnost jedné nebo více následujících skutečností s myelomem souvisejících (MDE = „myeloma defining events“):</p> <ul style="list-style-type: none">• známky poškození orgánů nebo tkání podmíněné proliferací plazmatických buněk:• hyperkalcémie: koncentrace sérového Ca $> 0,25$ mmol/l (1 mg/dl) vyšší než horní limit normálního rozmezí nebo $> 2,75$ mmol/l (11 mg/dl)• renální insuficience: snížení clearance kreatininu < 40 ml/min (= 0,67 ml/s) nebo koncentrace sérového kreatininu > 177 μmol/l (2 mg/dl)• anémie: koncentrace hemoglobinu > 20 g/l nižší než dolní limit normálního rozmezí nebo < 100 g/l• kostní postižení: jedno nebo více osteolytických ložisek na RTG skeletu, CT nebo PET/CT ²
<p>jedna nebo více z následujících známek maligního procesu:</p> <ul style="list-style-type: none">• zmnožení klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni $\geq 60\%$• poměr postižených/nepostiženým volným řetězcům v séru ≥ 100 ³• > 1 ložisko při vyšetření pomocí MR ⁴
<p>1 Klonalita by měla být stanovena pomocí průkazu κ/λ restrikce lehkých řetězců při vyšetření pomocí průtokové cytometrie, imunohistochemie nebo imunofluorescence, počet plazmatických buněk by měl být přednostně stanoven z biopsie kostní dřene. V případě rozdílu v procentuálním zastoupení plazmatických buněk zjištěném v aspirátu a bioptickém vzorku by měla být použita vyšší hodnota.</p> <p>2 Pokud je počet klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni $< 10\%$, pak je nutná přítomnost více než jednoho ložiska k odlišení od solitárního plazmocyty s minimálním postižením kostní dřene.</p>

3 Při použití stanovení pomocí metody Freelite© (The Binding Site, Birmingham, UK).
4 Velikost ložiska musí být minimálně 5 mm.

V roce 2014 došlo ke změně názvosloví, kdy asymptomatická fáze myelomu byla „staronově“ pojmenována doutnající („smoldering“) myelom, viz Tab 2.

Tab.2 Revidovaná diagnostická kritéria „smoldering“ (doutnajícího, asymptomatického) mnohočetného myelomu* [1, 22]

Koncentrace monoklonálního proteinu v seru (IgG nebo IgA) ≥ 30 g/l
nebo ≥ 500 mg/24hod v moči
a/nebo počet klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni 10–60 %
Nepřítomnost výše uvedených skutečností souvisejících s myelomem
*Pro diagnózu je nutné splnění obou následujících kritérií.

5.6 Klasifikace a stážování

Mimo stanovení diagnózy je nedílnou součástí algoritmu vyšetření i zhodnocení míry postižení organismu mnohočetným myelomem. Cílem je rozpoznání potenciálně rizikových pacientů a má tedy i prognostický význam.

Nejstarším a stále (byť spíše okrajově) užívaným stážovacím systémem je klasifikace dle Durie- Salmona (D-S) (Tab.3) z roku 1975. Rozděluje pacienty do stádia I-III dle rozsahu nádorové masy a odráží i pokročilost onemocnění s postižením orgánových systémů (podle anémie, renální insuficience, hyperkalcémie a míry kostního postižení). [23]

Tab. 3 Durie-Salmon klasifikace [22, 23]

I. Stadium	Jsou splněny všechny níže uvedené podmínky:	Masa nádorových buněk:
------------	---	------------------------

	<p>koncentrace Hb > 100 g/l</p> <p>koncentrace Ca < 3 mmol/l</p> <p>normální kostní struktura anebo solitární kostní ložisko</p> <p>plazmocytomu</p> <p>relativně nízká koncentrace M-Ig:</p> <p>a) M-IgG < 50 g/l, b) M-IgA < 30 g/l, c) exkrece lehkých řetězců v moči < 4 g/24 hodin.</p>	< 0,6 x 10 ¹² /m ²
II. Stadium	Nejsou splněny podmínky prvního ani třetího stadia.	0,6–1,2 x 10 ¹² /m ²
III. Stadium	<p>Je splněna alespoň jedna z následujících podmínek:</p> <p>koncentrace hemoglobinu < 85 g/l</p> <p>zvýšena koncentrace Ca > 3 mmol/l</p> <p>pokročile postižení skeletu s mnohočetnými osteologickými ložisky</p> <p>a/nebo zlomeninami</p> <p>vysoké koncentrace M-Ig:</p> <p>a) M-IgG > 70 g/l, b) M-IgA > 50 g/l</p> <p>c) vyloučení > 12 g lehkých řetězců moče za 24 hodiny.</p>	> 1,2 x 10 ¹² /m ²
<p>Subklasifikace:</p> <p>A – kreatinin < 177 μmol/l (2 mg/ml)</p> <p>B – renální insuficience s retencí dusíkatých látek, kreatinin > 177 μmol/l</p>		

Mladší a ve srovnání s předchozí klasifikací také mnohem jednodušší je International staging system (ISS), který pochází z roku 2003. ISS hodnotí pouze dva parametry – hodnoty albuminu a β -2-mikroglobulinu (β -2-m), jenž do jisté míry reflektují metabolismus nádorové masy a tedy i aktivitu onemocnění. (Tab. 4) ISS má lepší prognostický potenciál jak u pacientů léčených konvenční léčbou, tak u autologně transplantovaných nemocných. [24]

Tab. 4 Mezinárodní prognostický index (ISS) pro mnohočetný myelom [24]

Klinické stadium	Beta2-mikroglobulin (mg/l)	albumin (g/l)
I	< 3,5 a současně	≥ 35
II	<3,5 a současně	<35
	nebo 3,5 – 5,5	
III	> 5,5	

V roce 2015 došlo k rozšíření ISS systému o hodnoty sérové koncentrace laktátdehydrogenázy (LDH) a přítomnost rizikových cytogenetických změn na nový model – Revised International staging system (R-ISS), (Tab. 5). [25]

Tab. 5 Revidovaný mezinárodní prognostický index (R-ISS) mnohočetného myelomu [22, 25]

R-ISS stadium	Kritéria
I	ISS stadium I a standardně riziková cytogenetika při vyšetření iFISH a normální koncentrace LDH
II	Nejsou splněna kritéria R-ISS I ani III
III	ISS stadium III a současně vysoce rizikové cytogenetické změny při vyšetření iFISH nebo zvýšené LDH
Vysoce rizikové cytogenetické změny – přítomnost del(17p) a/nebo translokace t(4;14) a/nebo translokace t(14;16) při iFISH; standardní riziko = nebyla prokázána žádná z uvedených změn.	

5.7 Léčba mnohočetného myelomu

Mnohočetný myelom je v současnosti stále považován za nevléčitelné onemocnění, byť se stále se zlepšujícími léčebnými možnostmi. Průběh onemocnění můžeme ovlivnit volbou správných léčebných i podpůrných postupů, kterými můžeme dosáhnout příznivé léčebné odezvy a také zlepšit kvalitu života nemocných. Vývoj MM je charakterizován střídáním období remise a relapsu/progrese. Období mezi jednotlivými obdobími se obvykle zkracuje, až onemocnění dospěje do pozdní, refrakterní fáze. [26]

V posledních letech došlo k prudkému rozvoji léčby mnohočetného myelomu s využitím nových léků s biologickým mechanismem účinku. Cílem terapie v současnosti již není pouhé dosažení kompletní remise, ale ideálně vymizení tzv. minimální zbytkové choroby (minimal residual disease, MRD) s dosažením tzv. MRD negativity. Hloubka léčebné odezvy má zásadní vztah prognóze nemocného. Čím hlubší odezvy je dosaženo, tím delší je obvykle doba přežití. [27].

V současné době můžeme volit mezi dvěma základními přístupy. U mladších nemocných v dobrém celkovém stavu, bez významných komorbidit indikujeme indukční terapii s následným podáním vysokodávkované léčby a podporou autologní transplantací periferních krvetvorných buněk (ASCT). U rizikových pacientů je doporučena tzv. tandemová ASCT [28, 29] Starší nemocní, kteří nesplňují kritéria pro autologní transplantaci, mohou být léčeni obdobným režimem, ASCT pak nahrazuje delší doba kombinované terapie. [30, 31]

Současné protokoly používají sekvenční terapii, která obsahuje samotnou indukci (obvykle kombinace dexametazonu a 2 nových léků), následovanou vysokodávkovanou chemoterapií (HD-MEL) s podporou ASCT a udržovací terapií lenalidomidem. [32]

V minulosti hojně užívaná „konvenční chemoterapie“ je v současné léčbě MM používána jen okrajově a v nízké dávce u jedinců, kteří nejsou kandidáty moderních

léků. Do popředí se dostávají především biologické působky, jejichž kombinace je nyní standardem terapie jak u nemocných vhodných k ASCT, tak i nemocných, kteří ASCT podstoupit nemohou. Kombinace nových léků jsou zařazovány v dalších liniích léčby. Nejčastěji se používají kombinace s inhibitory proteazomu (bortezomib, ixazomib, carfilzomib), imunomodulačními léky – IMiDy (thalidomid, lenalidomid, pomalidomid), kortikoidy a nově též monoklonálními protilátkami – MoAb (daratumumab, elotuzumab, isatuximab). [33]

6. Myelomová kostní nemoc

Myelomová kostní nemoc (MKN) je hlavní příčinou morbidity a mortality u pacientů s MM a má tíživý dopad na kvalitu života pacientů. V době diagnózy je MKN detekována u ~ 80 % pacientů a přibližně 20 % z nich má patologické zlomeniny. [2, 3] V průběhu onemocnění se u přibližně 90 % pacientů objeví osteolytické léze, které jsou často problematizovány tzv. kostními komplikacemi (skletal related events - SRE). Mezi SRE patří především zlomeniny, komprese míchy a hyperkalcémie. [4, 5] Rozsah MKN je velmi heterogenní, kolísá od osteoporózy až po difúzní postižení patologickými zlomeninami postihujícími obvykle dlouhé kosti a páteř. [2] Rozsah MKN obvykle koreluje s prognózou; přítomnost patologické zlomeniny zvyšuje riziko úmrtí o více než 20%. [6]

6.1. Fyziologický kostní metabolismus

Fyziologický kostní metabolismus je neustále probíhající proces skládající se z novotvorby a resorpce kostí. Homeostáza je zabezpečena rovnováhou mezi polem osteocytů, osteoklastů a osteoblastů a je ovládána řadou cytokinů a chemokinů. Normální kost se skládá z 90 % z osteocytů, zatímco osteoklasty a osteoblasty jsou přítomny pouze v 5%. [34] Osteocyty tvoří především zásobárnu kostních buněk a po většinu svého života zůstávají biologicky neaktivní a při destrukci neinterferují s novotvorbou kostí.

Buňky odpovědné za resorpci kostí se nazývají osteoklasty (OC). OC se vyvíjejí z monocytů a produkují několik cytokinů; nejdůležitější z nich jsou: tartrát rezistentní kyselá fosfatáza (TRAP), karboanhydráza a několik katepsinů, např. katepsin K, původce osteolýzy. [35, 36]

Osteoklastogeneze je řízena především cestou aktivátoru receptoru nukleárního faktoru kappa B (RANK), jeho ligandu (RANKL) a osteoprotegerinu (OPG). [6] Tato dráha je hlavní cestou diferenciaci a maturace osteoklastů. RANK je transmembránový signální receptor umístěný na povrchu prekurzoru OC, je produkován zralými OC, jejich prekurzory a prekurzory chondrocytů. [37, 38] RANKL, tedy jeho ligand, je exprimován OB, stromálními buňkami kostní dřevě a také aktivovanými T-lymfocyty. Po navázání ligandu RANKL na receptor RANK probíhající na prekurzorech osteocytů dochází k indukci diferenciaci a aktivaci osteoklastů. [37] Osteoprotegerin je produkován stromálními buňkami kostní dřevě a osteoblasty a antagonizuje účinek RANKL. OPG se váže na jeho receptor RANK a interferuje s interakcí RANK/RANKL, čímž blokuje diferenciaci osteoklastů. [39] Ve zdravé kosti jsou RANK/RANKL a OPG v rovnováze a jsou zodpovědné za adekvátní zrání a blokádu osteoklastů.

Další dráhou zapojenou do aktivace osteoklastů je dráha makrofágového zánětlivého proteinu 1 α (MIP-1 α). MIP-1 α je cytokin patřící do rodiny chemokinů RANTES. [40] Jedná se o chemotaktický faktor pro zánětlivé buňky [35, 41] a jeho hlavní funkcí je migrace a adheze těchto buněk. [41] MIP-1 α také potencuje účinek RANK upevněním vazby ligandu vedoucí k aktivaci osteoklastů. [42, 43]

Na regulaci osteoklastogeneze se podílejí i osteoblasty tím, že produkují OPG i RANKL. [44]

Osteoblasty (OB) jsou mononukleární buňky pocházející z mezenchymálních kmenových buněk. [45, 46] Hlavním posláním OB je novotvorba kostí. Samotný vznik a zrání OB je řízen systémovými a lokálními faktory, jako jsou např. parathormon (PTH) či fibroblastový růstový faktor (FGF). [42] Významným regulátorem je

především dráha „wingless“ (Wnt). [47] Tato dráha má dvě části, kanonickou a nekanonickou. Obě dvě části Wnt dráhy mají jak pro-osteogenní tak pro-adipogenní aktivitu. U kanonické dráhy se váží Wnt proteiny na povrch bílkovin patřících do skupiny tzv. Frizzled proteinů. Spuštěním této kaskády dochází k fosforylaci β -kateninu, který stimuluje diferenciaci osteoblastického prekursoru na osteoblasty. [48] Tento proces je regulován (blokován) sklerostinem a proteinem Dickkopf 1 (DKK 1). [34] DKK 1 tak působí jako regulátor osteoblastogeneze, neboť blokuje kanonickou Wingless dráhu. [49, 50] Role nekanonické dráhy Wnt v biologii kostního metabolismu není dosud dostatečně vysvětlena. Někteří autoři popisují vliv nekanonické dráhy na zvýšení tvorby osteoklastů potenciací exprese RANK v prekurzorech osteoklastů. [51, 52]

Dalším činitelem zapojeným do homeostázy kostního metabolismu je parathormon (PTH). PTH zvyšuje počet a aktivitu osteoklastů potenciací účinku dráhy RANK/RANKL. [42, 44] Jeho hlavním mechanismem účinku je snížení produkce OPG a zvýšení poměru RANKL/OPG v osteoblastech, což vede k vystupňované osteoklastogenezi. [53, 54]

6.2. Etiologie a patogeneze myelomové kostní choroby

U myelomové kostní nemoci je porušena rovnováha mezi kostní novotvorbou a osteoresorpcí. Základním patogenetickým mechanismem je vystupňování osteoklastogeneze a/nebo potlačení osteoblastogeneze. Tato nerovnováha vede k rozvoji myelomové kostní nemoci s patognomickými osteolytickými ložisky. [55] Buňky myelomu zvyšují produkci faktorů aktivujících osteoklasty, a naopak snižují hladiny faktorů inhibujících OC. Současně se podílejí na inhibici maturace osteoblastů.

6.2.1. Potenciace osteoklastogeneze

Hlavním mechanismem rozvoje myelomové kostní choroby je aktivace osteoklastů.

[41] Některé předchozí práce prokázaly korelaci mezi aktivitou onemocnění a počtem osteoklastů v kostní dřeni. [56] Adherence patologických plazmocytů ke stromatu kostní dřeni je zprostředkována vazbou mezi adhezivními molekulami nacházejícími se na buňkách stromatu a integriny, které jsou na myelomových buňkách. Po navázání je stimulována tvorba, maturace OC a taktéž i aktivita již vzniklých osteoklastů. Důležitou roli hraje adhezivní interakce mezi patologickými plazmocyty a stromálními buňkami kostní dřeni prostřednictvím těchto molekul: „very late antigen 4“ (VLA-4) a adhezivní molekuly cévních buněk 1 (VCAM-1), které vedou k produkci a regulaci tvorby osteoklastogenních cytokinů. [43]

Osteoklasty samy mohou produkovat další působky a pomocí myelomových buněk indukovat tvorbu IL-6, Annexinu A2, osteopontinu, aktivačního faktoru B-buněk (BAFF) a ligandu indukujícího proliferaci (APRIL), které dále podporují vývoj MKN. [57-59]

Porucha rovnováhy dráhy RANK/RANKL/OPG

Většina osteogenních faktorů působí v rámci dráhy RANK/RANKL/OPG, která se děje dvěma způsoby. Jednak samotné myelomové buňky stimulují expresi RANKL, čímž aktivují proliferaci OC. [60, 61]

Dále myelomové buňky blokují tvorbu osteoprotegerinu pomocí syndecanu-1 (taktéž znám jako CD 138). Jedná se o proteoglykan, jenž se váže na doménu OPG a indukuje lysosomální degradaci OPG. [62] Výsledkem těchto procesů je alterace (zvýšení) poměru RANK/OPG, což stimuluje novotvorbu osteoklastů. Celý tento proces vyústí ve vystupňovanou a neregulovanou osteoklastogenezi, která vede k nerovnováze kostního metabolismu ve prospěch destrukce kostí. [63]

Makrofágový zánětlivý protein 1 alfa (MIP-1 α)

Makrofágový zánětlivý protein 1 alfa se podílí na osteoklastogenezi dvěma způsoby. Jednak indukuje aktivaci dráhy RANK/RANKL, další cesta je ale již nezávislá. [64] Vliv MIP-1 α na rozvoj myelomové kostní choroby je zprostředkován především vazbou na receptory CCR1-CCR5. [65] CCR 1 a CCR 5 jsou exprimovány na MM buňkách a řídí jejich migraci a „hnízdění“ v kostní dřeni. [66] Interakce mezi MIP-1 α a CCR1-CCR5 aktivuje dráhu protein kinázy B a dále dráhy kináz regulované extracelulárními signály, což vede ke zvýšenému zrání osteoklastů. [67].

Hepatocytární růstový faktor (HGF)

HGF je cytokin, jehož primární úlohou je stimulovat růst epiteliálních buněk. Je také důležitým induktorem neovaskularizace a navíc potencuje osteoklastogenezi. [68] Myelomové buňky exprimují HGF a jeho receptor (c-met), jejich společná interakce následně vede k přeměně neaktivní formy HGF na formu aktivní. [69] HGF také zvyšuje expresi IL-11, jenž následně podporuje tvorbu osteoklastů a inhibuje aktivitu osteoblastů. IL-11 navíc ještě stimuluje produkci RANKL, čímž dále zvyšuje osteoklastogenezi. [70]

Role interleukinu 3/Activinu A

Interleukin 3 (IL-3) je tzv. bifunkční cytokin. Za fyziologických podmínek má schopnost indukovat zrání prekursorů osteoklastů ve zralé buňky. [71] U mnohočetného myelomu je nadprodukce IL-3 zprostředkována dvěma transkripčními faktory AML-1A a AML-1B. Bylo prokázáno, že sérové hladiny IL-3 jsou zvýšené u 70% pacientů s MM. Vyšší hladiny IL-3 vedou k potenciaci osteoklastogeneze. IL-3 také stimuluje makrofágy kostní dřeni k produkci activinu A, dalšího cytokinu potencujícího rozvoj MKN. [72]

Activin A je členem rodiny faktorů transformujících růst (TGF – z angl. transforming growth factor či také tumor growth factor), konkrétně TGF- β . Tento cytokin působí prostřednictvím svého receptoru IIA a inhibicí Dlx5. Dlx5 je faktor transkripce při

diferenciaci OB. Nadměrná exprese aktivinu A vede ke stimulaci a generování OC a zvyšuje dále účinek RANKL. [73]. Ukázalo se, že sérové hladiny aktivinu A korelovaly s rozsahem MKN, pacienti s vyššími hladinami aktivinu A měli rozsáhlejší kostní postižení (více než 3 lytické léze a/nebo patologická zlomenina). [74]

Annexin A2

Annexin A2 je člen rodiny proteinů na vápníku závislých, fosfolipidy vázajících. Annexin A2 a jeho receptor (AXIIR) jsou produkovány stromálními buňkami a osteoklasty a jsou důležité při „hnízdění“ lidských kmenových buněk do dřene. [75] Výsledkem nadprodukce annexinu A2 je podpora adheze myelomových buněk v kostní dřeni a inhibice jejich apoptózy. Kromě toho má Annexin A2 i přímý účinek na rozvoj MKN, neboť také stimuluje proliferaci prekurzorů osteoklastů. [76, 77]

6.2.2. Inhibice osteoblastů

Současně s vystupňovanou osteoklastogenezí je u myelomové kostní choroby inhibována aktivita osteoblastů. Kostní novotvorba vyžaduje řádné maturaci prekurzorů OB ke zralým buňkám. Byla identifikována řada faktorů, které snižují aktivitu osteoblastů, resp. jejich dominantní signální dráhy Hlavním inhibítorem Wnt dráhy jsou proteiny DKK 1, sklerostin a dále např. „frizzled“ proteiny (sFRP), molekula RUNX2 /CBFA1 a některé další.

Inhibice dráhy Wnt

Wnt dráha má dvě části, kanonickou a nekanonickou. Kanonická dráha je klíčová pro osteoblastogenezi. Nekanonická dráha má částečný vliv i na osteoklastogenezi tím, že potencuje expresi RANK v prekurzorech osteoklastů. [78, 79]

Buňky myelomu produkují zejména antagonisty kanonické části Wnt dráhy, především DKK 1 a sFRP, čímž dochází k inhibici osteoblastogeneze a dalšímu vychýlení rovnováhy ve prospěch destrukce kostí. [78, 79] V případě mnohočetného

myelomu dochází ke zvýšené expresi DKK 1 přímo patologickými plazmocyty. Je zajímavostí, že fyziologické plazmocyty DKK 1 netvoří. Nadprodukce DKK 1 vede taktéž k horšímu hojení fraktur, vlivem tohoto mechanismu dochází k nedostatečné tvorbě kostního „svalku“. [80-83] Inhibitorem Wnt dráhy jsou také molekuly patřící do rodiny „frizzled“ proteinů (sFRP). Jedná se o glykoproteiny bohaté na cystein, které na rozdíl od DKK 1 blokují obě dvě Wnt dráhy. [84] Dalším mechanismem účinku je inhibice osteoblastogeneze díky molekule BMP 2 (Bone Morphogenetic Protein 2). BMP 2 inhibuje mineralizaci osteoblastů což vede k poruše jejich maturace. [85]

Další inhibitory osteoblastogeneze

Tumor necrosis factor α (TNF α)

TNF α je zánětlivý cytokin, jehož hlavní funkcí je indukovat tvorbu dalších zánětlivých působků. U mnohočetného myelomu dochází k jeho nadprodukcí myelomovými buňkami, což vede ke zvýšené tvorbě IL 6. IL 6 hraje významnou roli v přežívání klonálních plazmatických buněk. [86] Mimo nadprodukce IL 6 se TNF α podílí přímo na kostní remodelaci. Kromě poruchy maturace OB se podílí i na jejich zvýšené apoptóze. [87]

6.3 Diagnostika myelomové kostní nemoci

Přítomnost osteologických kostních lézí patří mezi diagnostická kritéria mnohočetného myelomu [1]. V nedávné minulosti byla hlavní diagnostickou zobrazovací technikou konvenční radiografie (RTG) a dlouhodobě byla tato diagnostická metoda považována za „zlatý standard“ [23]. V současné době je nahrazena citlivějšími zobrazovacími technikami, jako je celotělová nízkodávkovaná výpočetní tomografie (CT), magnetická rezonance (MRI) a pozitronová emisní tomografie (PET) s CT (PET/CT).

Přítomnost osteolytických lézí často vede k intenzívním bolestem vyplývajícím ze strukturálního poškození kosti. Rozsah onemocnění kolísá od prosté osteoporózy až po

patologické zlomeniny. Pacienti s patologickými frakturami mají horší prognózu, než nemocní bez zlomenin (o 20% vyšší riziko úmrtí). [88] I asymptomatictí pacienti, kteří ovšem mají radiologicky prokázanou přítomnost MKN mají vyšší riziko progresse onemocnění (medián doby do progresse je 8 měsíců. [89]

Konvenční radiografie

Konvenční radiografie byla dlouhou dobu považována za zlatý standard v diagnostickém algoritmu mnohočetného myelomu. [23] Asi 80 % pacientů s nově diagnostikovaným MM má patrnou osteolytickou lézi na planárním radiografickém snímku. [90] Nejčastěji jsou postiženy následující oblasti: obratle v 65 %, žebra ve 45 %, lebka ve 40 %, ramena ve 40 %, pánev ve 30 % a dlouhé kosti ve 25 %. [91] Myelomové léze mají typický vzhled. V oblasti plochých kostí jím je osteolýza, ovšem bez reaktivní sklerózy okolních kostí. Velmi dobře patrné bývají léze na lebce (obr.1). U dlouhých kostí rozsah kolísá od diskrétních lézí až po ložiska zasahující téměř celý průměr kosti. [92] K predikci pravděpodobnosti zlomenin u dlouhých kostí postižených metastatickým procesem byl vytvořen skórovací systém založený na radiologických nálezech [93] (tabulka 6) tzv. Mirelsovo skóre.

Tab 6 Mirelsovo skóre [93]

Body	1	2	3
Místo	horní končetina	dolní končetina	peritrochanter.
Bolest	lehká	střední	těžká
Typ metastázy	plastická	smíšená	lytická
Velikost (je udána poměrem průměru ložiska ku šířce kosti)	<1/3	1/3-1/2	> 2/3
Pravděpodobnost vzniku patologické zlomeniny se zvyšuje při skóre nad 7 bodů. <ul style="list-style-type: none"> • skóre do 7 - nevyžaduje profylaktickou osteosyntézu -konz. léčba zlomeniny u 4 % • skóre 8 bodů – hraniční pro indikaci preventivní osteosyntézy 15 % • skóre 9 a více – stav vyžaduje vždy preventivní osteosyntézu 33 % 			

Výhodou konvenční radiografie je její dostupnost, nízká cena a vcelku jednoduchá interpretovatelnost.

Hlavní nevýhodou je nízká citlivost záchytu ložisek u pacientů s již přítomnou osteoporózou, zvláště v případě, kdy je rozsah kostního postižení limitovaný. V tomto případě může být až 30–70 % výsledků falešně negativních. [94] A asi u 15 % pacientů může být první známkou MKN pouze generalizovaná osteopenie.[95] Další nevýhodou rentgenového zobrazení (limitující ale většinu morfologických zobrazovacích technik) je skutečnost, že jej nelze použít k hodnocení odpovědi na terapii.

Tab.7: Srovnání výhod a nevýhod zobrazovacích vyšetření

	Výhoda	Nevýhoda
Magnetická rezonance	Senzitivita měkkých tkání	Způsob vyšetření (Obezita, klaustrofobie)
	Zrcadlí procesy v kostní dřeni	Nelze využít v případě kovových implantátů
	Prognostická významnost	Doba trvání
„Low dose“ počítačová tomografie	Rychlost	Nižší senzitivita
	Cena	Nedostatečné zobrazení míchy
Positron Emission Tomography/Počítačová tomografie	Zobrazení anatomických i funkčních struktur	Méně senzitivní v zobrazení difúzního postižení
	Prognostický význam	Falešná pozitivita v případě zánětu
		Použití kontrastní látky
		Cena

Počítačová tomografie (CT)

CT poskytuje citlivější detekci menších lytických lézí než konvenční radiografie.

Zejména multidetektorová počítačová tomografie je považována za velmi citlivou pro detekci časných kostních lézí a také umožňuje zachycení extramedulárního onemocnění. [96] Další výhodou CT je krátká doba trvání vyšetření (téměř třikrát kratší než RTG). [92] Jednou z nevýhod je dávka záření, kumulativní je až 36,6 mSv (asi 400x vyšší než u RTG). [97] Ke snížení radiační zátěže lze úspěšně využít tzv.

„low dose“ CT (LD-CT), které využívá nižší napětí (kV) a proud (mAS) ke snížení radiační dávky až na 4–7 mSv, což je dávka srovnatelná s celotělovým RTG zobrazením. [98] LD-CT je také schopno zobrazit extramedulární onemocnění a je citlivější než magnetická rezonance při zobrazování lebky. [99] Na druhou stranu je LD-CT méně citlivé než MR pro detekci medulární infiltrace a při hodnocení postižení páteře. [92] Hlavní výhodou LD-CT je pohodlí pro nemocného, jde o techniku, která je rychlá, neinvazivní a též ekonomicky nenákladná.

Magnetická rezonance

Využití magnetická rezonance je součástí nových diagnostických kritérií pro diagnostiku mnohočetného myelomu z roku 2014. [1] Přítomnost >1 ložiskové léze (nad 5 mm) na MR skenech je považováno za jeden z projevů aktivity onemocnění a za indikaci k léčbě i u jinak asymptomatického pacienta bez jiných známek CRAB MR poskytuje vynikající zobrazení axiálního skeletu; hodnotí přítomnost míšní komprese, detekuje extramedulární onemocnění a zobrazuje infiltraci kostní dřeně. [92] U pacientů s mnohočetným myelomem lze popsat pět různých typů infiltrace: normální vzhled kostní dřeně navzdory drobné mikroskopické infiltraci plazmatickými buňkami, fokální postižení, difúzní infiltrace, kombinovaná difúzní a fokální infiltrace a léze charakteru „sůl-pepř“. [100] Bylo také prokázáno, že difúzní infiltrace kostní dřeně koreluje se špatnou prognózou. [101] Zároveň jde o nejcitlivější zobrazovací vyšetření k rozlišení časně MKN, zobrazující léze charakteru „sůl-pepř“ s možností jejich odlišení od prosté osteoporózy. [102]

Srovnání MR a PET/CT ukázalo vyšší senzitivitu a specificitu MR. [103] Některé studie prokázaly superioritu MR v oblasti páteře, na druhou stranu je prokázána limitace tohoto onemocnění při hodnocení ložiskového postižení lebky. [99] Další nevýhodou MRI je i jeho ekonomická nákladnost, celková délka trvání a mírný diskomfort při vyšetření v úzkém prostoru, zvláště u pacientů s klaustrofobií.

Nové techniky MR

Zobrazení difuze pomocí magnetické rezonance (DW-MR) je relativně nová technika založená na odlišném tkáňovém kontrastu způsobeném mikroskopickým pohybem vody v tkáních. Dokáže kvantifikovat strukturální i funkční změny a poskytuje informace o každé lézi. Nejdůležitějším parametrem je tzv. difúzní koeficient (Apparent Diffusion Coefficient – ADC) – indikátor intracelulárního a extracelulárního pohybu vody. Ve tkáních s vysokým objemem tuku (tedy i v kostní dřeni) je nízký ADC. Používá se k hodnocení vzorců infiltrace myelomu. ADC je vyšší u pacientů s mnohočetným myelomem v době diagnózy. [104] Senzitivita těchto zobrazovacích technik je vyšší než u PET/CT, a to i v diagnostice difúzního onemocnění. [105] Dynamické kontrastní zobrazení (Dynamic contrast enhanced – DCE) je funkční zobrazovací technika využívající rozdílnou distribuci intravenózní kontrastní látky uvnitř a vně cév. Tato skutečnost umožňuje hodnocení mikrocirkulace a mikrovaskulární denzity a jejich korelace před a po terapii. [106, 107] V rutinní praxi jsou ale zmíněné techniky využívány spíše ojediněle.

Pozitronová emisní tomografie s výpočetní tomografií

PET/CT je relativně nová funkční zobrazovací metoda kombinující hypermetabolickou aktivitu v intramedulárních a extramedulárních ložiscích (PET) pomocí fluorodeoxygukózy s průkazem morfologického korelátu – osteolytických lézí (CT). Je to metoda používaná především u solidních nádorů. V hematologii je široce používána především při detekci lymfomů. [108] I v případě mnohočetného myelomu jde o spolehlivou zobrazovací techniku při detekci osteolytických lézí i extramedulárního onemocnění. [109] Navíc byla prokázána pozitivní korelace mezi rozsahem MKN v době diagnózy (ale i během sledování) a prognostickými ukazateli. PET/CT negativita po léčbě u pacientů s kompletní remisí prodloužila PFS (přežití bez progresu; 50 měsíců vs. 90 měsíců). [94] V současnosti je tak hodnocení PET/CT

doporučováno jak při diagnóze MM, tak i po ukončení léčby, pro zhodnocení negativity minimální zbytkové choroby.

Ve srovnání s MR je PET/CT méně senzitivní v detekci difuzního onemocnění, na druhé straně nebyl popsán rozdíl mezi PET/CT a MR v rozpoznání fokálních kostních lézí. [109] Další relativní nevýhodou této zobrazovací techniky je dostupnost vyšetření, jeho ekonomická nákladnost a také nízká specifita PET avidních lézí, které mohou být způsobeny nejen nádorovým procesem, ale např. též zánětem. [94] U mnohočetného myelomu je diskutována otázka podávání nitrožilního kontrastu, který může zhoršit již přítomné renální postižení. Také celková dávka záření není zanedbatelná, proto se obdobně jako u výpočetní tomografie zvažuje použití nízkodávkovaných protokolů.

[68Ga] Pentixafor-PET/CT

Tato nová zobrazovací technika je založena na vysoké afinitě ligandu gallia-68 k receptoru CXCR4 spojeného s G-proteinem. [110] Tento chemokin je nadměrně exprimován u více než 30 typů nádorových onemocnění včetně mnohočetného myelomu. [111, 112] Při jedné z prvních studií s [68Ga] Pentixafor-PET/CT bylo hodnoceno 30 pacientů s pokročilým mnohočetným myelomem, z toho 21 % bylo zcela nově diagnostikováno. Bylo také prokázáno, že pozitivita tohoto vyšetření významně koreluje s prognostickými faktory jako TTP a OS. [90].

Obdobně jako u FDG-PET/CT byla na malém vzorku 17 pacientů hodnoceným pomocí Pentixafor-PET/CT korelace nálezů s celkovým přežitím. [113]

Tab. 7 Srovnání ceny, časové náročnosti, radiační zátěže, citlivosti a dostupnosti zobrazovacích technik u monoklonálních gamapatií [114]

	RTG (lebka, S+P, C, Th, LS páteř, pánev, humery, femury)	LD-CT	MRI	PET/CT
Cena	1500 Kč	2200 Kč	25000 Kč	39000 Kč

Časová náročnost	80 minut	15 minut	45 minut	110 minut
Radiační zátěž	1,8 mSv	3-4 mSv	-	> 10- 15 mSv
Citlivost	+	++ (+)	+++	+++
Dostupnost	+++	+++	++	+

6.4. Léčba myelomové kostní choroby

V posledních desetiletích prošla terapie mnohočetného myelomu velkým rozvojem. Stejně tak i léčba myelomové kostní choroby prodělala výrazné změny. Léčba spočívá jak v terapii základního onemocnění, tak ve specifické terapii MKN. Terapie MKN se sestává z kombinace farmakoterapie, radioterapie a chirurgie [115]

6.4.1 Farmakoterapie MKN

Bisfosfonáty (BSF)

Základem farmakoterapie jsou bisfosfonáty. Zavedení těchto léků znamenalo skutečnou revoluci v léčbě myelomové kostní nemoci a staly se (společně s vitamínem D a vápníkem) nedílnou součástí léčby kostního postižení. Chemicky se jedná o pyrofosfátové analogy, které inhibují farnesyl-pyrofosfát syntázu [116]. Všechny BSF mají stejné jádro, ale afinita a účinnost závisí na přítomnosti dusíku a aminoskupiny. Pamidronat (PAM) a kyselina zoledronová (ZA) jsou 100x účinnější než nedusíkové BSF, jako je klodronat (CLO). [117] BSF se váží na krystaly hydroxyapatitu a jsou začleněny do oblastí aktivní kostní remodelace. Uvolněný BSF se stává cytotoxickým – zasahuje do intracelulárních signálních drah nezbytných pro přežití osteoklastů [118]

Prvním bisfosfonátem použitým v terapii MKN byl perorální klodronat. U tohoto preparátu byl prokázán efekt na snížení incidence tzv. skeletal-related event ve srovnání s placebem kontrolovanou skupinou. [119] Nicméně dnes je jeho používání omezené na úzkou skupinu pacientů, kteří nemají dostatečný i.v. přístup.

Nová generace aminobisfosfonátů má mnohem vyšší efekt. U perorálního užití pamidronátu bylo sice prokázáno snížení výskytu SRE a vliv na klinický stav a kvalitu života nemocných, nicméně nebyl prokázán vliv na celkové přežití. [120] Vzhledem k nedostatečné klinickému efektu se používá intravenózní aplikace pamidronatu.

Kyselina zoledronová je v současnosti nejúčinnějším bisfosfonátem v léčbě MKN.

Snižuje osteoresorpci, má prokazatelný vliv na četnost patologických fraktur. [121]

Srovnání pamidronátu a kyseliny zoledronové prokázalo, že zoledronat je účinnější v terapii hyperkalcémie. Na druhou stranu nebyl prokázán rozdíl mezi pamidronatem a kys. zoledronovou v redukci intenzity bolesti. [122]

Při srovnání zoledronatu a klodronatu u nově diagnostikovaných nemocných přinesla terapie kyselinou zoledronovou významné snížení SRE.

Kyselina zoledronová také snížila mortalitu o 16 % ve srovnání s klodronatem a prodloužila dokonce medián OS o 5,5 měsíce a medián PFS o 2 měsíce. [123]

Složitější situace nastává v případě ibadronátu. Byla publikována pouze 1 studie srovnávající ibadronat s placebem u pacientů s MM. V této studii byl ibadronát podáván v nízké dávce (2 mg i.v. oproti obvyklým 6 mg), zřejmě proto nebyl účinek tohoto bisfosfonátu na léčbu MKN jednoznačně potvrzen. [124]

Nežádoucí účinky bisfosfonátů

Relativním častým nežádoucím účinkem je akutní nebo chronické selhání ledvin u pacientů s mnohočetným myelomem, karcinomem prsu nebo jinými solidními nádory, kteří jsou léčeni intravenózním bisfosfonáty. Nárůst azotémie byl prokázán u přibližně 12 % nemocných. [123] Nefrotoxicita závisí na dávce, délce podávání a maximální plazmatické koncentraci bisfosfonátu. Dávkování kyseliny zoledronové by mělo být upraveno u pacientů, kteří již trpí poruchou funkce ledvin (clearance kreatininu 30-60 ml/min). U pacientů s rozsáhlým kostním postižením a těžkou poruchou renálních funkcí se doporučuje podávat pamidronát 90 mg s prodlouženou délkou aplikace během 4–6 hodin [125].

Méně častou (od 2 do 10 %) komplikací intravenózních bisfosfonátů je avaskulární osteonekróza čelisti. Jedná se o více než 2 měsíce nehojící se defekt čelisti s obnažením kosti. Výskyt osteonekrózy souvisí s délkou podání, invazivními stomatologickými výkony a špatnou ústní hygienou. [126]

Nejčastěji se osteonekróza čelisti vyskytuje po terapii kyselinou zolendronovou, nejméně po terapii klodronatem. [118, 127-129]

Nejllepší prevencí se vyvarovat se invazivních zákroků v průběhu léčby bisfosfonáty. Jsou-li nicméně nezbytné, je nutné je provádět v ATB profylaxi a je-li to možné, minimalizovat invazivitu. Doporučené je přerušení léčby 3 měsíce před zákrokem, v praxi je ovšem těžké toto doporučení dodržovat, zvláště s přihlédnutím k faktu, že se většinou jedná o akutní komplikace. Opětovné nasazení BFN je možné s odstupem 3 měsíců po extrakci [108]. Léčba osteonekrózy spočívá především v léčbě ATB a opakovaných chirurgických toaletách rány. U poloviny pacientů může dojít ke zhojení, ale až u poloviny pacientů v případě opětovného zahájení BFN dochází k recidivě [130].

Další popisovanou nežádoucí reakcí jsou atypické fraktury femuru, které jsou způsobeny změnou kostní remodelací při dlouhodobé terapii bisfosfonáty [131]

Nové léky

Mezi nejnovější slibné léky patří inhibitor RANKL – denosumab. Patří mezi biologické léky schválené k prevenci SRE u pacientů s kostními metastázami. Denosumab je plně humanizovaná monoklonální protilátka (MoAb), která se typicky váže pouze na RANKL a inhibuje tvorbu a přežívání osteoklastů. [132] Denosumab byl schválen pro léčbu pacientů s osteoporózou a u pacientů s metastatickým onemocněním [133].

Mezi nežádoucí účinky patří především edémy DKK, hubnutí a hypokalcémie.

Randomizovaná, dvojité zaslepená studie fáze 3 porovnávající kyselinu zolendronovou a denosumab prokázala superioritu denosumabu, s menším počtem SRE. Vliv na délku přežití ale nebyl dosud prokázán [134].

Mezi další moderní léky patří Sotatercept (ACE-011). Jedná se o rozpustný ligand rekombinantního aktivinového receptoru typu IIA (ActRIIA). Po podání sotaterceptu došlo ke snížení bolesti, zvýšení objemu a mineralizace kostní tkáně doprovázené vzestupem bALP (kostní izoforma alkalické fosfatázy), N-terminálního propeptidu prokolagenu typu-I (PINP) a snížení množství osteolytických lézí. Bylo také pozorováno snížení protinádorové aktivity s poklesem M-proteinu a zlepšení anémie [135, 136]

Analýza účinku monoklonálních protilátek inhibitorů sklerostinu (romosozumab) prokázala supresi osteolýz díky inhibici apoptózy a funkce osteoblastů u postmenopauzálních žen. [137, 138]

Anti-DKK-1 protilátky (BHQ880) podporují zvýšenou diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk v osteoblastech, což vede ke zvýšení tvorby kosti a růstu trabekulární kosti. [139]

6.4.2 Chirurgická léčba

Ortopedická léčba

Cílem ortopedické intervence v léčbě mnohočetného myelomu je především zmírnění bolestí, zlepšení pohyblivosti a prevence či již léčba patologických fraktur. Jedná se o komplexní přístup zahrnující farmakologickou léčbu i radioterapii. [118] Osteosyntéza dlouhých kostí je metodou volby nejen u již vzniklé fraktury, ale i v prevenci v případě rozsáhlé osteolytické léze. Indikace operačního řešení se velmi často řídí tzv. Mirelsovým skóre, kdy pravděpodobnost vzniku patologické fraktury se zvyšuje při skóre > 7 bodů. [93]

Kyfoplastika a vertebroplastika

Začlenění mini invazivních neurochirurgických výkonů do léčby patologických fraktur osového skeletu přineslo pacientům okamžité zmírnění bolesti, zlepšení funkčního stavu a kvality života. [130] Mezi metodu volby patří vertebroplastika nebo balónková

kyfoplastika s odstraněním deformace páteře. V případě nestabilní kompresivní zlomeniny obratle a/nebo přítomnosti neurologického deficitu je nutné provést do 24 hodin magnetickou rezonanci k rozhodnutí o volbě způsobu řešení. [140]

6.4.3 Radioterapie

Vzhledem k vysoké radiosenzitivitě myelomové tkáně je nedílnou součástí léčby MKN radioterapie (RT). [140] Indikace léčby jsou následující: bolesti nedostatečně reagující na analgetickou terapii, rozsáhlé osteolytické léze, hrozící nebo již existující patologická zlomenina, komprese míchy a extramedulární myelom. [130] Celková dávka záření a stupeň frakcionace je vždy nutné upravit podle cíle. Pacienti v dobrém klinickém stavu a s příznivou prognózou mívají celkovou dávku záření 36–40 Gy rozdělenou do 10–12 frakcí. V dnešní době je v léčbě bolestí u seniorů a jako doplněk chirurgické prevence či stabilizace zlomenin preferována jednorázová aplikace 8-10 Gy [130]

Praktická část

7.1. Cíl 1: Zhodnocení přínosu stanovení sérových hladin vybraných markerů kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně ve srovnání s aktivitou mnohočetného myelomu

Úvod

Odlišení aktivního mnohočetného myelomu (resp. onemocnění indikovaného k léčbě) je stěžejní ve volbě léčebného postupu. Prakticky všechny případy MM vznikají z asymptomatického, premaligního stavu známého jako monoklonální gamapatie nejistého významu (MGNV). [141] Monoklonální gamapatie nejistého významu je definována přítomností sérového paraproteinu <30 g/l, se zastoupením <10 % klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni a absencí přítomnosti poškození orgánů. [1] Přibližně 0,5-1 % pacientů s MGNV přejde během roku do aktivního mnohočetného myelomu nebo jiného lymfoproliferativního onemocnění. [142]

Doutnající mnohočetný myelom (SMM) je přechodným stavem mezi MGNV a aktivním mnohočetným myelomem. SMM je definován přítomností 10–60 % klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni a/ nebo hladinou sérového M proteinu ≥ 30 g/l nebo monoklonálním proteinem v moči ≥ 500 mg/24 h a současně absencí přítomnosti poškození orgánů.[1] Oproti MGNV je ale riziko progresu do aktivního mnohočetného myelomu v prvních 5 letech od diagnózy mnohem vyšší, asi 10 % ročně.[143]

Důvodem k přesnému odlišení těchto jednotek od aktivního mnohočetného myelomu je skutečnost, že se tyto potenciálně maligní stavy neléčí, ale mají různě vyjádřené riziko transformace do aktivního onemocnění.[144] Protože se jedná o tři vývojová stadia téhož onemocnění, lze předpokládat, že i u premaligních stavů již může docházet k jistému narušení mikroprostředí kostní dřeně, které ještě nemusí mít odraz v celkovém chování onemocnění.

Prvním cílem práce proto bylo stanovení hladin vybraných ukazatelů kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně u nemocných s aktivním mnohočetným myelomem, s doutnajícím myelomem a s monoklonální gamapatií nejistého významu s předpokladem, že s narůstající aktivitou onemocnění budou narůstat hladiny ukazatelů kostního poškození.

Pacienti a metody

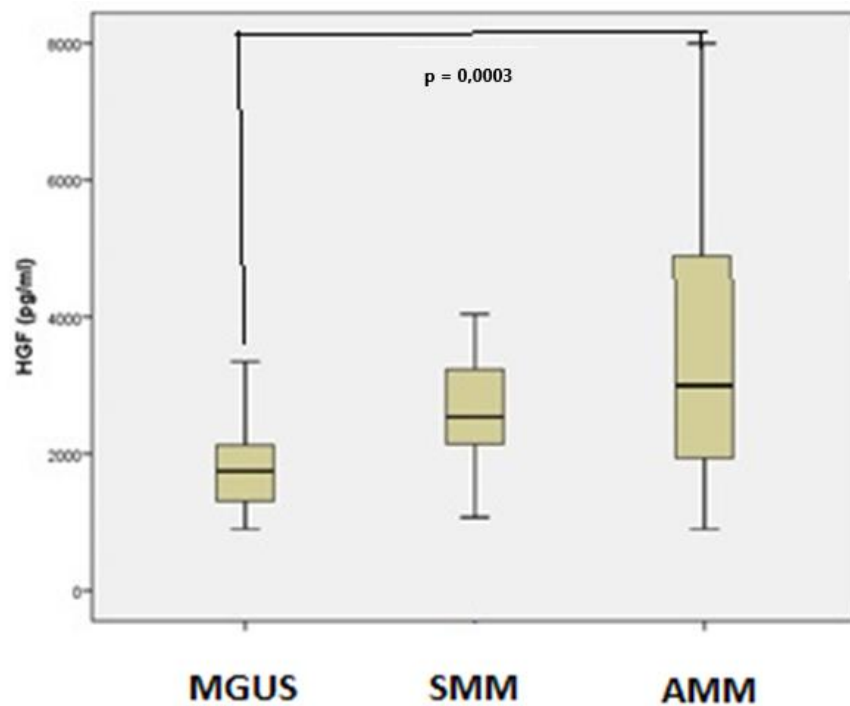
Analyzovaný soubor tvořilo 97 jedinců s monoklonálními gamapatiemi. Celkem bylo v souboru 59 pacientů s aktivním mnohočetným myelomem (AMM), 10 s doutnajícím myelomem (SMM) a 28 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGNV). Věkový medián nemocných byl 63 let (39-89 let), poměr M/Ž = 1,06:1. Z hlediska pokročilosti MM bylo dle klasifikace Durie-Salmon stádium I zastoupeno v 19% (n = 18) pacientů, stádium II v 23% (n = 12) a stádium III v 58% (n = 67), podstádium B bylo zastoupeno v 6% (n = 6) [9]. Prognostická stratifikace MM dle mezinárodního prognostického indexu (ISS) měla následující zastoupení: stádium 1 v 15 % (n = 15), stádium 2 v 35% (n = 34) a stádium 3 v 50 % (n = 49).

Ze sérových ukazatelů myelomové kostní nemoci byly posuzovány: Hepatocytární růstový faktor (HGF, Human HGF Quantine ELISA), Zánětlivý makrofágový faktor 1 α (MIP-1 α , Human CCL3/MIP-1a Quantikine ELISA), Dickkopf protein 1 (DKK 1, Human DKK-1 Quantikine ELISA), Aktivin A Human Activin A Quantikine ELISA, Annexin A2 (Human Annexin A2 ELISA kit), Syndekan1/CD138 (SYN, Human Syndecan-1 (CD138) ELISA), Matrixová metaloproteináza 9 (MMP 9, MMP9, BlueGene Biotech ELISA kit) 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 $p < 0,05$

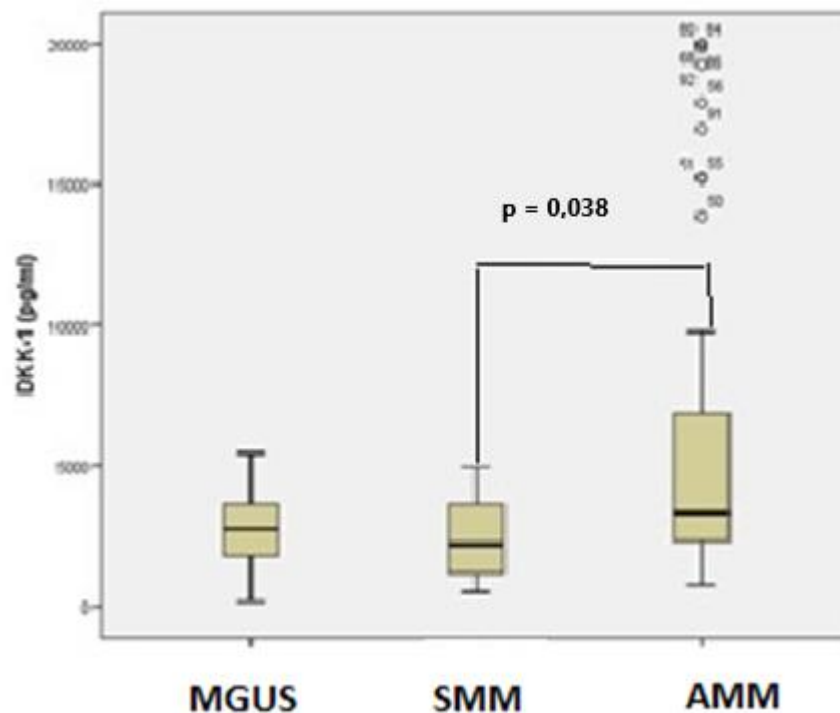
Výsledky

Při srovnání sérových hladin posuzovaných cytokinů a chemokinů u AMM a MGNV bylo zjištěno, že u pacientů s AMM jsou významně vyšší sérové hladiny HGF (medián = M 2587 vs 1548 ng/l, $p = 0,0003$), MIP1 α (M 23,2 vs 19,3 ng/l, $p = 0,021$), SYN-1 (M 60,1 vs 19,5 $\mu\text{g/l}$, $p = 0,0001$) a DKK-1 (M 3102 vs 2543 ng/l, $p = 0,030$), (obr. 1-4). Při srovnání AMM a SMM byla u AMM nalezena signifikantně zvýšená hladina DKK-1 (M 3102 vs 2196 ng/l, $p = 0,038$) a Annexinu A2 (M 37,5 vs 26,5 $\mu\text{g/l}$, $p = 0,017$), (obr. 2). Při srovnání MGNV a SMM bylo zjištěno, že u SMM jsou vyšší hladiny SYN-1 (M 60,1 vs 29,1 $\mu\text{g/l}$, $p = 0,027$), (obr.4). U ostatních pozorovaných parametrů nebyla prokázána signifikantní korelace ve vztahu k aktivitě onemocnění.

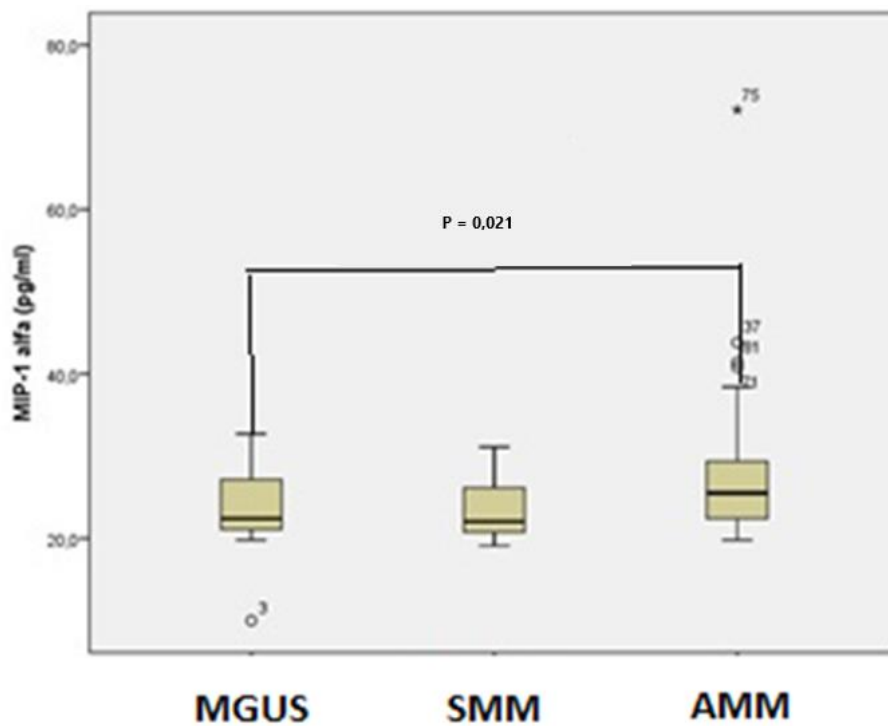
Obr. 1 Výsledky srovnání sérových hladin hepatocytárního růstového faktoru (HGF) u pacientů s mnohočetným myelomem (AMM) s jedinci s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGNV) a doutnajícím myelomem (SMM)



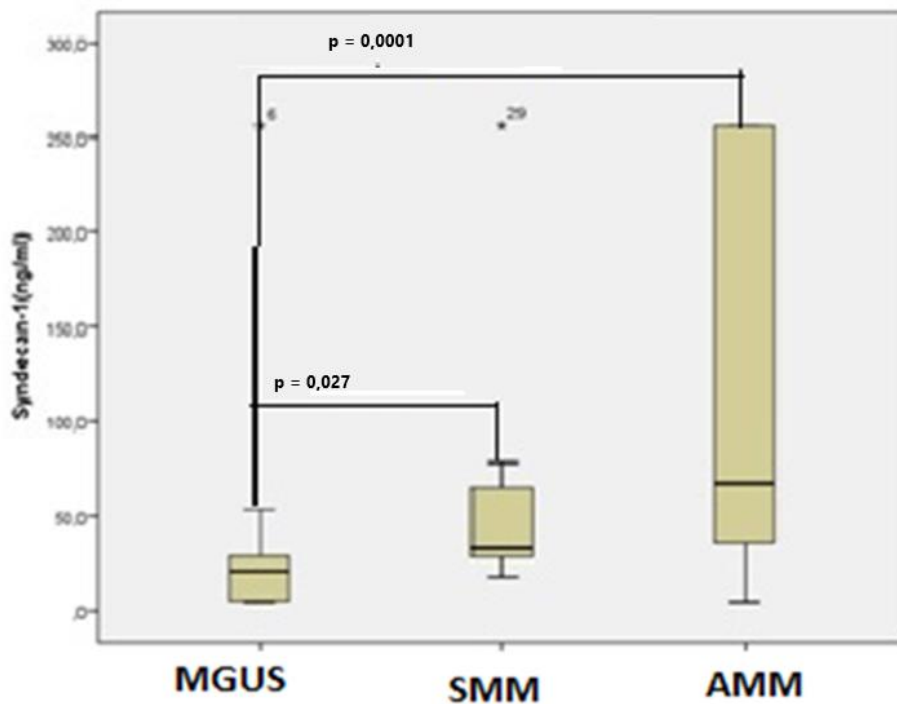
Obr. 2 Výsledky srovnání sérových hladin Dickkopf-related proteinu 1 (DKK-1) u pacientů s mnohočetným myelomem (AMM) s pacienty s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGNV) a doutnajícím myelomem (SMM)



Obr. 3 Výsledky srovnání sérových hladin makrofágového zánětlivého proteinu 1 α (MIP 1 α) u pacientů s mnohočetným myelomem (AMM) s jedinci s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGNV) a doutnajícím myelomem (SMM)



Obr. 4 Výsledky srovnání sérového Syndecanu 1 u pacientů s mnohočetným myelomem (AMM) s pacienty s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGNV) a doutnajícím myelomem (SMM).



Diskuze

V této části dizertační práce jsme hodnotili 9 markerů, kteří byli vybráni jako potenciálně významně se uplatňují v rozvoji myelomové kostní nemoci. U 6 z nich byla potvrzena nárůst sérových hladin s rostoucí aktivitou onemocnění.

U aktivního mnohočetného myelomu byly významně vyšší hladiny chemokinů dráhy MIP, především MIP-1 α . Jedná se o potentního induktora osteoklastogeneze, který působí mimo dráhu RANK/RANKL, přesto navíc účinek této dráhy umocňuje, čímž napomáhá v aktivaci osteoklastů. [65]

I některé zahraniční studie prokázaly vyšší hladiny MIP-1 α u nemocných s aktivním mnohočetným myelomem. [65, 145, 146] Kromě hladin MIP byly zjištěny i vyšší hladiny ukazatelů angiogeneze (VEGF, angiogenin), což ukazuje na vliv neovaskularizace v kostní dřeni u nemocných s MM, v naší sestavě ale nebyla korelace významná. [147] I některé studie zkoumající hladiny MIP-1 α u pacientů s MGNV jsou ve shodě s našimi výsledky, kdy pacienti s AMM měli typicky vyšší hladiny MIP-1 α než jedinci s MGNV. [65, 145, 146, 148] Lze předpokládat, že důvodem je odlišné zastoupení patologických plazmocytů v kostní dřeni, které se spolupodílejí na tvorbě MIP-1 α . [149]

Hepatocytární růstový faktor (HGF) patří mezi skupinu cytokinů podporujících neovaskularizaci, konkrétně tento je především zodpovědný za stimulaci a růst epiteliálních buněk. Dále také potencuje osteoklastogenezi, což je spolu s angiogenezí hlavní způsob ovlivnění MKN. [68, 149]. Bylo prokázáno, že vyšší hladina HGF v době diagnózy může být negativním prediktivním faktorem přežití [150, 151], což jsme ostatně potvrdili i v další části této disertační práce. [152] Při srovnání hladin HGF u MGNV a AMM jsme prokázali signifikantně vyšší hladiny HGF u pacientů s aktivním onemocněním oproti MGNV, což dále potvrzuje předpokládaný vliv neovaskularizace a vyšší hustoty kapilár u AMM. [149]

Další dráhou podílející se na rozvoji osteoklastogeneze je dráha DKK-1. Proteiny z této skupiny jsou tvořeny především pomocí parakrinní stimulace a tím umocňují osteoklastogenezi. Fungují především jako inhibiční proteiny, neboť blokují dráhu Wnt. [85, 153]

Podobně jako MIP i DKK-1 je tvořena klonálními plazmocyty, zatímco plazmocyty fyziologické tento cytokin netvoří. Lze proto předpokládat vyšší hladiny DKK-1 u pacientů v aktivní fázi onemocnění. [80] Vyšší hladiny DKK-1 vedou k zabránění maturace osteoblastů a tím i k obtížnému hojení fraktur. I zde jsou naše výsledky ve shodě se zahraničním písemnictvím, kdy byla prokázána korelace mezi hladinou DKK-1 a rozsahem kostního postižení. [80-83] Významným faktem je skutečnost, že hladiny DKK-1 byly signifikantně odlišné i při srovnání AMM s SMM, což naznačuje možný podíl narušení Wnt signální dráhy na transformaci neaktivního onemocnění do fáze rozvinuté.

Syndekan-1 je dalším z markerů, u něhož byl nalezen vztah s aktivitou onemocnění. V našem výzkumu byly nalezeny rozdílné hladiny mezi pacienty s MGNV, SMM i AMM, což je ve shodě s přechozími studiemi. [154, 155] Syndekan-1, někdy také nazýván CD 138, patří mezi tzv. transmembránové glykoproteiny nacházející se na povrchu buněk. Je odpovědný za adhezi patologických plazmocytů v kostní dřeni a dále indukuje diferenciaci osteoklastů. [155] Je na povrchu maligních plazmatických buněk v periferní krvi. Proto také je využíván v průtokové cytometrii k identifikaci plazmocytů. [156-158] Naše práce potvrdila, že nejen Syndekan vázaný na plazmocytech (odpovídající jejich zastoupení), ale i jeho sérové hladiny korelují s aktivitou monoklonálních gamapatií.

Šestým ukazatelem, který prokázal vztah souvislost s aktivitou onemocnění je Annexin A2. Annexin A2 je intracelulární i extracelulární protein. Uvnitř buněk se podílí na endocytóze a exocytóze. [159] Mimo buňku aktivuje receptor tkáňového plazminogenu a tím se podílí především na adhezi. [76] Jeho patologickým účinkem je potenciace růstu myelomových buněk. Za běžných podmínek má svou roli

v kostním obratu a zřejmě prodlužuje přežití plazmocytů, Vyšší hladiny Annexinu A2 u aktivního onemocnění tedy zřejmě odrážejí vystupňování jeho fyziologické funkce a vliv na růst populace klonálních plazmocytů. [160]

Závěr

U nemocných s AMM byly oproti SMM a MGNV zjištěny signifikantně vyšší hladiny těchto ukazatelů: hepatocytární růstový faktor (HGF), makrofágový zánětlivý protein 1 α (MIP-1 α), syndekan-1 (SYN-1), Dickkopf protein-1 (DKK-1) a annexin A2.

7.2 Cíl 2: Zhodnocení přínosu stanovení ukazatelů signálních drah myelomové kostní nemoci a jejich korelace s rozsahem onemocnění hodnoceného pomocí zobrazovacích vyšetření

Úvod

Zobrazovací techniky prodělaly v poslední době výrazný vývoj. Od historického zlatého standardu, kterým bylo dlouhodobě rentgenové zobrazení, došlo k posunu ke komplexnějším technikám zahrnující 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) [21] Ke stanovení rozsahu kostního postižení u mnohočetného myelomu pomáhá hodnocení parametrů kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně.

Druhým cílem práce je srovnání radiodiagnostických metod; tedy konvenční radiografie a celotělové magnetické rezonance ve vztahu k MKN a korelace rozsahu kostního postižení s hladinami vybraných ukazatelů kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně.

Pacienti a metody

Hodnoceným souborem pacientů bylo 32 jedinců s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem splňujících IMWG kritéria nemoci. [1] Věkový medián nemocných byl 64 (31-81) let, poměr M/Ž 1,7:1,0. Klasifikace Durie-Salmon byla zastoupena následovně: stádium I zastoupeno v 12,58 % (n= 4) pacientů, stádium II v 40,62 % (n=13) a stádium III v 46,8 % (n=15) [6]. U všech pacientů bylo provedeno rentgenové vyšetření osového skeletu a celotělová magnetická rezonance. Rozsah postižení pomocí RTG byl určen podle počtu osteologických lézí (Tabulka 8) a postižení na WB MR bylo hodnoceno dle Durie-Salmon-PLUS klasifikace (Tabulka 9). [23, 161]

Ze sérových ukazatelů myelomové kostní nemoci byly posuzovány: osteokalcin, osteoprotegerin, karboxyterminální telopeptid kolagenu typu-I, osteopontin, parathormon, syndecan-1/CD138 (SYN), zánětlivý makrofágový faktor 1 α a 1 β , endostatin, interleukin-17, vaskulární endoteliální růstový faktor, hepatocytární růstový faktor, angiogenin, kostní izoenzym alkalické fosfatázy a insulínu podobný růstový faktor-1 a N-terminalní propeptid prokolagenu typu-I. Metodika vyšetření jednotlivých ukazatelů je blíže rozepsána v kapitole 7.1

Kromě vzájemného srovnání citlivosti obou zobrazovacích technik byl hodnocen vztah uvedených ukazatelů MKN k rozsahu kostního postižení popsanému pomocí RTG a WB MRI.

Ke statistickému zhodnocení byla použita Spearmanova korelační analýza, na hranici významnosti $p < 0,05$.

Tab. 8 Kostní postižení u mnohočetného myelomu hodnocené pomocí konvenční radiografie

0	Bez zachycené léze
1	Difúzní osteoporóza nebo izolovaná lytická léze
2	≥ 1 lytická léze
3	Difuzní postižení a/nebo patologické fraktury

Tab. 9 Kostní postižení u mnohočetného myelomu hodnocené pomocí WB-MR (Durie-Salmon PLUS klasifikace)

I	< 5 fokálních lézí
II	5 – 20 fokálních lézí
III	> 20 fokálních lézí

Výsledky

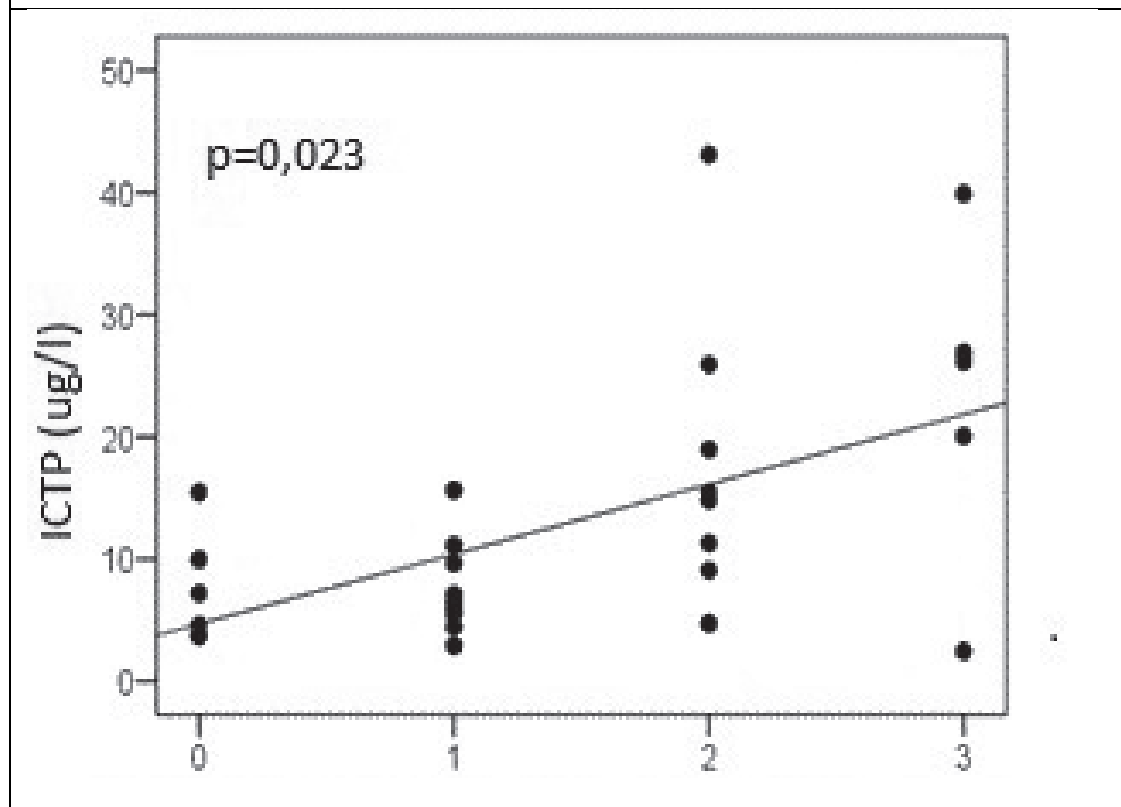
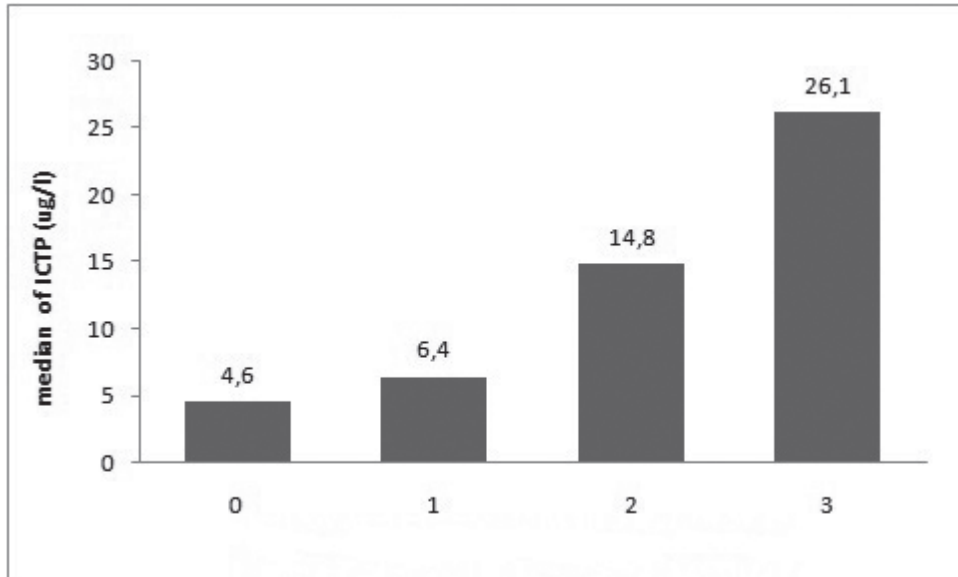
Celotělová magnetická rezonance potvrdila rozsáhlý nález na skeletu (tedy stadium II-III dle Durie-Salmon PLUS klasifikace) u 81 % nemocných, konvenční radiografie našla významný nález u 47 % pacientů. Při porovnání jednotlivých zobrazení odhalila WB-MR u 40 % rozsáhlé postižení, zatímco na RTG byly u těchto nemocných minimální či žádné změny. Obě tyto metody byly shodné u 34 % jedinců

a u 24 % byly výsledky podobné. Konvenční RTG nezachytila žádnou lézi, která by nebyla zřejmá též na vyšetření MR.

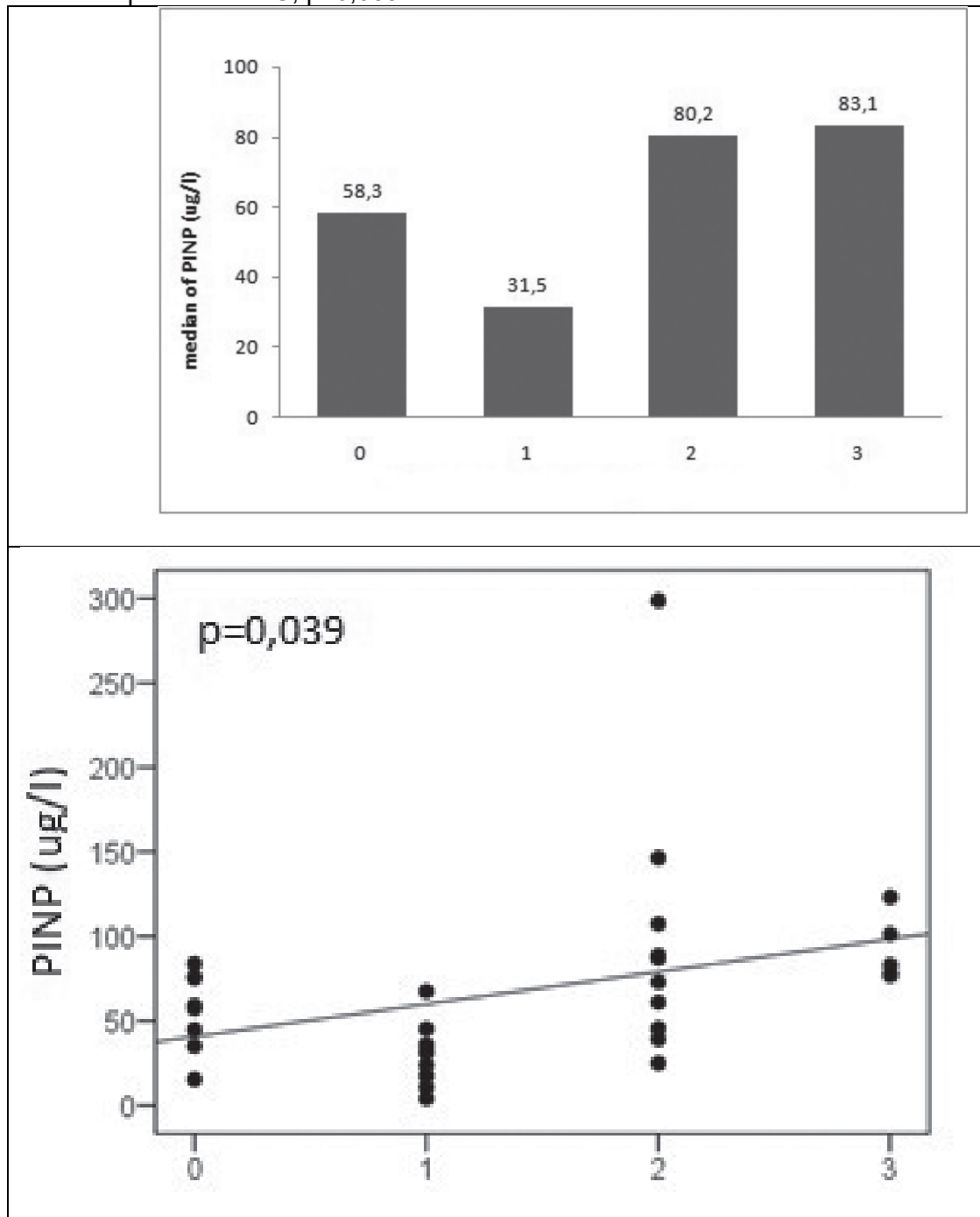
Při srovnání rozsahu MKN hodnoceného díky zobrazovacím technikám ve vztahu k parametrům kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně byly prokázány následující souvislosti: s WB-MR korelovala hladina ICTP ($kk=0,317$; $p=0,021$). U jiných parametrů nebyla prokázána souvislost se vztahem k postižení na WB-MR.

Při posouzení rozsahu postižení skeletu pomocí RTG ve vztahu k vybraným parametrům byla prokázána signifikantní korelace u ICTP ($kk=0,306$, $p=0,023$), PINP ($kk=0,274$, $p=0,039$) a osteopontinu ($kk =0,331$, $p=0,013$). Hladiny uvedených byly přímo úměrné rozsahu postižení skeletu (obr. 5-7). U dalších posuzovaných parametrů jsme neprokázali vztah mezi nimi a rozsahu MKN hodnocené pomocí RTG.

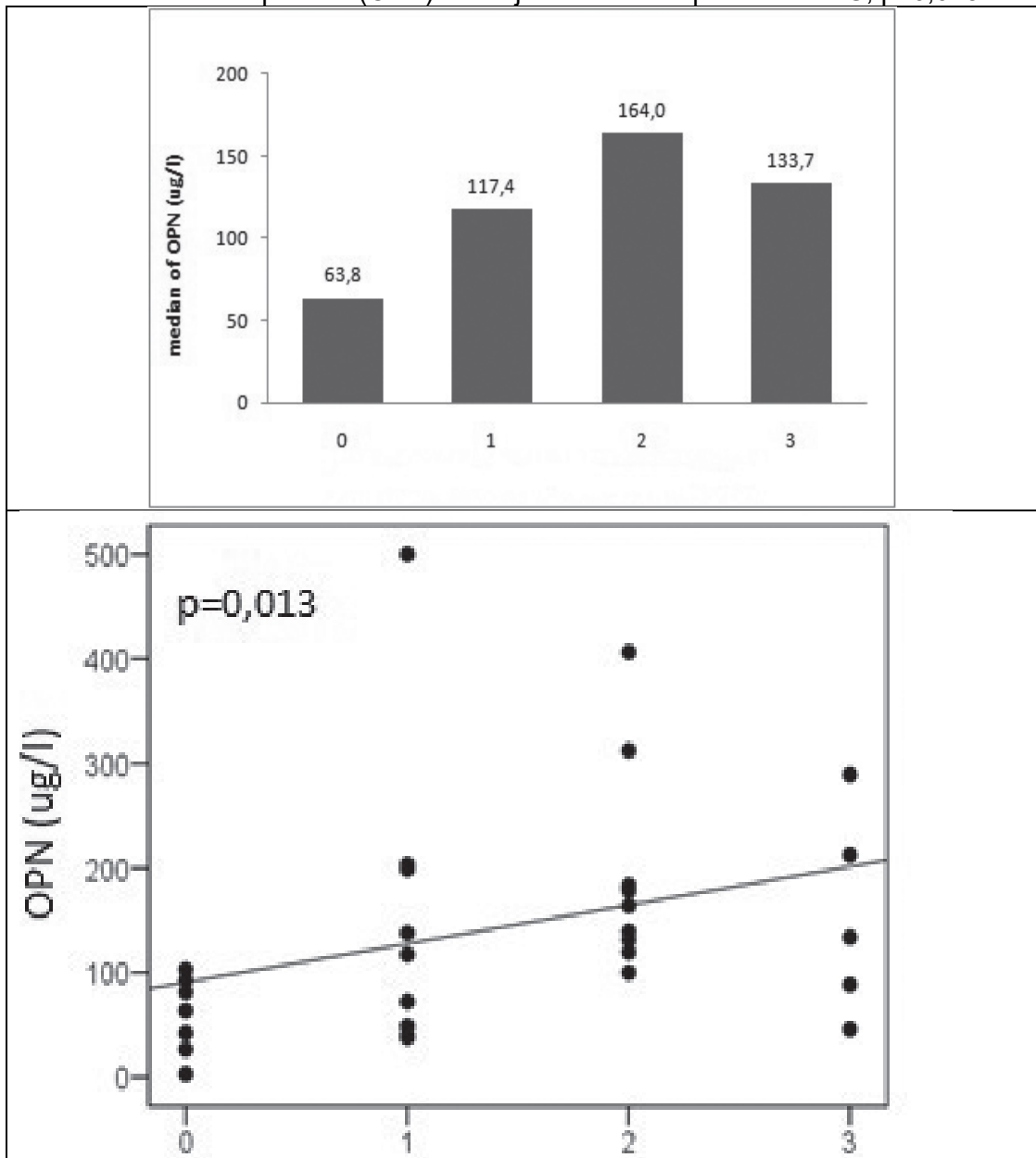
Obr. 5 Výsledky korelační analýzy: vybrané ukazatele mikroprostředí kostní dřeně a rozsah myelomové kostní choroby dle RTG
Sérová hladina telopeptidu kolagenu typu I (ICTP) významně koreluje s rozsahem postižení RTG, $p=0,023$



Obr. 6. Výsledky korelační analýzy: vybrané ukazatele mikroprostředí kostní dřeně a rozsah myelomové kostní choroby dle RTG
Sérová hladina N-terminálního propeptidu prokolagenu typu I (PINP) koreluje s rozsahem postižení RTG, $p=0,039$



Obr. 7 Výsledky korelační analýzy: vybrané ukazatele mikroprostředí kostní dřeně a rozsah myelomové kostní choroby dle RTG
Sérová hladina osteopontinu (OSP) koreluje s rozsahem postižení RTG, $p=0,013$



Diskuze

Cílem při stanovení rozsahu myelomové kostní nemoci je najít takovou zobrazovací metodu či biochemický marker, který by pomohl zachytit postižení kostí již v úplném počátku onemocnění.

Pro myelomovou kostní nemoc je typická přítomnost osteolytických lézí na RTG s postižením především osového skeletu. Dalším častým nálezem jsou patologické fraktury lokalizované především v obratlových tělech či žebrech. Nevýhodou konvenční radiografie je vysoká falešná negativita, zejména v oblasti páteře [92, 99, 162].

Význam WB-MR je především v diagnostice hraničních stavů a hodnocení míry postižení páteře a pánve. Naopak, pro zobrazení lebky není WB-MR metodou volby. [162] Ve shodě se zahraničním písemnictvím jsou i naše závěry, které potvrzují superioritu WB-MR oproti RTG s nalezením vyšší citlivost magnetické rezonance. V době zahájení této výzkumné části byla konvenční radiografie dosud zlatým standardem pro hodnocení kostního postižení u MM. V současnosti je již za základ považováno vyšetření LD-CT a dochází k významnému posunu k sofistikovanějším technikám, jako je MRI či PET/CT, i díky nemalému podílu výsledků z našeho pracoviště, jejichž součástí jsou i výstupy této dizertační práce. [99, 114]

Posuzování parametrů kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně zaujímá poslední době významnou roli. Proto bylo vybráno několik perspektivních cytokinů a chemokinů, u nichž je znám podíl na rozvoji MKN, případně u nichž jsme již dříve prokázali souvislost s aktivitou MM. ICTP patří mezi degradační produkty kolagenu typu I, a je citlivých markerem kostní přestavby, především resorpce. Je také prokázána souvislost s velikostí nádorové masy. [163]

PINP zrcadlí rychlost produkce kolagenu I a tedy souvisí s rychlostí kostní přestavby a novotvorby [146]. Osteopontin se za fyziologických podílí na angiogenezi, apoptózy a také přestavbě kostní tkáně [146].

V rámci naší práce jsme hodnotili korelaci vybraných markerů k rozsahu kostního postižení pomocí zobrazovacích technik. U většiny nebyla prokázána souvislost s rozsahem myelomové kostní nemoci, ale u tří parametrů (ICTP, PINP a OPN) byl nalezen vztah k rozsahu osteologického procesu.

Osteopontin spolu s IL-6 má nezastupitelnou roli v rozvoji myelomové kostní nemoci.

[62] I v zahraničním písemnictví byla prokázána korelace mezi osteopontinem a přítomností osteolytických lézí hodnocených pomocí konvenční radiografie. [163-165]. Tyto nálezy nabízejí osteopontin jako jeden ze potenciálních markerů časného rozvoje myelomové kostní nemoci, především, když přihlédneme ke skutečnosti, že aktivní onemocnění se liší od MGNV mimo jiné i méně rozvinutou angiogenezí.

[166] Naše výsledky potvrzují vztah mezi sérovými hladinami osteopontinu a rozsahem onemocnění na RTG, ač byl korelační koeficient spíše nižší.

ICTP je dalším ze sérových markerů, který koreloval i s rozsahem kostního postižení hodnoceného citlivější celotělovou magnetickou rezonancí. Hladina ICTP bývá elevována u většiny nemocných s aktivním onemocněním. Vyšší sérové hladiny ICTP mají prediktivní hodnotu v přítomnosti ložiskových lézí při zobrazení MR, zatímco na konvenční radiografii tyto léze patrné nejsou. [163] I naše závěry potvrzují souvislost sérových hladin ICTP s kostním postižením zachyceným na WB-MR, ale i na RTG. Inhibice osteoblastogeneze je jedním ze základních mechanismů etiologie rozvoje MKN. Dalo by se předpokládat, že hladina PINP jakožto ukazatele obratu novotvorby kosti bude výrazně inhibována, jak bylo popsáno i v zahraničních studiích. [167].

Přesto jsme prokázali korelaci mezi postižením hodnoceném pomocí RTG a hladiny PINP. Tyto nálezy si vysvětlujeme předpokládanou přítomností „mikrofraktur“ v oblasti osteolýz, které mohou potencovat novotvorbu kostí, a tedy i tvorbu osteoblastů. [168]

Další souvislost mezi sérovými hladinami vyšetřovaných parametrů a rozsahem onemocnění hodnoceného pomocí zobrazovacích technik nebyla prokázána.

Za jednu z nejdůležitějších drah podílející se na rozvoji MKN lze považovat dráhu RANK/RANKL. Tuto premisu potvrzuje i náš výzkum, kdy z vyšetřených parametrů kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně byly nejvýrazněji zastoupeny parametry mající souvislost právě s dráhou RANK/RANKL.

Závěr

Vyšetření pomocí WB MR přináší vyšší citlivost při rozpoznávání kostního postižení u MKN oproti konvenční radiografii. Až u 40,63 % pacientů odhalila WB MRI závažné postižení skeletu, zatímco na RTG byly pouze minimální či žádné změny.

Z vybraných sérových ukazatelů MKN byl prokázán vztah hladiny ICTP k rozsahu postižení hodnocenému pomocí MRI ($kk=0,317$; $p=0,021$). Při korelaci s RTG byl prokázán signifikantní vztah u ICTP ($kk=0,306$, $p=0,023$), PINP ($kk=0,274$, $p=0,039$) a osteopontinu ($kk =0,331$, $p=0,013$).

7.4 Cíl 3: Analýza parametrů kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně a jejich korelace s cytogenetickými změnami

Úvod

Ačkoli je MKN obecně akceptována jako hlavní příčina morbidity a mortality MM, v poslední době není mnoho prací, které by posuzovaly vývoj MKN s ohledem na cytogenetické změny, které jsou v současnosti nejdůležitějšími prognostickými faktory u MM. Některé cytogenetické změny jsou považovány za „vysoce rizikové“, např. přítomnost del(17p), t(4;14) nebo t(14;16), které se staly dokonce součástí nově zavedeného revidovaného mezinárodního stážovacího systému (R- ISS). [25]

International Myeloma Working Group (IMWG) navrhla v roce 2014 definovat vysoce rizikovou skupinu pacientů na základě přítomnosti cytogenetických aberací t(4;14), t(14;16) a del (17/17p). [169] Novější, komplexnější metodika považuje za „vysoce rizikové“ všechny pacienty s translokacemi t(14;16), t(14;20), del (17/17p) a nehyperdiploidním karyotypem u nově diagnostikovaného MM. Také zisk 1q spojený s delecí 1p zhoršuje prognózu. Naopak t(11;14) znamená obvykle prognózu příznivou. [169]

Cílem naší práce bylo posoudit možný vztah cytogenetických změn s vybranými ukazateli kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně s předpokladem identifikace těch abnormalit, které mohou vést k rozvoji MKN.

Pacienti a metody

V této části práce byl analyzován soubor celkem 308 pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem (NDMM), kteří splňují IMWG kritéria. [1] Poměr M/Ž byl 1,4:1 s mediánem věku 65 let (28-86 let), při společném zastoupení jednotlivých imunohistochemických typů (tab. 11). Stážování dle Mezinárodního prognostického indexu (International Staging System) bylo rozvrstveno následovně:

stadium 1 bylo zastoupeno ve 23 % (N = 75), stadium 2 u 51 % (N = 158) a stadium 3 u 31 % (N = 98). [24] Rozsah onemocnění byl hodnocen pomocí Durie-Salmon klasifikace. [23] Stádium I bylo zastoupeno v 10 % (N = 32), stadium II ve 49 % (N = 150) a stadium III ve 41 % (N = 126).

Tab. 11. Charakteristika pacientů (N = 308)

M: Ž	1,4/1
Věk (roky)	Median 65 (25-86)
Isotype	
IgG	184 (60%)
IgA	69 (23%)
LC only	47 (15%)
IgD	3 (1%)
Nonsecretory	4 (1%)
IgM	1

Byly stanoveny následující markery: thymidinkináza (sTK), ELISA β 2-mikroglobulin (β 2m), Dickkopf-1 protein (DKK-1), C-terminální telopeptid kolagenu-I (ICTP), N-terminální propeptid prokolagenu typu I (PINP), receptor pro interleukin 6 (IL-6R), vaskulární buněčná adhezivní molekula-1 (VCAM), rozpustná intercelulární adhezivní molekula-1 (sICAM-1) a osteoprotegerin (OPG); hepatocytární růstový faktor (HGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), syndekan-1/CD138 (SYN), Antigen Fas (sFas), metodika je blíže uvedena v kapitole 7.1.

Ke stanovení chromozomálních změn jsme použili konvenční cytogenetickou analýzu a fluorescenční imunofenotypizaci a in situ hybridizační metodu (FISH) s lokusově specifickými sondami 1q21/1p32, IgH, RB1, TP53, t(4;14), t(11;14), t(14;16) a centromerické sondy pro chromozomy 7, 9, 11, 15 a 17 (Abbott-Vysis Inc., Downers

Grove, IL, USA; MetaSystems, Altlußheim, Německo, Zytovision, Bremerhaven, Německo).

Pro statistický odhad jsme použili Mann–Whitney post hoc U-test s Bonferroniho korekcí ke srovnání dvou skupin spojitých proměnných. Za statisticky významnou byla považována hodnota $p < 0,05$.

Výsledky

Rozsah cytogenetických změn byl zkoumán u všech 308 pacientů s následující distribucí: del(17p) u 7,5 % pacientů (N = 23), t(4;14) u 12,7 % pacientů (N = 39), t(14;16) u 2,6 % pacientů (N = 8), zisk 1q u 25 % pacientů (N = 77) a delRB1 u 42 % pacientů (N = 129). Vysoce rizikové změny představovaly přítomnost alespoň jedné z těchto změn: t(4;14), t(14;16) nebo del(17p), a byly přítomny u 22 % (N = 68) pacientů. Cytogenetické abnormality spojené s dobrou prognózou - t(11;14) byly přítomny u 12,7 % nemocných (N = 39) a polyploidie u 60 % nemocných (N = 186). Většina pacientů měla kombinaci 2 a více abnormalit. Individuální zastoupení jednotlivých cytogenetických abnormalit je uvedeno v tabulce 12.

Tab. 12 Zastoupení jednotlivých cytogenetických změn

delRB1	129 (42%)
Hyperdiploidie	186 (60%)
t(11;14)	39 (12,7%)
t(4;14)	38 (12,3%)
t(14;16)	8 (2,6 %)
Zisk 1q21	77 (25%)
del(17p)	22 (7,5%)

U pacientů s del(17p) se hladiny všech hodnocených parametrů MKN významně nelišily od hodnot u pacientů s absencí del(17p). Podobně nebyly zachyceny žádné

významné korelace v posuzovaných ukazatelích MKN u pacientů s přestavbou IgH nebo bez ní. U pacientů s přítomností t(11;14) však byl jistý trend k nižším hladinám IL-6R.

Byly nalezeny vyšší hladiny TK u pacientů s t(4;14), ale rozdíl nebyl statisticky významný, pravděpodobně kvůli omezenému počtu pacientů.

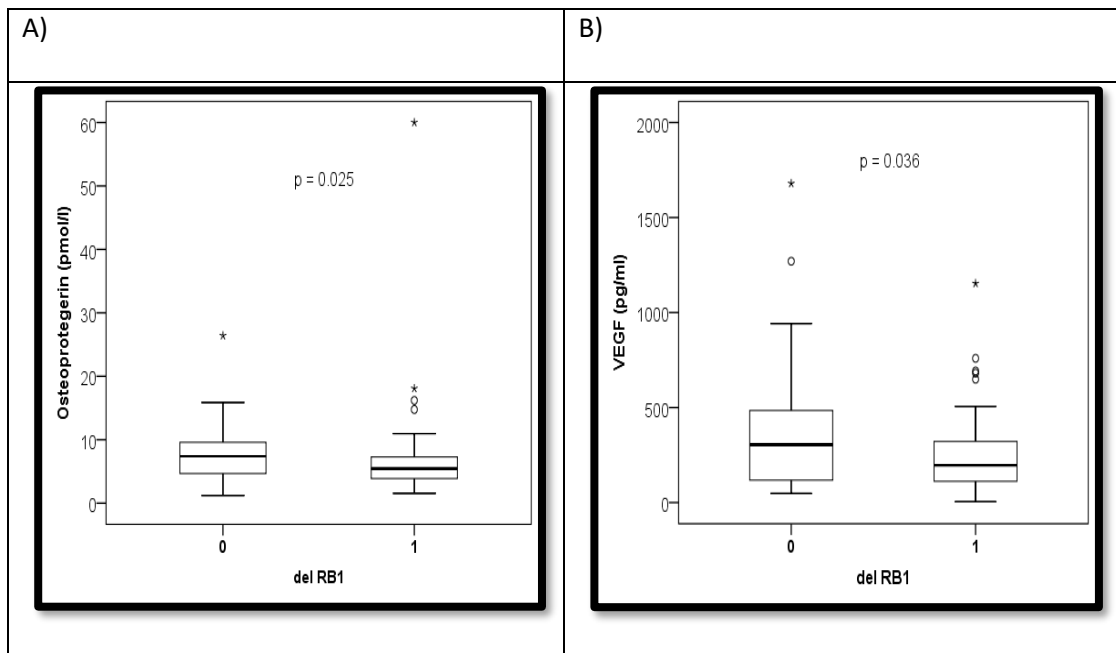
Podobně pacienti s komplexním karyotypem (tj. > 3 cytogenetické změny) měli vyšší sérové hladiny DKK-1, ale bez statistické významnosti.

Jedinci s delRB1 měli významně nižší hladiny OPG (medián (M) 5,46 vs 7,39 pmol/l, $p=0,025$) a VEGF (M = 196 vs 304 pg/ml; $p=0,036$) (obrázek 8). Tato cytogenetická abnormalita byla také spojena s nižšími hladinami DKK-1 v séru, ale rozdíl nebyl statisticky významný.

Obr. 8 Korelace delRB1 s osteoprotegerinem a vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF).

A: Srovnání sérových hladin osteoprotegerinu a delRB1 u pacientů s mnohočetným myelomem. Vertikální osa: sérové hladiny osteoprotegerinu (pmol/l), horizontální osa: přítomnost delRB1 (0 = bez, 1 = s)

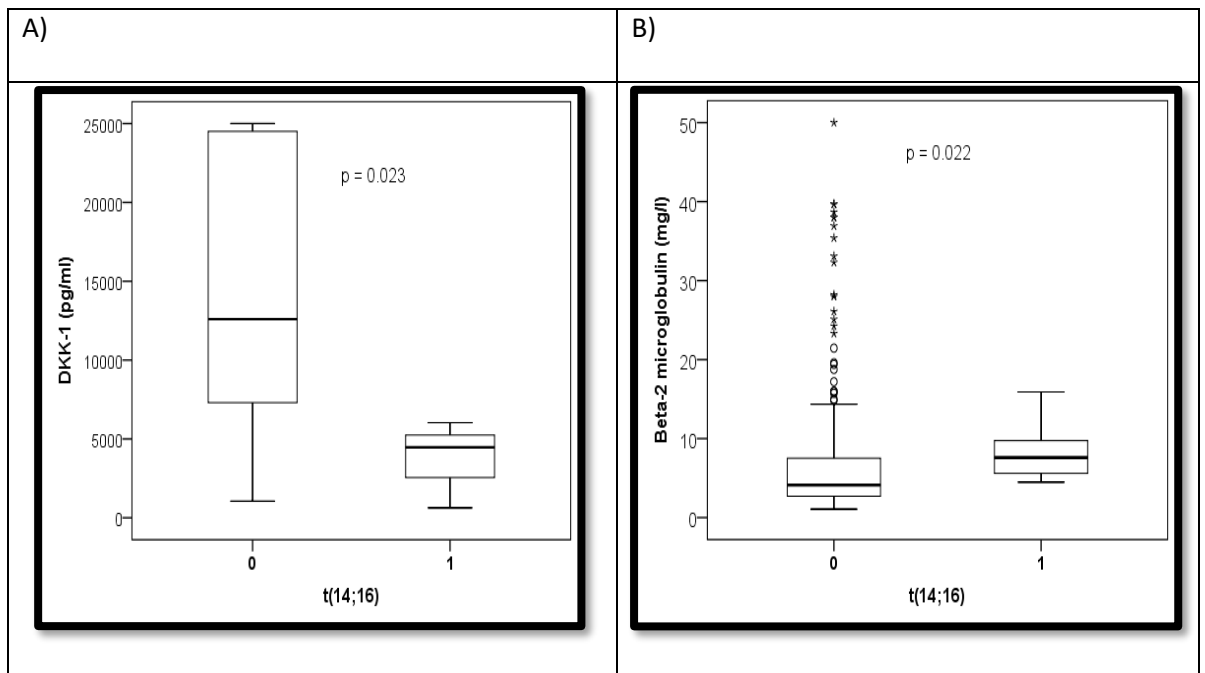
B: Srovnání sérových hladin vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) a delRB1 u pacientů s mnohočetným myelomem. Vertikální osa: hladiny VEGF v séru (pg/ml), horizontální osa: přítomnost delRB1 (0 = bez, 1 = s)



Přítomnost t(14;16) byla spojena s vyššími hladinami β 2m ($M = 7,59$ vs $4,13$ mg/l; $p=0,022$) a nižšími hladinami DKK-1 ($M = 4465$ vs 12593 ng/l) (obrázek 9). Také jsme u pacientů s t(14;16) zjistili tendenci k nižším hladinám TK, ovšem bez statistické významnosti.

Obr. 9 Korelace t(14;16) se sérovými hladinami β 2-mikroglobulinu a DKK-1
 A: Srovnání sérových hladin Dickkopf-related proteinu 1 (DKK-1) a t(14;16) u pacientů s mnohočetným myelomem. Vertikální osa: sérové hladiny DKK-1 (pg/ml), horizontální osa: přítomnost t(14;16) (0 = bez, 1 = s)

B: Srovnání sérových hladin β 2-mikroglobulinu (B2M) a t(14;16) u pacientů s mnohočetným myelomem. Vertikální osa: sérové hladiny β 2-mikroglobulinu (mg/l), horizontální osa: přítomnost t(14;16) (0 = bez, 1 = s)

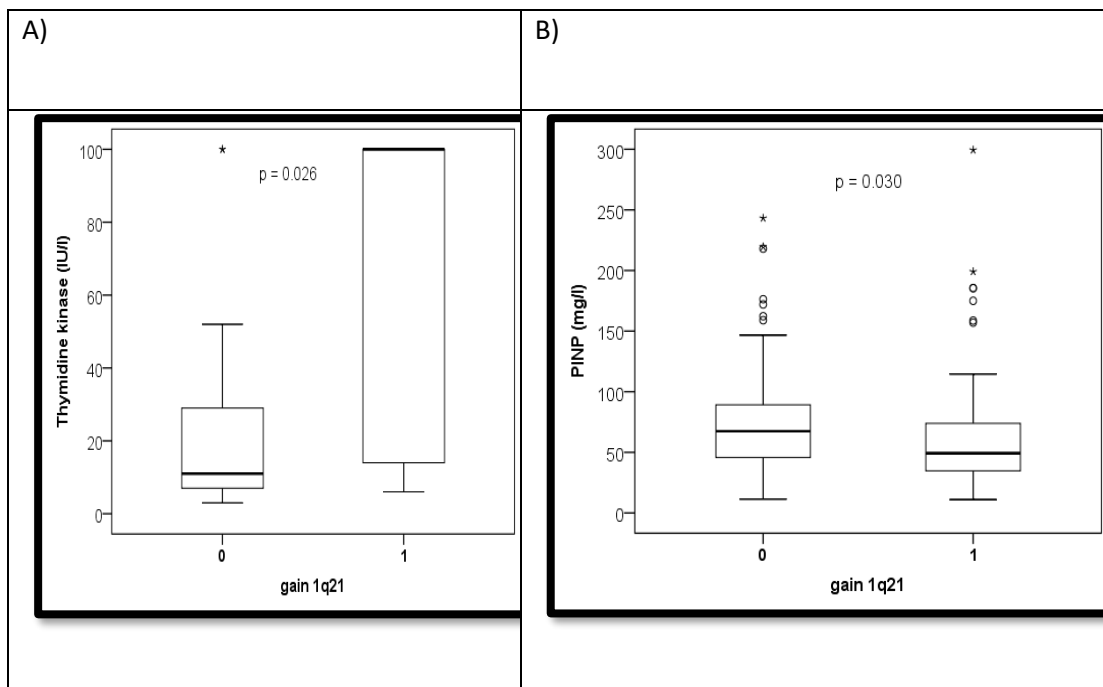


Přítomnost zisku 1q21 byla spojena s vyššími hladinami TK (M = 100,0 vs 11,0 IU/l, $p=0,026$) a nižšími hladinami PINP (M = 49,3 vs 67,4 mg/l, $p=0,030$) (obrázek 10). Byla zde také tendence k nižším hladinám DKK-1, ale rozdíl nebyl statisticky významný.

Obr. 10 Korelace zisku 1q21 s thymidinkinázou a N-terminálním peptidem prokolagenem-I (PINP)

A: Srovnání sérových hladin Thymidin kinázy (TK) a zisku 1q21 u pacientů s mnohočetným myelomem. Vertikální osa: sérové hladiny TK (IU/l), horizontální osa: přítomnost zisku 1q21. (0 = bez, 1 = s).

B: Porovnání sérových hladin N-terminálního peptidu prokolagenu-I (PINP) a zisku 1q21 u pacientů s mnohočetným myelomem. Vertikální osa: N-terminální peptid prokolagen-I (mg/l), horizontální osa: přítomnost zisku 1q21 (0 = bez, 1 = s).



Diskuze

Rozsah myelomové kostní choroby je velmi heterogenní a liší se svým rozsahem viditelným pomocí zobrazovacích technik od solitární léze, osteoporózu až po výrazné osteolytické postižení s přítomností patologických zlomenin nebo dokonce extramedulárního onemocnění. Kvůli kolísání rozsahu MKN jsme předpokládali zapojení různých drah mikroprostředí kostní dřeně. Existují odlišné způsoby manifestace a průběhu onemocnění, a dokonce i v případě jednoho nemocného existuje intraklonální heterogenita populace myelomových buněk, což naznačuje vliv inherentních charakteristik, jako jsou cytogenetické změny. U několika cytogenetických aberací byl prokázán vliv na nepříznivou prognózu. Mezi ně patří $\text{del}(17p)$, $t(4;14)$ nebo $t(14;16)$. Přítomnost kterékoli z těchto cytogenetických abnormalit je klasifikována jako vysoce riziková. [170] Jejich přítomnost zřejmě ovlivňuje dominantní vlastnosti myelomového klonu – jeho agresivitu a odolnost vůči léčbě. Bylo zjištěno, že přítomnost $\text{del}(17p)$ je spojena s vyšším výskytem extramedulárního onemocnění, ale ne s větším postižením skeletu. [171, 172]

Předpokládáme, že vývoj MKN spočívá v kontinuálním a pomalém ovlivňování mikroprostředí kostní dřeně než jako důsledek agresivního a rychlého obratu myelomových buněk, u něhož dochází spíše k ovlivnění normální hematopoézy, ale zatím bez dopadu na kostní strukturu. [171] V souladu s touto hypotézou i v našem souboru existovaly pouze vzácné asociace vysoce rizikových rysů a aktivace MKN. Pacienti s $\text{del}(17p)$ neměli významně změněné hladiny žádné z hodnocených drah MKN ve srovnání s pacienty bez této abnormality. Podobně nebyla patrná asociace $t(4;14)$ a zvýšená aktivace kterékoli z drah MKN ve srovnání s pacienty bez $t(4;14)$. Tato translokace je rovněž spojena se špatnou prognózou a má negativní dopad, který je nezávislý na typu léčby a dalších prognostických faktorech. [170] V éře nových látek by mohl být negativní dopad překonán, zejména inhibitory proteazomu (jako je bortezomib, carfilzomib či ixazomib), samotnými nebo v kombinaci s

následnou autologní transplantací krvetvorných buněk. [173, 174] Absence vztahu t(4;14) a rozsahu MKN naznačuje, podobně jako v případě del(17p), její vliv spíše na agresivitu onemocnění než na procesy vedoucí k postižení kosti.

Translokace t(14;16) patří k přestavbám IgH a je popisována u 5–7 % všech pacientů s MM. Spolu s t(4;14) je zcela specifická pro MM a není popsána u žádné jiné hematologické malignity. [172] Přítomnost t(14;16) je často spojena s IgA izotypem MM a také s akutním renálním selháním v době diagnózy. [172, 175] V naší studii byl t(14;16) spojen s vyššími hladinami B2M a nižšími hladinami DKK-1 v séru. Abychom vyloučili možný dopad renální insuficience na zkreslení sérových hladin, analyzovali jsme také renální parametry, ale pouze 8 % pacientů mělo zvýšené hladiny kreatininu. [172, 175] Kromě agresivního průběhu MM se tak zdá, že přítomnost t(14;16) může mít možnou roli v řízení dráhy WNT vlivem na produkci DKK-1.

Rozsah MKN je zřejmě ovlivněn jinými příčinami než přítomností vysoce rizikových cytogenetických změn. Posuzované cytogenetické abnormality dominantně ovlivňují spíše plazmatické buňky jako takové, včetně jejich proliferační aktivity, případně rezistence na léčbu, ale jejich dopad na rozvoj MKN bude spíše limitovaný.

V hodnoceném souboru jsme našli významné korelace mezi cytogenetickými abnormalitami a parametry MKN u pacientů s méně rizikovými změnami (a méně agresivním průběhem), zato s výraznějším postižením kostí. Pacienti s delRB1, který je nejčastější u nehyperdiploidních pacientů, ale také u hyperdiploidních pacientů a pacientů s normální cytogenetikou, měli nižší hladiny osteoprotektivních markerů a markerů kostní tvorby, jako je PINP nebo OPG. Tato cytogenetická aberace je často přítomna i u pacientů s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGNV) a může tedy být jednou z počátečních změn, které řídí transformaci premaligního MGNV na aktivní MM. U nemocných s přítomnou delRB1 byly rovněž vyšší sérové hladiny VEGF. VEGF je glykoprotein související s indukci angiogeneze a proliferace

endoteliálních buněk. VEGF zvyšuje přežití osteoklastů, a proto může také ovlivnit rozsah myelomového onemocnění kostí. [176, 177]

Zisk 1q21, je často prezentován jako vysoce rizikový, ale některé práce jej řadí mezi standardní či střední riziko. [167, 178, 179] Bylo zjištěno, že zisk 1q21 je často pozorován v pozdějších fázích onemocnění a je také patognomický pro aktivní mnohočetný myelom, u pacientů s MGNV nebyl pozorován.[170, 180] To znamená, že zisk 1q21 může hrát roli v progresi onemocnění a má též variabilní vliv na prognózu.[181]

V našem souboru bylo 25 % pacientů se ziskem 1q21. Přítomnost amp 1q21 významně korelovala se sníženými hladinami PINP i OPG, což naznačuje možný dopad této cytogenetické změny také na pokročilé onemocnění kostí.,

Závěr

Nebyl prokázán signifikantní vztah mezi vysoce rizikovými cytogenetickými změnami – del17p, t(4;14), t(14;16) a hladinami ukazatelů MKN, pouze v případě t(14;16) byl významný vztah k sérové hladině B2M. Signifikantní korelace však byly nalezeny u některých méně agresivních cytogenetických aberací: vztah delRB1 k nižším hladinám OPG a VEGF a dále vztah zisku 1q21 k vyšším hladinám TK a nižším hladinám PINP.

Předpokládáme, že vysoce rizikové cytogenetické změny vedou spíše k podpoře proliferace a rezistence nádorových plazmocyťů, zatímco rozvoj kostního postižení podporují pomalejší (méně agresivní) klony onemocnění, které více ovlivňují mikroprostředí kostní dřeně. Přítomnost zisku 1q21 má obě nepříznivé vlastnosti. Podobně jako del(17p) nebo t(4;14) podporuje proliferaci a agresivitu onemocnění; a podobně jako u pomalu proliferujících klonů je spojena s významně sníženými hladinami osteoprotektivních cytokinů.

7.4 Zhodnocení přínosu stanovení ukazatelů signálních drah myelomové kostní nemoci a jejich vliv na prognózu nemocných

Úvod

Přítomnost kostních lézí je typickým příznakem pro mnohočetný myelom. [2] Bylo také prokázáno, že rozsah onemocnění souvisí s prognózou nemocných. [6] Již i v této práci jsme prokázali korelaci markerů mikroprostředí kostní dřeně s aktivitou onemocnění.

Cílem této části práce bylo posouzení korelace signálních drah myelomové kostní nemoci k parametrům přežití.

Vyšetřený soubor:

V této studii byl analyzován soubor 117 pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem, kteří splňují IMWG kritéria. [1] Poměr M/Ž byl 1:1,2 s mediánem věku 66 let (40-92 let). Všichni pacienti byli zpočátku léčeni režimem na bázi inhibitoru proteazomu (PI) – buď bortezomibem (N=108) nebo karfilzomibem (N=9) Autologní transplantaci kmenových buněk (ASCT) podstoupilo 26 nemocných (30%).

Stážování dle Mezinárodního prognostického indexu (International Staging System) [24] bylo rozvrstveno následovně: stadium 1 bylo zastoupeno ve 28 % (N = 33), stadium 2 u 38 % (N = 40) a stadium 3 u 34 % (N = 40). Rozsah onemocnění byl hodnocen pomocí Durie-Salmon klasifikace. [23] Stádium I bylo zastoupeno v 9 % (N = 10), stadium II ve 33 % (N = 39) a stadium III ve 58 % (N = 68). Z parametrů přežití byla hodnocena doba bez progresu (progression free survival, PFS) a celkové přežití (overall survival OS).

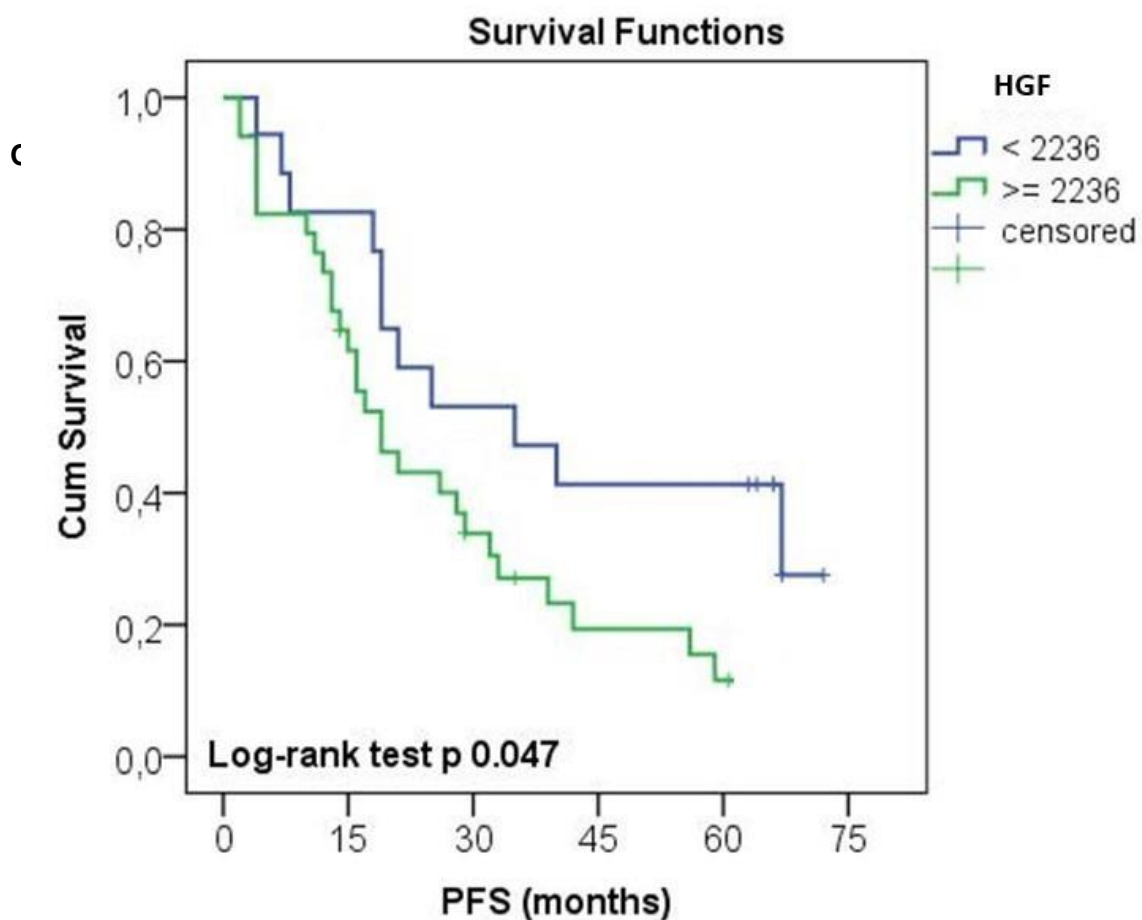
Byly hodnoceny následující parametry metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně parametry v séru: Hepatocytární růstový faktor, Zánětlivý makrofágový faktor 1 α ,

Dickkopf protein-1, Aktivin A, Annexin A2, Syndekan1/CD138, Matrixová metaloproteináza 9, Sklerostin, Osteoprotegerin. K jejich hodnocení byla použita metodika shodná s metodikou popsanou v kapitole 7.1.

Ke statistickému hodnocení jsme použili Mann–Whitney post hoc U-test s Bonferroniho korekcí ke srovnání dvou skupin spojitých proměnných, dále Kruskal-Wallisův test a Kaplan-Meierovu analýzu. P-hodnota $< 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

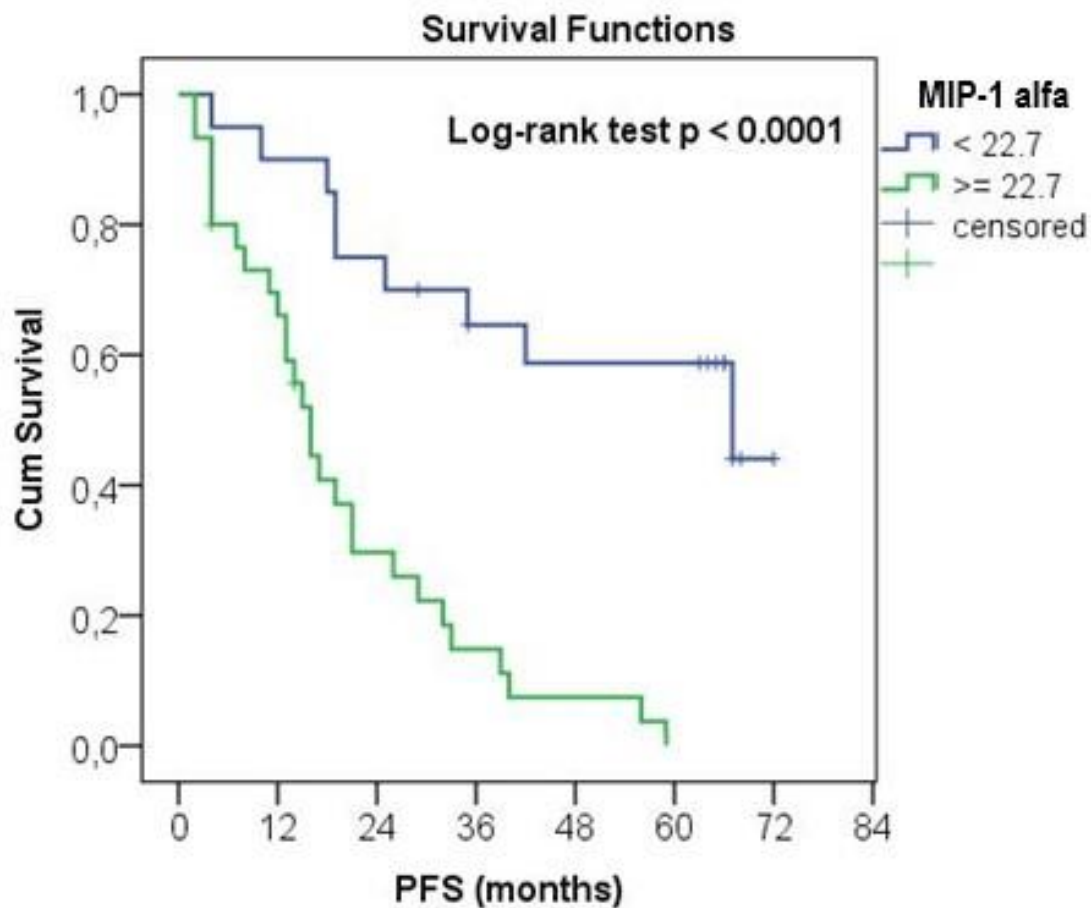
Výsledky

Vzhledem ke krátké době sledování nebylo možné vyhodnotit OS. Medián PFS byl u všech vyšetřovaných nemocných byl 21 měsíců. Byla prokázána signifikantní korelace mezi hepatocytárním růstovým faktorem a PFS, kdy diskriminační sérovou hladinou byla hodnota 2236 pg/ml. Pacienti s hladinou nižší než 2236 pg/ml měli



Obdobný vztah byl pozorován i u MIP-1 α : Pacienti s hladinou nižší než 22,7 pg/ml měli lepší PFS než pacienti s hladinou vyšší (M 67 vs 16m, $p = 0,0001$), viz obr. 12 U ostatních posuzovaných parametrů jsme vztah k prognóze onemocnění nenalezli.

Obr. 12



Diskuze:

Tato část práce popisuje prognostickou významnost sérových ukazatelů kostního metabolismu u pacientů s aktivním MM. MKN závisí na roli mikroprostředí kostní dřeně v přežití a proliferaci myelomových buněk. Účelem této práce bylo vyhodnotit, zda některé sérové markery kostního metabolismu a mikroprostředí KD mají vliv na délku přežití pacientů, a tedy i na klinický výsledek.

.Prokázali jsme, že zejména zvýšené sérové hladiny HGF a MIP-1 významně korelovaly s nepříznivou prognózou a délkou doby bez progresu u pacientů s MM.

U pacientů s pokročilým mnohočetným myelomem bylo prokázáno, že mají zvýšenou angiogenezi kostní dřeně ve srovnání s pacienty s monoklonální gamapatií nejistého významu. [182] Bylo také zjištěno, že neovaskularizace kostní dřeně souvisí s progresí onemocnění. [183-185] Angiogeneze hraje klíčovou roli v patogenezi MM. Role cytokinů podílejících se na angiogenezi byla intenzivně studována a korelována s proliferací plazmatických buněk i s maligní transformací [9]. Některé studie prokázaly, že angiogeneze má u MM prognostický význam [9, 10].

Jak již bylo v předchozích částech této práce zmíněno, HGF je zodpovědný především za stimulaci a růst epiteliálních buněk čímž podporuje neovaskularizaci. [68, 149] Jeho zvýšená hladina u pacientů s mnohočetným myelomem také souvisí se syndekanem – 1, což je transmembránový glykoprotein vyskytující se typicky na klonálních plazmocytech. [155] Díky syndekanu-1 pak HGF podporuje aktivaci fosfatidylinositol 3-kinázy/proteinkinázy B a dráhy RAS/mitogenem aktivované proteinkinázy, signální cesty zapojené do buněčného přežívání a proliferace myelomových buněk. [186] Z této analýzy vyplývá i možný vztah prognostický, kdy vysoká hladina HGF naznačuje kratší mPFS.

Dalším působkem korelujícím s PFS byl MIP-1 α , potentní induktor osteoklastogeneze. [65] Tento cytokin je tvořen klonálními plazmocyty, jeho zvýšená hladina v séru tedy souvisí s mírou infiltrace kostní dřeně. [65] Již v předchozích studiích bylo prokázáno, že větší množství myelomových buněk v kostní dřeni souvisí s agresivnějším onemocněním. [187] Mimo skutečnost, že je MIP-1 α tvořen patologickými plazmocyty, má také vliv na jejich akumulaci a proliferaci, čímž se dá rovněž vysvětlit jeho negativní vliv na délku přežití. [67] Naše výsledky naznačují, že hladiny MIP-1 mohou být užity jako případný prognostický ukazatel, současně ale dráha MIP-1 může být potenciálním cílem nových antimyelomových léčebných režimů.

Limitací našeho hodnocení je zejména krátká doba sledování souboru v době hodnocení a také nevyrovnané počty nemocných v posuzovaných skupinách. Mediány PFS jsou tak nejspíše v důsledku statistického odhadu a nekorelují plně se současnými literárními údaji o léčebném účinku použitých režimů. Zejména výsledky v prognosticky příznivých skupinách (s nízkou hladinou HGF a MIP-1) dosahují nad očekávání dlouhých mediánů. Také heterogenita v použité vstupní léčbě se může značně podílet na výsledném zkreslení. Přesto se zdá, že jak HGF, tak i MIP-1 jistou roli v chování onemocnění a jeho prognóze mají.

Závěr:

Byla prokázána signifikantní korelace mezi mPFS a sérovou hladinou HGF. Pacienti s hladinou HGF <2236 pg/ml, měli signifikantně delší mPFS než pacienti s hladinou vyšší (M 45 vs 19m; $p = 0,047$).

Byla prokázána signifikantní korelace mezi mPFS a sérovou hladinou *MIP-1 α* . Pacienti s *MIP-1 α* < 22,7 pg/ml měli delší mPFS než pacienti s hladinou vyšší (M 67m vs 16m, $p = 0,0001$)

8.0 Souhrn nálezů

8.1 Zhodnocení přínosu stanovení sérových hladin vybraných markerů kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně ve srovnání s aktivitou mnohočetného myelomu

- V sestavě nemocných s aktivním mnohočetným myelomem byly oproti jedincům s MGNV signifikantně zvýšeny sérové hladiny HGF ($p = 0,0003$), MIP1 α ($p = 0,021$), SYN-1 ($p = 0,0001$) a DKK-1 ($p = 0,030$).
- Při srovnání nemocných s aktivním mnohočetným myelomem a doutnajícím myelomem byla u AMM nalezena signifikantně zvýšená hladina DKK-1 ($p = 0,038$) a Annexinu A2 ($p = 0,017$)
- V souboru nemocných s monoklonální gamapatií nejasného významu bylo proti nemocným s diagnostikovaným doutnajícím mnohočetným myelomem nalezeny u SMM vyšší sérové hladiny SYN-1 ($p = 0,027$).

8.2 Zhodnocení přínosu stanovení ukazatelů signálních drah myelomové kostní nemoci a jejich korelace s rozsahem onemocnění hodnoceného pomocí zobrazovacích vyšetření

- Vyšetření pomocí WB MRI přináší vyšší citlivost při rozpoznávání kostního postižení u MKN oproti konvenční radiografii.
 - WB-MR odhalilo závažné postižení u 81 % pacientů, RTG u 47 % nemocných
 - Při srovnání zobrazovacích technik odhalila WB-MR u 40,63 % pacientů závažné postižení skeletu, kdy na RTG byly minimální či žádné změny.
 - Obě tyto metody se zcela shodovaly u 34 % vyšetřených jedinců a u 24,37 % byly výsledky obdobné.

Z vybraných sérových ukazatelů MKN byl prokázán vztah hladiny ICTP k rozsahu postižení hodnocenému pomocí MRI ($kk=0,317$; $p=0,021$). Při korelaci s RTG byl prokázán signifikantní vztah u ICTP ($kk=0,306$, $p=0,023$), PINP ($kk=0,274$, $p=0,039$) a osteopontinu ($kk =0,331$, $p=0,013$).

8.3 Analýza parametrů kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně a jejich korelace s cytogenetickými změnami

- Nebyl prokázán signifikantní vztah mezi vysoce rizikovými cytogenetickými změnami – del17p, t(4;14), t(14;16) a hladinami ukazatelů MKN, pouze v případě t(14;16) byl významný vztah k sérové hladině B2M.
- Jedinci s delRB1 měli významně nižší hladiny OPG ($p=0,025$) a VEGF ($p=0,036$)
- Přítomnost t(14;16) byla spojena s vyššími hladinami $\beta 2m$ ($p=0,022$) a nižšími hladinami DKK-1 ($p=0,023$)
- Přítomnost zisku 1q21 byla spojena s vyššími hladinami sTK ($p=0,026$) a nižšími hladinami PINP ($p=0,030$)
- Předpokládáme, že vysoce rizikové cytogenetické změny vedou spíše k podpoře proliferace a rezistence nádorových plazmocytů, zatímco rozvoj kostního postižení podporují pomalejší (méně agresivní) klony onemocnění, které více ovlivňují mikroprostředí kostní dřeně.

8.4 Zhodnocení přínosu stanovení ukazatelů signálních drah myelomové kostní nemoci a jejich vliv na prognózu nemocných

- Byla prokázána signifikantní korelace mezi mPFS a sérovou hladinou HGF. Pacienti s hladinou HGF <2236 pg/ml, měli signifikantně delší mPFS než pacienti s hladinou vyšší (M 45 vs 19m; $p = 0,047$).

- Byla prokázána signifikantní korelace mezi mPFS a sérovou hladinou *MIP-1 α* .
Pacienti s *MIP-1 α* < 22,7 pg/ml měli delší mPFS než pacienti s hladinou vyšší (M 67m vs 16m, p = 0,0001)

9.0 Závěry disertační práce

Z předložených analýz vyplývá, že hodnocení kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřeně u nemocných s plazmocelárními dyskrázemi má praktický význam při hodnocení aktivity onemocnění, odlišení potenciálně maligních stavů od již aktivního onemocnění a rovněž rozsahu kostního onemocnění. Výsledky mají také slibný potenciál k odlišení nemocných s časnou formou kostní nemoci.

Bylo prokázáno, že rentgenové zobrazení má pouze omezenou citlivost při hodnocení rozsahu MKN. Naše výsledky upřednostňují zobrazení pomocí WB-MR, která zachycuje významně vyšší rozsah postižení skeletu u MM.

Ukázalo se, že přítomnost vysoce rizikových cytogenetických změn nekoreluje s ukazateli myelomové kostní nemoci, ale spíše ovlivňuje agresivitu samotného myelomového klonu.

Vyšetření vybraných parametrů myelomové kostní nemoci, především HGF a *MIP-1 α* , mělo v analyzované sestavě nemocných významný vztah k PFS. Jistou limitací byl nehomogenní soubor s krátkou dobou sledování, přesto výsledky naznačují slibný prognostický potenciál.

Hodnocené kostní markerů se stává významnou součástí v diagnostice mnohočetného myelomu. Společně s cytogenetickými charakteristikami a dalšími specializovanými technikami přispívá k celkovému obrazu onemocnění a může napomáhat i v rozhodování o volbě léčebného přístupu.

10. Literatura:

1. RAJKUMAR SV, DIMOPOULOS MA, PALUMBO A, BLADE J, MERLINI G, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The lancet oncology* 2014; 15: e538–e548.
2. MELTON LJ, KYLE RA, ACHENBACH SJ, OBERG AL, and RAJKUMAR SV. Fracture Risk With Multiple Myeloma: A Population-Based Study. *Journal of Bone and Mineral Research* 2005; 20: 487-493.
3. KYLE RA, GERTZ MA, WITZIG TE, LUST JA, LACY MQ, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proceedings* 2003; 78: 21-33.
4. COLEMAN RE. Bisphosphonates: clinical experience. *The Oncologist* 2004; 9(Supplement 4): 14-27.
5. VOGEL CL, YANAGIHARA RH, WOOD AJ, SCHNELL FM, HENDERSON C, et al. Safety and pain palliation of zoledronic acid in patients with breast cancer, prostate cancer, or multiple myeloma who previously received bisphosphonate therapy. *The Oncologist* 2004; 9(6): 687-695.
6. SONMEZ M, AKAGUN T, TOPBAS M, COBANOGLU U, SONMEZ B, et al. Effect of pathologic fractures on survival in multiple myeloma patients: a case control study. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR* 2008; 27: 11.
7. MALUSKOVA D, SVOBODOVÁ I, KUCEROVA M, BROZOVA L, MUZIK J, et al. Epidemiology of multiple myeloma in the Czech Republic. *Klin Onkol Cas Ceske Slov Onkol Spolecnosti* 2017; 30: 35-42.
8. BARIS D, SILVERMAN DT, BROWN LM, SWANSON GM, HAYES RB, et al. Occupation, pesticide exposure and risk of multiple myeloma. *Scandinavian journal of work, environment & health* 2004: 215-222.
9. ALEXANDER DD, MINK PJ, ADAMI HO, COLE P, MANDEL JS, et al. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *International Journal of Cancer* 2007; 120(S12): 40-61.
10. LYNCH HT, FERRARA K, BARLOGIE B, COLEMAN EA, LYNCH JF, et al. Familial myeloma. *New England Journal of Medicine* 2008; 359(2): 152-157.
11. SEIFERT M, SCHOLTYSIK R, and KÜPPERS R, *Origin and pathogenesis of B cell lymphomas*, in *Lymphoma*. 2013, Springer. p. 1-25.
12. GHIA P, GRANZIERO L, CHILOSI M, and CALIGARIS-CAPPIO F. *Chronic B cell malignancies and bone marrow microenvironment*. in *Seminars in cancer biology*. 2002. Elsevier.
13. KUEHL WM and BERGSAGEL PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2(3): 175-187.
14. ADAM Z, BEDNAŘÍK J, NEUBAUER J, CHALOUPKA R, FOJTÍK Z, et al. Doporučení pro časně rozpoznání postižení skeletu maligním procesem a pro časnou diagnostiku mnohočetného myelomu. *Vnitř lék* 2006; 52(Suppl 2): 9-13.
15. ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU V, BAMIAS A, GIKA D, SIMEONIDIS A, POULI A, et al. Renal failure in multiple myeloma: incidence, correlations, and prognostic significance. *Leukemia & lymphoma* 2007; 48(2): 337-341.
16. HUTCHISON CA, BRADWELL AR, COOK M, BASNAYAKE K, BASU S, et al. Treatment of acute renal failure secondary to multiple myeloma with chemotherapy and extended high cut-off hemodialysis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2009; 4(4): 745-754.
17. HEYNE N, DENECKE B, GUTHOFF M, OEHRLEIN K, KANZ L, et al. Extracorporeal light chain elimination: high cut-off (HCO) hemodialysis parallel to chemotherapy allows for a high proportion of renal recovery in multiple myeloma patients with dialysis-dependent acute kidney injury. *Annals of hematology* 2012; 91(5): 729-735.
18. MACHÁLKOVÁ K, RADOCHA J, and MAISNAR V. Hyperviskózní syndrom u pacientů s mnohočetným myelomem. *Klin Biochem Metab* 2011; 19: 93-95.

19. PIKA MT, KOSATÍKOVÁ MZ, JURÁŇOVÁ MJ, and MLČÁK MP. Nekorpuskulární hyperviskózní syndromy v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi* 2014; 16(4): 156-158.
20. DIMOPOULOS MA, MOREAU P, TERPOS E, MATEOS M-V, ZWEEGMAN S, et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2021; 32(3): 309-322.
21. DIMOPOULOS M, TERPOS E, COMENZO R, TOSI P, BEKSAC M, 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(9): 1545.
22. HÁJEK R KM, Maisnar V, et al. . Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. Doporučení vypracované Českou myelomovou skupinou, Myelomovou sekci České hematologické společnosti a Slovenskou Myelómovou Spoločnosťou pro diagnostiku a léčbu mnohočetného myelomu. *Transfuzie Hematol dnes* 2018; (24): 1-157.
23. DURIE BG and SALMON SE. A clinical staging system for multiple myeloma correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975; 36(3): 842-854.
24. GREIPP PR, MIGUEL JS, DURIE BG, CROWLEY JJ, BARLOGIE B, et al. International staging system for multiple myeloma. *Journal of clinical oncology* 2005; 23(15): 3412-3420.
25. PALUMBO A, AVET-LOISEAU H, OLIVA S, LOKHORST HM, GOLDSCHMIDT H, et al. Revised international staging system for multiple myeloma: a report from International Myeloma Working Group. *Journal of clinical oncology* 2015; 33(26): 2863.
26. MIKHAEL JR, DINGLI D, ROY V, REEDER CB, BUADI FK, et al. *Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 2013. Elsevier.
27. MUNSHI NC, AVET-LOISEAU H, RAWSTRON AC, OWEN RG, CHILD JA, et al. Association of minimal residual disease with superior survival outcomes in patients with multiple myeloma: a meta-analysis. *JAMA oncology* 2017; 3(1): 28-35.
28. RAJKUMAR SV. Treatment of multiple myeloma. *Nature reviews Clinical oncology* 2011; 8(8): 479.
29. BARLOGIE B, TRICOT GJ, VAN RHEE F, ANGTUACO E, WALKER R, et al. Long-term outcome results of the first tandem autotransplant trial for multiple myeloma. *British journal of haematology* 2006; 135(2): 158-164.
30. KUMAR SK, DISPENZIERI A, LACY MQ, GERTZ MA, BUADI FK, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia* 2014; 28(5): 1122-1128.
31. BENBOUBKER L, DIMOPOULOS MA, DISPENZIERI A, CATALANO J, BELCH AR, et al. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *New England Journal of Medicine* 2014; 371(10): 906-917.
32. LUDWIG H, DURIE BG, MCCARTHY P, PALUMBO A, SAN MIGUEL J, et al. IMWG consensus on maintenance therapy in multiple myeloma. *Blood* 2012; 119(13): 3003-3015.
33. TAI Y-T and ANDERSON KC. Antibody-based therapies in multiple myeloma. *Bone marrow research* 2011; 2011.
34. BONEWALD LF. The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2011; 26: 229-238.
35. JANCKILA AJ, TAKAHASHI K, SUN SZ, and YAM LT. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clinical Chemistry* 2001; 47: 74-80.
36. DELAISSÉ JM, EECKHOUT Y, and VAES G. Inhibition of bone resorption in culture by inhibitors of thiol proteinases. *The Biochemical Journal* 1980; 192: 365-368.
37. HSU H, LACEY DL, DUNSTAN CR, SOLOVYEV I, COLOMBERO A, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96: 3540-3545.

38. NAKAGAWA N, KINOSAKI M, YAMAGUCHI K, SHIMA N, YASUDA H, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 253: 395-400.
39. SIMONET WS, LACEY DL, DUNSTAN CR, KELLEY M, CHANG MS, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-319.
40. TSUJIMOTO T, LISUKOV IA, HUANG N, MAHMOUD MS, and KAWANO MM. Plasma cells induce apoptosis of pre-B cells by interacting with bone marrow stromal cells. *Blood* 1996; 87: 3375-3383.
41. TERPOS E, CHRISTOULAS D, and GAVRIATOPOULOU M. Biology and treatment of myeloma related bone disease. *Metabolism-Clinical and Experimental* 2018; 80: 80-90.
42. MUNDY GR, RAISZ LG, COOPER RA, SCHECHTER GP, and SALMON SE. Evidence for the secretion of an osteoclast stimulating factor in myeloma. *The New England Journal of Medicine* 1974; 291: 1041-1046.
43. SILBERMANN R and ROODMAN GD. Myeloma bone disease: Pathophysiology and management. *Journal of Bone Oncology* 2013; 2: 59-69.
44. MATSUZAKI K, KATAYAMA K, TAKAHASHI Y, NAKAMURA I, UDAGAWA N, et al. Human osteoclast-like cells are formed from peripheral blood mononuclear cells in a coculture with SaOS-2 cells transfected with the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor gene. *Endocrinology* 1999; 140(2): 925-932.
45. BARON R and KNEISSEL M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature Medicine* 2013; 19: 179-192.
46. GEORGE J, KUBOKI Y, and MIYATA T. Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering* 2006; 95: 404-411.
47. DAY TF, GUO X, GARRETT-BEAL L, and YANG Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Developmental Cell* 2005; 8: 739-750.
48. SHAHI M, PEYMANI A, and SAHMANI M. Regulation of bone metabolism. *Reports of biochemistry & molecular biology* 2017; 5(2): 73.
49. MCSHEEHY PM and CHAMBERS TJ. Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulates osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* 1986; 119: 1654-1659.
50. OWEN TA, ARONOW MS, BARONE LM, BETTENCOURT B, STEIN GS, et al. Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology* 1991; 128: 1496-1504.
51. KOBAYASHI Y, THIRUKONDA GJ, NAKAMURA Y, KOIDE M, YAMASHITA T, et al. Wnt16 regulates osteoclast differentiation in conjunction with Wnt5a. *Biochemical and biophysical research communications* 2015; 463(4): 1278-1283.
52. KOBAYASHI Y, UEHARA S, UDAGAWA N, and TAKAHASHI N. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. *The Journal of Biochemistry* 2015; 159(4): 387-392.
53. LEE S-K and LORENZO JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 1999; 140(8): 3552-3561.
54. CARTER PH and SCHIPANI E. The roles of parathyroid hormone and calcitonin in bone remodeling: prospects for novel therapeutics. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)* 2006; 6(1): 59-76.
55. DIAMOND T, LEVY S, DAY P, BARBAGALLO S, MANOHARAN A, et al. Biochemical, histomorphometric and densitometric changes in patients with multiple myeloma: effects of

- glucocorticoid therapy and disease activity. *British Journal of Haematology* 1997; 97: 641-648.
56. VALENTIN-OPRAN A, CHARHON SA, MEUNIER PJ, EDOUARD CM, and ARLOT ME. Quantitative histology of myeloma-induced bone changes. *British journal of haematology* 1982; 52(4): 601-610.
 57. MORI Y, SHIMIZU N, DALLAS M, NIEWOLNA M, STORY B, et al. Anti-alpha4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis. *Blood* 2004; 104: 2149-2154.
 58. EDWARDS CM, ZHUANG J, and MUNDY GR. The Pathogenesis of the Bone Disease of Multiple Myeloma. *Bone* 2008; 42: 1007-1013.
 59. HIDESHIMA T, CHAUHAN D, PODAR K, SCHLOSSMAN RL, RICHARDSON P, et al. Novel therapies targeting the myeloma cell and its bone marrow microenvironment. *Seminars in Oncology* 2001; 28: 607-612.
 60. GIULIANI N, BATAILLE R, MANCINI C, LAZZARETTI M, and BARILLÉ S. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* 2001; 98(13): 3527-3533.
 61. CROUCHER PI, SHIPMAN CM, LIPPITT J, PERRY M, ASOSINGH K, et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* 2001; 98(13): 3534-3540.
 62. STANDAL T, SEIDEL C, HJERTNER Ø, PLESNER T, SANDERSON RD, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood* 2002; 100(8): 3002-3007.
 63. SEZER O, HEIDER U, ZAVRSKI I, KÜHNE CA, and HOFBAUER LC. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood* 2003; 101: 2094-2098.
 64. ABE M, HIURA K, WILDE J, MORIYAMA K, HASHIMOTO T, et al. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood* 2002; 100: 2195-2202.
 65. TERPOS E, POLITOU M, SZYDLO R, GOLDMAN JM, APPERLEY JF, et al. Serum levels of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha) correlate with the extent of bone disease and survival in patients with multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 2003; 123: 106-109.
 66. MENU E, LEENHEER ED, RAEVE HD, COULTON L, IMANISHI T, et al. Role of CCR1 and CCR5 in homing and growth of multiple myeloma and in the development of osteolytic lesions: a study in the 5TMM model. *Clinical & Experimental Metastasis* 2006; 23: 291-300.
 67. LENTZSCH S, GRIES M, JANZ M, BARGOU R, DÖRKEN B, et al. Macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1 α) triggers migration and signaling cascades mediating survival and proliferation in multiple myeloma (MM) cells. *Blood* 2003; 101(9): 3568-3573.
 68. SATO T, HAKEDA Y, YAMAGUCHI Y, MANO H, TEZUKA K, et al. Hepatocyte growth factor is involved in formation of osteoclast-like cells mediated by clonal stromal cells (MC3T3-G2/PA6). *Journal of Cellular Physiology* 1995; 164: 197-204.
 69. TJIN EP, DERKSEN PW, KATAOKA H, SPAARGAREN M, and PALS ST. Multiple myeloma cells catalyze hepatocyte growth factor (HGF) activation by secreting the serine protease HGF-activator. *Blood* 2004; 104(7): 2172-2175.
 70. HJERTNER Ø, TORGERSEN ML, SEIDEL C, HJORTH-HANSEN H, WAAGE A, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) induces interleukin-11 secretion from osteoblasts: a possible role for HGF in myeloma-associated osteolytic bone disease. *Blood* 1999; 94(11): 3883-3888.
 71. BARTON B and MAYER R. IL-3 induces differentiation of bone marrow precursor cells to osteoclast-like cells. *The Journal of Immunology* 1989; 143(10): 3211-3216.
 72. LEE JW, CHUNG HY, EHRLICH LA, JELINEK DF, CALLANDER NS, et al. IL-3 expression by myeloma cells increases both osteoclast formation and growth of myeloma cells. *Blood* 2004; 103: 2308-2315.

73. SILBERMANN R, BOLZONI M, STORTI P, GUASCO D, BONOMINI S, et al. Bone marrow monocyte-/macrophage-derived activin A mediates the osteoclastogenic effect of IL-3 in multiple myeloma. *Leukemia* 2014; 28: 951-954.
74. TERPOS E, CHRISTOULAS D, KASTRITIS E, GKOTZAMANIDOU M, GAVRIATOPOULOU M, et al. Elevated Levels of Circulating Activin-A Correlate with Features of Advanced Disease, Extensive Bone Involvement and Inferior Survival In Patients with Multiple Myeloma. *Blood* 2010; 116: 2967.
75. JUNG Y, WANG J, SONG J, SHIOZAWA Y, WANG J, et al. Annexin II expressed by osteoblasts and endothelial cells regulates stem cell adhesion, homing, and engraftment following transplantation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2007; 110(1): 82-90.
76. KWON M, MACLEOD TJ, ZHANG Y, and WAISMAN DM. S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 2005; 10: 300-325.
77. D'SOUZA S, KURIHARA N, SHIOZAWA Y, JOSEPH J, TAICHMAN R, et al. Annexin II interactions with the annexin II receptor enhance multiple myeloma cell adhesion and growth in the bone marrow microenvironment. *Blood* 2012; 119: 1888-1896.
78. WESTENDORF JJ, KAHLER RA, and SCHROEDER TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 2004; 341: 19-39.
79. VAN ANDEL H, KOCEMBA KA, SPAARGAREN M, and PALS ST. Aberrant Wnt signaling in multiple myeloma: molecular mechanisms and targeting options. *Leukemia* 2019; 1.
80. HAABER J, ABILDGAARD N, KNUDSEN LM, DAHL IM, LODAHL M, et al. Myeloma cell expression of 10 candidate genes for osteolytic bone disease. Only overexpression of DKK1 correlates with clinical bone involvement at diagnosis. *British Journal of Haematology* 2008; 140: 25-35.
81. HEIDER U, KAISER M, MIETH M, LAMOTTKE B, RADEMACHER J, et al. Serum concentrations of DKK-1 decrease in patients with multiple myeloma responding to anti-myeloma treatment. *European Journal of Haematology* 2009; 82: 31-38.
82. TIAN E, ZHAN F, WALKER R, RASMUSSEN E, MA Y, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine* 2003; 349: 2483-2494.
83. QIANG Y-W, BARLOGIE B, RUDIKOFF S, and SHAUGHNESSY JD. Dkk1-induced inhibition of Wnt signaling in osteoblast differentiation is an underlying mechanism of bone loss in multiple myeloma. *Bone* 2008; 42: 669-680.
84. KAWANO Y and KYPTA R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science* 2003; 116: 2627-2634.
85. OSHIMA T, ABE M, ASANO J, HARA T, KITAZOE K, et al. Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. *Blood* 2005; 106: 3160-3165.
86. HIDESHIMA T, CHAUHAN D, SCHLOSSMAN R, RICHARDSON P, and ANDERSON KC. The role of tumor necrosis factor α in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene* 2001; 20(33): 4519-4527.
87. NANES MS. Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 2003; 321: 1-15.
88. SAAD F, LIPTON A, COOK R, CHEN YM, SMITH M, et al. Pathologic fractures correlate with reduced survival in patients with malignant bone disease. *Cancer* 2007; 110(8): 1860-1867.
89. WISLØFF F, ANDERSEN P, ANDERSSON T, BRANDT E, EIKA C, et al. Incidence and follow-up of asymptomatic multiple myeloma. *European journal of haematology* 1991; 47(5): 338-341.
90. ANGTUACO EJ, FASSAS AB, WALKER R, SETHI R, and BARLOGIE B. Multiple myeloma: clinical review and diagnostic imaging. *Radiology* 2004; 231(1): 11-23.
91. COLLINS CD. Multiple myeloma. *Cancer Imaging* 2010; 10(1): 20-31.

92. TERPOS E, MOULOPOULOS LA, and DIMOPOULOS MA. Advances in imaging and the management of myeloma bone disease. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29(14): 1907-1915.
93. MIRELS H. Metastatic disease in long bones. A proposed scoring system for diagnosing impending pathologic fractures. *Clinical orthopaedics and related research* 1989; (249): 256-264.
94. TERPOS E, DIMOPOULOS M, and MOULOPOULOS L. *The Role of Imaging in the Treatment of Patients With Multiple Myeloma in 2016*. in *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Meeting*. 2016.
95. SINGH J, FAIRBAIRN KJ, WILLIAMS C, DAS-GUPTA EP, RUSSELL NH, et al. Expert radiological review of skeletal surveys identifies additional abnormalities in 23% of cases: further evidence for the value of myeloma multi-disciplinary teams in the accurate staging and treatment of myeloma patients. *British journal of haematology* 2007; 137(2): 172-173.
96. LÜTJE S, DE ROOY JW, CROOCKEWIT S, KOEDAM E, OYEN WJ, et al. Role of radiography, MRI and FDG-PET/CT in diagnosing, staging and therapeutical evaluation of patients with multiple myeloma. *Annals of hematology* 2009; 88(12): 1161.
97. GLEESON T, MORIARTY J, SHORTT C, GLEESON J, FITZPATRICK P, et al. Accuracy of whole-body low-dose multidetector CT (WBLDCT) versus skeletal survey in the detection of myelomatous lesions, and correlation of disease distribution with whole-body MRI (WBMRI). *Skeletal radiology* 2009; 38(3): 225-236.
98. CHANTRY A, KAZMI M, BARRINGTON S, GOH V, MULHOLLAND N, et al. Guidelines for the use of imaging in the management of patients with myeloma. *British journal of haematology* 2017.
99. MINARIK J, KRHOVSKA P, HRBEK J, PIKA T, BACOVSKY J, et al. Prospective comparison of conventional radiography, low-dose computed tomography and magnetic resonance imaging in monoclonal gammopathies. *Biomedical papers* 2016; 160(2): 305-309.
100. MOULOPOULOS L, VARMA D, DIMOPOULOS M, LEEDS N, KIM E, et al. Multiple myeloma: spinal MR imaging in patients with untreated newly diagnosed disease. *Radiology* 1992; 185(3): 833-840.
101. MOULOPOULOS LA, GIKA D, ANAGNOSTOPOULOS A, DELASALLE K, WEBER D, et al. Prognostic significance of magnetic resonance imaging of bone marrow in previously untreated patients with multiple myeloma. *Annals of Oncology* 2005; 16(11): 1824-1828.
102. BAUR-MELNYK A, BUHMANN S, DÜRR H, and REISER M. Role of MRI for the diagnosis and prognosis of multiple myeloma. *European journal of radiology* 2005; 55(1): 56-63.
103. HANRAHAN CJ, CHRISTENSEN CR, and CRIM JR. Current concepts in the evaluation of multiple myeloma with MR imaging and FDG PET/CT. *Radiographics* 2010; 30(1): 127-142.
104. MESSIOU C, GILES S, COLLINS D, WEST S, DAVIES F, et al. Assessing response of myeloma bone disease with diffusion-weighted MRI. *The British journal of radiology* 2012; 85(1020): e1198-e1203.
105. SACHPEKIDIS C, MOSEBACH J, FREITAG MT, WILHELM T, MAI EK, et al. Application of 18F-FDG PET and diffusion weighted imaging (DWI) in multiple myeloma: comparison of functional imaging modalities. *American journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2015; 5(5): 479.
106. HILLEGASS J, ZECHMANN C, BÄUERLE T, WAGNER-GUND B, HEISS C, et al. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging identifies a subgroup of patients with asymptomatic monoclonal plasma cell disease and pathologic microcirculation. *Clinical Cancer Research* 2009; 15(9): 3118-3125.
107. HUANG SY, CHEN BB, LU HY, LIN HH, WEI SY, et al. Correlation among DCE-MRI measurements of bone marrow angiogenesis, microvessel density, and extramedullary disease in patients with multiple myeloma. *American journal of hematology* 2012; 87(8): 837-839.

108. JUWEID ME, *FDG-PET/CT in Lymphoma*, in *Positron Emission Tomography*. 2011, Springer. p. 1-19.
109. ZAMAGNI E, NANNI C, PATRIARCA F, ENGLARO E, CASTELLUCCI P, et al. A prospective comparison of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography, magnetic resonance imaging and whole-body planar radiographs in the assessment of bone disease in newly diagnosed multiple myeloma. *Haematologica* 2007; 92(1): 50-55.
110. DEMMER O, GOURNI E, SCHUMACHER U, KESSLER H, and WESTER HJ. PET imaging of CXCR4 receptors in cancer by a new optimized ligand. *ChemMedChem* 2011; 6(10): 1789-1791.
111. BURGER JA and KIPPS TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006; 107(5): 1761-1767.
112. BAO L, LAI Y, LIU Y, QIN Y, ZHAO X, et al. CXCR4 is a good survival prognostic indicator in multiple myeloma patients. *Leukemia research* 2013; 37(9): 1083-1088.
113. KUYUMCU S, ISIK EG, TIRYAKI TO, HAS-SIMSEK D, SANLI Y, et al. Prognostic significance of 68Ga-Pentixafor PET/CT in multiple myeloma recurrence: A comparison to 18F-FDG PET/CT and laboratory results. *Annals of Nuclear Medicine* 2021; 35(10): 1147-1156.
114. MINAŘÍK J, HRBEK J, and KRHOVSKÁ P. Racionální algoritmus zobrazovacích vyšetření u mnohočetného myelomu v podmínkách České republiky. *Transfuze Hematol. dnes* 2015; 4: 200-205.
115. TERPOS E, CHRISTOULAS D, and GAVRIATOPOULOU M. Biology and treatment of myeloma related bone disease. *Metabolism: Clinical and Experimental* 2017.
116. FAVUS MJ. Bisphosphonates for osteoporosis. *New England Journal of Medicine* 2010; 363(21): 2027-2035.
117. DUNFORD JE, THOMPSON K, COXON FP, LUCKMAN SP, HAHN FM, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001; 296(2): 235-242.
118. YEHS HS and BERENSON JR. Myeloma bone disease and treatment options. *European journal of cancer* 2006; 42(11): 1554-1563.
119. LAHTINEN R, LAAKSO M, PALVA I, ELOMAA I, and VIRKKUNEN P. Randomised, placebo-controlled multicentre trial of clodronate in multiple myeloma. *The Lancet* 1992; 340(8827): 1049-1052.
120. BERENSON JR, LICHTENSTEIN A, PORTER L, DIMOPOULOS MA, BORDONI R, et al. Long-term pamidronate treatment of advanced multiple myeloma patients reduces skeletal events. Myeloma Aredia Study Group. *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16(2): 593-602.
121. BERENSON JR, ROSEN LS, HOWELL A, PORTER L, COLEMAN RE, et al. Zoledronic acid reduces skeletal-related events in patients with osteolytic metastases: A double-blind, randomized dose-response study. *Cancer* 2001; 91(7): 1191-1200.
122. ROSEN LS, GORDON D, KAMINSKI M, HOWELL A, BELCH A, et al. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid compared with pamidronate disodium in the treatment of skeletal complications in patients with advanced multiple myeloma or breast carcinoma. *Cancer* 2003; 98(8): 1735-1744.
123. MORGAN GJ, DAVIES FE, GREGORY WM, COCKS K, BELL SE, et al. First-line treatment with zoledronic acid as compared with clodronic acid in multiple myeloma (MRC Myeloma IX): a randomised controlled trial. *The Lancet* 2010; 376(9757): 1989-1999.
124. MENSSEN HD, SAKALOVÁ A, FONTANA A, HERRMANN Z, BOEWER C, et al. Effects of long-term intravenous ibandronate therapy on skeletal-related events, survival, and bone resorption markers in patients with advanced multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20(9): 2353-2359.
125. KYLE RA, YEE GC, SOMERFIELD MR, FLYNN PJ, HALABI S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 clinical practice guideline update on the role of bisphosphonates in multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25(17): 2464-2472.

126. BAMIAS A, KASTRITIS E, BAMIA C, MOULOPOULOS LA, MELAKOPOULOS I, et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol* 2005; 23(34): 8580-7.
127. TERPOS E, ROODMAN GD, and DIMOPOULOS MA. Optimal use of bisphosphonates in patients with multiple myeloma. *Blood* 2013; 121(17): 3325-3328.
128. DIMOPOULOS MA, KASTRITIS E, ANAGNOSTOPOULOS A, MELAKOPOULOS I, GIKA D, et al. Osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma treated with bisphosphonates: evidence of increased risk after treatment with zoledronic acid. *haematologica* 2006; 91(7): 968-971.
129. MORGAN GJ, DAVIES FE, GREGORY WM, SZUBERT AJ, BELL SE, et al. Effects of induction and maintenance plus long-term bisphosphonates on bone disease in patients with multiple myeloma: the Medical Research Council Myeloma IX Trial. *Blood* 2012; 119(23): 5374-5383.
130. TERPOS E, MORGAN G, DIMOPOULOS MA, DRAKE MT, LENTZSCH S, et al. International Myeloma Working Group recommendations for the treatment of multiple myeloma-related bone disease. *Journal of clinical oncology* 2013; 31(18): 2347.
131. CHANG ST, TENFORDE AS, GRIMSRUD CD, O'RYAN FS, GONZALEZ JR, et al. Atypical femur fractures among breast cancer and multiple myeloma patients receiving intravenous bisphosphonate therapy. *Bone* 2012; 51(3): 524-527.
132. ELLIOTT R, KOSTENUIK P, CHEN C, KELLEY M, HAWKINS N, et al. *Denosumab is a selective inhibitor of human receptor activator of NF-Kb ligand (RANKL) that blocks osteoclast formation and function.* in *OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL*. 2007. SPRINGER LONDON LTD ASHBOURNE HOUSE, THE GUILDWAY, OLD PORTSMOUTH ROAD, ARTINGTON GU3 1LP, GUILDFORD, ENGLAND.
133. YEE AJ and RAJE NS. Denosumab, a RANK ligand inhibitor, for the management of bone loss in cancer patients. *Clinical interventions in aging* 2012; 7: 331.
134. RAJE N, TERPOS E, WILLENBACHER W, SHIMIZU K, GARCÍA-SANZ R, et al. Denosumab versus zoledronic acid in bone disease treatment of newly diagnosed multiple myeloma: an international, double-blind, double-dummy, randomised, controlled, phase 3 study. *The Lancet Oncology* 2018; 19(3): 370-381.
135. TERPOS E, CONFAVREUX CB, and CLEZARDIN P. Bone antiresorptive agents in the treatment of bone metastases associated with solid tumours or multiple myeloma. *BoneKEy reports* 2015; 4.
136. ABDULKADYROV KM, SALOGUB GN, KHUAZHEVA NK, SHERMAN ML, LAADEM A, et al. Sotatercept in patients with osteolytic lesions of multiple myeloma. *British journal of haematology* 2014; 165(6): 814-823.
137. VALLET S, POZZI S, PATEL K, VAGHELA N, FULCINITI M, et al. A novel role for CCL3 (MIP-1 α) in myeloma-induced bone disease via osteocalcin downregulation and inhibition of osteoblast function. *Leukemia* 2011; 25(7): 1174.
138. LI X, OMINSKY MS, WARMINGTON KS, MORONY S, GONG J, et al. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 2009; 24(4): 578-588.
139. POZZI S, FULCINITI M, YAN H, VALLET S, EDA H, et al. In vivo and in vitro effects of a novel anti-Dkk1 neutralizing antibody in multiple myeloma. *Bone* 2013; 53(2): 487-496.
140. TOSI P. Diagnosis and treatment of bone disease in multiple myeloma: spotlight on spinal involvement. *Scientifica* 2013; 2013.
141. LANDGREN O, KYLE RA, PFEIFFER RM, KATZMANN JA, CAPORASO NE, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2009; 113(22): 5412-5417.
142. KYLE RA, THERNEAU TM, RAJKUMAR SV, OFFORD JR, LARSON DR, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *New England Journal of Medicine* 2002; 346(8): 564-569.

143. KYLE RA, REMSTEIN ED, THERNEAU TM, DISPENZIERI A, KURTIN PJ, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *New England Journal of Medicine* 2007; 356(25): 2582-2590.
144. RAJKUMAR SV and KUMAR S. *Multiple myeloma: diagnosis and treatment*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 2016. Elsevier.
145. ROUSSOU M, TASIDOU A, DIMOPOULOS M, KASTRITIS E, MIGKOU M, et al. Increased expression of macrophage inflammatory protein-1 α on trephine biopsies correlates with extensive bone disease, increased angiogenesis and advanced stage in newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23(11): 2177-2181.
146. ŠČUDLA V, BUDÍKOVÁ M, PETROVÁ P, MINAŘÍK J, PIKA T, et al. Analýza sérových hladin vybraných biologických ukazatelů u monoklonální gamapatie nejistého významu a mnohočetného myelomu. *Klin Onkol* 2010; 23(3): 171-181.
147. TERPOS E, POLITOU M, VINIOU N, and RAHEMTULLA A. Significance of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 α) in multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma* 2005; 46(12): 1699-1707.
148. KRHOVSKÁ P, HEŘMANOVÁ Z, PETROVÁ P, ZAPLETALOVÁ J, PIKA T, et al. Analýza parametrů signálních drah myelomové kostní nemoci u mnohočetného myelomu. *Klinická biochemie a metabolismus* 2016; 24(3).
149. BUSSOLINO F, DI RENZO MF, ZICHE M, BOCCHIETTO E, OLIVERO M, et al. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *The Journal of Cell Biology* 1992; 119: 629-641.
150. SEIDEL C, BØRSET M, TURESSON I, ABILDGAARD N, SUNDAN A, et al. Elevated serum concentrations of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma. *The Nordic Myeloma Study Group. Blood* 1998; 91: 806-812.
151. POUR L, SVACHOVA H, ADAM Z, ALMASI M, BURESOVA L, et al. Levels of angiogenic factors in patients with multiple myeloma correlate with treatment response. *Annals of hematology* 2010; 89(4): 385-389.
152. MINARIK J, PIKA T, BACOVSKY J, PETROVA P, LANGOVA K, et al. Prognostic value of hepatocyte growth factor, syndecan-1, and osteopontin in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *TheScientificWorldJournal* 2012; 2012: 356128.
153. GIULIANI N, MORANDI F, TAGLIAFERRI S, LAZZARETTI M, DONOFRIO G, et al. Production of Wnt inhibitors by myeloma cells: potential effects on canonical Wnt pathway in the bone microenvironment. *Cancer Research* 2007; 67: 7665-7674.
154. KYRTSONIS MC, VASSILAKOPOULOS TP, SIAKANTARIS MP, KOKORIS SI, GRIBABIS DA, et al. Serum syndecan-1, basic fibroblast growth factor and osteoprotegerin in myeloma patients at diagnosis and during the course of the disease. *European journal of haematology* 2004; 72(4): 252-258.
155. DHODAPKAR MV, ABE E, THEUS A, LACY M, LANGFORD JK, et al. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 1998; 91(8): 2679-2688.
156. SEIDEL C, SUNDAN A, HJORTH M, TURESSON I, DAHL IMS, et al. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2000; 95(2): 388-392.
157. WIJDENES J, VOOIJS WC, CLÉMENT C, POST J, MORARD F, et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *British journal of haematology* 1996; 94(2): 318-323.
158. WITZIG TE, KIMLINGER T, STENSON M, and THERNEAIP T. 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; 31(1-2): 167-175.

159. WAISMAN DM. Annexin II tetramer: structure and function. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1995; 149-150: 301-322.
160. SECKINGER A, MEIßNER T, MOREAUX J, DEPEWEG D, HILLENGASS J, et al. Clinical and prognostic role of annexin A2 in multiple myeloma. *Blood* 2012; blood-2012-03-415588.
161. DURIE BG. The role of anatomic and functional staging in myeloma: description of Durie/Salmon plus staging system. *European journal of cancer* 2006; 42(11): 1539-1543.
162. HEALY C, MURRAY J, EUSTACE S, MADEWELL J, O'GORMAN P, et al. Multiple myeloma: a review of imaging features and radiological techniques. *Bone marrow research* 2011; 2011.
163. JAKOB C, ZAVRSKI I, HEIDER U, BOLLOW M, SCHULZ C-O, et al. Serum levels of carboxy-terminal telopeptide of type-I collagen are elevated in patients with multiple myeloma showing skeletal manifestations in magnetic resonance imaging but lacking lytic bone lesions in conventional radiography. *Clinical cancer research* 2003; 9(8): 3047-3051.
164. HAYLOCK DN and NILSSON SK. Osteopontin: a bridge between bone and blood. *British journal of haematology* 2006; 134(5): 467-474.
165. ROBBIANI DF, COLON K, ELY S, ELY S, CHESI M, et al. Osteopontin dysregulation and lytic bone lesions in multiple myeloma. *Hematological oncology* 2007; 25(1): 16-20.
166. COLLA S, MORANDI F, LAZZARETTI M, RIZZATO R, LUNGI P, et al. Human myeloma cells express the bone regulating gene Runx2/Cbfa1 and produce osteopontin that is involved in angiogenesis in multiple myeloma patients. *Leukemia* 2005; 19(12): 2166-2176.
167. FONSECA R, TRENDLE MC, LEONG T, KYLE RA, OKEN MM, et al. Prognostic value of serum markers of bone metabolism in untreated multiple myeloma patients. *British journal of haematology* 2000; 109(1): 24-29.
168. ABILDGAARD N, BRIXEN K, ERIKSEN EF, KRISTENSEN JE, NIELSEN JL, et al. Sequential analysis of biochemical markers of bone resorption and bone densitometry in multiple myeloma. *haematologica* 2004; 89(5): 567-577.
169. CHNG W, DISPENZIERI A, CHIM C, FONSECA R, GOLDSCHMIDT H, et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia* 2014; 28(2): 269.
170. NAHI H, SUTLU T, JANSSON M, ALICI E, and GAHRTON G. Clinical impact of chromosomal aberrations in multiple myeloma. *Journal of internal medicine* 2011; 269(2): 137-147.
171. BILLECKE L, MURGA PENAS EM, MAY AM, ENGELHARDT M, NAGLER A, et al. Cytogenetics of extramedullary manifestations in multiple myeloma. *British journal of haematology* 2013; 161(1): 87-94.
172. FONSECA R, BLOOD E, RUE M, HARRINGTON D, OKEN MM, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003; 101(11): 4569-4575.
173. BARLOGIE B, ANAISSIE E, VAN RHEE F, HAESSLER J, HOLLMIG K, et al. Incorporating bortezomib into upfront treatment for multiple myeloma: early results of total therapy 3. *British journal of haematology* 2007; 138(2): 176-185.
174. NAIR B, VAN RHEE F, SHAUGHNESSY JD, ANAISSIE E, SZYMONIFKA J, et al. Superior results of Total Therapy 3 (2003-33) in gene expression profiling-defined low-risk multiple myeloma confirmed in subsequent trial 2006-66 with VRD maintenance. *Blood* 2010; 115(21): 4168-4173.
175. GREENBERG AJ, RAJKUMAR SV, THERNEAU TM, SINGH PP, DISPENZIERI A, et al. Relationship between initial clinical presentation and the molecular cytogenetic classification of myeloma. *Leukemia* 2014; 28(2): 398.
176. PODAR K, TAI Y-T, DAVIES FE, LENTZSCH S, SATTLER M, et al. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood* 2001; 98(2): 428-435.
177. NEUFELD G, COHEN T, GENGRINOVITCH S, and POLTORAK Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB journal* 1999; 13(1): 9-22.
178. BOYD KD, ROSS FM, CHIECCHIO L, DAGRADA G, KONN ZJ, et al. A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia* 2012; 26(2): 349.

179. JOSEPH NS, GENTILI S, KAUFMAN JL, LONIAL S, and NOOKA AK. High-risk multiple myeloma: definition and management. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 2017; 17: S80-S87.
180. HANAMURA I, STEWART JP, HUANG Y, ZHAN F, SANTRA M, et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood* 2006; 108(5): 1724-1732.
181. SAWYER JR, TIAN E, HEUCK CJ, JOHANN DJ, EPSTEIN J, et al. Evidence of an epigenetic origin for high-risk 1q21 copy number aberrations in multiple myeloma. *Blood* 2015; 125(24): 3756-3759.
182. RAJKUMAR SV, MESA RA, FONSECA R, SCHROEDER G, PLEVAK MF, et al. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clinical cancer research* 2002; 8(7): 2210-2216.
183. RAJKUMAR SV, LEONG T, ROCHE PC, FONSECA R, DISPENZIERI A, et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clinical cancer research* 2000; 6(8): 3111-3116.
184. SEZER O, NIEMÖLLER K, EUCKER J, JAKOB C, KAUFMANN O, et al. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Annals of Hematology* 2000; 79(10): 574-577.
185. KUMAR S, FONSECA R, DISPENZIERI A, LACY MQ, LUST JA, et al. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: effect of therapy. *British journal of haematology* 2002; 119(3): 665-671.
186. DERKSEN PW, KEEHNEN RM, EVERS LM, VAN OERS MH, SPAARGAREN M, et al. Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2002; 99(4): 1405-1410.
187. CAVO M, BACCARANI M, GOBBI M, LIPIZER A, and TURA S. Prognostic value of bone marrow plasma cell infiltration in stage I multiple myeloma. *British journal of haematology* 1983; 55(4): 683-690.