

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Monoklonální gamapatie

**Význam stanovení paraproteinu a volných lehkých řetězců u
mnohočetného myelomu**

Bakalářská práce

Monika Zahradníková

Školitel: MUDr. Ivan Vonke, MBA

České Budějovice 2017

Zahradníková, M., 2017: Monoklonální gamapatie: Význam stanovení paraproteinu a volných lehkých řetězců u mnohočetného myelomu [Monoclonal gammopathy: The clinical importance of paraprotein and free light chain measurement in multiple myeloma. Bc. Thesis, in Czech.] – 49 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The monoclonal gammopathies are a group of disorders associated with proliferation of clonal plasma cells producing monoclonal immunoglobulin proteins. Assessing serum levels of monoclonal proteins is an essential component of detecting and monitoring plasma cell proliferative disorders.

The first part of this thesis provides a general overview that covers diagnosis and clinical features of some of the monoclonal gammopathies, particularly multiple myeloma. The second part was focused on investigating the utility of serum free light chains measurement in following the disease course in myeloma patients where monoclonal intact immunoglobulin was also present.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 19. 4. 2017

.....

Monika Zahradníková

Poděkování

Děkuji svému školiteli MUDr. Ivanu Vonkemu za odborné vedení práce, cenné připomínky, vlídný přístup a věnovaný čas. Velké díky patří také rodině a přátelům, za vše.

Obsah

Úvod	1
1. Monoklonální gamapatie.....	2
1.1 Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)	3
1.2 Maligní příčiny monoklonální gamapatie.....	6
1.2.1 Doutnající mnohočetný myelom	6
1.2.2 Mnohočetný myelom	7
1.2.3 Solitární kostní a extramedulární plazmocytom	18
1.2.4 Plazmocelulární leukémie.....	18
2. VLASTNÍ PRÁCE.....	19
2.1 Cíle práce a hypotézy.....	19
2.2 Analytické metody	20
2.2.1 Elektroforéza sérových bílkovin	20
2.2.2 Imunofixační elektroforéza	21
2.2.3 Stanovení volných lehkých řetězců v séru	22
2.3 Soubor pacientů	24
2.4 Výsledky	26
3. Diskuze.....	34
4. Závěr.....	37
5. Seznam použitých zkratk.....	38
6. Seznam citované literatury	40

Úvod

Jedním ze základních rysů skupiny onemocnění zvaných monoklonální gamapatie je přítomnost monoklonálního imunoglobulinu (paraproteinu) v séru a/nebo moči. Narozdíl od polyklonálních gamapatií, které jsou sekundárním projevem reaktivního polyklonálního zmnožení plazmocyტů například při infekcích nebo zánětech, monoklonální gamapatie zahrnují premaligní a maligní stavy v čele s mnohočetným myelomem. Monoklonální protein nejčastěji sestává z intaktní (kompletní) imunoglobulinové molekuly, méně často jen z jejích strukturních komponent, tj. lehkých či těžkých řetězců imunoglobulinů, které lze detekovat a charakterizovat pomocí elektroforetických a imunofixačních metod (IMWG, 2003; Adam *et al.*, 1999).

Významným přínosem v rámci diagnostiky i monitorování průběhu zejména některých typů monoklonálních gamapatií s izolovanou produkcí pouze lehkých řetězců a při nízkých koncentracích monoklonálního proteinu, které jsou dostupnými elektroforetickými technikami často obtížně zachytitelné, je kvantitativní imunochemické stanovení volných lehkých řetězců v séru. V případě mnohočetného myelomu s produkcí intaktní molekuly monoklonálního imunoglobulinu rovněž reflektují sérové hladiny volných lehkých řetězců klinický vývoj choroby u většiny pacientů. Vzhledem ke krátkému metabolickému poločasu představují volné lehké řetězce ve srovnání s kompletní molekulou paraproteinu dynamičtější marker schopný pružněji reflektovat stupeň myelomové cytoredukce při probíhající léčbě (Mead *et al.*, 2004). Klinický význam vyšetření volných lehkých řetězců v tomto kontextu zůstává z velké části jen málo definován a je předmětem dalších studií.

1. Monoklonální gamapatie

Roku 1961 švédský lékař Jan Gosta Waldenström (1906 – 1996) poprvé uvedl koncept popisující monoklonální a polyklonální gamapatie. Úzký pruh hypergamaglobulinémie v elektroforéze bílkovin krevního séra pacientů označil za monoklonální protein, široký nejasně ohraničený pruh v oblasti γ -globulinů pak popsal jako polyklonální nárůst gama globulinové frakce. K polyklonálnímu vzestupu γ -globulinů dochází například při infekcích, zánětech a řadě dalších nemaligních stavů, zatímco nález monoklonálního proteinu obvykle provázel maligní krevní onemocnění, jako je mnohočetným myelom (MM) nebo Waldenströмова makroglobulinémie (Waldenström, 1960-61; Kyle, 1978).

Monoklonální gamapatie (paraproteinémie) je termín zahrnující řadu hematologických jednotek, jejichž společným jmenovatelem je nález monoklonálního imunoglobulinu (M-Ig, M-komponenta, paraprotein) či jeho strukturních částí (tj. lehkých řetězců, vzácně jen těžkých řetězců) v plazmě a/nebo v moči. Z biochemického hlediska je M-Ig homogenní plazmatická bílkovina imunoglobulinového charakteru, jejíž molekulu tvoří dva identické těžké řetězce (IgH) a dva lehké řetězce (IgL) stejného typu. Lehké a těžké řetězce i těžké řetězce navzájem jsou kovalentně spojeny disulfidickými můstky. Jednotlivé typy IgH se liší strukturou konstantní oblasti a jsou označovány řeckými písmeny. Podle typu IgH se imunoglobuliny (Ig) dělí na třídy (izotypy) IgG (γ), IgA (α), IgM (μ), IgD (δ) a IgE (ϵ). IgL mohou být dvojího typu – κ (kappa), nebo λ (lambda), přičemž v jedné molekule Ig jsou oba IgL vždy téhož typu (IMWG, 2003).

Klasifikace monoklonálních gamapatií (MG) se může opírat o různé parametry, jako jsou klinické a laboratorní nálezy nebo sekundární obtíže. Jedním ze základních dělení je rozlišení MG na základě biologického potenciálu buněk stojících za tvorbou paraproteinu. Produkce a zvýšená v krvi detekovatelná koncentrace M-Ig je spojena s patologickou proliferací jednoho klonu B-lymfocytů, který stupněm diferenciací odpovídá plazmatickým buňkám a může mít benigní nebo maligní charakter (Adam *et al.*, 1999). Od maligního potenciálu plazmocyárního klonu se odvíjí rozlišení na (benigní) monoklonální gamapatie nejasného významu (*Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance* – MGUS) a maligní MG (Kyle, 1994).

1.1 Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)

Monoklonální gamapatie nejasného významu je klinicky bezpříznakový stav vyznačující se klonálním zmnožením plazmatických buněk v kostní dřeni. Stabilní (nezhoubná) expanze klonu plazmocytů produkujících M-Ig má za následek jeho zvýšenou hladinu v krevním séru, resp. v moči. Pokud lze jako příčinu M-Ig vyloučit jiné B-buněčné lymfoproliferace a primární amyloidózu, je tento nález klasifikován jako MGUS (Kyle *et al.*, 2010; Kyle a Rajkumar, 2009). Diagnostická kritéria MGUS vypracovaná Mezinárodní pracovní skupinou pro mnohočetný myelom (*The International Myeloma Working Group – IMWG*) v roce 2003 zahrnují sérovou koncentraci M-Ig nižší než 30 g/l a méně než 10 % klonálních plazmocytů v kostní dřeni. Zároveň nesmí být přítomny známky specifického orgánového postižení, jako je hyperkalcémie, renální nedostatečnost, anémie a osteolytické změny, které by byly způsobeny vlivem proliferativního onemocnění plazmatických buněk. Pro stanovení diagnózy MGUS musí být splněna všechna uvedená kritéria (IMWG, 2003).

Výskyt v populaci

MGUS je nejčastější plazmocelulární dyskrázií, jejíž celková prevalence se zvyšuje s věkem a u osob starších 50 let činí přibližně 3 % (Kyle *et al.*, 2006a). Poněkud častější je výskyt u mužů. V prevalenci MGUS existují i jisté etnické rozdíly. V afroamerické populaci se vyskytuje přibližně dvakrát častěji v porovnání s populací kavkazskou (Landgren, 2006). Naproti tomu celková prevalence MGUS je v porovnání se západními zeměmi nižší v japonské populaci (Iwanaga *et al.*, 2007).

Patogeneze

Významnou roli v patogenezi MGUS zřejmě hraje genetická nestabilita a primární cytogenetické změny. Příčina jejich vzniku je nejasná, ale zdá se, že jedním z faktorů uplatňujících se v iniciaci MGUS by mohla být nepřiměřená odpověď na antigenní stimulaci vyvolávající rychlou proliferaci buněk, s níž zároveň narůstá i riziko vzniku chromozomových aberací (Rajkumar a Hayman, 2011). Ve více než 90 % případů byly u klonálních plazmocytů nalezeny chromozomové aberace získané pravděpodobně během izotypového přesmyku nebo somatických hypermutací v germinálním centru (Fonseca *et al.*, 2004).

U téměř poloviny pacientů s MGUS byly identifikovány translokace postihující gen pro těžký řetězec imunoglobulinů (IgH) lokalizovaný na 14. chromozomu v oblasti 14q32 (Avet-Loiseau *et al.*, 1999; Fonseca *et al.*, 2002). Primární IgH translokace mohou mít za následek inzerci onkogenu do blízkosti IgH lokusu, jehož silné enhancery (zesilovače) způsobí zvýšení transkripce translokovaného genu. Nejčastěji dochází k deregulaci exprese genů pro cyklin D1 a D3, MMSET (*multiple myeloma set domain*) a FGFR-3 (receptor růstového faktoru fibroblastů 3) a transkripční faktory c-MAF a MAFB. Abnormální proliferační a růstové stimuly mohou vést k časně imortalizaci plazmocytů a ustanovení monoklonální buněčné populace. (Kuehl, 2002; Bergsagel, 2001; Fonseca, 2002). Ve zbylé polovině případů se nestabilita genomu projevuje převážně jako hyperdiploidie, tedy klonální zmnožení jednoho nebo více chromozomů s lichým číslem vyjma chromozomu 13. Pokud je na některém z těchto chromozomů lokalizován gen, jehož proteinový produkt stimuluje replikaci a buněčný růst, může mít přemíra jeho exprese způsobená vyšším počtem kopií daného chromozomu význam v iniciaci MGUS (Chng *et al.*, 2005; Fonseca, 2004; Drach *et al.*, 1995).

Maligní transformace

Dlouhodobé sledování pacientů s MGUS ukázalo, že k rozvoji zhoubného onemocnění dochází přibližně u 1 % pacientů ročně. (Kyle *et al.*, 2002). S ohledem na možný přechod v maligní chorobu je tak MGUS považována za premaligní stav a má se za to, že předchází většinu případů MM (Landgren, 2009; Kyle a Rajkumar, 2007a).

Na základě typu produkovaného M-Ig jsou rozlišovány 3 klinické typy MGUS: non-IgM, IgM a MGUS s produkcí výlučně lehkých řetězců (*light chain MGUS* – LC-MGUS), z nichž každý má převažující tendenci k progresi v jinou maligní chorobu, a to přes rozvinutější asymptomatické rané stádium (Rajkumar *et al.*, 2010). IgM MGUS je typická sklonem k progresi ve Waldenströmovu makroglobulinémii (WM), méně často i jiná lymfoproliferativní onemocnění a IgM myelom, zatímco ostatní izotypy M-Ig (non-IgM MGUS) mají potenciál zejména k přechodu v aktivní (symptomatický) MM (Kyle *et al.*, 2003a; Schuster *et al.*, 2010). LC-MGUS je spojená s rizikem progresu v *light chain* MM (přibližně 20 % nově diagnostikovaných případů MM) nebo AL-amyloidózu (Dispenzieri *et al.*, 2010).

Rizikové ukazatele maligního zvratu

V době záchytu M-Ig, k němuž u MGUS dochází často náhodně, nelze potenciál pro neoplastickou transformaci plazmocytárního klonu spolehlivě rozpoznat, nicméně výsledky některých laboratorních vyšetření a vyšetření kostní dřene mohou pomoci odhalit pacienty s vyšším rizikem maligní evoluce. (Kyle *et al.*, 2010). Za rizikový faktor progresu MGUS v MM a jiné maligní onemocnění je v klinické praxi považována především sérová koncentrace M-Ig. Negativním prognostickým faktorem je kromě výše M-Ig také jeho izotyp, přičemž v porovnání s IgG je vyšší riziko spojeno s izotypy IgA a IgM (Kyle *et al.*, 2002). Zvyšující se sérová koncentrace M-Ig během prvního roku od diagnózy je rovněž důležitým ukazatelem potenciálního maligního zvratu (Rosiñol *et al.*, 2007).

Prognostický význam má i množství plazmocytů v kostní dřeni $> 5\%$ (Cesana *et al.*, 2002) a abnormální poměr sérové koncentrace volných lehkých řetězců (*serum free light chains* – sFLC). Poměr sFLC nevykazuje známky korelace s množstvím ani typem paraproteinu a je tak nezávislým prediktorem progresu ve zhoubné onemocnění (Rajkumar *et al.*, 2005). Perez-Persona (2007) sledoval také prognostický význam zastoupení aberantních plazmatických buněk v kostní dřeni, které lze od polyklonálních fyziologických plazmocytů odlišit na základě imunofenotypizace buněk metodou průtokové cytometrie. Pokud bylo v době diagnózy MGUS přítomno 95 % nebo více abnormálních plazmatických buněk spolu s aneuploidií chromozomů, tendence k maligní progresi byla během následujících let výrazně vyšší.

1.2 Maligní příčiny monoklonální gamapatie

1.2.1 Doutnající mnohočetný myelom

Doutnající myelom (*smoldering multiple myeloma* – SMM) je klinicky bezpříznakové postižení kostní dřeně klonální plazmocelulární proliferací, které Kyle a Greipp (1980) poprvé popsali jako pokročilejší stádium vývoje MGUS směrem k MM. Vůči MGUS je kromě vyšší sérové koncentrace M-Ig a míry infiltrace kostní dřeně vymezen také silnější tendencí k přechodu v MM, k němuž během prvních 5 let od diagnózy dochází u 10 % pacientů ročně v porovnání s 1 % u MGUS. Nepříznivým prognostickým znamením je mj. vysoká koncentrace a IgA izotyp M-Ig, rozsah infiltrace kostní dřeně (Kyle *et al.*, 2007b), zvyšování hladiny M-Ig (Rosiñol *et al.*, 2003) a abnormální hodnota poměru sFLC (Dispenzieri *et al.*, 2008).

SMM představuje heterogenní skupinu onemocnění, která mají v některých případech spíše premaligní charakter, zatímco v jiných se již pravděpodobně jedná o časné stádium malignity, u níž se zatím nerozvinuly klinické příznaky onemocnění a/nebo jiné události definující MM (Rajkumar, 2012b; Rajkumar *et al.*, 2014). SMM tak zahrnuje na jedné straně klinicky stabilní pacienty s delší dobou do progresse onemocnění, ale i pacienty, u nichž se během 2 let od stanovení diagnózy rozvíjí klinické příznaky signalizující přechod v aktivní formu MM (Landgren a Waxman, 2010; Rajkumar *et al.*, 2012a).

Aktualizovaná kritéria IMWG reklasifikovala část pacientů s časnou malignitou na MM na základě biomarkerů, jejichž identifikace byla spojena s ≥ 80 % rizikem progresse během následujících 2 let. Novým diagnostickým kritériím MM pak byla přizpůsobena i kritéria pro diagnózu jeho „doutnající“ varianty, která zahrnují přítomnost M-Ig v séru (IgG nebo IgA) o koncentraci ≥ 30 g/l nebo ≥ 500 mg M-Ig v objemu moči za 24 hodin a/nebo 10 – 60 % klonálních plazmocytů v kostní dřeni při současné absenci známek poškození orgánů vyvolaných patologickou klonální proliferací či jiných událostí definujících MM (Rajkumar *et al.*, 2014). Základní péčí o pacienty jsou opakované kontroly a sledování aktivity nemoci. Léčba indikována není, dokud nedojde k progresi do MM (IMWG, 2003).

1.2.2 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom (MM) je zhoubné proliferativní onemocnění maligního klonu plazmatických buněk secernujících M-Ig, které se akumulují v kostní dřeni. Hladina M-Ig v krvi a stupeň infiltrace kostní dřene myelomovými buňkami vedou ke klinické manifestaci onemocnění, jejíž pravidelnou součástí bývají specifické příznaky orgánové dysfunkce shrnuté do akronyma CRAB – hyperCalcemia (hyperkalcémie), Renal insufficiency (renální nedostatečnost), Anaemia (anémie), osteolytic Bone lesions (postižení kostí projevující se osteolytickými ložisky) (IMWG, 2003).

Diagnóza MM se v klinické praxi dlouhodobě opírá o počet plazmocytů v kostní dřeni $\geq 10\%$ (nebo biopsií prokázaný plazmocytom), přítomnost M-Ig v séru a/nebo v moči a současné známky poškození koncových orgánů v důsledku zhoubné plazmocytární proliferace (Kyle a Rajkumar, 2008). Pro diagnózu aktivního MM je tak nezbytná přítomnost alespoň jednoho z CRAB kritérií prokazatelně vyvolaných myelomem nebo alespoň jednoho ze tří rizikových faktorů, které byly v roce 2014 nově zařazeny mezi události definující myelom („*myeloma defining events*“; MDE), a zahrnují $\geq 60\%$ klonálních plazmocytů v kostní dřeni, poměr postižených vůči nepostiženým sFLC ≥ 100 a více než jednu fokální lézi skeletu větší než 5 mm při vyšetření magnetickou rezonancí (MR) (Rajkumar *et al.*, 2014).

Jedná se o relativně vzácnou nádorovou chorobu (necelé 1 % všech malignit), ze zhoubných krevních chorob však tvoří přibližně 10 % a po non-hodgkinských lymfomech je tak druhou nejčastější hematoonkologickou diagnózou (Kyle a Rajkumar, 2004). V afroamerické populaci se vyskytuje přibližně dvakrát častěji než v bělošské a je zde také lehká predominance výskytu u mužů. Jen zřídka je diagnostikován před 40. rokem života, medián věku při diagnóze je 66 let (Kyle *et al.*, 2003b). V České republice se incidence této choroby pohybuje kolem 4/100 000 obyvatel (Hájek *et al.*, 2012). MM je stále považován za nevléčitelnou chorobu, ale pokroky v možnostech léčby se zasloužily o prodloužení mediánu přežití na více než 6 let (Mahindra *et al.*, 2012).

1.2.1.1 Patogeneze

Předpokládá se, že k prvním potenciálně onkogenním změnám dochází na úrovni vývoje B-lymfocyту ve folikulech lymfatické tkáně, který proliferuje a dává vznik klonální populaci, jejíž buňky v kontaktu s prostředím kostní dřeně vyžívají v terminálně diferencované patologické plazmocytu – myelomové buňky (Adam *et al.*; 1999). O post-germinálním původu prekurzorových buněk MM svědčí především rozsáhlé somatické hypermutace v oblasti Ig genů a jen ojedinělá tvorba IgM izotypu M-Ig (Kyle *et al.*, 2003b; Kuehl a Bergsagel, 2002).

Na základě karyotypu myelomových buněk (MM buňky) se podobně jako u MGUS rozlišují dvě varianty MM: hyperdiploidní (HRD) a non-hyperdiploidní (NHRD), z nichž každá představuje asi 50 % případů MM (Fonseca *et al.*, 2004; Bergsagel a Kuehl, 2001). HRD varianta se vyznačuje numerickými odchylkami od diploidního karyotypu, převážně trisomiemi chromozomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 19 a 21 (Fonseca *et al.*, 2002). Málodky jsou přítomny translokace zahrnující IgH lokus, zatímco NHRD formy, u nichž převažují strukturální přestavby, nesou IgH translokace v 70 % případů (Fonseca *et al.*, 2003). HRD a NHRD karyotypy zřejmě reprezentují dvě odlišné dráhy onkogeneze, ale kdy a jakým způsobem je hyperdiploidie ustanovena není jasné (Smadja *et al.*, 1998).

Přinejmenším ve většině případů předchází MM prekancerózní stádium MGUS (Landgren *et al.*, 2009). Patogenezi MM lze tedy vnímat jako několikastupňový proces, jehož časnou fází je iniciace MGUS následovaná její maligní transformací a později další progresí nádorové choroby. I přes heterogenní povahu onemocnění dochází v rané fázi patogeneze u většiny MGUS i MM k deregulaci genové exprese alespoň jednoho typu cyklinu D, která se uskutečňuje buď přímo, tj. IgH translokacemi zahrnujícími geny pro cyklin D1 a D3, nebo nepřímo deregulací aktivity transkripčních faktorů MafB a c-Maf ovlivňujících expresi cyklinu D2 (Bergsagel *et al.*, 2005). Jelikož ne u všech pacientů s MGUS dochází k maligní progresi, primární cytogenetické změny iniciující MGUS jsou zřejmě nezbytné pro pozdější vznik MM, samy o sobě však k rozvoji plně maligního onemocnění nestačí (Kyle *et al.*, 2002).

K progresi MGUS dochází relativně konstantním tempem (1 % pacientů ročně) a delší trvání premaligní fáze riziko maligního zvratu nezvyšuje. Je tak nasnadě, že spíše než dlouhodobá akumulace škodlivých změn uvnitř buňky se v patogenezi MM uplatňují další onkogenní události náhodného charakteru („*random second hit*“), jejichž povaha se u IgH

non-translokované a IgH translokované formy MGUS může lišit (Kyle *et al.*, 2002; Rajkumar a Hayman, 2011). Na maligní transformaci se mohou podílet sekundární cytogenetické změny (mutace Ras genů, metylace p16, mutace p53, sekundární IgH translokace upregulující c-MYC onkogen aj.), deregulace buněčného cyklu, defekty v indukci apoptózy i změny v mikroprostředí kostní dřene. Všechny zmíněné abnormality se v klonální populaci objevují v souvislosti s progresí v symptomatické stádium onemocnění, avšak sled i konkrétní role jednotlivých změn v patogenezi zůstávají nejasné (Kuehl a Bergsagel, 2002). Jakmile dojde k ustanovení klonální plazmocyární populace a progresi v MM, dochází u pacientů k rozvoji klinických příznaků.

Na rozvoji a progresi MM se významně podílí reciproční interakce MM buněk s mikroprostředím kostní dřene. Buňky mikroprostředí secernují četné cytokiny, jako je interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α), vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor (IGF-1) a řada dalších, které aktivují hlavní signální cesty účastníci se stimulace růstu, přežití, úniku apoptóze i rezistenci MM buněk k léčbě (Klein *et al.*, 2003, De Vos *et al.*, 2006). Vzájemné interakce nádorových buněk a mikroprostředí jsou rovněž podkladem pro patogenezi kostního postižení typického pro MM. Tvorba osteolytických ložisek je výsledkem deregulace kostní přeměny dané dysbalancí mezi úrovní osteoresorpce zprostředkované osteoklasty a tvorbou nové kostní tkáně činností osteoblastů.

Osteoblasty a stromální buňky exprimují na svém povrchu RANKL (ligand pro receptor aktivující nukleární faktor kappa B), který stimuluje diferenciaci prekurzorových buněk osteoklastů a aktivitu zralých forem vazbou na RANK receptor ukotvený v jejich membráně, a rovněž produkují jeho „falešný“ (*decoy*) solubilní receptor osteoprotegerin (OPG), který kompetitivně inhibuje interakci RANKL/RANK. V regulaci kostní přeměny hraje důležitou roli poměr RANKL/OPG, na jehož zvýšení s následnou stimulací osteoklastogeneze a odbouráváním kostní hmoty se podílejí MM buňky skrze adhezivní interakce s buňkami kostní dřene (Roodman, 2009; Adam, 2005).

V patogenezi osteolytických změn se uplatňují také lokální stimulatory osteoklastů produkované stromálními a MM buňkami, jako je IL-6, MIP-1 α (makrofágový zánětlivý protein 1 α) a IL-3. Zároveň dochází také k aktivnímu potlačování osteoblastické novotvorby kostní tkáně vlivem nadměrné exprese IL-3, IL-7 a DKK1 (dickkopf-1), které inhibují diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk v osteoblasty (Tian *et al.*, 2003).

1.2.1.2 Možné klinické projevy

Mnohočetný myelom se vyznačuje klonální proliferací a akumulací patologicky změněných terminálních stádií plazmocytární vývojové linie (myelomových buněk) v kostní dřeni. Klinické projevy onemocnění způsobené myelomovou infiltrací kostní dřene, působky nádorových buněk a patologickou sérovou hladinou M-Ig mohou být pestré a u jednotlivých pacientů různě vyjádřené. Mezi hlavní klinické příznaky patří osteolytické postižení skeletu, útlum fyziologické krevetvorby a poruchy funkce ledvin (Adam *et al.*, 2008b).

Příznaky způsobené myelomovou infiltrací kostní dřene a cytokiny MM buněk

Kostní změny

Dysbalance kostní remodelace s převahou osteoklastické resorpce nad osteoblastickou novotvorbou způsobuje progresivní destrukci kostní tkáně s rozvojem myelomové kostní nemoci, mezi jejíž základní projevy patří bolesti kostí, difúzní osteoporóza, přítomnost osteolytických ložisek a neřídka i patologických zlomenin (Adam *et al.*, 1999). Bolesti kostí v důsledku myelomové osteolýzy jsou součástí klinické prezentace MM u dvou třetin pacientů. Mohou být chronické nebo začínat náhle, obzvláště jsou-li asociovány s patologickou frakturou. Difúzní či ložiskové osteolytické změny postihují většinou ty kosti, které i v dospělosti zůstávají místem aktivní krevetvorby, tj. žebra, hrudní kost, páteř, lebku, pánevní kosti a proximální části dlouhých kostí (Kyle *et al.*, 2003b; Dispenzieri a Kyle, 2005). Typickým rentgenovým nálezem jsou mnohočetné osteolytické léze (Obr. 1) a patologické zlomeniny vertebrální i nevertebrální lokalizace. Častým projevem je bolest v oblasti bederní páteře způsobená kompresivními zlomeninami obratlových těl v důsledku porušení jejich integrity osteolytickými procesy (Dispenzieri a Kyle, 2005).

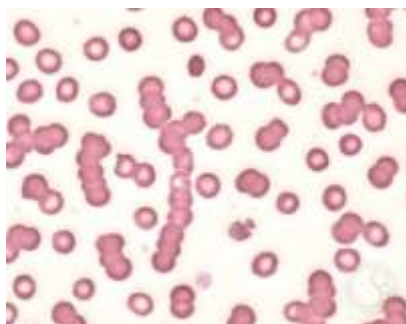


Obrázek 1: Osteolytická ložiska na rentgenových snímcích lebky^[1].

Vystupňovaná osteolýza podmiňuje patologické zvýšení hladiny sérového kalcia. **Hyperkalcémie** se v závislosti na intenzitě může projevovat řadou příznaků, jako je polydipsie, polyurie, nauzea se zvracením, obstipace, dehydratace, somnolence (spavost), dezorientace až poruchy vědomí. Průvodní komplikací hyperkalcémie může být renální insuficience (Adam, 2005; Dispenzieri a Kyle, 2005).

Cytopenie

Jednou z nejčastějších klinických známek choroby je **anémie**, k jejímž klasickým příznakům patří celková slabost, únava a dušnost (Adam *et al.*, 1999). Vyšetření krevního prokáže anémii u přibližně 70 % nově diagnostikovaných nemocných (Kyle *et al.*, 2003b). V nátěru periferní krve je při vysokých sérových hodnotách M-Ig často patrné penízkovatění erytrocytů („rouleaux“ formace; Obr. 2). Na útlumu erytropoézy se vedle přímého útlaku krvetvorby podílí také aberantní cytokinová síť mikroprostředí kostní dřeně podporující nádorový růst, která je nepříznivá pro erytropoézu (Dispenzieri a Kyle, 2005; Fosså, 1999). V patogenezi anémie se v neposlední řadě může uplatňovat také relativní nedostatek erythropoetinu při renální insuficienci způsobené paraproteinem (Dispenzieri a Kyle, 2005).



Obrázek 2: Rouleaux formace erytrocytů v nátěru periferní krve^[2].

Trombocytopenie může u nemocných dle stupně závažnosti vést k rozvoji krvácivých komplikací. Nedostatek krevních destiček způsobuje petechie, samovolné krvácení z nosu nebo dásní a výraznější krvácení při drobném poranění. Trombocytopenie je také podmíněna negativním vlivem cytokinů MM buněk na regulaci krvetvorby (Adam *et al.*, 1999 a 2008b).

Poměrně časté jsou také opakované či závažnější infekce, a to zejména dýchacích cest. Infekční komplikace jsou podmíněné poruchou B-lymfatické imunity s výrazným poklesem produkce fyziologických Ig i defektem buněčné složky imunitní odpovědi v důsledku

porušené T-buněčné imunity a neutropenie. Sérová koncentrace fyziologických polyklonálních gamaglobulinů klesá s pokročilejším stádiem onemocnění a limitována je také schopnost reagovat na antigenní stimulaci tvorbou příslušného Ig. (Adam *et al.*, 1999).

Příznaky poškození organismu M-Ig

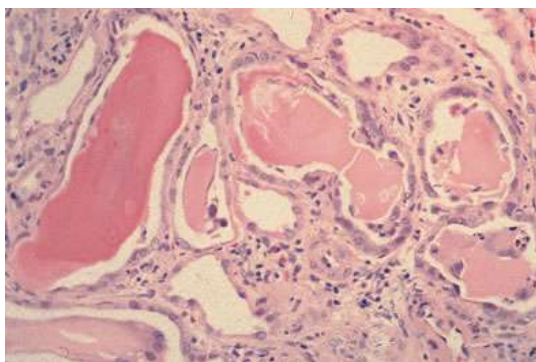
Myelomové buňky jsou odvozené od plazmatických buněk. Stejně jako jejich zdravé protějšky ve většině případů produkují buď kompletní molekulu M-Ig, nebo její strukturní komponenty, tj. IgL (Kyle *et al.*, 2003b). M-Ig podmiňuje řadu patologických jevů vazbou na určité struktury, depozicí monoklonálních IgL v amyloidové i neamyloidové podobě a rušivým zásahem do rovnováhy fyziologických dějů (Adam *et al.*, 2008b).

Velmi vysoké koncentrace M-Ig mohou způsobit vzestup viskozity krve, která jinak provází spíše IgM monoklonální gamapatie, jako je Waldenströмова makroglobulinémie. Mezi klinické příznaky hyperviskózního syndromu patří poruchy mikrocirkulace a hemoragická diatéza, trombóza, rozostřené vidění v důsledku retinopatie, zvětšení objemu plazmy způsobující mj. chronické bolesti hlavy a městnavé srdeční selhání (Adam *et al.*, 2008b; Dispenzieri a Kyle, 2005).

Snížení ledvinných funkcí je přítomno až u 50 % nově diagnostikovaných pacientů, u 12 až 20 % se jedná o akutní selhání ledvin a 10 % nemocných je přítomno těžké poškození s nutností zařazení těchto pacientů do dialyzačního programu (Kyle *et al.*, 2003b). Frekvence výskytu renální insuficience u pacientů s MM narůstá s klinickou pokročilostí onemocnění. Z příčin vedoucích k selhání ledvin u pacientů s MM je nejčastější „myelomová ledvina“ (*cast nephropathy* – odlitková nefropatie). Jejím patofyziologickým podkladem je ireverzibilní poškození ledvin způsobené intratubulární precipitací IgL s Tamm-Horsfallovým proteinem (uromodulinem), který je přirozeně produkován tubulárními buňkami vzestupné části Henleovy kličky (Adam *et al.*, 2008a). Dominantní příčinou ledvinného poškození jsou obecně monoklonální IgL, kompletní molekula M-Ig se do ultrafiltrátu nedostává, neboť zpravidla neprochází glomerulem (Adam *et al.*, 1999).

Sérové FLC (sFLC) jsou jako nízkomolekulární proteiny filtrovány přes glomerulární membránu a reabsorbovány epitelem proximálních tubulů. Po internalizaci do tubulárních buněk dochází k jejich katabolismu. Metabolismus FLC závisí na glomerulární filtraci. Sérový poločas monomerních κ řetězců se pohybuje v rozmezí 2-4 hodin, u λ řetězců,

které obvykle cirkulují v krvi ve formě kovalentně vázaných dimerů, pak mezi 3-6 hodinami. Pokud je v krvi excesivní množství sFLC, dojde k překročení kapacity tubulární resorpce. FLC se dostávají do distálního tubulu a definitivní moči („overflow“ proteinurie). Precipitací FLC s Tamm-Horsfallovým proteinem v ledvinných tubulech vznikají odlitky tubulů ve formě nerozpustných válců (Obr. 3). Válce blokují tok tubulární tekutiny a způsobují zánět vedoucí ke vzniku fibrózních změn v intersticiu. Snížení glomerulární filtrace dané úbytkem funkčních nefronů způsobí vzestup sérových hodnot FLC. Zbývajícími funkčními nefrony je tak filtrováno stále větší množství FLC a poškození ledvin se dále prohlubuje (Adam *et al.*, 1999; Bradwell, 2008). Nefrotoxický potenciál lehkých řetězců se odvíjí od jejich afinity k Tamm-Horsfallovu proteinu, která se u různých molekul FLC liší (Sanders 1990, 1992).



Obrázek 3: Intratubulární depozita s průvodnou atrofií tubulárních buněk^[3].

Méně častou formou postižení ledvin je rozvoj nefrotického syndromu, jehož patofyziologickým mechanismem je ukládání amyloidogenních IgL v glomerulu. Podstatou AL-amyloidózy je tvorba defektních lehkých řetězců, které se v důsledku pozměněné struktury stávají nerozpustnými a dochází k jejich extracelulární akumulaci v různých tkáních (Adam *et al.*, 2011). Pokud tvoří samostatnou klinickou jednotku bez známek plazmocelulární malignity, hovoříme o primární AL-amyloidóze. V některých případech však může být také sekundární u monoklonálních gamapatií, jako je MM. Subjektivní potíže nemocných vyplývají z postižení tkáně či orgánu depozicí amyloidových hmot. Kromě ledvin mohou depozita amyloidu poškozovat například nervovou tkáň a vyvolávat tak různé formy periferní neuropatie nebo způsobovat amyloidózu srdce (Adam *et al.*, 1999).

1.2.1.3 Klasifikace mnohočetného myelomu

Po stanovení diagnózy MM je u pacientů provedeno vstupní vyhodnocení klinického stádia onemocnění, které vyjadřuje stupeň jeho pokročilosti a je jedním z faktorů, od něhož se odvíjí doporučení léčebného postupu (Maisnar, 2008). Existují dva hlavní stážovací systémy: klasifikace MM dle Durieho a Salmona z roku 1975 (D-S klasifikace) a novější prognostický systém pro MM (*International Staging System – ISS*) zveřejněný v roce 2005 (Greipp *et al.*, 2005).

Klasifikace D-S rozlišuje tři stádia pokročilosti onemocnění. Rozdělení klinických stádií I – III odráží rozsah nádorové masy a závažnost postižení organismu a umožňuje nepřímý odhad velikosti nádorové masy. Subklasifikace na podstádia A a B vypovídá o normální, resp. zhoršené funkci ledvin (Durie a Salmon, 1975). Přehled kritérií pro stanovení klinických stádií MM dle Durieho a Salmona je uveden v tabulce I.

Tabulka I: Klinická stádia mnohočetného myelomu dle Durieho a Salmona (1975).

I. stádium	Nízká masa tumorových buněk: $< 0,6 \times 10^{12}$ buněk/m ² a zároveň jsou splněny všechny níže uvedené podmínky: <ul style="list-style-type: none">• koncentrace Hb > 100 g/l• koncentrace Ca < 3 mmol/l• normální kostní struktura anebo solitární ložisko plazmocyтому• relativně nízká koncentrace M-Ig: IgG < 50 g/l, IgA < 30 g/l, exkrece IgL v moči < 4g/24 h
II. stádium	Nejsou splněny podmínky I. ani III. stádia.
III. stádium	Velká tumorová masa: $> 1,2 \times 10^{12}$ buněk/m ² a zároveň je splněna alespoň jedna z následujících podmínek: <ul style="list-style-type: none">• koncentrace Hb < 85 g/l• sérové kalcium > 3 mmol/l• pokročilé postižení skeletu s vícečetnými osteolytickými lézemi• vysoká hladina M-Ig: IgG > 70 g/l, IgA > 50 g/l, exkrece IgL v moči > 12 g/24 h
Subklasifikace	A – relativně normální funkce ledvin
	B – abnormální renální funkce (sérový kreatinin > 177 μmol/l)

Jednodušší a prognosticky významnější je rovněž třístupňový stážovací systém ISS vycházející pouze ze dvou laboratorních parametrů stanovených v době diagnózy – sérové koncentrace albuminu a β_2 -mikroglobulinu (β_2 M). Medián celkového přežití pacientů v klinickém stádiu I – III byl 62, resp. 44 a 29 měsíců (Greipp *et al.*, 2005). Systém ISS, často označovaný jako „mezinárodní prognostický index“ (*International Prognostic Index*), je uveden v tabulce II.

Tabulka II: Mezinárodní prognostický index pro mnohočetný myelom (ISS).

Klinické stádium	β_2 -mikroglobulin (mg/l)	albumin (g/l)
I.	< 3,5	≥ 35
II.	neodpovídá I. ani III. stádiu	
III.	$\geq 5,5$	<i>nezávisle</i>

Pokles koncentrace albuminu a vzestup β_2 M v séru koreluje se stupněm pokročilosti a prognózou nemoci. ISS není spolehlivým indikátorem nádorového zatížení, neboť sérové hladiny β_2 M i albuminu mohou být významně ovlivněny např. porušenou funkcí ledvin nebo současným výskytem dalších nemocí. Stádium III tak zahrnuje jednak pacienty, u nichž elevace β_2 M v séru koreluje s velikostí nádorové populace, a jednak pacienty s renálním selháním (Kyle a Rajkumar, 2009).

1.2.1.4 Léčba mnohočetného myelomu

Prvním a nejdůležitějším krokem je správné stanovení diagnózy MM s vyloučením MGUS a SMM (také odpovídá stádiu IA dle D-S), které vyžadují pravidelné sledování, nikoliv zahájení léčby. Léčba je indikována v případě splnění diagnostických kritérií MM, tedy u pacientů se známkami orgánové dysfunkce způsobené myelomem nebo u vysoce rizikových asymptomatických pacientů, jejichž diagnóza odpovídá dle aktualizovaných kritérií časné fázi aktivního MM (Rajkumar a Kyle, 2009; Rajkumar *et al.*, 2014).

Mnohočetný myelom je stále považován za nevléčitelnou chorobu. Cílem léčby je dosažení co nejdélejší kompletní remise, tj. vymizení klinických i laboratorních známek aktivity nemoci. Po různě dlouhé době remise však obvykle dochází k relapsu (znovuvzplanutí) nemoci. Pacienti, kteří dosáhli kompletní léčebné odpovědi, jsou proto pravidelně sledováni za účelem včasné detekce relapsu a zahájení jeho léčby s cílem dosažení další remise (Ščudla, 2010). Léčba MM vyžaduje komplexní přístup zahrnující cytostatickou léčbu zaměřenou na snížení myelomové masy, kombinované režimy s cílenou protinádorovou léčbou novými léky s biologickým účinkem a intenzivní podpůrnou terapií (Rajkumar a Kyle, 2009; Adam *et al.*, 1999).

Indukční léčba zakončená vysokodávkovanou chemoterapií za podpory autologní transplantace kmenových buněk (*autologous stem cell transplantation* – ASCT) vede k hlubší redukci nádorových buněk a prodloužení přežití nemocných ve srovnání s klasickou chemoterapií (Rajkumar a Hayman, 2011). K indikačním kritériím ASCT patří věk < 65 let při současném zohlednění celkového stavu pacienta a absenci kontraindikujících komplikací. Alogenní transplantaci od ne/příbuzného dárce lze s ohledem na všechna rizika i přes přítomnost *graft-versus-myeloma* efektu (reakce štěpu proti myelomu) zvažovat jen v omezených indikacích (Rajkumar a Kyle, 2009; Tricot *et al.*, 1996; Adam *et al.*, 2004). Pro volbu léčebné strategie má po rozhodnutí, zda je nemocný vhodným kandidátem na ASCT, význam také riziková stratifikace pacientů důležitá kromě optimálního výběru léčby první linie i z hlediska jejího celkového pojetí (Rajkumar a Kyle, 2005; Dispenzieri *et al.*, 2007).

Odpověď nemoci na podávanou léčbu se hodnotí v pravidelných intervalech. Sledovanými parametry v rámci hodnocení efektivity léčby a včasného rozpoznání recidivy nemoci jsou především hladina M-Ig v séru a moči, hladina sérových FLC, rozsah, resp. ústup orgánového postižení a extramedulární infiltrace (Rajkumar, 2016). Základní metodou pro detekci a sledování dynamiky změn koncentrace M-Ig je elektroforetická analýza

bílkovin séra a moči a kvantitativní stanovení koncentrace M-Ig denzitometrickým vyhodnocením elektroforeogramu. Nízké hladiny M-Ig, které nezachytí elektroforéza, lze v některých případech prokázat citlivější imunofixací (IMWG, 2003; Adam *et al.*, 1999). V rámci uniformních kritérií odpovědi dle IMWG uvedených v tabulce III, která se používají k hodnocení stupně léčebné odezvy, je stanovení koncentrace, resp. poměru κ/λ FLC v séru důležité pro určení „stringent“ kompletní remise a rovněž u pacientů s neměřitelným M-Ig (Durie *et al.*, 2006).

Tabulka III: Kritéria pro hodnocení léčebných odpovědí u pacientů s mnohočetným myelomem (Durie *et al.*, 2006).

„Stringent“ kompletní remise (sCR)	CR (viz níže) + normální poměr FLC a žádné klonální buňky dle imunohistochemie nebo imunofenotypizace
Kompletní remise (CR)	negativní imunofixace séra a moči a < 5 % plazmocytů v kostní dřeni a žádná mimokostní ložiska plazmocytomu v měkkých tkáních
Velmi dobrá parciální remise (VGPR)	$\geq 90\%$ pokles původní hladiny M-Ig v séru a M-Ig v moči < 100 mg/24 hodin nebo průkaz M-Ig v séru a moči imunofixací při negativní elektroforéze
Parciální remise (PR)	$\geq 50\%$ pokles sérové hladiny M-Ig a pokles koncentrace M-Ig v moči za 24 hodin o $\geq 90\%$ nebo na méně než 200 mg/24 hodin a > 50% redukce velikosti měkkotkáňového plazmocytomu, byl-li přítomen na začátku sledování
Stabilní onemocnění (SD)	nesplňuje kritéria CR, VGPR, PR ani progresivního onemocnění
Progrese onemocnění (PD)	$\geq 25\%$ nárůst nejnižší hodnoty dosažené v průběhu léčby kteréhokoliv z následujících parametrů (v závorce jsou uvedeny absolutní hodnoty vzestupu, k nimž musí současně dojít): <ul style="list-style-type: none"> • sérový M-Ig (> 5 g/l) • M-Ig v moči (≥ 200 mg/24 hodin) • počet plazmatických buněk v kostní dřeni ($\geq 10\%$) • rozdílu κ a λ FLC (> 10 mg/dl) Zvětšení či vznik nových kostních lézí, event. plazmocytomu v měkkých tkáních nebo hyperkalcémie při vyloučení jiné příčiny.

Příbuzné plazmocelulární malignity

1.2.3 Solitární kostní a extramedulární plasmocytom

Solitární plasmocytomy jsou relativně vzácné maligní nádory vznikající lokalizovanou klonální proliferací plazmatických buněk. Dělí se na extramedulární (EM) plasmocytomy měkkých tkání a solitární kostní plasmocytomy (Adam *et al.*, 1999). Stanovení diagnózy je založeno na přítomnosti jediného ložiska postižení skeletu nebo měkkých tkání a průkazu infiltrace klonálními plasmocyty při bioptickém vyšetření léze. Pro vyloučení přítomnosti dalších ložisek se vedle konvenční radiografie současně používá MR nebo PET/CT. Dalšími kritérii jsou absence orgánového postižení konzistentního s plasmocytární proliferativní poruchou (CRAB) a normální nález v kostní dřeni. Pokud je vůbec přítomen M-Ig, pak jen v nízké koncentraci (IMWG, 2003). Při procentuálním zastoupení klonálních plasmocytů v kostní dřeni < 10 % se jedná o tzv. solitární plasmocytom s minimálním dřeňovým postižením, u něhož je riziko rozvoje MM významně vyšší než při normálním nálezu (Rajkumar *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2014; Paiva *et al.*, 2014; Warsame *et al.*, 2012).

1.2.4 Plazmocelulární leukémie

Plazmocelulární leukémie (PCL) je vzácná agresivní varianta plazmocelulární dyskrázie charakterizovaná zmnožením plazmatických buněk v periferní krvi, jejichž absolutní počet přesahuje $2 \times 10^9/l$ a současně > 20 % v diferenciálním rozpočtu leukocytů. Může vzniknout *de novo* (primární PCL – pPCL) nebo sekundárně (sPCL) leukemickou transformací relabovaného či refrakterního MM (Noel a Kyle, 1987; Dimopoulos *et al.*, 1994). Primární PCL bývá v porovnání s sPCL diagnostikována u mladších pacientů, je provázena nižším stupněm osteolytického postižení kostí i hladinou M-Ig. Vzájemně se liší také molekulárním i cytogenetickým profilem. Přes genetické a patobiologické rozdíly jsou obě formy PCL zatíženy velmi špatnou prognózou. Průběh je zpravidla rychlý a fatální s mediánem přežití mezi 6 až 11 měsíci, v případě sPCL jako terminální fáze refrakterního myelomu (nereagující na léčbu) je přežití významně kratší (Noel a Kyle, 1987; Ramsingh, 2009; Tiedemann *et al.*, 2008).

2. VLASTNÍ PRÁCE

2.1 Cíle práce a hypotézy

Cílem předložené práce bylo sledování a vzájemné porovnání hodnot paraproteinu a volných lehkých řetězců u nemocných s mnohočetným myelomem

1. v průběhu léčby
2. před relapsem
3. po ukončení léčby

Hypotézy:

- 1) Odpověď na změnu průběhu choroby je dříve zachytitelná vývojem volných lehkých řetězců.
- 2) Vývoj paraproteinu a volných lehkých řetězců se u individuálních pacientů může lišit – proto je vhodné sledovat oba parametry.

2.2 Analytické metody

Monoklonální gamapatie je souhrnné označení pro jinak heterogenní skupinu onemocnění vyznačujících se přítomností M-Ig či jeho strukturních komponent v séru a/nebo v moči. Základní součástí laboratorně diagnostického a monitorovacího algoritmu u MG je detekce monoklonální komponenty pomocí elektroforetické, resp. imunofixační analýzy bílkovin séra (moči). Stěžejním přínosem z hlediska diagnostiky i sledování průběhu zejména některých variantních forem MM a jiných typů MG je kvantitativní vyšetření sérových hladin volných lehkých řetězců (Tichý a Maisnar, 2006).

Vyšetření vzorků sér pacientů s MM, jejichž výsledky byly vyhodnocovány v rámci této studie, bylo provedeno na Pracovišti klinické chemie (PKCH) v úseku Centrálních laboratoří Nemocnice České Budějovice, a. s.

2.2.1 Elektroforéza sérových bílkovin

Elektroforéza proteinů krevního séra (*serum protein electrophoresis* – SPE) je základní screeningovou metodou pro vyhledávání změn ve složení bílkovinného spektra. Pro identifikaci a kvantifikaci monoklonálních gradientů se používají elektroforetické systémy s vysokou rozlišovací schopností na gelovém nosiči (zejména agaróza) nebo kapilární elektroforéza. Je-li v séru přítomen M-Ig, obvykle se po elektroforetické separaci nachází v γ -globulinové frakci, může ale migrovat i v oblasti β , příp. α -globulinů (např. IgA izotyp nebo IgL). Celistvé molekuly M-Ig i jejich strukturní komponenty jsou elektroforetický homogenní, jejich migrační zóny se proto v elektroforetickém obraze zpravidla jeví jako úzké ostře ohraničené frakce. Pravděpodobnost vzniku atypické zóny v elektroforeogramu závisí na koncentraci M-Ig v cirkulaci – rutinní elektroforézou nezachytitelné jsou tak malé M gradienty skryté v β - nebo γ -globulinové frakci (Tichý a Maisnar, 2006; Engliš, 2007).

Plně automatickým přístrojem pro elektroforetickou analýzu bílkovinného spektra séra na PKCH je Capillarys 2 Flex Piercing od firmy Sebia. Systém Capillarys používá princip kapilární elektroforézy, kde jsou bílkoviny separovány ve volném roztoku v přítomnosti silně alkalických pufrů uvnitř křemenné kapiláry s malým vnitřním průměrem za vysokého napětí. Elektricky nabitě molekuly jsou separovány podle elektroforetické pohyblivosti v alkalickém tlumícím roztoku. Separace je rovněž závislá na pH základního elektrolytu (pufru) a elektroosmotickém toku. Vzorky jsou ředěny pufrům a injektovány do kapilár na

jejich anodickém konci. Poté následuje vysokovoltážní separace bílkovin a jejich přímá detekce při 200 nm na katodickém konci kapiláry, kde je umístěno okénko detektoru. Výsledkem je elektroforetický profil bílkovin pro kvalitativní nebo kvantitativní analýzu. Systém automaticky určí relativní zastoupení jednotlivých zón a po zadání koncentrace celkové vypočítá koncentraci každé frakce.

2.2.2 Imunofixační elektroforéza

Na pozitivní nález nebo podezření na přítomnost M gradientu při SPE bezprostředně navazuje imunofixační elektroforéza (IFE), která slouží k definitivnímu potvrzení nálezu elektroforetického vyšetření a typizaci nově zachyceného M proteinu, tj. určení izotypu M-Ig a antigenního typu IgL. Výhodou IFE je vzhledem k nižšímu detekčnímu limitu větší citlivost ve srovnání s SPE. Představuje tak vhodnou metodu pro kvalitativní průkaz M-Ig v případě negativity či suspektním nálezu při SPE, neposkytuje však možnost kvantitativního stanovení (Tichý a Maisnar, 2006). Mezi indikace IFE patří také negativní SPE u nemocných s léčeným MM v rámci posouzení kompletní remise (Durie *et al.*, 2006).

Pro imunofixační analýzu se na PKCH využívají soupravy Hydragel 4 IF ve spojení s poloautomatickým systémem Hydrasis výrobce Sebia. Principiálně se jedná o kombinaci elektroforézy a imunoprecipitace. Elektroforetické dělení vzorku séra probíhá na agarózovém gelu simultánně v šesti paralelních drahách. Po ukončení separace se na příslušné migrační dráhy s výjimkou referenční stopy aplikují jednotlivá specifická antiséra proti těžkým řetězcům IgG, IgA a IgM a lehkým řetězcům κ a λ . Po inkubaci se odsátím a promytím z gelu odstraní nezreagované proteiny a vzniklé precipitační linie jsou vizualizovány obarvením kyselou violetí nebo amidočerní. Migrační pozice imunofixačních proužků jsou následně porovnávány s odpovídajícími frakcemi referenčního. V případě negativity vyšetření na IgG, A nebo M a současném průkazu monoklonálních IgL κ nebo λ následuje inkubace s antiséry proti IgD a IgE.

2.2.3 Stanovení volných lehkých řetězců v séru

Během syntézy Ig molekul vytváří plazmatické buňky IgL v nadbytku vůči IgH. Nevyvázaná část IgL, tedy volné lehké řetězce (*free light chains* – FLC), jsou secernovány ven z buňky a dochází k jejich distribuci v intra- a extravazálním prostoru. Denní produkce polyklonálních FLC za normálních okolností dosahuje přibližně 500 mg. FLC jsou stejně jako jiné nízkomolekulární proteiny z oběhu volně filtrovány glomerulem a za fyziologických podmínek téměř kompletně reabsorbovány epitelem proximálních tubulů, kde dochází k jejich katabolismu. Fyziologický poměr množství plazmatických buněk produkujících κ , resp. λ IgL je přibližně 2:1. Tomuto poměru také odpovídá zastoupení jednotlivých typů IgL vázaných v Ig molekulách. Tendence λ FLC k dimerizaci má za následek pomalejší renální clearance ve srovnání s κ monomery, proto obsahuje normální sérum i přes nižší stupeň jejich syntézy o něco vyšší koncentrace λ FLC (Bradwell, 2008).

K elevaci sérových hladin FLC dochází u patologických stavů spojených s excesivní tvorbou polyklonálních Ig, jako jsou zánětlivé a reaktivní procesy, při poklesu glomerulární filtrace a maligních či potenciálně maligních B-lymfoproliferativních poruch s produkcí M-Ig. Pouze u posledně jmenovaných však vlivem nadprodukce jednoho typu FLC dochází ke změně poměru κ/λ , přičemž sérová hladina dominantního FLC („*involved*“ *free light chain* – iFLC) je nepřímým ukazatelem velikosti patologického klonu (Bradwell, 2008).

V roce 2001 byl vyvinut systém FreeLite™ (The Binding Site, Birmingham) umožňující kvantitativní analýzu FLC v séru založenou na principu detekce vysoce avidní polyklonální protilátkou proti epitopům κ a λ FLC, které v případě vazby IgL v intaktních molekulách Ig zůstávají skryté a detekci nepřístupné. Stanovení množství precipitovaných imunokomplexů nefelometricky nebo turbidimetricky umožňuje citlivou kvantitativní detekci i velmi nízkých koncentrací obou typů FLC (Bradwell *et al.*, 2001; Bradwell, 2008).

Kvantitativní analýza FLC se na PKCH provádí nefelometricky soupravami N Latex FLC kappa a N Latex FLC lambda na přístroji Siemens BN™. Narozdíl od metody FreeLite™ je na povrch polystyrenových latexových částic navázána monoklonální protilátka proti epitopům FLC. Po vazbě antigenu (FLC) ve vzorku na protilátky dochází k aglutinaci částic, která může být nefelometricky změřena. Referenční rozmezí vyšetření pomocí N Latex FLC uváděné výrobcem (te Velthuis *et al.*, 2011) včetně referenčních intervalů vyšetření FreeLite™ (Katzmann *et al.*, 2002) jsou uvedeny v tabulce IV.

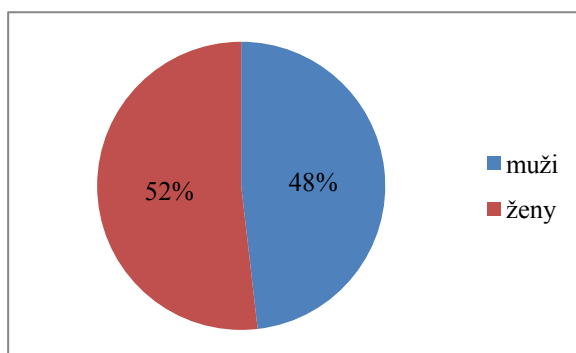
Tabulka IV: Referenční meze N Latex FLC a FreeLite™.

	N Latex FLC	FreeLite™
sFLC κ	6,7 – 22,4 mg/l	3,3 – 19,4 mg/l
sFLC λ	8,3 – 27,0 mg/l	5,7 – 26,3 mg/l
index κ/λ	0,31 – 1,56	0,26 – 1,65

Kvantitativní analýza FLC přispívá k přesnější diagnostice i monitoringu prakticky všech typů MG. Zvláštního významu nabývá především u některých méně obvyklých forem MM, jako je tzv. nesekreční a oligosekreční typ onemocnění, LCMM a jiných MG, především AL amyloidózy (Drayson *et al.*, 2001; Lachmann *et al.*, 2003). Sekreční forma MM s produkcí intaktní molekuly M-Ig představuje asi 80 % případů MM. Nezastupitelnou roli v diagnostice těchto pacientů hraje SPE a IFE, nicméně u 96 % pacientů byla rovněž prokázána abnormální hodnota iFLC a/nebo indexu κ/λ (Bradwell, 2008). Pro mnohonásobně kratší (několikahodinový) poločas FLC ve srovnání s intaktními molekulami Ig (až 21 dní pro IgG) umožňuje stanovení kvantity sFLC pružné sledování vývoje nemoci a reakce na léčbu (Mead *et al.*, 2004). Sérologickou diagnostiku relapsu navíc může komplikovat skutečnost, že v důsledku klonální evoluce dochází v některých případech relabovaného myelomu ke změně původní produkce intaktního M-Ig na izolovanou tvorbu pouze monoklonálních FLC – tzv. „light chain escape“. (Hobbs *et al.*, 2010; Kühnemund *et al.*, 2009).

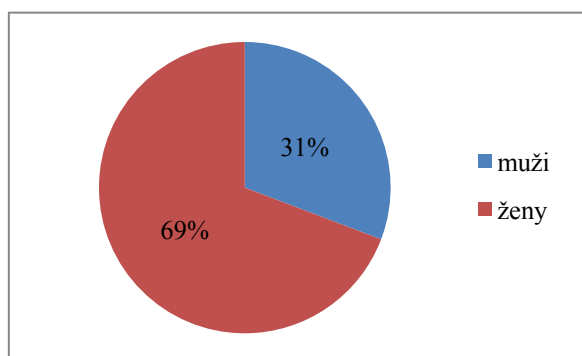
2.3 Soubor pacientů

Původní soubor nemocných s diagnózou mnohočetného myelomu soustředěných na oddělení Klinické hematologie (OKH) Nemocnice České Budějovice, a. s., kteří byli vyšetřeni v průběhu roku 2016 a u nichž byly současně k dispozici výsledky analýzy FLC, tvořilo celkem 137 pacientů v různých fázích vývoje onemocnění s mediánem věku 69 let (rozmezí 39 – 90 let). Poměr mužů a žen (M/Ž) v celkovém počtu pacientů byl 0,9 (1 : 1,1). Procentuální vyjádření počtu mužů a žen je znázorněno na obrázku 4.



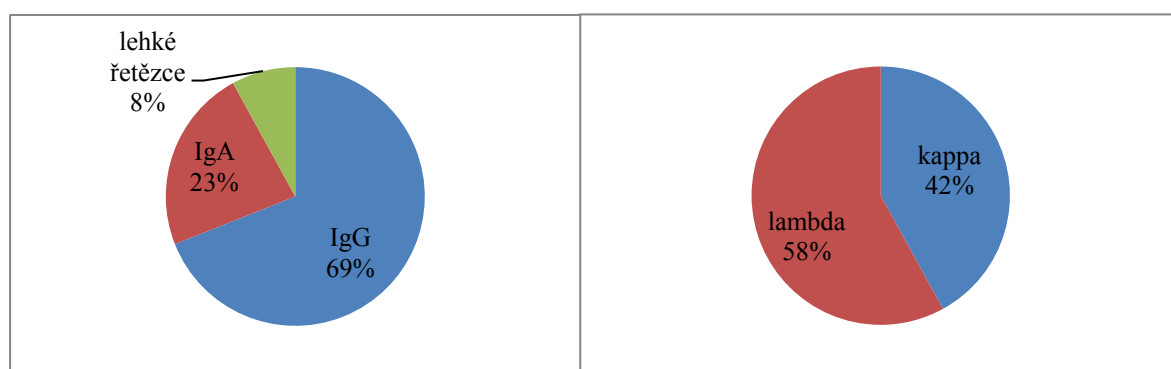
Obrázek 4: Procentuální zastoupení mužů a žen v původním souboru pacientů s diagnózou mnohočetného myelomu.

Z původní sestavy pacientů byli následně vybráni ti, u nichž bylo za rok 2016 k dispozici alespoň 7 výsledků kvantitativní vyšetření FLC. Výběrem na základě tohoto kritéria byl získán soubor 26 nemocných za současné změny demografické charakteristiky studované skupiny pacientů. Ve srovnání s výchozím souborem je patrné významnější zastoupení žen s poměrem M/Ž 0,4 (1 : 2,2). Procentuální zastoupení obou pohlaví je znázorněno na obrázku 5. Věkový medián byl 72 let (rozmezí 48 – 90 let).



Obrázek 5: Procentuální zastoupení mužů a žen v analyzovaném souboru pacientů s mnohočetným myelomem.

Studovaný soubor sestával převážně z pacientů podstupujících léčbu indikovanou v průběhu roku 2016 či v druhé polovině roku 2015. K dostupným výsledkům analýzy FLC v jednotlivých intervalech byly následně dohledány a přiřazeny hodnoty odpovídajících vyšetření paraproteinu. Převládajícím typem paraproteinu byl IgG s relativním zastoupením 69 %, imunochemický typ IgA byl zastoupen u 23 % pacientů a dva nemocní měli MM z lehkých řetězců (8 %). Přítomností IgL typu kappa se vyznačovalo 42 % nemocných, antigenního typu lambda pak 58 %. Zastoupení jednotlivých typů MM z hlediska izotypu produkovaného M-Ig spolu s relativní četností výskytu IgL typu kappa a lambda je znázorněno v grafickém přehledu na obrázku 6.



Obrázek 6: Procentuální zastoupení jednotlivých izotypů těžkých a lehkých řetězců ve studovaném souboru pacientů.

Vyhodnocení

Statistická analýza průměrného trendu vývoje hladin FLC a paraproteinu v různých stádiích průběhu nemoci včetně grafického vyhodnocení byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007.

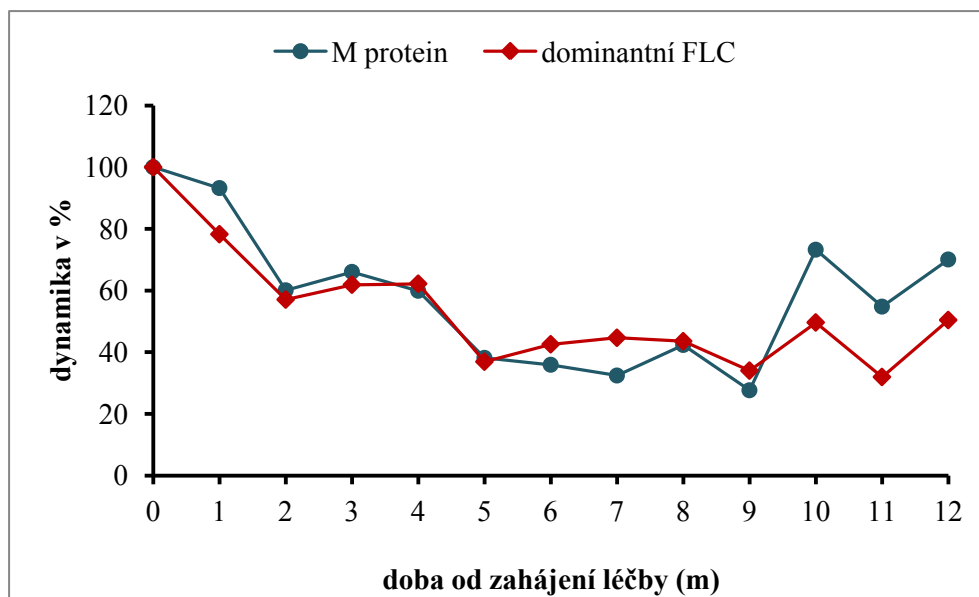
2.4 Výsledky

2.4.1 Sledování hodnot paraproteinu a volných lehkých řetězců v průběhu léčby

Klinický význam analýzy sérových hladin FLC u sekrečních forem MM s kompletním typem molekuly M-Ig byl zkoumán v preliminární studii (Mead *et al.*, 2004) sledující dynamiku sérové hladiny FLC u 17 pacientů, a to vzhledem ke koncentraci intaktního M-Ig i dalším parametrům včetně β_2 -mikroglobulinu a počtu plazmatických buněk v kostní dřeni. Díky výrazně kratšímu metabolickému poločasu FLC v séru (2 – 4 hodiny pro κ FLC a 3 – 6 hodin pro λ dimery) oproti Ig molekulám (6 dní pro IgA izotyp, v případě IgG až 21 dní) představují sérové hladiny FLC dynamičtější parametr schopný pružněji reflektovat změnu masy myelomové populace v podmínkách probíhající léčby. Příčinou možného nepoměru mezi stanoveními M-Ig a FLC při probíhající léčbě s poklesem koncentrace FLC a zároveň určitým přetrvávajícím množstvím M-Ig může být právě delší poločas katabolismu intaktních M-Ig molekul (Bradwell, 2008; Pika *et al.*, 2012; Mead *et al.*, 2004).

V rámci této části práce byly sledovány relativní změny koncentrací M-Ig a iFLC v reakci na zahájení léčby i během jejího dalšího průběhu u skupiny 15 pacientů z původní 26 členné sestavy. Limitujícím faktorem byla zejména skutečnost, že do hodnoceného souboru mohli být zařazeni pouze pacienti indikovaní k léčbě v průběhu roku 2016 či 2015, u nichž byly současně k dispozici výsledky vyšetření obou sledovaných parametrů před zahájením léčby. Do výsledné analyzované sestavy tak nebyli zahrnuti „rozléčení“ pacienti bez dostupných měření časově relevantních k datu zahájení léčby a rovněž oba nemocní s LCMM.

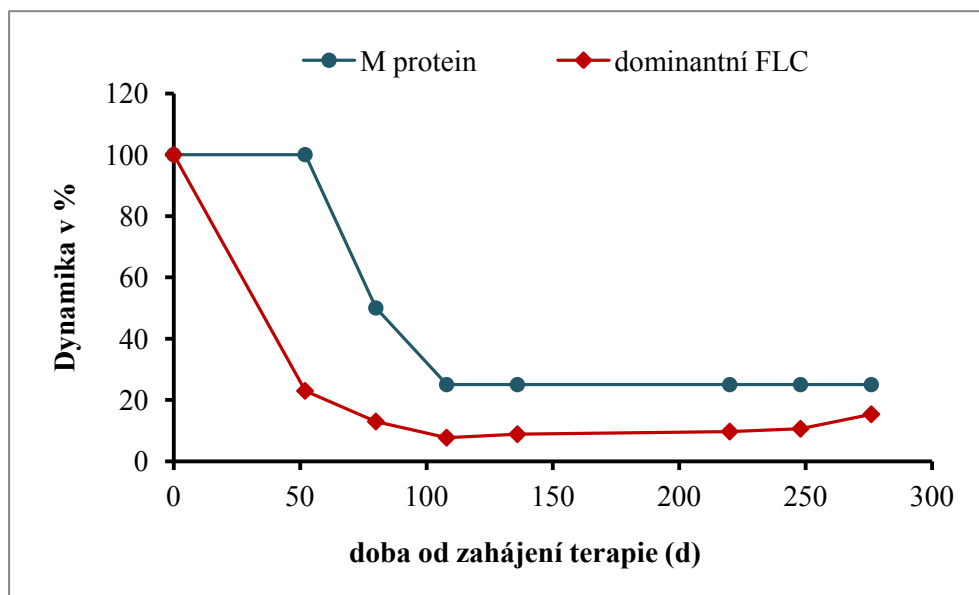
Vzhledem k rozdílnosti hodnot M-Ig a iFLC mezi jednotlivými pacienty byly v rámci souhrnné analýzy vypočteny průměrné relativní změny koncentrace obou parametrů oproti původní hodnotě, tj. při zahájení léčby, v měsíčních intervalech vyjádřené v procentech. Průměrný trend vývoje obou ukazatelů v daných časových intervalech je graficky znázorněn na obrázku 7.



Obrázek 7: Grafické srovnání sérových hladin dominantního typu volných lehkých řetězců a paraproteinu v průběhu léčby.

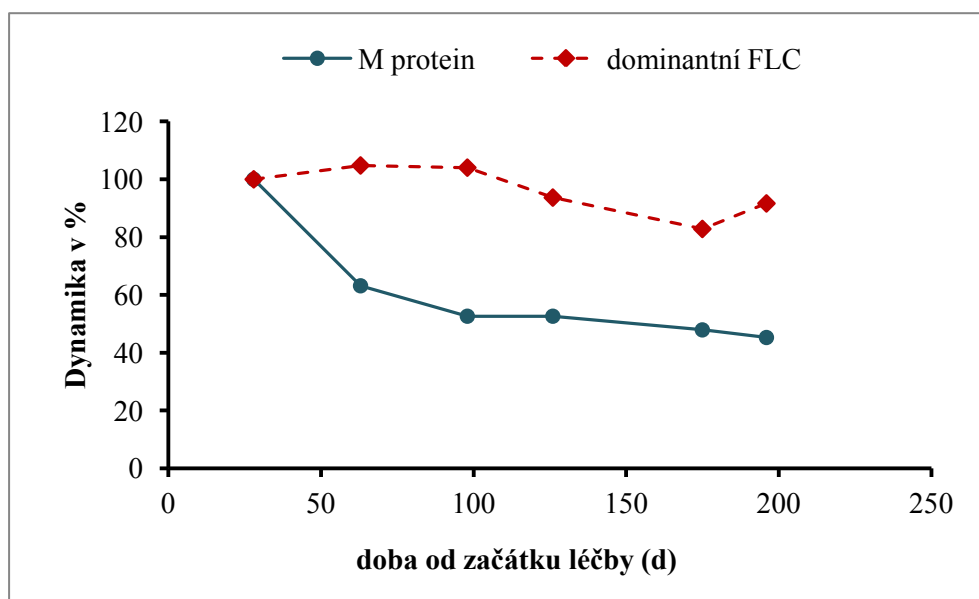
Z průběhu obou křivek je patrné, že kvantitativní změny obou markerů se uskutečňují paralelně. Zároveň byly sestrojeny grafy znázorňující dynamiku kvantitativních změn M-Ig a iFLC u jednotlivých pacientů. Při pohledu na konkrétní situace byla patrná převaha trendu paralelní odpovědi obou parametrů, v některých případech však byly pozorovány i výsledky odlišné, které lze demonstrovat na příkladu dvou pacientů (Obr. 8 a 9).

V prvním případě se jednalo o pacienta s paraproteinem typu IgA kappa (Obr. 8), u něhož dochází k časnějšímu poklesu iFLC. V době prvního odběru při probíhající terapii byla zaznamenána redukce koncentrace iFLC o 77 % oproti původní hladině bez současné úpravy hodnot M-Ig, jehož pokles (o 50 %) byl zaznamenán teprve po dalších 28 dnech.



Obrázek 8: Dynamika kvantity monoklonálního IgA a κ FLC u pacienta s mnohočetným myelomem v průběhu terapie.

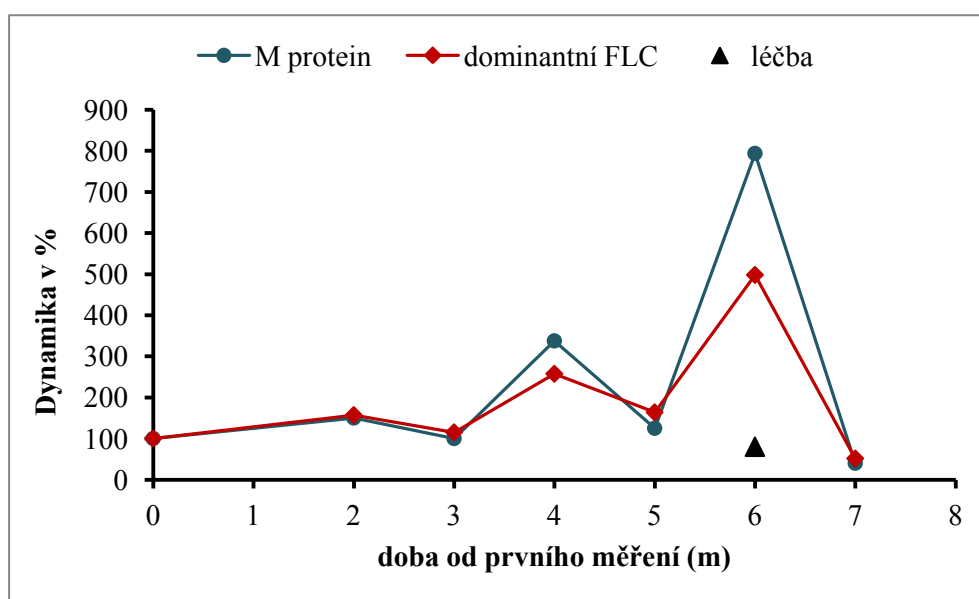
Druhým příkladem jsou výsledky pacientky s paraproteinem typu IgG lambda, u níž nastala situace zcela opačná (Obr. 9). Navzdory očekávanému vývoji dochází po zahájení léčby k úpravě M-Ig s perzistencí zvýšené koncentrace iFLC. K prvnímu, navíc pouze mírnému, poklesu hladiny iFLC (o 6,3 % vůči výchozí hodnotě) došlo teprve po 4 měsících od začátku terapie.



Obrázek 9: Dynamika kvantitativních změn monoklonálního IgG a λ FLC u pacienta s mnohočetným myelomem v podmínkách probíhající terapie.

2.4.2 Sledování hodnot paraproteinů a volných lehkých řetězců před relapsem

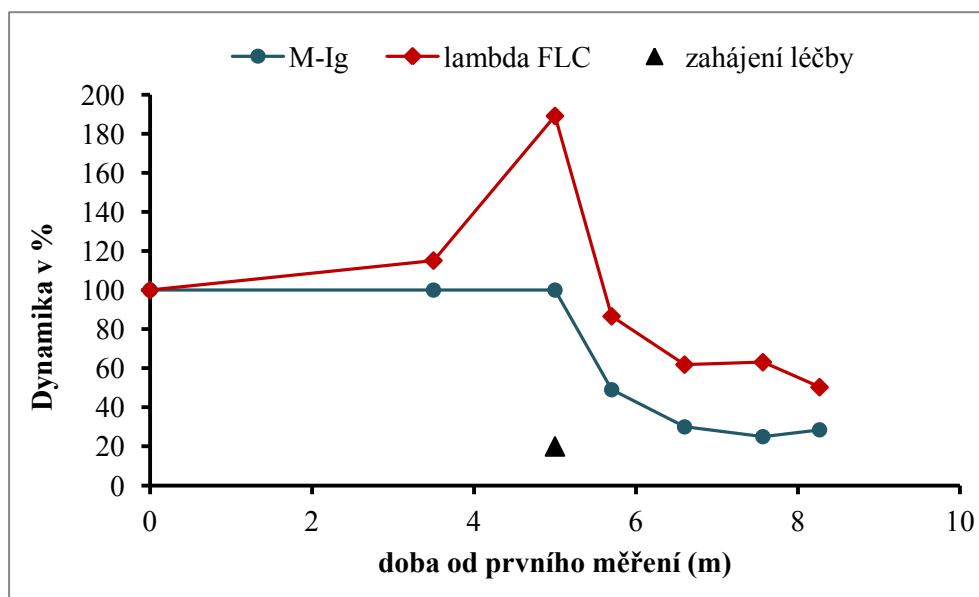
V analyzovaném souboru byli dále sledováni nemocní, u nichž byly dostupné alespoň tři výsledky kvantitativního stanovení jak FLC, tak paraproteinu v době před započítáním léčby. Za referenční hodnotu pro sledování změn v kvantitě M-Ig a iFLC byla stanovena hodnota výsledků prvního vyšetření v daném roce či před koncem léčby, pokud po ní následoval interval bez terapie a její opětovné zahájení. Výsledky statistického vyhodnocení průměrných změn vyjádřených v procentech jsou znázorněny na obrázku 10.



Obrázek 10: Grafické srovnání dynamiky sérových hladin dominantního typu FLC a paraproteinů před relapsem.

Z uvedeného grafického znázornění je patrné, že před relapsem onemocnění dochází k současné elevaci sérových hladin obou ukazatelů.

Výsledky laboratorních vyšetření jednotlivých pacientů byly vyneseny do zvláštních grafů pro zhodnocení individuálního vývoje kvantitativních změn M-Ig a iFLC. Téměř u všech pacientů docházelo k paralelnímu vzestupu hodnot obou ukazatelů. Výjimku představovaly výsledky pacientky s paraproteinem IgG lambda znázorněné na obrázku 11, u níž byla zaznamenána elevace sérových iFLC, a to až na 189 % výchozí hodnoty, zatímco koncentrace M-Ig zůstávala stabilní.

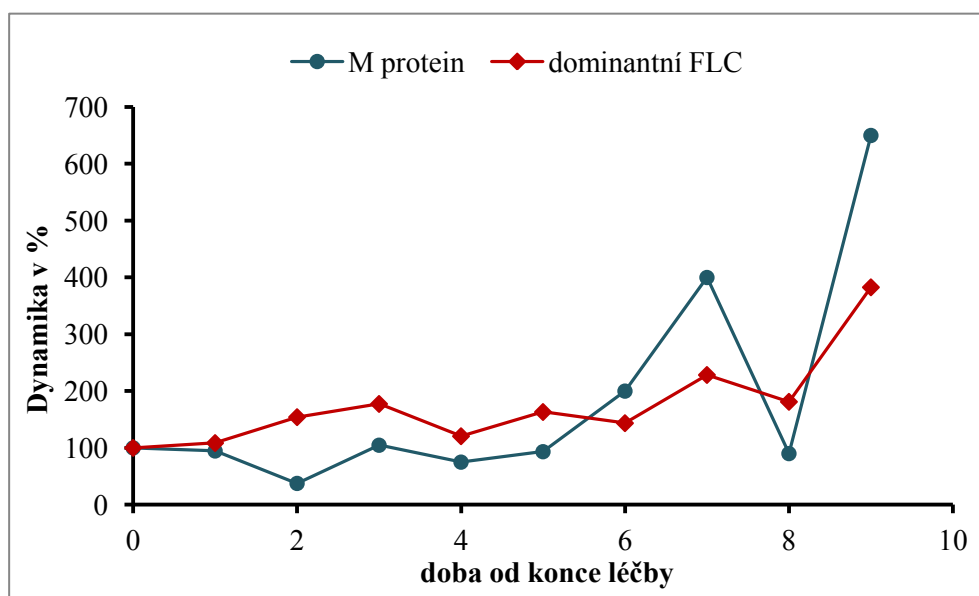


Obrázek 11: Relativní změny koncentrace paraproteinu a dominantního FLC u pacientky v době relapsu.

Opačný trend, tedy případ vzestupu koncentrace M-Ig bez odpovídající změny ve vyšší sérové hladiny iFLC v období předcházejícím relapsu, nebyl zaznamenán u žádného pacienta.

2.4.3 Sledování hodnot paraproteinů a volných lehkých řetězců po ukončení léčby

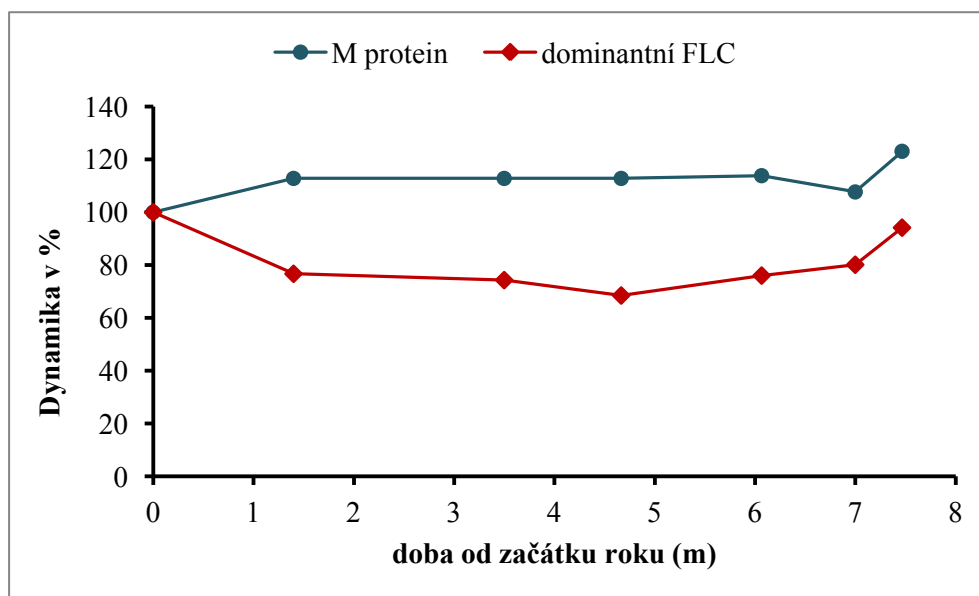
V hodnoceném souboru nemocných s MM byly dále sledovány hodnoty paraproteinů a dominantního typu FLC u pacientů, u nichž byla léčba v průběhu roku 2016 ukončena, a zároveň byly dostupné výsledky nejméně tří následných odběrů. Jako původní, výchozí, hodnoty pro posouzení dynamiky kvantity M-Ig a iFLC po ukončení terapie sloužily výsledky laboratorního stanovení obou parametrů v době před ukončením léčby. Výsledek statistického zpracování relativních změn hodnot sledovaných parametrů je znázorněn na obrázku 10.



Obrázek 10: Dynamika kvantitativních změn koncentrace monoklonálního imunoglobulinu a dominantního typu volných lehkých řetězců po ukončení terapie.

Průběh změn je však ke konci sledování vzhledem k malému počtu pacientů do značné míry ovlivněn klinickým vývojem onemocnění pacienta, u něhož ve sledovaném období došlo k relapsu s vysokým relativním vzestupem hodnot M-Ig.

V souboru pacientů byly rovněž dva nemocní se stabilním onemocněním. Pro předběžný pohled na chování obou parametrů v podmínkách stabilní choroby, byly vyneseny do grafu relativní změny koncentrace M-Ig a iFLC pacientky s paraproteinem IgG lambda v závislosti na čase uplynulém od začátku roku (Obr. 11).



Obrázek 11: Vývoj hladiny monoklonálního IgG a volných lehkých řetězců lambda u pacientky se stabilní chorobou.

Z grafického zpracování bylo zřejmé, že koncentrace obou parametrů zůstávaly stabilní po celou dobu sledování.

3. Diskuze

Doporučení týkající se vhodné indikace a interpretace vyšetření koncentrace FLC včetně jeho významu pro další léčebný postup u MM a příbuzných chorob byla publikována IMWG v roce 2009. Jedná se především o diagnostiku a monitorování oligo- a nesekrečního typu myelomu, AL amyloidózy, LCMM a MGUS. Většinu případů MM však představuje sekreční typ se syntézou intaktních molekul M-Ig. Přestože byla v době diagnózy u 96 % těchto nemocných pozorována abnormální hodnota sFLC a/nebo indexu kappa/lambda (Mead *et al.*, 2004), klinický význam laboratorně zjištěných výsledků stanovení FLC v séru pro monitorování průběhu IIMM zůstává z velké části nedefinován (Dispenzieri *et al.*, 2009).

V této práci jsem se soustředila na sledování relativních změn sérové hladiny paraproteinu a volných lehkých řetězců v různých klinických situacích. Sérová koncentrace volných lehkých řetězců nekoreluje s hladinou intaktního M-Ig. Jedná se tedy o vzájemně nezávislé parametry, zároveň ale oba vyjadřují sekreční potenciál klonálních buněk (Pika *et al.*, 2012). Výsledky pozorování jsem porovnávala se studii několika autorů, jejichž cíle a metodika se nejvíce blížily mé práci.

Výsledný sledovaný soubor byl tvořen 26 pacienty s diagnózou mnohočetného myelomu v různých fázích onemocnění. Z hlediska demografické charakteristiky pacientů bylo patrné zejména vyšší zastoupení žen (téměř 70 %), které je nejen v rozporu s trendem mírné predominance výskytu tohoto onemocnění u mužů uváděným v literatuře, ale neodpovídá ani struktuře původního souboru pacientů (Obr. 5). Demografické rozdíly mezi celkovým souborem nemocných a studovanou skupinou vyplynuly z výběru pacientů na základě kritéria, kterým byl počet dostupných laboratorních dat za rok 2016.

Věkový medián pacientů v celkovém souboru pacientů ($n = 137$) byl 69 let, ve zkoumané sestavě ($n = 26$) pak 72 let. V literatuře nejčastěji uváděný medián věku při diagnóze se v jednotlivých publikacích mírně liší, nejčastěji se však pohybuje v rozmezí 65-70 let (Kyle *et al.*, 2003b; Kristinsson *et al.*, 2007). V našem případě oba soubory sestávaly z pacientů v různých fázích průběhu choroby, nikoliv pouze nově diagnostikovaných, věková struktura souboru je nicméně i tak v souladu s literárními údaji.

Je známo, že zastoupení jednotlivých izotypů M-Ig u MM odráží vcelku přirozené koncentrační zastoupení imunoglobulinových tříd v krvi. Z rozsáhlejších studií na souboru

více než tisíce pacientů vyplynulo, že nejčastějším typem je IgG (~ 53 %), méně častý izotyp IgA (~22 %) a MM s izolovanou tvorbou lehkých řetězců (16 %), ostatní formy jsou vzácné s přibližně 1% výskytem (Kyle *et al.*, 2003b; Nair *et al.*, 2009). Z hlediska imunochemického typu paraproteinu byly v našem analyzovaném souboru zastoupeny pouze izotypy IgG (69 %) a IgA (23 %), přičemž dva nemocní (8 %) měli LCMM (myelom z lehkých řetězců). Raritní formy myelomu provázené IgD, IgE a IgM paraproteinémií se v našem souboru nevyskytovaly, což nebylo vzhledem k jeho velikosti možno očekávat.

Pro všechna sériová měření 26 pacientů s diagnózou mnohočetného myelomu soustředěných na OKH bylo zjištěno datum zahájení i ukončení léčby, přičemž s ohledem na limitovaný počet pacientů nebylo dále rozlišováno, zda se jednalo o první či následnou linii léčby. Souhrnná analýza průměrného trendu vývoje obou laboratorních parametrů u skupiny 15 pacientů s dostupnými měřeními umožňujícími stanovení výchozích hodnot paraproteinu a FLC ve vztahu k zahájení a průběhu léčby ukázala, že změny obou ukazatelů se uskutečňují paralelně s mírně naznačeným trendem rychlejšího poklesu FLC. Toto pozorování je v souladu se závěry dalších autorů, kteří provedli sériová měření několika laboratorních markerů včetně FLC a paraproteinu, přičemž i přes paralelní změny docházelo k větším relativním změnám FLC (Mead *et al.*, 2004; Pratt *et al.*, 2006). Po statistickém zpracování celého souboru je zřejmé, že hodnoty obou ukazatelů klesají paralelně a po přibližně 5 měsících od zahájení léčby dosahují plateau. Dále je patrné, že počínaje devátým měsícem od započetí terapie dochází u některých pacientů k nárůstu obou parametrů. Při bližším pohledu na konkrétní vývoj u jednotlivých pacientů byly zaznamenány i odlišné situace, v nichž docházelo izolovaně ke změně pouze FLC, přičemž úprava hodnot paraproteinu se uskutečnila teprve s určitým zpožděním (Obr. 7). Výskyt diskrepantních výsledků mezi stanoveními FLC a paraproteinu byly pozorovány v několika dalších studiích (Mead *et al.*, 2004; Tate *et al.*, 2005).

Při monitorování vývoje změn obou laboratorních markerů v rámci hodnocené skupiny pokrýval interval sledování u některých pacientů období relapsu onemocnění. Na základě dostupných měření z doby před indikací zahájení jeho léčby byl statistickým zpracováním výsledků měření u této podskupiny nemocných sledován vývoj hodnot FLC a paraproteinu. Při celkovém hodnocení dynamiky průměrných změn byl v intervalu dvou měsíců před samotným relapsem patrný počínající nárůst obou markerů s naznačeným trendem výraznějšího vzestupu hladiny paraproteinu. Ve většině případů se v souladu s průměrným trendem změny obou ukazatelů signalizující relaps choroby uskutečňovaly paralelně. Při

analýze dynamického průběhu hodnot FLC a paraproteinu u individuálních nemocných byl rovněž zaznamenán jeden případ vzestupu FLC beze změny v hladině paraproteinu. Mead *et al.* (2004) ve své studii pozoroval, že sérové hladiny FLC představovaly časnější indikátor nastupujícího relapsu ve srovnání se stanovením paraproteinu u jednoho ze 7 relabujících pacientů, přičemž Tate *et al.* (2005) popsal stejnou situaci u jednoho z 11 pacientů. Naopak časnější změny v hladině intaktní molekuly paraproteinu signalizující nástup relapsu pozorovali autoři u 2 ze 7, resp. 6 z 11 pacientů. V našem souboru však tento opačný trend vývoje zaznamenán nebyl.

Při pohledu na vývoj hodnot sérové hladiny FLC a paraproteinu v období po ukončení léčby byla dynamika podobná jak z hlediska statistického zpracování souboru, tak v konkrétních situacích jednotlivců. Výsledky souhrnné analýzy naznačují, že přibližně s odstupem 6 měsíců již dochází k relapsu, nicméně tento výsledek byl do značné míry ovlivněn jedním relabujícím pacientem, u něhož docházelo k elevaci sérové hladiny paraproteinu s relativním vzestupem o několik set procent.

V analyzované sestavě pacientů byly rovněž dva nemocní se stabilním onemocněním, kteří nebyli v průběhu celého roku léčeni. Pro předběžný pohled na vývoj změn sledovaných laboratorních parametrů v podmínkách stabilní choroby byly v daném období sledovány relativní změny v hladinách paraproteinu a FLC u jedné pacientky. Z grafického zpracování bylo zřejmé, že koncentrace obou parametrů zůstávaly stabilní po celou dobu sledování a zpočátku očekávané kolísání hodnot FLC v důsledku vnějších vlivů (např. infekcí) při stabilní hodnotě paraproteinu pozorováno nebylo.

Všechny údaje ve všech klinických situacích u většiny pacientů jsou paralelní (s výjimkou těch, co mají jenom FLC), ale zachytili jsme i případy, v nichž změna klinického stavu byla signalizována jenom jedním nebo druhým parametrem. Je zřejmé, že o oba markery mohou mít u individuálních pacientů odlišnou dynamiku, proto se na základě získaných dat domnívám, že je tedy pro časný záchyt změn klinického stavu u většiny pacientů optimální sledovat oba parametry. Přestože jde o výsledek hodnocení poměrně malé skupiny pacientů, odpovídá závěrům předchozích studií.

4. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo sledování a vzájemné porovnání hodnot paraproteinu a volných lehkých řetězců u nemocných s mnohočetným myelomem v různých fázích průběhu choroby – v průběhu léčby, před relapsem a dále po ukončení terapie. Stanovený cíl byl splněn.

Na základě teoretických předpokladů byly stanoveny dvě hypotézy týkající se dynamiky koncentrace monoklonálního imunoglobulinu a volných lehkých řetězců v séru v průběhu choroby. První hypotéza předpokládající časnější zachytitelnost odpovědi na změnu průběhu choroby změnou koncentrace volných lehkých řetězců se nepotvrdila. Druhá hypotéza vycházela z předpokladu, že vývoj hodnot paraproteinu a volných lehkých řetězců se u individuálních pacientů může lišit, proto je vhodné sledovat oba parametry. Tato hypotéza byla potvrzena na základě dokumentace individuálních případů, kdy docházelo k odpovídající změně v hladině pouze jednoho z laboratorních ukazatelů.

5. Seznam použitých zkratk

ASCT	autologous stem cell transplantation, autologní transplantace kmenových buněk
β_2 M	β_2 -mikroglobulin
CR	complete response, kompletní remise
CRAB	akronym hyperkalcémie, renální insuficience, anémie, osteolytické změny
D-S klasifikace	klasifikace mnohočetného myelom dle Durieho a Salmona
EM	extramedulární (mimokostní)
FLC	free light chains, volné lehké řetězce
HRD	hyperdiploidní karyotyp
IFE	imunofixační elektroforéza
iFLC	involved free light chain, dominantní typ volných lehkých řetězců
Ig	imunoglobulin
IgL	lehké řetězce imunoglobulinů
IgH	těžké řetězce imunoglobulinů, z anglického "heavy"
IMWG	International Myeloma Working Group
ISS	International Staging System, mezinárodní stážovací systém
LC-MGUS	<i>light chain</i> MGUS, monoklonální gamapatie nejasného významu s produkcí lehkých řetězců
MDE	myeloma defining events, události definující myelom
MG	monoklonální gamapatie
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu
M-Ig	monoklonální imunoglobulin
MM	mnohočetný myelom
MR	magnetická rezonance
NHRD	non-hyperdiploidní karyotyp
OKH	oddělení Klinické hematologie
OPG	osteoprotegerin
PCL	plazmocelulární leukémie
PD	progressive disease, progresivní onemocnění
PKCH	Pracoviště klinické chemie
pPCL	primární plazmocelulární leukémie

PR	parciální remise
RANK	receptor aktivující nukleární faktor kappa B
RANKL	ligand pro RANK receptor
SD	stable disease, stabilní onemocnění
sCR	stringent complete response, "stringent" kompletní remise
sFLC	serum free light chains, volné lehké řetězce v séru
sPCL	sekundární plazmocelulární leukémie
SPE	serum protein electrophoresis, elektroforéza bílkovin séra
SMM	smoldering multiple myeloma, doutnající myelom
VGPR	very good partial response, velmi dobrá parciální remise

6. Seznam citované literatury

ADAM, Z., L. POUR, M. KREJČÍ, S. ŠTĚPÁNKOVÁ, I. SVOBODOVÁ, K. VESELÝ a R. HÁJEK, 2008a. Poškození funkce ledvin při mnohočetném myelomu a dalších monoklonálních gamapatiích. *Vnitřní lékařství*. **54**(9), 847-861.

ADAM, Z., 1999. *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 8021020342.

ADAM, Z., 2005. *Kostní nádorová choroba*. Praha: Grada. ISBN 8024713578.

ADAM, Z., M. KREJČÍ a J. VORLÍČEK, 2008b. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada. ISBN 9788024725024.

ADAM, Z., J. VANÍČEK a J. VORLÍČEK, 2004. *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. 2., aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 8024708965.

ADAM, Z., M. KREJČÍ a J. SIMONIDES, 2011. Choroby způsobené ukládáním monoklonálních imunoglobulinů. Postgraduální medicína [online]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/choroby-zpusobene-ukladanim-monoklonalnich-imunoglobulinu-462098>

AVET-LOISEAU, H., T. FACON, A. DAVIET, C. GODON, M-J. RAPP, J-L. HAROUSSEAU, B. GROSBOIS a R. BATAILLE, 1999. 14q32 Translocations and Monosomy 13 Observed in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance Delineate a Multistep Process for the Oncogenesis of Multiple Myeloma. *Cancer Research*. **59**(18), 4546-4550.

BERGSAGEL, P. L., 2005. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. **106**(1), 296-303. ISSN 00064971.

BERGSAGEL, P. L. a W. M. KUEHL, 2001. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*. **20**(40), 5611-5622.

BRADWELL, A. R., 2008. *Serum free light chain analysis: (plus Hevylite)*. 5th ed. Birmingham: Binding Site. ISBN 9780704427020.

BRADWELL, A.R., H.D. CARR-SMITH, G.P. MEAD, L.X. TANG, P.J. SHOWELL, M.T. DRAYSON a R. DREW, 2001. Highly Sensitive, Automated Immunoassay for Immunoglobulin Free Light Chains in Serum and Urine. *Clinical Chemistry*. **47**(4), 673-680.

CESANA, C., C. KLERSY a L. BARBARANO, et al., 2002. Prognostic Factors for Malignant Transformation in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Smoldering Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. **20**(6), 1625-1634. ISSN 0732183x.

DE VOS, J., D. HOSE, T. REME, et al. Microarray-based understanding of normal and malignant plasma cells. *Immunological Reviews*. 2006, **210**(1), 86-104. ISSN 0105-2896.

DIMOPOULOS, M. A., A. PALUMBO, K. B. DELASALLE a R. ALEXANIAN, 1994. Primary plasma cell leukaemia. *British Journal of Haematology*. **88**(4), 754-759.

DISPENZIERI, A., R. A. KYLE, J. A. KATZMANN, et al., 2008. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood*. **111**(2), 785-789. ISSN 00064971.

DISPENZIERI, A., R. KYLE, G. MERLINI, et al., 2009. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. **23**(2), 215-224.

DISPENZIERI, A., J. A. KATZMANN, R. A. KYLE, et al., 2010. Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *The Lancet*. **375**(9727), 1721-1728. ISSN 01406736.

DISPENZIERI, A. a R. A. KYLE, 2005. Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. **18**(4), 553-568. ISSN 15216926.

DISPENZIERI, A., S. V. RAJKUMAR, M. A. GERTZ, et al., 2007. Treatment of Newly Diagnosed Multiple Myeloma Based on Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART): Consensus Statement. *Mayo Clinic Proceedings*. **82**(3), 323-341. ISSN 00256196.

DRACH, J., J. ANGERLER, J. SCHUSTER, et al., 1995. Interphase fluorescence in situ hybridization identifies chromosomal abnormalities in plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. **86**(10), 3915-3921.

DRAYSON, M., L. X. TANG, R. DREW, G.P. MEAD, H. CARR-SMITH a A.R. BRADWELL, 2001. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood*. **97**(9), 2900-2902.

DURIE, B. G. M., J-L. HAROUSSEAU, J. S. MIGUEL, et al., 2006. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. **20**(9), 1467-1473.

DURIE, B. G. M. a S. E. SALMON, 1975. A clinical staging system for multiple myeloma correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. **36**(3), 842–854.

Engliš 2007. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi* [online] verze 12 (prosinec 2014), ISBN 80 – 238 – 9775 – 6, [cit. 10.3.2017] Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/MEACS.htm>

FONSECA, R., 2004. Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report. *Cancer Research*. **64**(4), 1546-1558. ISSN 00085472.

FONSECA, R., 2003. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood*. **102**(7), 2562-2567. ISSN 00064971.

FONSECA, R., R. J. BAILEY, G. J. AHMANN, et al., 2002. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. **100**(4), 1417-1424.

FOSSÅ, A., D. BRANDHORST, J. H. MYKLEBUST, S. SEEBER a M. R. NOWROUSIAN, 1999. Relation between S-phase fraction of myeloma cells and anemia in patients with multiple myeloma. *Experimental Hematology*. **27**(11), 1621–1626.

GREIPP, P. R., J. S. MIGUEL, B. G.M. DURIE, et al., 2005. International Staging System for Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. **23**(15), 3412-3420. ISSN 0732183.

HÁJEK R., Z. ADAM, V. ŠČUDLA, J. BAČKOVSKÝ, I. ŠPIČKA, M. KREJČÍ, P. KESSLER, J. MINAŘÍK, V. SANDECKÁ a J. RADOCHA, 2012. Česká myelomová skupina: Souhrn doporučení 2012, Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. *Transfuze a hematologie dnes*. 18: 1-89.

HILL, Q. A., A. C. RAWSTRON, R. M. DE TUTE a R. G. OWEN, 2014. Outcome prediction in plasmacytoma of bone: a risk model utilizing bone marrow flow cytometry and light-chain analysis. *Blood*. **124**(8), 1296-1299. ISSN 00064971.

HOBBS, J. A. R., M. T. DRAYSON, K. SHARP, S. HARDING, A. R. BRADWELL a G. P. MEAD, 2010. Frequency of altered monoclonal protein production at relapse of multiple myeloma. *British Journal of Haematology* [online]. **148**(4), 659-661 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07952.x. ISSN 00071048. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2009.07952.x>

CHNG, W. J., 2005. A validated FISH trisomy index demonstrates the hyperdiploid and nonhyperdiploid dichotomy in MGUS. *Blood*. **106**(6), 2156-2161. ISSN 00064971.

IWANAGA, M., M. TAGAWA, K. TSUKASAKI, S. KAMIHIRA a M. TOMONAGA, 2007. Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance: Study of

52,802 Persons in Nagasaki City, Japan. *Mayo Clinic Proceedings*. **82**(12), 1474-1479. ISSN 00256196.

KATZMANN, J.A., R.J. CLARK, R.S. ABRAHAM, S. BRYANT, J.F. LYMP, A.R. BRADWELL a R.A. KYLE, 2002. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clinical Chemistry*. **48**(9), 1437-1444.

KLEIN, B., K. TARTE, M. JOURDAN, et al., 2003. Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. *International Journal of Hematology*. **78**(2), 106-113.

KRISTINSSON, S.Y., O. LANDGREN, P. W. DICKMAN, Å. R. DEROLF a M. BJÖRKHOLM, 2007. Patterns of Survival in Multiple Myeloma: A Population-Based Study of Patients Diagnosed in Sweden From 1973 to 2003. *Journal of Clinical Oncology*. **25**(15), 1993-1999. ISSN 0732183.

KUEHL, W. M. a P. L. BERGSAGEL, 2002. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature Reviews Cancer*. **2**(3), 175-187. ISSN 1474175.

KÜHNEMUND, A., P. LIEBISCH, K. BAUCHMÜLLER, A. ZUR HAUSEN, H. VEELKEN, R. WÄSCH a M. ENGELHARDT, 2009. □‘Light-chain escape-multiple myeloma’ – an escape phenomenon from plateau phase: report of the largest patient series using LC-monitoring. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* . **135**(3), 477-484. ISSN 01715216.

KYLE, R. A., B. G. M. DURIE, S. V. RAJKUMAR, et al., 2010. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*. **24**(6), 1121-1127. ISSN 08876924.

KYLE, R. A., 1994. The monoclonal gammopathies. *Clinical Chemistry*. **40**(11), 2154-2161.

KYLE, R. A., 2003a. Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. **102**(10), 3759-3764. ISSN 00064971.

KYLE, R. A. a S. V. RAJKUMAR, 2008. Multiple myeloma. *Blood*. **111**(6), 2962-2972. ISSN 00064971.

KYLE, Robert A. a S. V. RAJKUMAR, 2009. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. **23**(1), 3–9.

KYLE, R. A., 1978. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *The American Journal of Medicine*. **64**(5), 814-826. ISSN 00029343.

KYLE, R. A., M. A. GERTZ, Thomas E. WITZIG, et al., 2003b. Review of 1027 Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Mayo Clinic Proceedings*. **78**(1), 21-33. ISSN 00256196.

KYLE, R. A. a P. R. GREIPP, 1980. Smoldering Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. **302**(24), 1347-1349. ISSN 00284793.

KYLE, R. A. a S. V. RAJKUMAR, 2007a. Epidemiology of the plasma-cell disorders. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. **20**(4), 637-664. ISSN 15216926.

KYLE, R. A. a S. V. RAJKUMAR, 2004. Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. **351**(18), 1860-1873. ISSN 00284793.

KYLE, R. A., E. D. REMSTEIN, T. M. THERNEAU, et al., 2007b. Clinical Course and Prognosis of Smoldering (Asymptomatic) Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. **356**(25), 2582-2590. ISSN 00284793.

KYLE, R. A., T M. THERNEAU, S. V. RAJKUMAR, et al., 2006a. Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *New England Journal of Medicine*. **354**(13), 1362-1369. ISSN 00284793.

KYLE, R. A., T. M. THERNEAU, S. V. RAJKUMAR, J. R. OFFORD, D. R. LARSON, M. F. PLEVAK a L. J. MELTON, 2002. A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *New England Journal of Medicine*. **346**(8), 564-569. ISSN 00284793.

LACHMANN, H.J., R. GALLIMORE, J.D. GILLMORE, H.D. CARR-SMITH, A.R. BRADWELL, M.B. PEPYS a P.N. HAWKINS, 2003. Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating free immunoglobulin light chains following chemotherapy. *British Journal of Haematology*. **122**(1), 78-84.

LANDGREN, O., 2005. Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States. *Blood*. **107**(3), 904-906. ISSN 00064971.

LANDGREN, O., R. A. KYLE, R. M. PFEIFFER, et al., 2009. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. **113**(22), 5412-5417. ISSN 00064971.

LANDGREN, O. a A. J. WAXMAN, 2010. Multiple Myeloma Precursor Disease. *JAMA*. **304**(21), 2397-2404. ISSN 00987484.

MAHINDRA, A., J. LAUBACH, Noopur RAJE, Nikhil MUNSHI, Paul G. RICHARDSON a Kenneth ANDERSON, 2012-2-21. Latest advances and current challenges in the treatment of multiple myeloma. *Nature Reviews Clinical Oncology*. **9**(3), 135-143. ISSN 17594774.

MAISNAR, V. a R. HÁJEK, 2008. Změny v diagnostických kritériích a kritériích léčebné odpovědi u mnohočetného myelomu. *Klinická biochemie a metabolismus*. **16** (37), No. 2, 84-88.

MEAD, G. P., H. D. CARR-SMITH, M. T. DRAYSON, G. J. MORGAN, J. A. CHILD a A. R. BRADWELL, 2004. Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. **126**(3), 348-354

NAIR, B, S. WAHEED, J. SZYMONIFKA, J. D. SHAUGHNESSY JR, J. CROWLEY a B. BARLOGIE, 2009. Immunoglobulin isotypes in multiple myeloma: laboratory correlates and prognostic implications in total therapy protocols. *British Journal of Haematology*. **145**(1), 134-137. ISSN 00071048.

NOEL, P. a R. A. KYLE, 1987. Plasma cell leukemia: an evaluation of response to therapy. *The American Journal of Medicine*. **83**(6), 1062-8.

PAIVA, B., M. CHANDIA, M.-B. VIDRIALES, et al., 2014. Multiparameter flow cytometry for staging of solitary bone plasmacytoma: new criteria for risk of progression to myeloma. *Blood*. **124**(8), 1300-1303. ISSN 00064971.

PEREZ-PERSONA, E., M.-B. VIDRIALES, G. MATEO, et al., 2007. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. **110**(7), 2586-2592. ISSN 00064971.

PIKA, T., P. LOCHMAN, J. MINAŘÍK, J. BAČOVSKÝ a V. ŠČUDLA, 2012. Úskalí interpretace výsledků společné analýzy hladin volných lehkých řetězců a elektroforézy séra. *Klinická biochemie a metabolismus*. **20**(41), No.2, 59-62.

PRATT, G., G. P. MEAD, K. R. GODFREY, Y. HU, N. D. EVANS, M. J. CHAPPELL, R. LOVELL a A. R. BRADWELL, 2009. The tumor kinetics of multiple myeloma following autologous stem cell transplantation as assessed by measuring serum-free light chains. *Leukemia & Lymphoma*. **47**(1), 21-28. ISSN 10428194.

RAJKUMAR, S V., M. A DIMOPOULOS, A. PALUMBO, et al., 2014. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*. **15**(12), e538-e548. ISSN 14702045.

RAJKUMAR, S. V., 2005. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. **106**(3), 812-817. ISSN 00064971.

RAJKUMAR, S. V. a S. R. HAYMAN, 2011. Monoclonal gammopathy of undetermined significance, smoldering multiple myeloma, and multiple myeloma. In: *Management of hematologic malignancies*. Cambridge: Cambridge University Press, 155-183, s. **160**. ISBN 978-0-521-89640-5.

- RAJKUMAR, S. V., G. MERLINI a J. F. SAN MIGUEL, 2012a. Haematological cancer: Redefining myeloma. *Nature Reviews Clinical Oncology*. **9**(9), 494-496.
- RAJKUMAR, S. V., 2012b. Preventive strategies in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *American Journal of Hematology*. **87**(5), 453-454. ISSN 03618609.
- RAJKUMAR, S. V., 2016. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*. **91**(7), 719-734. ISSN 03618609.
- RAJKUMAR, S. V. a R. A. KYLE, 2005. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. **80**(10), 1371-1382. ISSN 00256196.
- RAJKUMAR, S. V., R. A. KYLE a Francis K. BUADI, 2010. Advances in the Diagnosis, Classification, Risk Stratification, and Management of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance: Implications for Recategorizing Disease Entities in the Presence of Evolving Scientific Evidence. *Mayo Clinic Proceedings*. **85**(10), 945-948. ISSN 00256196.
- RAJKUMAR, S. V. a R. A. KYLE, 2009. *Treatment of multiple myeloma and related disorders*. New York: Cambridge University Press. ISBN 9780521515030.
- RAMSINGH, G., P. MEHAN, J. LUO, Ravi VIJ a Daniel MORGENSZTERN, 2009. Primary plasma cell leukemia. *Cancer*. **115**(24), 5734-5739. ISSN 0008543.
- ROODMAN, G. D., 2009. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. **109**(2), 283-291 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1002/jcb.22403. ISSN 07302312. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.22403>
- ROSIÑOL, L., J. BLADÉ, J. ESTEVE, et al., 2003. Smoldering multiple myeloma: natural history and recognition of an evolving type. *British Journal of Haematology*. **123**(4), 631-636. ISSN 00071048.
- ROSIÑOL, L., M. T. CIBEIRA, S. MONTOTO, M. ROZMAN, J. ESTEVE, X. FILELLA a J. BLADÉ, 2007. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance: Predictors of Malignant Transformation and Recognition of an Evolving Type Characterized by a Progressive Increase in M Protein Size. *Mayo Clinic Proceedings*. **82**(4), 428-434. ISSN 00256196.
- SANDERS, P W a B B BOOKER, 1992. Pathobiology of cast nephropathy from human Bence Jones proteins. *Journal of Clinical Investigation*. **89**(2), 630-639. ISSN 00219738.
- SANDERS, P W, B B BOOKER, J B BISHOP a H C CHEUNG, 1990. Mechanisms of intranephronal proteinaceous cast formation by low molecular weight proteins. *Journal of Clinical Investigation*. **85**(2), 570-576. ISSN 00219738.

SCHUSTER, S. R., S. V. RAJKUMAR, A. DISPENZIERI, W. MORICE, A. M. ASPITIA, S. ANSELL, R. KYLE a J. MIKHAEL, 2010. IgM multiple myeloma: Disease definition, prognosis, and differentiation from Waldenstrom's macroglobulinemia. *American Journal of Hematology*. **85**(11), 853-855. ISSN 03618609.

SMADJA, N. V., C. FRUCHART, F. ISNARD, et al., 1998. Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia*. **12**(6), 260-269.

ŠČUDLA, Vlastimil. Současné možnosti léčby mnohočetného myelomu. *Remedia*. 2009, č. 6. [cit. 13.3.2017] Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Hematologie/Soucasne-moznosti-lecby-mnohocetneho-myelomu/8-15-NE.magarticle.aspx>

TATE, J., P. MOLLEE a D. GILL, 2005. Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. **128**(3), 405-406. ISSN 00071048.

TE VELTHUIS, H., I. KNOP, P. STAMP, et al., 2011. N Latex FLC - new monoclonal high-performance assays for the determination of free light chain kappa and lambda. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. **49**(8), 1323-1332.

The International Myeloma Working Group, 2003 Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology*. **121**(5), 749-757. ISSN 00071048.

TIAN, E., F. ZHAN, R. WALKER, E.RASMUSSEN, Y. MA, B. BARLOGIE a J. D. SHAUGHNESSY, 2003. The Role of the Wnt-Signaling Antagonist DKK1 in the Development of Osteolytic Lesions in Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. **349**(26), 2483-2494. ISSN 00284793.

TIEDEMANN, R E, N GONZALEZ-PAZ, R A KYLE, et al., 2008. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia*. **22**(5), 1044-1052. ISSN 08876924.

TICHÝ, M. a V. MAISNAR, 2006. Laboratorní průkaz monoklonálních imunoglobulinů. *Vnitřní lékařství*. **20**(S2), 41-45.

TRICOT, G., D. H. VESOLE, S. JAGANNATH, J. HILTON, N. MUNSHI a B. BARLOGIE, 1996. Graft-versus-myeloma effect: proof of principle. *Blood*. **87**(3), 1196-1198.

WALDENSTRÖM, J., 1960–1961. Studies on conditions associated with disturbed gamma globulin formation (gammopathies). Harvey Lecture Series, 56, 211–231.

WARSAME, R., M. A. GERTZ, M. Q. LACY, et al., 2012. Trends and outcomes of modern staging of solitary plasmacytoma of bone. *American Journal of Hematology*. **87**(7), 647-651. ISSN 03618609.

7. Internetové zdroje obrázků

- [1] <http://www.myelomapennstate.net/Contents/08a-BoneDis-Eval.htm>
- [2] <https://imagebank.hematology.org/image/2674/rouleaux-formation--2?type=upload>
- [3] <http://www.immunologyclinic.com/figure.asp?chap=09&fig=84-92a>