

Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

III. interní klinika

**Hodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců
imunoglobulinu u mnohočetného myelomu
a jejich vztahu k vybraným klinicko-laboratorním
ukazatelům nemoci**

MUDr. Tomáš Pika

Doktorandská disertační práce

Olomouc 2011

Prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem disertační práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl veškerou použitou literaturu i jiné prameny.

V Olomouci, dne 30.5.2011

.....

MUDr. Tomáš Pika

Specifikace podílu autora

Student doktorského studijního programu MUDr. Tomáš Pika je autorem předkládané disertační práce. Práce zahrnovala sestavení analyzovaných souborů nemocných, sběr a třídění potřebných dat, publikační výstupy, přednáškovou činnost a sepsání disertačního spisu.

Statistická analýza včetně části grafického zpracování dat byla provedena Mgr. Janou Zapletalovou z Ústavu lékařské biofyziky, Lékařské Fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Analýzy vybraných zmiňovaných laboratorních parametrů byly provedeny na Oddělení klinické biochemie a imunogenetiky a Ústavu imunologie Fakultní Nemocnice v Olomouci.

Definitivní grafická úprava disertačního spisu byla provedena p. Michalem Slánským.

Část práce vznikla s podporou grantového projektu NR 9500-3, VVZ MSM 619895205 a grantu Vnitřní grantové agentury Univerzity Palackého LF 2010013.

.....
MUDr. Tomáš Pika

.....
Prof. MUDr. Vlastimil Ščudla, CSc.

Poděkování

Je mou povinností poděkovat především prof. MUDr. Vlastimilu Ščudlovi, CSc., přednostovi III. interní kliniky a zároveň mému školiteli, excelentnímu internistovi, za uvedení do problematiky monoklonálních gamapatií, jeho vedení během doktorandského studia a při zpracování disertační práce, ale zejména za trpělivé a důsledné vedení během prvních let praxe lékaře interní kliniky, čehož si vážím nejvíce.

Za pomoc rovněž děkuji kolegům hematologického oddělení III. interní kliniky doc. MUDr. Jaroslavu Bačovskému, CSc. a MUDr. Jiřímu Minaříkovi, Ph.D..

Za provedení statistické analýzy děkuji Mgr. Janě Zapletalové z Ústavu lékařské biofyziky, Lékařské Fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Za finální úpravu textu disertační práce děkuji p. Michalu Slánskému.

Část práce vznikla s podporou grantového projektu NR 9500-3, VVZ MSM 619895205 a grantu Vnitřní grantové agentury Univerzity Palackého LF 2010013.

Své ženě Kateřině děkuji za nekončící podporu a trpělivost.

Tomáš Pika

Obsah

1.0 Předmluva

2.0 Přehled použitých zkratk a symbolů

3.0 Souhrn

3.1 Souhrn dizertační práce

3.2 Přehled klíčových slov

3.3 Seznam tabulek

3.4 Seznam grafů

4.0 Cíle disertační práce

5.0 Úvod do řešené problematiky

5.1 Charakteristika mnohočetného myelomu

5.2 Diagnostická kritéria mnohočetného myelomu

5.3 Stážovací systémy mnohočetného myelomu

5.4 Laboratorní vyšetření u mnohočetného myelomu

5.4.1 Základní hematologická vyšetření

5.4.2 Základní biochemická vyšetření

5.4.3 Analýza imunoglobulinů

5.4.4 Ostatní biochemická vyšetření

5.5 Vyšetření kostní dřeně u mnohočetného myelomu

5.5.1 Cytologické, histologické a imunohistochemické vyšetření kostní dřeně

5.5.2 Vyšetření kostní dřeně průtokovou cytometrií

5.5.3 Cytogenetické vyšetření

5.6 Zobrazovací vyšetření u mnohočetného myelomu

5.6.1 Radiografické vyšetření skeletu

5.6.2 Vyšetření počítačovou tomografií

5.6.3 Vyšetření magnetickou rezonancí

5.6.4 ^{99m}Tc -MIBI scintigrafie

5.6.5 FDG-PET/CT vyšetření

5.7 Léčba mnohočetného myelomu

5.7.1 Vysokodávkovaná chemoterapie s podporou autologního štěpu

5.7.2 Alogenní transplantace krvetvorných buněk

5.7.3 Thalidomid

5.7.4 Bortezomib

- 5.7.5 Lenalidomid
- 5.7.6 Terapie nemocných s renálním postižením
- 5.7.7 Podpůrná terapie u mnohočetného myelomu
- 5.8 Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu
 - 5.8.1 Struktura, syntéza a metabolismus volných lehkých řetězců
 - 5.8.2 Metody stanovení hladin volných lehkých řetězců
 - 5.8.3 Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců, normální rozmezí
 - 5.8.4 Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců ve FN Olomouc
- 5.9 Stanovení izotypových párů lehkých/těžkých řetězců imunoglobulinu

6.0 Vlastní studie

- 6.1 Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonální gamapatie nejistého významu – význam pro stratifikaci a optimální sledování
- 6.2 Sérové hladiny volných lehkých řetězců u mnohočetného myelomu
 - 6.2.1 Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u mnohočetného myelomu
 - 6.2.2 Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u nesekretorické formy mnohočetného myelomu
 - 6.2.3 Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u Bence-Jonesovy formy mnohočetného myelomu
 - 6.2.4 Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u IgD mnohočetného myelomu
 - 6.2.5 Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u oligosekreční formy mnohočetného myelomu
- 6.3 Přínos sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu v diferenciální diagnostice monoklonální gamapatie nejistého významu a mnohočetného myelomu
- 6.4 Vztah sérových hladin volných lehkých řetězců ke stupni pokročilosti mnohočetného myelomu
- 6.5 Vztah sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu a vybraných biologických ukazatelů mnohočetného myelomu
- 6.6 Prognostický význam sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu u mnohočetného myelomu
- 6.7 Stanovení sérových hladin párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonálních gamapatií

7.0 Závěry dizertační práce

8.0 Literatura

9.0 Přehled publikační a přednáškové činnosti

9.1 Práce související s tématem dizertační práce

9.1.1 Původní práce – 1. autor

9.1.2 Původní práce – spoluautor

9.1.3 Přednášky a postery – sborníky a abstrakta v časopisech

9.1.4 Přednášky a postery – sborníky a abstrakta mimo časopisy

9.2 Přehled další publikační a přednáškové činnosti – 1. autor

9.2.1 Původní práce

9.2.2 Přednášky a postery – sborníky a abstrakta v časopisech

9.3 Citace u jiných autorů

9.4 Původní práce v časopise s IF - spoluautor

10.0 Anglický název práce, klíčová slova, souhrn

1.0 Předmluva

Mnohočetný myelom patří mezi nejčastější zhoubná onemocnění krvetvorné tkáně a jedním z jeho hlavních charakteristik je produkce monoklonálního imunoglobulinu. Kromě kompletních molekul imunoglobulinu produkují klonální nádorové plazmocyty rovněž variabilní množství volných lehkých řetězců, které nejsou vázány v molekulách imunoglobulinu. Nové možnosti stanovení volných lehkých řetězců se v posledních letech staly předmětem zájmu čelních hematologických pracovišť pro svůj evidentní přínos pro běžnou klinickou praxi, nejen v péči o nemocné s mnohočetným myelomem, ale i s dalšími monoklonálními gamapatiemi. Vzhledem k tomu, že problematika monoklonálních gamapatií patří mezi základní obory III. interní kliniky, je tato práce věnována zhodnocení klinického přínosu stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců právě u nemocných s mnohočetným myelomem a u jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu. Nutno uvést, že problematice volných lehkých řetězců byla na našem pracovišti věnována soustředěná pozornost a z pohledu České republiky byla spojena i s prvními přednáškovými a publikačními prezentacemi, a to i sděleními shrnujícími dílčí výstupy vzniklé v rámci předloženého disertačního spisu. Je potěšující s jakou rychlostí našla problematika vyšetřování volných lehkých řetězců praktické uplatnění a stala se v současnosti přirozenou součástí běžné klinické praxe.

2.0 Přehled použitých zkratk a symbolů

^{99m}Tc -MIBI	scintigrafie s využitím metoxyizobutylyzonitridu značeného ^{99m}Tc Techneciem
AL amyloidóza	amyloidóza způsobená amyloidem z lehkých řetězců imunoglobulinu
Allo-SCT	transplantace alogenních kmenových buněk
ASCT	transplantace autologních kmenových buněk
ASO-PCR	polymerázová řetězová reakce s užitím specifických oligonukleotidů
$\beta_2\text{m}$	β_2 – mikroglobulin
bALP	kostní frakce alkalické fosfatázy
B-J bílkovina	Bence-Jonesova bílkovina
BJ-MM	Bence – Jonesova forma mnohočetného myelomu
B-J urie	odpad Bence – Jonesovy bílkoviny v moči
CAD	chemoterapie: Cyklofosfamid, Adriablastin, Dexametazon
CR	kompletní remise
CRAB	hyperkalcémie, renální nedostatečnost, anémie, kostní postižení
CT	počítačová tomografie
CTD	chemoterapie: Cyklofosfamid, Thalidomid, Dexametazon
D-S	stážovací systém dle Durieho-Salmona
D-S plus	stážovací systém Durie-Salmon plus
Fas	Fas antigen
FC	průtoková cytometrie

FDG-PET/CT	pozitronová emisní tomografie kombinovaná s počítačovou tomografií využívající 2-[¹⁸ F]-fluoro-2-deoxy-d-glukózu
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FW	sedimentace erytrocytů
GEP	genový expresní profil
HD-T/ASCT	vysokodávkovaná terapie s podporou autologních kmenových buněk
HGF	hepatocytární růstový faktor
HLC	těžký/lehký řetězec imunoglobulinu
ICAM	intercellular adhesive molecule-1
ICTP	telopeptid kolagenu typu I
IFE	imunofixační elektroforéza
IgG, A, M, D, E	imunoglobulin G, A, M, D, E
IL-6R	receptor pro interleukin-6
IMWG	„International Myeloma Working Group“
ISS	„International Staging System“
KT	konvenční terapie
LCE	„light-chain escape“ fenomén
LŘ	lehké řetězce imunoglobulinu
MG	monoklonální gamapatie
MGUS	monoklonální gamapatie nejistého významu
MIG	monoklonální imunoglobulin
MM	mnohočetný myelom
MP	chemoterapie: Melfalan, Prednizon

MPR	chemoterapie: Melfalan, Prednizon, Lenalidomid
M-protein	monoklonální imunoglobulin
MPT	chemoterapie: Melfalan, Prednizon, Thalidomid
MR	magnetická rezonance
NF-kappaB	nukleární faktor kappaB
NS	nesignifikantní
NSMM	nesekretorická forma mnohočetného myelomu
OPG	osteoprotegerin
PAD	chemoterapie: Bortezomib, Adriablastin, Dexametazon
PB	plazmatické buňky
PINP	N-terminal peptide procollagen-I
RAD	chemoterapie: Lenalidomid, Adriablastin, Dexametazon
RCD	chemoterapie: Lenalidomid, Cyklofosfamid, Dexametazon
RD	chemoterapie: Lenalidomid, Dexametazon
REA	radioenzymatická analýza
RIA	radioimunoanalýza
RIC	přípravný režim s redukovanou intenzitou
ROTI	„related organ or tissue impairment“
RTG	rentgenologické vyšetření
sCR	„stringentní“ kompletní remise
STIR	sekvence s potlačením tukové tkáně při vyšetření magnetickou rezonancí
S-VLŘ	volné lehké řetězce v séru

SWOG	„Southwest Oncology Group“
Syn-1	Syndecan-1/CD 138
TAD	chemoterapie: Thalidomid, Adriablastin, Dexametazon
T-CED	chemoterapie: Thalidomid, Cyklofosfamid, Etoposid, Dexametazon
TK	thymidinkináza
TRAP	tartarát-rezistentní kyselá fosfatáza
VAD	chemoterapie: Vinkristin, Adriablastin, Dexametazon
VBMCP	chemoterapie: Vinkristin, BCNU (CCNU), Melfalan, Cyklofosfamid, Prednizon
VCAM	vaskular cell adhesive molecule-1
VCD	chemoterapie: Bortezomib, Cyklofosfamid, Dexametazon
VD	chemoterapie: Bortezomib, Dexametazon
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VGPR	velmi dobrá parciální remise
VLŘ	volné lehké řetězce imunoglobulinu
VMP	chemoterapie: Bortezomib, Melfalan, Prednizon

3.0 Souhrn

3.1 Souhrn disertační práce

Předložená práce se zabývá problematikou stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců (VLŘ) imunoglobulinu κ a λ u monoklonální gamapatie nejistého významu (MGUS) a mnohočetného myelomu (MM). V teoretické části je podán stručný přehled současného stavu znalostí o epidemiologii, patogenezí, diagnostice a terapii MM, přičemž bližší pozornost je věnována možnostem stanovení monoklonálního imunoglobulinu. Vlastní disertační práce je rozdělena do 6 kapitol, které jsou věnovány zhodnocení klinického přínosu stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu a jejich vztahu k vybraným klinicko-laboratorním aspektům MGUS a MM a jedné kapitoly zabývající se pilotním vyšetřením sérových hladin párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonálních gamapatií.

V první kapitole věnované stanovení sérových hladin VLŘ u MGUS bylo vyšetřeno 191 jedinců s MGUS, přičemž patologické hladiny VLŘ a indexu klonality κ/λ byly zjištěny v 62 resp. 55,5% případů. Během šestiletého sledování došlo u 11 jedinců k transformaci v maligní formu monoklonální gamapatie, což odpovídá přibližně 0,95% případů za rok. S užitím stratifikačního systému pro MGUS, založeném na kvantitě, izotypu M-proteinu a hodnotě indexu κ/λ byly identifikovány rizikové skupiny jedinců s MGUS, přičemž právě míra zaznamenané transformace odpovídala tíži rizika. Vývoj MGUS v MM byl spojen s nárůstem hladin volných lehkých řetězců a zejména s nárůstem míry patologie indexu κ/λ . Práce tedy potvrdila význam stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců u MGUS a zejména pak jejich přínos pro identifikaci rizikových forem s určením optimálního sledování.

V kapitole věnované stanovení sérových hladin VLŘ u MM, byla v souboru 261 nemocných zjištěna patologie hladin VLŘ a indexu κ/λ v 96% případů, přičemž bylo prokázáno, že se jedná o parametr zcela nezávislý na hodnotě M-proteinu.. Byl potvrzen nenahraditelný přínos pro méně obvyklé formy MM jako je nesekretorický či oligosekretorický typ a IgD typ. Kapitola se zčásti věnuje i problematice „light-chain escape“ fenoménu.

V třetí kapitole zaměřené na srovnání sérových hladin VLŘ a κ/λ indexu u monoklonální gamapatie nejistého významu byly zjištěny vysoce signifikantní rozdíly v hladinách dominantního lehkého řetězce i indexu κ/λ , ale rovněž i ve významné míře suprese řetězce alternativního svědčící o výrazné imunitní paréze u nemocných s mnohočetným myelomem.

Nicméně výsledky ukázaly, že stanovení hladin VLŘ s výpočtem indexu klonality, lze použít jako pomocného ukazatele v rámci ostatních parametrů k odlišení MM od MGUS, přičemž v případě normálních hladin je diagnóza MM nepravděpodobná, nicméně vzhledem k významnému vzájemnému překrývání hodnot k odlišení MGUS od MM rozhodující mírou nepřispívá.

V další kapitole věnované analýze sérových hladin VLŘ a κ/λ indexu ve vztahu ke stádiu pokročilosti MM definovanými dle stážovacích systému dle Durieho-Salmona a International Staging System nebyl zjištěn významnější rozdíl v jejich hladinách. Bylo potvrzeno, že hladiny VLŘ jsou poměrně nezávislý parametr, daný zejména jejich variabilní mírou sekrece a rychlým katabolismem a mohou tedy být užity jako doplňující parametr stážovacích systémů.

V páté kapitole věnované analýze vztahů sérových hladin VLŘ a κ/λ indexu, byly zjištěny vzájemné závislosti s hladinami β_2 mikroglobulinu, thymidinkinázy, parametrů kostního metabolismu, hepatocytárního růstového faktoru, Syndecanu-1 a Fas antigenu. Z dosažených výsledků ale vyplývá, že vztah většiny biologických, námi vyšetřených působků k sérovým hladinám VLŘ κ a λ a jejich vzájemného poměru, přispívá především k hlubšímu poznání patobiologie MM a nemá významější přínos pro klinickou praxi.

V kapitole věnované prognostickému vlivu VLŘ na přežití nemocných s MM byl předběžnou analýzou potvrzen vztah míry patologie indexu κ/λ a délky přežití u léčených pacientů se symptomatickým onemocněním. Při detailní analýze souboru však bylo zjištěno, že tento prognostický vliv platí pouze pro nemocné léčené konvenční terapií, včetně začlenění nových, biologicky působících léků. U nemocných léčených vysokodávkovanou terapií s podporou autologního štěpu tento trend zachycen nebyl a dá se říci, že intenzivní terapie stírá prognostický význam indexu klonality κ/λ a u takto léčených nemocných je nutné hledání a identifikace nových, vhodných prognostických ukazatelů.

V poslední kapitole věnované stanovení hladin párů lehkých/těžkých řetězců (HLC) imunoglobulinu metodou HevyLiteTM, iniciální analýza na doposud početně limitovaném souboru nemocných s MGUS a MM typu IgA a IgG potvrdila vztah HLC k aktivitě onemocnění, byly prokázány silné korelace hodnot HLC k hladinám M-proteinu stanovených elektroforézou séra a k hladinám celkového IgG resp. IgA stanoveného nefelometricky. Jako velmi přínosné se jeví výsledky stanovení u nemocných s dosaženou léčebnou odpovědí, umožňující detailní stanovení velmi nízkých hladin MIG.

3.2 Přehled klíčových slov

mnohočetný myelom – monoklonální gamapatie nejistého významu – monoklonální gamapatie – volné lehké řetězce imunoglobulinu – diagnóza - stážovací systémy – biologické ukazatele – prognóza – páry těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu

3.3 Seznam tabulek

- Tab. 1. SWOG kritéria mnohočetného myelomu
- Tab. 2. IMWG kritéria symptomatického mnohočetného myelomu
- Tab. 3. IMWG kritéria monoklonální gamapatie nejistého významu
- Tab. 4. IMWG kritéria asymptomatické formy mnohočetného myelomu
- Tab. 5. Stážovací systém dle Durieho-Salmona
- Tab. 6. Stážovací systém ISS (International Staging System)
- Tab. 7. Referenční intervaly systému FreeLite™
- Tab. 8. Stratifikační model pro MGUS
- Tab. 9. Rozdělení souboru jedinců s MGUS (n=191) podle stratifikačního systému dle Rajkumara a počet transformujících pacientů během 6 let
- Tab. 10. Popisné charakteristiky sledovaného souboru nemocných s mnohočetným myelomem.
- Tab. 11. Vzájemná nezávislost sérových hladin volných lehkých řetězců a monoklonálního imunoglobulinu.
- Tab. 12. Sérové hladiny volných lehkých řetězců u nemocných s nesekretorickou formou mnohočetného myelomu v době diagnózy nemoci.
- Tab. 13. Sérové hladiny volných lehkých řetězců u nemocných s IgD formou myelomu.
- Tab. 14. Skupina „kappa“: mediány a rozmezí sérových hladin volných lehkých řetězců a indexu κ/λ v porovnávaných skupinách.
- Tab. 15. Skupina „lambda“: mediány a rozmezí sérových hladin volných lehkých

řetězců a indexu κ/λ v porovnávaných skupinách.

- Tab. 16. Skupina „kappa“: mediány a rozmezí sérových hladin volných lehkých řetězců a indexu κ/λ u jednotlivých porovnávaných stádií stážovacích systémů D-S a ISS.
- Tab. 17. Skupina „lambda“: mediány a rozmezí sérových hladin volných lehkých řetězců a indexu κ/λ u jednotlivých porovnávaných stádií stážovacích systémů D-S a ISS.
- Tab. 18. Skupina „kappa“: porovnání sérových hladin VLŘ κ , λ a κ/λ indexu mezi stádii stážovacích systémů D-S a ISS.
- Tab. 19. Skupina „lambda“: porovnání sérových hladin VLŘ κ , λ a κ/λ indexu mezi stádii stážovacích systémů D-S a ISS.
- Tab. 20. Skupina „kappa“: vztah sérových hladin VLŘ a vybraných biologických ukazatelů mnohočetného myelomu.
- Tab. 21. Skupina „lambda“: vztah sérových hladin VLŘ a vybraných biologických ukazatelů mnohočetného myelomu.
- Tab. 22. Popisné charakteristiky souboru nemocných se symptomatickým mnohočetným myelomem.

3.4 Seznam grafů

- Graf 1. Sérové hladiny volných lehkých řetězců u monoklonální gamapatie nejistého významu (MGUS).
- Graf 2. Nárůst hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu κ resp. λ u 10 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu v průběhu transformace v mnohočetný myelom.
- Graf 3. Nárůst resp. prohloubení indexu κ/λ volných lehkých řetězců imunoglobulinu u 10 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu během transformace v mnohočetný myelom.
- Graf 4. Sérové hladiny volných lehkých řetězců u mnohočetného myelomu (MM).
- Graf 5. Sérové hladiny volných lehkých řetězců κ a hodnoty κ/λ indexu u izotypů mnohočetného myelomu – skupina „kappa“.
- Graf 6. Sérové hladiny volných lehkých řetězců λ a hodnoty κ/λ indexu u izotypů mnohočetného myelomu – skupina „lambda“.
- Graf 7. Průběh mnohočetného myelomu IgA kappa, III-A, s progresí formou parciálního „light-chain escape“ fenoménu, srovnání hladiny paraproteinu IgA kappa a volných lehkých řetězců κ .
- Graf 8. Průběh onemocnění hodnocený pomocí hladin volných lehkých řetězců κ a indexu κ/λ : Nesekretorický myelom (podle konvenčních kritérií), kappa free, léčený vysokodávkovanou terapií s podporou autologního štěpu s následným dosažením kompletní remise.

- Graf 9. Mnohočetný myelom B-J lambda, II-A, vztah sérových hladin volných lehkých řetězců λ , B-J urie a indexu κ/λ během indukční chemoterapie VAD.
- Graf 10. Srovnání sérových hladin volných lehkých řetězců κ a κ/λ indexu u jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS) a pacientů s mnohočetným myelomem (MM) – skupina „kappa“.
- Graf 11. Srovnání sérových hladin volných lehkých řetězců κ , λ a κ/λ indexu u jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS) a iniciálními stádii mnohočetného myelomu dle Durieho-Salmona (DS) a International Staging System (IPI) – skupina „kappa“.
- Graf 12. Srovnání sérových hladin volných lehkých řetězců κ , λ a κ/λ indexu u jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS) a iniciálními stádii mnohočetného myelomu dle Durieho-Salmona (DS) a International Staging System (IPI) – skupina „lambda“.
- Graf 13. Srovnání sérových hladin volných lehkých řetězců κ , λ a κ/λ indexu mezi stádii stážovacího systému dle Durieho – Salmona (D-S) – skupina „kappa“.
- Graf 14. Srovnání sérových hladin volných lehkých řetězců λ a κ/λ indexu mezi podstádii A a B stážovacího systému dle Durieho – Salmona – skupina „lambda“.
- Graf 15. Srovnání sérových hladin volných lehkých řetězců λ a κ/λ indexu mezi stádii stážovacího systému International Staging System (IPI) – skupina „lambda“.
- Graf 16. Skupina „kappa“: vztah sérových hladin VLŘ κ a β_2m , ICTP a sHGF.
- Graf 17. Skupina „kappa“: vztah hodnot indexu κ/λ a β_2m , ICTP a sHGF.

- Graf 18. Skupina „lambda“: vztah sérových hladin VLŘ λ a β_2m , ICTP a sHGF.
- Graf 19. Skupina „lambda“: vztah hodnot indexu κ/λ a β_2m , ICTP a sHGF.
- Graf 20. Prognostický význam indexu κ/λ s diskriminačními hodnotami $\langle 0,02;3,6 \rangle$ vs. $\langle 0;0,02 \rangle$ a $(\geq 3,6)$ ve skupině nemocných se symptomatickým myelomem, léčených konvenční terapií či vysokodávkovanou terapií s autologní transplantací.
- Graf 21. Prognostický význam indexu κ/λ s diskriminačními hodnotami $\langle 0,03;32 \rangle$ vs. $\langle 0;0,03 \rangle$ a (≥ 32) ve skupině nemocných se symptomatickým myelomem, léčených konvenční terapií či vysokodávkovanou terapií s autologní transplantací.
- Graf 22. HevyLite™ vyšetření u 24 nemocných s IgA mnohočetným myelomem (MM) a 7 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS).
- Graf 23. HevyLite™ vyšetření u 30 nemocných s IgG mnohočetným myelomem (MM) a 1 jedince s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS).
- Graf 24. Spearmanova korelace hladin M-proteinu a IgA κ resp. IgA λ stanovených metodou HevyLite™; korelace sumace IgA κ a IgA λ s celkovými hladinami IgA.
- Graf 25. Spearmanova korelace hladin M-proteinu a IgG κ resp. IgG λ stanovených metodou HevyLite™; korelace sumace IgG κ a IgG λ s celkovými hladinami IgG.

4.0 Cíle disertační práce

4.1 Zhodnocení přínosu stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců

imunoglobulinu u mnohočetného myelomu a monoklonální gamapatie nejistého významu

- 4.1.1 Zhodnocení vyšetření sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu v souboru jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu a posouzení jejich přínosu pro rizikovou stratifikaci
- 4.1.2 Zhodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu u nemocných s mnohočetným myelomem a jejich přínos u jednotlivých typů choroby
- 4.1.3 Posouzení možného přínosu stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu v diferenciální diagnostice monoklonální gamapatie nejistého významu a mnohočetného myelomu
- 4.1.4 Posouzení vztahu sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu ke stupni pokročilosti mnohočetného myelomu
- 4.1.5 Zhodnocení vztahu sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu a vybraných biologických ukazatelů mnohočetného myelomu
- 4.1.6 Posouzení prognostického významu sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu u symptomatického mnohočetného myelomu

4.2 Zavedení stanovení sérových hladin párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonálních gamapatií a provedení pilotní analýzy získaných výsledků

5.0 Úvod do řešené problematiky

5.1 Charakteristika mnohočetného myelomu

Mnohočetný myelom (MM) je zhoubné hematologické onemocnění charakterizované klonální proliferací a akumulací neoplasticky transformovaných elementů terminální fáze diferenciace B-lymfocytů v kostní dřeni, s produkcí monoklonálního imunoglobulinu (MIG), detekovatelného v séru a/nebo v moči a provázeným orgánovým postižením definovaným zkratkou CRAB (hyperkalcémie, renální nedostatečnost, anémie a kostní postižení). Samotný celkový klinický obraz nemoci, tedy manifestace, průběh, odpověď na terapii a možné komplikace, je velmi rozdílný, daný zejména vlastními charakteristikami nádorového klonu, neméně důležitou roli však hraje i včasnost stanovení diagnózy s brzkým zahájením adekvátní terapie a samozřejmě i charakteristiky samotného nemocného (1,2,3,4,5).

Incidence onemocnění je 4-5 nových případů na 100 tisíc obyvatel za rok a po skupině non-hodginských lymfomů představuje druhou nejčastější hematologickou malignitu. MM je typickým onemocněním starší populace s mediánem ~ 66 let s lehkou predominancí mužské populace (M:Ž = 1,1:1) (4,6). Doposud nebyla vysledována spojitost s infekčním či jiným etiologickým agens a taktéž nebyla identifikována specifická změna karyotypu, jako je tomu u některých jiných zhoubných onemocnění krvevorného systému (7). Dědičný výskyt, až na ojedinělá kazuistická sdělení nebyl pozorován, otázka častějšího výskytu monoklonální gamapatie je v současnosti předmětem speciálního výzkumu (8).

Prvotní proces rozvoje nemoci je charakterizován vývojem monoklonální gamapatie nejistého významu (MGUS), což je prekurzorová léze předcházející MM (9). Její vznik je iniciován mutacemi paměťových B-lymfocytů a plazmoblastů v oblastech zárodečných center lymfatických folikulů, zřejmě jako následek antigenní stimulace a následné aktivaci a abnormální exprese Toll-like receptorů a/nebo nadměrné exprese receptorů pro interleukin-6 (IL-6R). Následné IL-6-dependentní impulzy se podílejí na vzniku dalších cytogenetických změn, charakteristických pro premaligní fázi MGUS. U přibližně 50% případů MGUS se jedná o změny zahrnující IgH lokus na chromozomu 14 definující těžké řetězce imunoglobulinu. Ve zbývajících případech se většinou jedná o hyperdiploidní změny. Následně vzniklé cytogenetické změny jako např. změny mutace Ras a myc onkogenů, sekundární translokace, p53 mutace a mnoho dalších, mají přímý vliv na transformaci MGUS

do mnohočetného myelomu. Poté jsou plazmocyty, jako cirkulující klonální myelomové prekurzory uvolňovány do periferní krve a jejich zachycováním dominantně v kostní dřeni, dochází k disseminaci nemoci. Samotné zachycování myelomových prekurzorů v kostní dřeni je dáno interakcí cytoadhezivních molekul na povrchu myelomových buněk a elementů stromatu a extracelulární matrix kostní dřeně. Za působení celé řady proliferačních a aktivačních stimulů, para- i autokrinních dochází následně k další proliferaci a diferenciaci nádorového klonu. Samotná cytokinová síť mikroprostředí kostní dřeně ve vztahu k myelomové populaci je charakterizována nesmírně složitou plejádou mezibuněčných a cytokinových interakcí, která má kromě samotného vlivu na nádorovou populaci i aktivační a diferenciací vliv pro populace osteoklastů, jež má za následek vystupňovanou kostní resorpci (4, 10, 11, 12, 13).

5.2 Diagnostická kritéria mnohočetného myelomu

Páteří stanovení diagnózy mnohočetného myelomu byla jasně definovaná diagnostická kritéria sestavená skupinou SWOG (South-West Oncology Group) a v současnosti skupinou IMWG (International Myeloma Working Group) jednoznačně definující onemocnění shrnutím všech základních, charakterizujících aspektů nemoci: infiltraci kostní dřenež monoklonálními plazmocytami, produkci monoklonálního imunoglobulinu a/nebo jeho strukturálních komponent detekovatelných v séru či moči a navozené specifické orgánové postižení, zejména v různé míře vyjádřené osteolytické postižení skeletu (14, 15). SWOG i IMWG kritéria jsou shrnuta v Tab. 1 a 2.

Častým, v mnohých případech komplikovaným a složitým úkolem je rozpoznání premaligní či potenciálně maligní tzv. monoklonální gamapatie nejistého významu (MGUS) od asymptomatické či symptomatické fáze mnohočetného myelomu (15,16,17,18). Proto i pro tuto diagnózu byla vypracována specifická kritéria shrnutá v Tab. 3. Ve většině sporných případů hraje rozhodující roli právě přítomnost osteolytického postižení skeletu, proto při negativitě konvenční radiografie skeletu je nutno v hraničních situacích využít vyšetření počítačovou tomografií (CT), lépe však citlivější magnetickou rezonancí (MR) a výběrově i fúzní vyšetření pomocí celotělového CT v kombinaci s pozitronovou emisní tomografií (FDG-PET/CT). Tyto nové zobrazovací metody jsou citlivější a přesnější zejména v přítomnosti kompresivních fraktur obratlových těl, extramedulárního postižení a zejména ve velmi časném stádiu kostního postižení, a FDG-PET/CT vyšetření má navíc potenciál posouzení aktivity myelomového procesu.

Definice samotné asymptomatické, dříve také zvané doutnající/dřímající fáze mnohočetného myelomu bývá v některých případech velmi obtížná a opírá se zejména o absenci specifického orgánového postižení – tedy hyperkalcémie, anémie, renálního a kostního postižení (15,16,18,19). Definice asymptomatické formy myelomu je shrnuta v Tab. 4. V případě iniciální/asymptomatické formy myelomu se v běžné klinické praxi volí terapeutická strategie „watch and wait“ s pravidelnými kontrolami klinického a laboratorního stavu, přibližně v intervalu 3 až 6-ti měsíců. Preventivní terapie, zejména u rizikových forem, sloužící k oddálení progresu či vzniku orgánových komplikací je zatím rezervována pouze pro klinické studie s použitím minimálně toxické, zejména biologické terapie (19). Zahájení

chemoterapie se v iničiální/asymptomatické fázi MM neosvědčilo, neboť nevedlo k prodloužení celkového přežití.

Tab. 1. SWOG kritéria mnohočetného myelomu (14)

Velká kritéria:

1. Histologicky verifikovaný plazmocytom
2. Plazmocytóza kostní dřeně > 30%
3. Monoklonální imunoglobulin v koncentraci
 - IgG > 35 g/l
 - IgA > 20 g/l
 - nebo odbyt Bence-Jonesovy bílkoviny v moči > 1g/24 hodin

Malá kritéria:

1. Plazmocytóza kostní dřeně 10-30%
2. Monoklonální imunoglobulin v koncentraci
 - IgG < 35 g/l
 - IgA < 20 g/l
3. Osteolytická ložiska skeletu
4. Suprese polyklonálních imunoglobulinů

Diagnóza MM je potvrzena při splnění alespoň 1 velkého a 1 malého kritéria.

Tab. 2. IMWG kritéria symptomatického mnohočetného myelomu (15,16)

1. Přítomnost klonálních plazmocytů v kostní dřeni $\geq 10\%$ nebo histologicky verifikovaný plazmocytom
2. Přítomnost monoklonálního imunoglobulinu v séru a/nebo v moči
3. Přítomnost specifického orgánového postižení – ROTI (Related Organ or Tissue Impairment):
 - Hyperkalcémie $> 2,75$ mmol/l nebo $0,25$ nad normální limit
 - Renální insuficience s hodnotou kreatininu > 173 $\mu\text{mol/l}$
 - Normochromní, normocytární anémie s hodnotou hemoglobinu < 100 g/l nebo 20 g/l pod dolní hranici normálního rozmezí
 - Osteolytické kostní léze nebo osteoporóza s kompresivními frakturami ev. další, s myelomem související postižení: symptomatická hyperviskozita, amyloidóza, opakující se epizody bakteriální infekce > 2 za 12 měsíců

Pro stanovení diagnózy symptomatického myelomu je nutné splnění všech 3 kritérií. Specifické orgánové postižení (ROTI) bývá často označováno zkratkou CRAB vyjadřující velkými písmeny zkratky hlavních postižených orgánových systémů: hyperkalcémie, renální insuficience, anémie a kostní postižení („bone disease“). Zvláštní, poměrně vzácnou formou mnohočetného myelomu je nesekretorická forma, vyznačující se absencí detekovatelné M-komponenty v séru a/nebo v moči při vyšetření s pomocí imunofixační elektroforézy. Pro splnění diagnostických kritérií u této formy je nezbytná přítomnost klonální plazmocytózy kostní dřene $\geq 10\%$ nebo histologicky verifikovaný plazmocytom, spolu s přítomností specifického orgánového postižení ROTI (15,16).

Tab. 3. IMWG kritéria monoklonální gamapatie nejistého významu (15,16)

1. Monoklonální imunoglobulin v séru v koncentraci < 30 g/l
2. Přítomnost klonálních plazmocytů v kostní dřeni $< 10\%$ a nízký stupeň infiltrace kostní dřene plazmocyty při histobiopstickém vyšetření při trepanobiopsii (pokud provedena)
3. Nepřítomnost jiné B-lymfoproliferativní choroby
4. Nepřítomnost specifického orgánového postižení – ROTI („CRAB“)

Tab. 4. IMWG kritéria asymptomatické formy mnohočetného myelomu (15,16)

1. Monoklonální imunoglobulin v séru v koncentraci ≥ 30 g/l a/nebo přítomnost klonálních plazmocytů v kostní dřeni $\geq 10\%$
2. Bez přítomnosti specifického orgánového postižení – ROTI („CRAB“)

5.3 Stážovací systémy mnohočetného myelomu

Kromě správné stanovení diagnózy MM dle IMWG diagnostických kritérií je neméně důležitou součástí algoritmu vyšetření mnohočetného myelomu zhodnocení stupně pokročilosti nemoci. Samotné určení stádia nemoci má nejen prognostický význam, ale je i klíčovým krokem určujícím zahájení a výběr adekvátní, v dnešní době individualizované chemo-imunoterapie a podpůrných léčebných metod (20). Nejznámější a doposud stále akceptovaný je tradiční stážovací systém dle Durieho- Salmona (D-S) (Tab. 5). Tento stážovací systém odráží nejen stupeň postižení daný nádorovou masou s ekvivalentní produkcí monoklonálního imunoglobulinu, ale do jisté míry reflektuje i stupeň asociovaného orgánového postižení - tíži anémie, přítomnost hyperkalcémie či renální nedostatečnosti, ale zejména i míru rozsahu kostního postižení (21). Kritérium kostního postižení je však mnohdy obtížně hodnotitelné a vyžaduje kvalitní, v dostatečném rozsahu provedené radiografické vyšetření axiálního skeletu spolu s dobrou erudiicí hodnotícího pracovníka. Radiografické vyšetření skeletu není ale zcela optimálním vyšetřením v iniciální/asymptomatické fázi MM, neboť pro svou nízkou senzitivitu vede k podhodnocení strukturálních změn skeletu. Není rovněž vhodné pro průběžné hodnocení vývoje MM, či restážování v době remise nebo nastupující progresse onemocnění tím, že nereflektuje okamžité změny v oblasti skeletu, probíhající ve vztahu k měnící se nádorové masě. Proto následné snahy o nalezení vhodného stážovacího systému vedly k vyřazení radiografického kritéria pro jeho malou pohotovost a nemalou radiační zátěž nemocného. V předchozích letech došlo ke vzniku dvou nových stážovacích systémů – Southwest Oncology Group (SWOG) a následně International Staging System (ISS), používající jako diskriminační kritéria sérové hodnoty β_2 -mikroglobulinu (β_2 -m) a albuminu. V současnosti byl jako všeobecně platný stratifikační systém MM přijat ISS systém, vhodný pro stratifikaci nemocných dle tíže nádorového postižení, s uspokoivým prognostickým potenciálem. V současnosti je ISS inkorporován do běžného algoritmu stratifikace mnohočetného myelomu (22, 23). Samotné hladiny β_2 -m a albuminu reflektují kinetiku a do jisté míry i metabolismus nádorové masy a ISS systém se proto jeví vhodným i pro opakované, průběžné hodnocení stupně nemoci a taktéž pro svou „jednoduchost“ jako mnohem vhodnější, než systém dle D-S (Tab. 6).

Tab. 5. Stážovací systém dle Durieho-Salmona (21)

Stádium	Kritéria
I	<p>Nutnost splnění všech kritérií:</p> <p>Hemoglobin > 100 g/l</p> <p>Kalcium v séru < 2,9 mmol/l</p> <p>RTG skeletu s normálním nálezem (stupeň 0) nebo solitární kostní plazmocytom</p> <p>Hodnota M-proteinu: IgG < 50 g/l</p> <p style="padding-left: 40px;">IgA < 30 g/l</p> <p style="padding-left: 40px;">BJ-urie < 4g/24 hod.</p>
II	Stav nespĺňujícĺ kritéria stádia I nebo III
III	<p>Splnění \geq z následujících kritérií:</p> <p>Hemoglobin < 85 g/l</p> <p>Kalcium v séru > 3,0 mmol/l</p> <p>Pokročilé osteolytické postižení skeletu (stupeň 3)</p> <p>Hodnota M-proteinu: IgG > 70 g/l</p> <p style="padding-left: 40px;">IgA > 50 g/l</p> <p style="padding-left: 40px;">BJ-urie > 12g/24 hod.</p>
Podstádium	
A	Relativně normální renální funkce (kreatinin v séru < 177 μ mol/l)
B	Abnormální renální funkce (kreatinin v séru \geq 177 μ mol/l)

Kritéria pro hodnocení kostního postižení:

Stupeň 0	bez známek osteolytického postižení
Stupeň 1	solitární kostní léze nebo difuzní osteoporóza
Stupeň 2	mnohočetné osteolytické léze
Stupeň 3	rozsáhlé osteolytické léze s přítomností fraktur

Tab. 6.: Stážovací systém ISS (International Staging System) (23)

Stádium	Kritéria
I	Hladina β_2 -mikroglobulinu v séru < 3,5 mg/l Hladina albuminu v séru \geq 35 g/l
II	Hladina β_2 -mikroglobulinu v séru 3,5 – 5,5 mg/l nebo Hladina β_2 -mikroglobulinu v séru < 3,5 mg/l a hladina albuminu < 35 g/l
III	Hladina β_2 -mikroglobulinu v séru \geq 5,5 mg/l

5.4 Laboratorní vyšetření u mnohočetného myelomu

5.4.1 Základní hematologická vyšetření

Tradičním hematologickým vyšetřením v případě podezření na mnohočetný myelom je i v současnosti stanovení rychlosti sedimentace erytrocytů (FW). Jedná se o jednoduché, levné a zcela běžné vyšetření prováděné v ordinacích praktických lékařů, poskytující velmi cenné základní orientační vodítko. V případě rozvinutého MM bývá FW zpravidla extrémě vysoká (> 100 /hod), neboť souvisí zejména s přítomností a výší monoklonálního imunoglobulinu v séru, v menší míře je ovlivněna přítomnou anémií. Toto pravidlo ovšem neplatí do jisté míry pro méně časté formy MM s minimální či chybějící přítomností kompletních molekul M-proteinu, tedy v případě Bence-Jonesova typu (BJ-MM), či oligosekreční nebo nesekreční formy (NSMM). Kompletní krevní obraz, včetně počítačového a manuálního diferenciálního rozpočtu leukocytů, zpravidla odhaluje různě závažnou anémii, velmi často makrocytárního charakteru, v pokročilejších stádiích i trombocytopenii a leukopenii. Ojedinele lze z periferního krevního obrazu rozpoznat primární formu plazmocelulární leukemie ($> 2,0 \times 10^9/l$ plazmocytů), častěji pak u relabujících/refrakterních forem i sekundární leukemizaci myelomového procesu při progresi onemocnění. Nelze pominout i nález penízkovatění v důsledku přítomnosti MIG. Koagulační vyšetření informuje o změně koagulačních poměrů v důsledku přítomnosti monoklonálního imunoglobulinu v séru (1,2,17,24).

5.4.2 Základní biochemická vyšetření

Mezi zcela základní biochemická vyšetření v diagnostice MG patří kompletní vyšetření iontogramu, zejména pak kalcémie, vyšetření renálního souboru včetně stanovení hladiny kyseliny močové a kreatininové clearance, a ukazatelů jaterního souboru. Zvýšená hladina celkové bílkoviny, bez znalosti detailní analýzy bílkovinného spektra, může poskytnout informaci o možné přítomnosti abnormálního bílkovinného gradientu a její stanovení spolu s vyšetřením viskozity séra je jedním z aspektů při klinickém podezření na přítomnost hyperviskózního syndromu. Naopak nízké hladiny albuminu svědčí spíše pro pokročilý stav nemoci, spojený s katabolismem a konzumpcí albuminu nádorovou masou, může jít ale i o důsledek různého typu postižení ledvin u MG, zejména pak asociace s AL amyloidózou s rozvinutým nefrotickým syndromem. Vysoká aktivita laktát-dehydrogenázy v séru je známa jako nepříznivý prognostický ukazatel a zpravidla je obrazem pokročilého stavu nemoci, často i s extramedulárním šířením (17,24).

5.4.3 Analýza imunoglobulinů

Základním a zcela nenahraditelným vyšetřením v diagnostice a sledování MG je elektroforéza bílkovin séra a moči, zpravidla sbírané za 24 hodin. Jedná se o vyšetření kvantitativní, umožňující detekci a kvantifikaci MIG, spolu s analýzou celého bílkovinného spektra – albuminu, α_1 -, α_2 -, β - a γ -globulinů. Principiálně je založena na separaci molekul bílkovin dle náboje a velikosti na nosiči (obvykle agaróza) za působení elektrického pole. Molekuly M-proteinu (imunoglobulin) jsou většinou nalézány v γ oblasti, avšak nebývá výjimkou i migrace v oblasti β frakce (např. u IgA typu M-proteinu). Limitací elektroforézy je detekční limit $< 0,5$ g/l, možnost migrace M-proteinu v β -frakci či přítomnost kryoglobulinu. Nejmodernější metodu v dnešní době představuje systém vysokovoltické kapilární elektroforézy se separací bílkovin ve volném roztoku (1, 25, 26).

K samotné typizaci (určení typu, např. IgG κ , IgA λ , atd.) monoklonálního imunoglobulinu je v současné době používána imunofixační elektroforéza, principiálně založená na užití specifických antisér vůči epitopům těžkých a lehkých řetězců imunoglobulinu, které se aplikují přímo na elektroforeogram a následně vzniklé imunoprecipitační linie jsou obarvením vizualizovány. Vyšetření slouží nejen k typizaci monoklonálního imunoglobulinu, ale taktéž k jeho kvalitativnímu průkazu, zejména v případě negativy elektroforetického vyšetření po proběhlé chemoterapii. Samotné elektroforetické a imunofixační vyšetření probíhá principiálně shodně i v případě analýzy moči, nejčastěji z 24 hodinového sběru, nicméně v případě velmi nízké proteinurie je nutné před analýzou vzorek moči adekvátně koncentrovat. Dominantním aspektem analýzy moči je zjištění přítomnosti a kvantifikace tzv. Bence – Jonesovy bílkoviny (B-J urie), tedy exkrece lehkých řetězců imunoglobulinu κ nebo λ (25, 26).

Stanovení monoklonálního imunoglobulinu v séru či moči neslouží pouze k diagnostice MG, ale samotná změna kvantity hladiny slouží ke sledování progresu či odpovědi na léčbu, neboť odráží i přímo změnu nádorové hmoty a je tedy i součástí pevně definovaných léčebných kritérií (27, 28, 29). Pro stanovení hladin jednotlivých tříd imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM) se používá imunoturbidimetrického či imunonefelometrického vyšetření. Vyšetření má nejen výpovědní hodnotu v době diagnózy nemoci (oligo, polykonální suprese) jako jedno ze SWOG kritérií MM, ale slouží i k průběžnému sledování hladin ve vztahu k průběhu onemocnění a funkci vlastního imunitního systému. V době rozvinutého stavu nemoci platí, že u MM s intaktní molekulou imunoglobulinu bývá elevace hladiny celkového

imunoglobuliny stejné třídy jako je typ monoklonálního imunoglobulinu se supresí ostatních typů (např. u IgGκ typu MM, bývá elevace celkové hladiny IgG imunoglobulinu se supresí tříd IgA a IgM), u B-J MM formy či v případě NSMM bývá pravidlem polyklonální suprese všech izotypových tříd (14, 24, 25, 26).

Specifický přístup vyžaduje analýza kryoglobulinů, což jsou sérové bílkoviny charakterizované kryoprecipitačními či kryogelifikačními vlastnostmi při teplotách pod 37°C. Kryoglobuliny lze rozdělit na 3 typy: typ I - je tvořen monoklonálním imunoglobulinem, typ II - je tvořen monoklonálním imunoglobulinem, obvykle IgM s protilátkovou aktivitou proti polyklonálním imunoglobulinům obvykle IgG typu, typ III je tvořen polyklonálními imunoglobuliny. Při typizaci MIG tvořícího kryoprecipitát je vzorek séra zkapalněn 2-merkaptotanolem při teplotě 37°C a následně je vyšetřen imunofixační elektroforézou (25, 26).

Vyšetření sérových hladin volných lehkých řetězců (FreeLite™) a stanovení izotypových párů imunoglobulinů (HevyLite™) je zmíněno v kapitole 5.8 a 5.9.

5.4.4. Ostatní biochemická vyšetření

Mezi další nezbytná vyšetření zejména při hodnocení stupně pokročilosti MM patří stanovení hladiny β_2 -mikroglobulinu (β_2 -m) v séru. Pro stanovení byla používána RIA a v současnosti především ELISA metoda a hladiny β_2 -m jsou, jako diskriminační kritéria, součástí stážovacího systému ISS. Hladiny β_2 -m korelují nejen s nádorovou masou a biologickými vlastnostmi myelomových buněk, ale jsou výrazně ovlivněny glomerulární filtrací, proto do jisté míry informují o poškození ledvin a musí být proto hodnoceny v kontextu stavu renální funkce (26).

Výběrově lze využít některá specializovaná vyšetření, např. sledování ukazatelů kostní resorpce a novotvorby (kostní izoenzym alkalické fosfatázy (bALP), tartarát-rezistentní kyselá fosfatáza (TRAP), telopeptid kolagenu typu I (ICTP)), stanovení hladin angiogenních cytokinů (např. vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), hepatocytárního růstového faktoru (HGF)), sérové thymidinkinázy či jiných parametrů, které doposud nebyly do běžného algoritmu vyšetření zavzaty (1).

5.5 Vyšetření kostní dřeně u mnohočetného myelomu

5.5.1 Cytologické, histologické a imunohistochemické vyšetření kostní dřeně

Cytologické a histologické vyšetření kostní dřeně patří mezi stěžejní vyšetření v diagnostice a diferenciální diagnostice monoklonálních gamapatií. Samotné procentuální zastoupení plazmocytů s průkazem jejich klonality je jedním z kritérií SWOG i IMWG kritérií mnohočetného myelomu a vyšetření kostní dřeně nelze v diagnostickém algoritmu pominout. Kromě kvantitativních charakteristik, je pro klinika velmi přínosný i morfologický obraz plazmocytů, zejména pokud se jedná o méně diferencovanou, zejména plazmoblastickou populaci včetně přítomnosti jadérek a kdy lze očekávat agresivní, méně příznivý průběh onemocnění. Hodnocení samotného roztěrového preparátu může být v mnohých případech obtížné, často nepřínosné a falešně negativní, např. při nesprávné technice aspirace s „naředěním“ kostní dřeně periferní krví, při hypocelulární kostní dřeni, zejména ale při nodulárním typu myelomové infiltrace kostní dřeně nebo v případě multifokálního charakteru nemoci. Imunohistochemické barvení trepanobiopsického vzorku kostní dřeně s identifikací plazmocytů barvením na povrchový glykoprotein Syndecan – CD₁₃₈ umožňuje jasnou vizualizaci a kvantifikaci myelomové populace a spolu s barvením protilátkami proti lehkým řetězcům κ a λ s následným vyhodnocením vzájemného poměru ($> 4:1$ nebo $< 1:2$) dovoluje určit klonalitu myelomových plazmocytů v kostní dřeni. Vyšetření kostní dřeně hraje nedílnou součást i při hodnocení léčebné odpovědi, zejména pak stanovení kompletní remise (17, 28, 30, 31, 32,33).

5.5.2 Vyšetření kostní dřeně průtokovou cytometrií

Průtoková cytometrie kostní dřeně (FC), zejména pak její sofistikovaná, multiparametrická (vícebarevná) varianta využívající barvení 4 a více monoklonálními protilátkami značenými fluorochromy, umožňuje vyšetřit podrobný imunofenotyp sledovaných buněčných populací. U mnohočetného myelomu se používá pro ověření klonality nádorové populace barvení na přítomnost znaků CD 38, CD 138, CD 45 a vyšetření cytoplazmatických lehkých řetězců κ a λ , kdy nádorová populace exprimuje pouze jeden typ lehkého řetězce, přičemž samotná exprese některých specifických znaků nese i jistý prognostický význam (CD 45, CD 56, CD117, CD 28). Kromě využití v diagnostice, je vyšetření používáno ke zjištění reziduální nádorové populace po proběhlé chemoterapeutické, ev. transplantační a biologické terapii.

V tomto případě se jedná o detekci klonálních, imunofenotypizačně aberantních plazmatických buněk v kostní dřeni s předpokládaným velmi nízkým zastoupením plazmocyty. K analýze bývá nejčastěji používáno ≥ 3000 plazmatických buněk (vyšetření tedy není závislé na procentu infiltrace kostní dřene plazmocyty) a užívá se barvení alespoň 4 vybranými stěžejními znaky. Výsledky jsou potřebné pro splnění kritérií tzv. stringentní kompletní léčebné odpovědi (sCR) a jednak mají poměrně významný prognostický význam. FC se jeví jako vysoce prediktivní, schopná identifikovat rizikové skupiny u jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu a u nemocných s asymptomatickou fází mnohočetného myelomu a optimalizovat strategii sledování těchto nemocných (1, 34, 35, 36, 37,38, 39,40).

5.5.3 Cytogenetické vyšetření

Cytogenetické změny u mnohočetného myelomu lze rozdělit do 2 velkých, prognosticky rozdílných skupin: hyperdiploidie (charakterizované variabilními trisomiemi chromosomů s nízkou prevalencí *IgH* translokací) a nonhyperdiploidie (zahrnující hypodiploidie, pseudodiploidie a near-tetraploidie s častými translokacemi *IgH* genu). Mezi další prognostické ukazatele patří delece chromosomu 13, 17 a změny chromosomu 1. Hyperdiploidní změny se vyznačují příznivější prognózou, postihují častěji starší nemocné a častěji jsou spojeny s izotypem IgG kappa, naopak všeobecně nonhyperdiploidní změny jsou zatíženy nepříznivou prognózou, jsou četnější u mladších nemocných a častěji spojeny s izotypem IgA lambda. Mezi nejčastější translokace *IgH* genu patří translokace t (4;14)(p16;q32) a t (4;16)(q32;q23), které jsou obvykle prognosticky nepříznivé a t (11;14)(q13;q32), která je naopak spojena s prognózu příznivou, resp. neutrální. Sekundární cytogenetické změny, akumulované během vývoje nádorového klonu s sebou nesou i změnu charakteru biologického chování a primárně příznivé cytogenetické změny mohou být v případě sekundárních, následných změn, příčinou progresu a léčebné rezistence onemocnění (41-57).

Analýza cytogenetických změn u mnohočetného myelomu zaznamenala v posledních letech velký rozmach a pro běžnou klinickou praxi představuje již zcela rutinní vyšetření, které je pro každodenní praxi o nemocné s mnohočetným myelomem nezbytné. Cytogenetická klasifikace onemocnění, zejména s identifikací rizikových změn, je základem pro individuální, moderní léčebnou stratifikaci – tzv. Risk-Adapted Therapy (mSMART klasifikace) (58, 59, 60).

5.6 Zobrazovací vyšetření u mnohočetného myelomu

5.6.1 Radiografické vyšetření skeletu

Konvenční radiografické vyšetření skeletu zůstává i přes množství moderních zobrazovacích metod standartní metodou v diagnostice a hodnocení tíže postižení skeletu u mnohočetného myelomu s určením stádia onemocnění (stážovací systém D-S). Typickým radiografickým nálezem jsou vesměs ostře ohraničené kulovité či oválné osteolytické léze, bez osteosklerotického lemu, dobře patrné zejména v oblastech plochých kostí lebky a pánve, ale i dlouhých kostí femurů a humerů. Dalším velmi častým nálezem bývají kompresivní fraktury obratlových těl či patologické fraktury dlouhých kostí. Velmi často nacházíme kombinaci obou těchto nálezů, zejména pak v terénu osteoporózy a to až u 60% nemocných, pouze u asi 10-20% nemocných nacházíme pouze difuzní osteoporózu bez přítomnosti osteolytických lézí. Rozsah vyšetření skeletu zahrnuje oblasti s předpokladem přítomnosti aktivní kostní dřene – tedy snímek kalvy, krční, hrudní a bederní páteře, pánve, humerů, femurů a snímek hrudníku. Periferní postižení skeletu (tedy kostí předkloktí, bérců, drobných kostí rukou a nohou) bývá extrémě vzácné, často spojené s agresivním typem onemocnění. Výhodou radiografického vyšetření je bezesporu dostupnost a nízká cena, s možností opakovaného vyšetření s možností rychlého sériového porovnání, a velmi dobré zobrazení postižení plochých kostí. Mezi nevýhody patří radiační zátěž, nemožnost zobrazení měkkých tkání, zejména v oblasti páteřního kanálu, nemožnost vizualizace extramedulárního postižení a taktéž i nízká senzitivita, kdy dochází ke zobrazení lytického postižení kostí až při ztrátě přibližně 30-50% trabekulární kosti (24, 61).

5.6.2 Vyšetření počítačovou tomografií

Vyšetření počítačovou tomografií (CT) je citlivější než planární radiografické vyšetření v rozlišení malých lytických lézí, dovoluje identifikovat ložiska s možnou extramedulární propagací a taktéž dovoluje zobrazení oblastí, které jsou konvenční radiografií obtížně přístupné – lopatky, žebra a sternum. Jistou limitací je typ přístroje, které má dané pracoviště k dispozici s omezením velikosti vyšetřované oblasti. Nejnovější, multidetektorové spirální CT přístroje však umožňují vyšetření celé páteře a ve vybraných případech i celotělové vyšetření, s výhodou fúzního vyšetření s pozitronovou emisní tomografií. CT napomáhá při cílených biopsiích, při plánování radioterapie a operačních zákroků. Nevýhodou CT vyšetření je vyšší cena a poměrně vysoká radiační zátěž, ač některá pracoviště implementovala specifické protokoly využívající nižší dávku ionizujícího záření (24,61, 62,63).

5.6.3 Vyšetření magnetickou rezonancí

Magnetická rezonance (MR) v posledních letech prodělala extrémě rychlý vývoj, kromě běžného vyšetření vybraných úseků skeletu lze nyní na nejmodernějších přístrojích běžně provádět celotělové vyšetření včetně vyšetření periferního skeletu. Výhodou je nulová radiační zátěž, poměrně rozsáhlá oblast vyšetření v několika rovinách, zobrazení měkkých tkání a poměrů v páteřním kanálu. Mezi nevýhody patří vyšší cena a nemožnost použití u pacientů s kovovými implantáty. Vyšetření skeletu magnetickou rezonancí představuje neobyčejný přínos zejména v iniciálních fázích mnohočetného myelomu či rizikové formy MGUS, kdy umožňuje zobrazit počínající změny způsobené infiltrací myelomovými elementy, zasahující pouze oblast kostní dřeně bez zjevného postižení kostní hmoty. Zobrazení ložisek infiltrovaných myelomovými elementy je spojeno s potlačením signálu v T1 vážených sekvencích v důsledku vyššího obsahu vody, naopak v sekvenci STIR (sekvence s potlačením tukové tkáně) jsou naopak tato ložiska hypersignální. Tíže postižení skeletu stanovená počtem lézí při MR (ev. PET/CT) byla inkorporována do stážovacího systému D-S jako Durie – Salmon plus (D-S plus) s výhodou přesnější klasifikace zejména iniciální, aktivní fáze onemocnění a pro evidentní prognostický význam. MR má nezastupitelnou roli v diagnostice a diferenciací diagnostice solitárního kostního plazmocytomu. Limitací MR vyšetření je dlouhá latence při hodnocení léčebné odpovědi, neboť potřebný čas k rekonverzi signálu kostní dřeně představuje několik měsíců (61, 64, 65, 66, 67).

5.6.4 ^{99m}Tc -MIBI scintigrafie

Scintigrafické vyšetření s pomocí ^{99m}Tc -MIBI (metoxyizobutylyzonitril) využívá specifického vychytávání radiofarmaka v mitochondriích viabilních myelomových buněk s možností následné detekce aktivity pomocí scintilační kamery. Kromě samotné detekce viabilní tkáně se rovněž využívá rozlišení typu obrazu akumulace radiofarmaka a scintigrafické nálezy jsou klasifikovány jako: fokální, difuzní a kombinovaný obraz (fokální+ difuzní), přičemž nález fokálního a kombinovaného obrazu patří mezi prognosticky nepříznivý. ^{99m}Tc -MIBI lze využít k detekci aktivní nádorové tkáně ještě před vývinem strukturální kostních změn a k průběžnému sledování onemocnění. Limitací vyšetření je nemožnost detekce lézí menších 10 mm, radiační zátěž a nezbytná, velmi dobrá erudice hodnotícího lékaře (61, 64, 68, 69, 70, 71).

5.6.5 FDG-PET/CT vyšetření

Pozitronová emisní tomografie s využitím radiofarmaka 2-[^{18}F]-fluoro-2-deoxy-d-glukózy kombinovaná s celotělovým vysokorozlišovacím CT vyšetřením (FDG-PET/CT) patří mezi nejnovější a nejmodernější metody využívané v diagnostice, stážování a hodnocení léčebné odezvy u nemocných s mnohočetným myelomem. V časných fázích dovoluje rozpoznání aktivního onemocnění ještě před vývinem strukturálních změn kosti a napomáhá rozpoznání asymptomatické formy MM ev. rizikové formy MGUS od aktivního MM. Počet aktivních lézí definuje stádium dle modifikovaného stažovacího systému D-S plus, přičemž se s vyšším počtem lézí zhoršuje prognóza nemocného. Celotělové FDG-PET/CT umožňuje velmi dobrou detekci extramedulárního postižení, neboť tyto většinou klinicky němé léze, unikají zobrazovacím schopnostem jiných modalit a přínos vyšetření zejména v období progresu/relapsu onemocnění bývá mnohdy neocenitelný. Metoda taktéž umožňuje téměř okamžité hodnocení efektu proběhlé chemoterapie. Sekundárním přínosem celotělového vyšetření je detekce nádorových duplicit a zánětlivých stavů. Přes své nesporné výhody však FDG-PET/CT vykazuje jisté diagnostické limity zejména ve velmi časném, iniciálním stádiu choroby s přítomností pouze difuzních změn v kostní dřeni a studie určující definitivní postavení metody nyní probíhají. Nespornou nevýhodou vyšetření je vysoká radiační zátěž a ekonomická náročnost této metody (61, 64, 72, 73).

5.7 Léčba mnohočetného myelomu

Mnohočetný myelom, přes nesporně významné pokroky v terapii, zůstává stále nevléčitelné onemocnění a proto úkolem podávané terapie je získat nad nemocí kontrolu, zvýšit kvalitu a zejména prodloužit délku života nemocného. Průběh onemocnění je obvykle charakterizován zpočátku dobrou reakcí na podanou chemo-imunoterapii s různě dlouhým bezpříznakovým obdobím remise, avšak s následným relapsem/progresí, v optimálním případě následovaným opětovným dosažením remise onemocnění. Je všeobecně známo, že období remise se s postupujícím průběhem onemocnění a s nárůstající rezistencí k terapii stále zkracují a taktéž tíže relapsů/progresí nabývá na intenzitě a agresí. Pozdní, refrakterní fáze onemocnění je charakterizována rezistencí na kombinovanou chemo-imunoterapii, často s přítomným extramedulárním postižením a terminálním postižením parenchymatózních orgánů, často navíc s vývinem komplikující obtížně zvladatelné infekce (1, 2, 17).

Samotný stupeň dosažené remise s různě výraznou redukcí nádorové populace je charakterizována nejen počtem myelomových elementů v kostní dřeni, kvantitou monoklonálního imunoglobulinu v séru a/nebo v moči, stabilitou kostních lézí, ale v posledních letech i dalšími ukazateli – jako jsou sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu, přítomnost imunofenotypizačně aberantních plazmocytů v kostní dřeni či negativita vyšetření polymerázovou řetězovou reakcí s užitím specifických oligonukleotidů (ASO-PCR) (27,28,29). V primoléčbě, u nově diagnostikovaných nemocných, je zřejmé, že zejména v případě „high-risk“ nemocných, dosažení maximální hloubky léčebné odpovědi ev. kompletní remise (CR) a její udržení, s použitím vysokodávkovaných ale i konvenčních přístupů, má vliv nejen na celkové přežití, ale i na délku bezpříznakového období a období do další progrese onemocnění (74, 75, 76, 77, 78, 79, 80).

V posledních desetiletích prodělala terapie mnohočetného myelomu rychlý vývoj a kromě užití vysokodávkované chemoterapie s podporou autologního štěpu (HD-T/ASCT), byly do terapeutických režimů začleněny tzv. „nové“, biologicky působící léky – thalidomid, bortezomib a lenalidomid, což se velmi příznivě promítlo do podstatně prodloužené délky života nemocných (81). Rovněž dochází k implifikaci tzv. „Risk-Adapted“ terapie s výběrem konkrétního léčebného režimu se zohledněním biologických charakteristik nemoci a stavu nemocného (60, 82).

Nadále platí, že k zahájení terapie jsou indikováni nemocní se symptomatickou formou onemocnění. U pacientů s asymptomatickou formou nemoci je všeobecně zaujímana strategie vyčkávací, tedy „watch-and-wait“, ačkoliv probíhají klinické studie hodnotící terapii thalidomidem či lenalidomidem u asymptomatických forem myelomu či tzv. „high-risk“ MGUS s cílem oddálit progresi do symptomatické formy (83).

5.7.1 Vysokodávkovaná chemoterapie s podporou autologního štěpu (HD-T/ASCT)

Vysokodávkovaná chemoterapie přípravným režimem na bázi melfalanu s následnou podporou autologního štěpu představovala a dá říci, že stále představuje dominantní léčebnou modalitu pro mladé nemocné s myelomem do 65 let, bez duplicitní malignity či komplikující interní komorbidit, a alespoň zajištění autologního štěpu nesmí být z léčebného algoritmu pominuto. Hlavním cílem HD-T/ASCT je optimálně dosažení kompletní remise onemocnění, tedy plné eliminace nádorového klonu, což má vliv na další osud nemocného (84, 85). Jako indukční terapie (zpravidla 4 cykly) byl do zavedení biologických působků v léčbě MM zlatým standardem režim VAD (Vinkristin, Adriablastin, Dexametazon) či CAD (Cyklofosamid, Adriablastin, Dexametazon). V současnosti, s možností užití „nových“ léků s biologickým účinkem je ponejvíce využíváno režimu CTD (Cyklofosamid, Thalidomid, Dexametazon) ve vyjimečných případech lze užít v našich podmínkách i velmi účinného indukčního režimu na bázi Bortezomibu např. PAD (Bortezomib, Adriablastin, Dexametazon) (17). Následné zajištění autologního štěpu probíhá v naprosté většině za podpory vysokodávkovaného Cyklofosfamidu ($2,5-3 \text{ g/m}^2$) a granulocytárních růstových faktorů s následnou leukaferézou (17). Je známo, že zvolený indukční režim má vliv na výtěžek leukaferézy a v případě nedostatečné mobilizace lze užít i plerixaforu (86, 87). HD-T/ASCT je relativně bezpečná i u nemocných s nepříliš závažným chronickým renálním postižením (88). Na další průběh onemocnění má z pretransplantačních parametrů vliv – věk, iniciační stádium nemoci, cytogenetické změny, kontaminace autologního štěpu nádorovými buňkami a z posttransplantačních faktorů je to míra dosažené léčebné odpovědi a ev. použití tandemové HD-T/ASCT (89, 90, 91, 92). Recentní studie poukazují na nedostatečný efekt HD-T/ASCT u nemocných s přítomností rizikových cytogenetických změnám (del RB1, t(4;14), del 17p). Zdá se, že vliv této nepříznivé genomové výbavy lze zřejmě překlenout volbou indukční chemoterapie na bázi Bortezomibu (84, 93, 94, 95). Konsensus pro indikaci a optimální typ udržovací resp. konzolidační terapie po HD-T/ASCT není zatím zcela

jednoznačně daný, v podmínkách České republiky je u nemocných, kteří nedosáhli alespoň velmi dobré parciální remise (VGPR) indikována roční udržovací terapie thalidomidem nebo konzolidace jiným režimem nežli byl použit v indukčním schématu a ev. v případě dispozice autologního štěpu i provedení tandemové HD-T/ASCT (17).

5.7.2 Alogenní transplantace krvetvorných buněk

Alogenní transplantace krvetvorných buněk (Allo-SCT) je potenciálně kurativní modalita mnohočetného myelomu, jejíž hlavní limitací je extrémě vysoká mortalita (v peritransplantačním období až 38%) spojená s myeloablativními režimy. Zavedení přípravných režimů s redukovanou intenzitou (RIC) sice snížilo peritransplantační mortalitu na 10-20%, nicméně došlo ke zvýšení míry relapsů a progresí choroby a zatím nebylo prokázáno prodloužení přežití nemocných ve srovnání s HD-T/ASCT. Proto o Allo-SCT nelze uvažovat jako o běžné léčebné modalitě a její pozice je nyní pouze v kontextu klinických studií pro selektovanou skupinu nemocných mladších 55 let. V praxi lze za možné kandidáty Allo-SCT považovat mladé nemocné s HLA identickým sourozencem stejného pohlaví a kteří jsou senzitivní na indukční terapii (84, 96, 97, 98).

5.7.3 Thalidomid (Myrin)

Thalidomid je prvním ze skupiny „nových“ léků, které mají u mnohočetného myelomu výrazný léčebný efekt. Mechanismus působení léku není zatím zcela objasněn, ale předpokládá se přímý vliv na nádorové buňky, ale i nepřímý inhibiční vliv okolí nádoru, které je thalidomidem stimulováno. Prokázán byl taktéž antiangiogenní efekt léku. Thalidomid je podáván perorálně, obvykle v denní dávce 100-200mg nejčastěji v kombinaci s kortikosteroidy a cytostatickými působky alkylačního či antracyklinového typu. Nejčastěji používanými režimy jsou MPT (Melfalan, Prednizon, Thalidomid), CTD (Cyklofosfamid, Thalidomid, Dexametazon), TAD (Thalidomid, Adriablastin, Dexametazon) či režimy záchranného typu – např. T-CED (Thalidomid, Cyklofosfamid, Etoposid, Dexametazon). Mezi hlavní vedlejší nežádoucí účinky patří teratogenní potenciál (znám z minulosti – tzv. Conterganová aféra), vyšší incidence tromboembolické nemoci a irreverzibilní senzomotorické polyneuropatie dolních končetin (17, 99, 100, 101, 102, 103).

5.7.4 Bortezomib (Velcade)

Druhým „novým“ biologickým lékem v terapii mnohočetného myelomu je bortezomib, jehož hlavním mechanismem působení je inhibice proteasomu (multienzymový komplex s dominantní úlohou při degradaci proteinů) s inhibicí nukleárního faktoru kappa B (NF-kappaB) s následným výrazným cytotoxickým a antiproliferačním efektem. Bortezomib je aplikován intravenózně, obvykle 3-4x v měsíčním cyklu dle zvoleného režimu, v kombinaci s kortikosteroidy a dalšími cytostatiky, neboť kombinační terapie dosahuje jednoznačně lepších výsledků než monoterapie. Nespornou výhodou bortezomibu je jeho poměrně rychlý účinek, který je využíván zejména u nemocných s iniciálním renálním postižením či velkou nádorovou masou, schopnost překlenout nepříznivou cytogenetickou výbavu nádorového klonu jako je delece chromosomu 13 či t(4;14) a jistý pozitivní vliv na myelomou kostní nemoc. Nejčastěji používanými režimy jsou VD (Velcade, Dexametazon), VMP (Velcade, Melfalan, Prednizon), PAD (Velcade, Adriablastin, Dexametazon) a VCD (Velcade, Cyklofosfamid, Dexametazon). Mezi nejčastější vedlejší nežádoucí účinky patří většinou reversibilní periferní neuropatie a vyšší incidence infekce Varicella-Zoster virem (17, 104, 105, 106, 107, 108, 109)

5.7.5 Lenalidomid (Revlimid)

Další imunomodulačním lékem je Lenalidomid. Lenalidomid je derivátem thalidomidu a stejně jako v případě thalidomidu mechanismu účinku léku není doposud zcela znám. Stejně jako thalidomid je podáván perorálně, ale profil toxicity tohoto léku se podstatně liší. Oproti thalidomidu není neurotoxický a proto je tento lék s výhodou využíván u nemocných s preexistující polékovou polyneuropatií nebo u jedinců s vyšší náchylností ke vzniku – např. u diabetiků. Stejně jako thalidomid, tak i lenalidomid je teratogenní a léčba je provázána vyšší incidencí trombembolické nemoci, navíc je léčba spojena s výraznou mírou myelosuprese s nutností obezřetného dávkování a ev. užití růstových myeloidních působků. Zatím není zcela jasně známo, zda lenalidomid dokáže překlenout nepříznivou cytogenetickou výbavu, a u nemocných s renální nedostatečností je nutno tento lék užívat s vysokou obezřetností z důvodu vysoké toxicity. Nejčastěji používanými režimy s lenalidomidem jsou RD (Revlimid, Dexametazon), RCD (Revlimid, Cyklofosfamid, Dexametazon) MPR (Melfalan, Prednizon, Revlimid) (17, 110, 111).

5.7.6 Terapie nemocných s renálním postižením

Přibližně u 20% nemocných s mnohočetným myelomem je v době diagnózy nemoci prokázáno různě závažné renální postižení. Nejčastější příčinou bývá poškození proximálního tubulu s precipitací lehkých řetězců imunoglobulinu (κ , λ) v tubulech a sběrných kanálcích ledvin se vznikem odlitkové nefropatie (cast nephropathy), méně častou příčinou pak bývá nemoc z depozice lehkých řetězců (light chain deposition disease), depozita AL amyloidu či postižení ledvin hyperkalcémií či hyperviskózním syndromem (112, 113). Obecným principem terapie je, kromě podpůrné hydratační terapie, volba rychlé a účinné chemoterapie založené dle recentních doporučení na kombinaci vysokodávkovaných kortikosteroidů, Bortezomibu a případně i Doxorubicinu. V případě užití klasických alkylačních cytostatik a Lenalidomidu je nutná adekvátní redukce dávky, naopak použití Thalidomidu je naopak relativně bezpečné (114, 115, 116, 117, 118). V případě průkazu poškození ledvin velkými kvanty lehkých řetězců je možno využít high cut-off dialýzy s kolonou Gambro HCO 1100, umožňující odstranění poměrně velkého množství lehkých řetězců z plazmy. Tato metoda je však zatím využívána pouze v rámci klinických studií (119, 120).

5.7.7 Podpůrná terapie u mnohočetného myelomu

Kromě chemoterapie je nedílnou součástí léčby mnohočetného myelomu i terapie myelomové kostní nemoci, kde dominantní úlohu hrají bisfosfonáty, podávané perorálně (Klodonát, Ibandronát) či parenterálně (Pamidronát, Kyselina zolendronová). Parenterální bisfosfonáty se rovněž používají ke zvládnutí hyperkalcemických stavů (17, 121, 122). Péče o samotné postižení skeletu je multioborové a často žádá intervenci neurochirurga, ortopeda či traumatologa v případě nutné intervence u proběhlé či hrozící kostní či vertebrální fraktury. S výhodou jsou využívány vertebro či kyfoplastiky komprimovaných obratlových těl (121, 123).

Nedílnou součástí léčby myelomu je i terapie bolestí s užitím opiátů a opioidů a taktéž i paliativní analgetické radioterapie, zejména při sériovém postižení obratlů. S výhodou jsou užívány transdermální a retardované perorální formy analgetik (17, 24).

Terapie anémie, leukopenie, stejně tak i terapie infekčních komplikací je zajišťována podle principů používaných v každodenní hematologické praxi (24, 121).

5.8 Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu

5.8.1 Struktura, syntéza a metabolismus volných lehkých řetězců

Strukturálně se molekuly protilátek skládají ze dvou identických těžkých řetězců (γ , α , μ , δ , ϵ) určující izotypy protilátek, a ze dvou lehkých řetězců (κ nebo λ). Na obou typech řetězců rozlišujeme konstantní a variabilní domény, které umožňují svou konformací specifickou vazbu antigen-protilátka. Lehké a těžké řetězce, a těžké řetězce mezi sebou, jsou vzájemně spojeny disulfidickými můstky (124, 125).

Geny kontrolující syntézu lehkých řetězců (LŘ) κ se nacházejí na 2 chromozómu a zahrnují přibližně 40 oblastí pro $V\kappa$ geny, 5 oblastí pro $J\kappa$ geny a 1 $C\kappa$ gen. Oblasti kódující syntézu LŘ λ jsou umístěny na 22 chromozómu a zahrnují přibližně 30 segmentů pro $V\lambda$ geny, 4 páry segmentů pro $J\lambda$ a jeden $C\lambda$ gen). Lehké řetězce jsou začleněny do molekul imunoglobulinu během vývoje B-lymfocytů, kdy zprvu bývají exprimovány na povrchu nezralých elementů. Syntéza a sekrece LŘ během vývoje B-lymfocytu stoupá a u plazmatických buněk dosahuje maximální výše. Plazmatické buňky produkují jeden typ těžkého řetězce a jeden typ LŘ, přičemž je známo, že produkce LŘ je asi o 40% vyšší než produkce těžkých řetězců, což umožňuje optimální konformaci molekul imunoglobulinu. Množství plazmocyty produkujících LŘ κ je dvojnásobné, řetězce λ mají tendenci tvořit dimerické formy (124, 126, 127).

LŘ jsou poměrně rychle, vzhledem ke své malé velikosti (10-30 kDa), filtrovány póry glomerulu do primární moči, přičemž poločas monomerních LŘ κ představuje přibližně 2-4 hodiny, v případě dimerických LŘ λ se jedná o 3-6 hodin. Poločas kompletních molekul imunoglobulinu přitom představuje 6 (IgA) a 21 dní (IgG). V oblasti proximálního tubulu nefronu dochází následně ke zpětné reabsorpci LŘ, proto bývá případná patologie sérových hladin LŘ zaznamenávána častěji a dříve než v moči. V případě masivní produkce, filtrace LŘ glomeruly a překročení reabsorpčního maxima proximálního tubulu dochází k úniku LŘ do moči, kde bývají identifikovány jako Bence – Jonesova (B-J) bílkovina. K identifikaci B-J bílkoviny bylo dříve užíváno termoprecipitační zkoušky, nyní se pro její stanovení a kvantifikaci využívá elektroforetických a imunofixačních technik (128).

V případě masivní exkrece LŘ do moči, spolu s postižením struktur nefronu a zpomalením proudu moči může dojít k precipitaci LŘ a jejich vazbě na Tamm-Horsfallův protein v oblasti distálního tubulu s následným vznikem odlitkové (tzv. cast nefropathy) nefropatie, což je nejčastější příčina renální nedostatečnosti u mnohočetného myelomu (113, 128).

5.8.2 Metody stanovení hladin volných lehkých řetězců

Běžně užívané metody pro stanovení hladin volných lehkých řetězců (VLŘ) v moči a zejména v séru se potýkaly dlouhodobě s technickými obtížemi, velkými nároky na zkušenost při interpretaci a rovněž poměrně výraznou preanalytickou chybou. Standartní elektroforéza bílkovin séra je sice technicky a cenově poměrně nenáročná, ale není dostatečně senzitivní v detekci nízkých koncentrací lehkých řetězců (< 500-1000 mg/l). Imunofixační elektroforéza séra je citlivější, ale nedokáže zachytit nižší hladiny (< 150mg/l) a navíc neposkytuje kvantitativní výsledky. Elektroforéza moči je jednoduchá, levná a poměrně citlivá metoda. Výsledek však závisí do jisté míry na subjektivním hodnocení, většinou je nutná předchozí koncentrace moči a k vyšetření je nutný, mnohdy problematický, 24-hodinový sběr moči. V případě těžké proteinurie navíc může dojít ke zkreslení výsledků. Imunofixační elektroforéza moči je mnohem citlivější, nicméně limitace jsou obdobné jako u elektroforézy a navíc neposkytuje kvantitativní výsledky. Vzhledem k výše uvedenému, byla tedy snaha o nalezení optimální metody založené na užití antigen-specifických protilátek (25, 26, 128).

Společností The Binding SiteTM (Birmingham, Velká Británie) imunizací ovcí pomocí řetězců κ nebo λ izolovaných z moči obsahující B-J bílkovinu a následným užitím specifických absorpčních, purifikačních a mobilizačních technik, byly připraveny vysoce specifické protilátky proti vnitřnímu epitopu volných lehkých řetězců, který je v případě vazby lehkého řetězce v molekule imunoglobulinu pro tyto protilátky nedostupný. Nazvaný systém FreeLiteTM byl určen pro přístroje na principu nefelometrie a turbidimetrie. Systém FreeLiteTM prokázal vysokou specifitu a senzitivitu pro stanovení volných lehkých řetězců v séru a moči, přibližně 1000x vyšší citlivost než elektroforéza séra a umožňující získat kvantitativní výsledky v případě i velmi nízkých hladin (128).

5.8.3 Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců, normální rozmezí

Referenční intervaly normálního rozmezí byly nejprve testovány autorem systému FreeLiteTM A.R. Bradwellem, ale plně byly definovány až J.A. Katzmannem po vyšetření rozsáhlého souboru vzorků sér od zdravých dárců krve a dále souboru normálních jedinců různého věku. Vzájemný, vypočtený poměr lehkých řetězců κ a λ , tzv. κ/λ index, určuje klonalitu lehkých řetězců a tím klonalitu produkující plazmocelulární populace (129, 130, 131). Bylo zjištěno, že hladiny VLŘ mírně narůstají s věkem z důvodu snížené glomerulární filtrace a rovněž

při renální nedostatečnosti dochází k nárustu hladin VLŘ s mírným ovlivněním indexu κ/λ , proto je doporučeno užití renálních referenčních intervalů (132, 133). Referenční intervaly uvádí tab. 7.

Stanovení sérových hladin VLŘ se v současnosti nyní stalo součástí standardního algoritmu skríningu, diagnostiky a monitorování monoklonálních gamapatií (134, 135, 136, 137, 138).

Tab. 7. Referenční intervaly systému FreeLite™ (130, 133).

S-VLŘ kappa	3,3 – 19,4 mg/l
S-VLŘ lambda	5,7 - 26,3 mg/l
Index kappa/lambda	0,26 – 1,65
Renální index kappa/lambda	0,37 – 3,1

5.8.4 Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců ve FN Olomouc

Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců se provádí ve FN Olomouc od roku 2004 a bylo zahájeno jako první v České republice. Samotné vyšetřování se provádí na oddělení Klinické biochemie a imunogenetiky. Ke stanovení se využívá kitů firmy The Binding Site a zprvu bylo využíváno platformy turbidimetrického přístroje Hitachi 917/Modular (Roche), od roku 2006 pak nefelometrického systému Radim Delta (Radim Diagnostics).

5.9 Stanovení izotypových párů lehkých/těžkých řetězců imunoglobulinů (HevyLite™)

Nejnovějším testem ve spektru vyšetření monoklonálního proteinu je systém HevyLite™, principiálně založený na užití dvojice specifických protilátek proti junkčním epitopům mezi doménami těžkého a lehkého řetězce v konstantní oblasti řetězců imunoglobulinu (HLC). V závislosti na typu použité soupravy metoda umožňuje stanovení hladin HLC u různých izotypů imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD), poskytuje reproduktibilní, kvantitativní výsledky i v případě pouhé imunofixační positivity M-proteinu a analogicky jako v případě vyšetření sérových hladin volných lehkých řetězců umožňuje výpočet poměru HLC – indexu klonality $Ig\kappa/Ig\lambda$. Metoda také eliminuje omezení konvenční elektroforézy zejména v případech změny hematokritu nebo překrytí části spektra M-proteinu transferinem, haptoglobinem či C3 složkou komplementu. Jedná se o metodu novou, perspektivní a studie definující přínos metody do klinické praxe nyní probíhají (139, 140, 141).

6.0 Vlastní studie

6.1 Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonální gamapatie nejistého významu – význam pro stratifikaci a optimální sledování

Úvod

Jako monoklonální gamapatie nejistého významu (MGUS) je označován klinicky bezpříznakový, potenciálně maligní stav, charakterizovaný klonální proliferací plazmatických buněk produkujících M-protein, detekovatelný v séru a/nebo v moči, a absenci známek orgánového postižení typického pro myelom (tab. 3) (5). MGUS je z monoklonálních gamapatií nejčastější (přibližně 58% všech MG) a její výskyt v populaci není nikterak nízký. Narůstá s věkem a v populaci > 50 let představuje 3,2% a u jedinců > 70 let až 5,3% (údaje se ovšem liší podle senzitivity použitých detekčních technik) (142). Bylo prokázáno, že MGUS prakticky vždy předchází mnohočetnému myelomu a je známo, že přibližně u 1-1,5% jedinců s MGUS dojde ročně k transformaci v některou z forem maligní monoklonální gamapatie (9, 143, 144). Proto cílem studií řady autorů byla identifikace rizikových faktorů vystihujících míru rizika a pravděpodobnost maligní transformace MGUS (145). Ze serologických metod byly identifikovány jako signifikantní vysoká koncentrace a non-IgG izotyp MIG, část autorů pokládá jako významný prediktor i přítomnost BJ urie, suprese jednotlivých izotypů polyklonálních imunoglobulinů a výši sedimentace erytrocytů (146, 147, 148, 149, 150).

Nově dostupné stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců s určením indexu klonality κ/λ , dovolilo identifikovat jedince s vyšším rizikem transformace do některé z maligních forem MG. Kombinací indexu klonality κ/λ , koncentrace a izotypu M-proteinu byl sestaven a všeobecně akceptován stratifikační systém publikovaný Rajkumarem, rozdělující nemocné do čtyř prognosticky rozdílných skupin (tab. 8) (151).

Tab. 8: Stratifikační model pro MGUS (Rajkumar) (151)

Prediktivní faktory:

1. Hodnota M-proteinu v séru < 15 g/l
2. IgG izotyp M-proteinu
3. Normální κ/λ index VLŘ v séru

Stratifikační model:

- | | |
|----------------------------|------------------------------------------------|
| 1. Nízké riziko - | normální hodnota všech 3 prediktivních faktorů |
| 2. Nízké střední riziko - | abnormita 1 faktoru |
| 3. Vysoké střední riziko - | abnormita 2 faktorů |
| 4. Vysoké riziko - | abnormita 3 faktorů |

Cílem následující studie bylo stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců κ , λ a κ/λ indexu v souboru jedinců s MGUS, inkorporace stratifikačního modelu pro MGUS a posouzení chování hladin VLŘ jedinců, u kterých došlo k transformaci v mnohočetný myelom.

Vyšetřený soubor

Analyzovaná sestava čítala 191 jedinců, splňující IMWG diagnostická kritéria monoklonální gamapatie nejistého významu diagnostikovaných na III. interní klinice v období let 2004-2009(5). Medián věku byl 62 let, poměr mužů a žen byl 1: 1,17. Imunochemický typ IgG byl přítomen u 137 jedinců (71,7%), IgA u 27 (14,1%), IgM u 18 (9,4%), IgD typ u 1 (0,5%), BJ-typ u 1 (0,5%) a u 7 jedinců (3,7%) se zjistila biklonální sekrece (2x IgM + IgG, 5x IgG + IgA). Výskyt lehkých řetězců κ v molekule imunoglobulinu byl u 108 jedinců (56,5%), λ u 80 (42%) a 3 (1,5%) jedinci vykazovali biklonální typ sekrece lehkého řetězce. U všech jedinců bylo provedeno kompletní biochemické vyšetření séra, včetně elektroforézy a imunofixační elektroforézy, stanovení hladin izotypů imunoglobulinů IgG, IgA a IgM; dále pak vyšetření kostní dřeně aspirací a/nebo histobiopsií a u většiny jedinců bylo provedeno kompletní radiografické vyšetření skeletu k vyloučení osteolytického postižení. Sérové hladiny volných lehkých řetězců byly vyšetřeny systémem FreeliteTM (The Binding Site, Birmingham, Velká Británie).

Výsledky

Patologické sérové hladiny lehkých řetězců κ nebo λ byly zjištěny u 119 jedinců (62,3%), přičemž u 19 (9,9%) z těchto jedinců bylo přítomno zvýšení hladin obou typů lehkých řetězců, z toho v 10 případech se jednalo o jedince s různou mírou renální nedostatečnosti, v 5 případech šlo o nemocné se systémovým revmatickým onemocněním s asociovanou monoklonální gamapatií a ve 4 případech nebyla příčina zřejmá (graf 1.). Patologické hodnoty indexu κ/λ byly zjištěny u 106 (55,5%) jedinců, přičemž suprese alternativního lehkého řetězce byla zaznamenána u 6 (3%) jedinců a vždy se jednalo o řetězec λ při dominantní sekreci řetězce κ .

S použitím stratifikačního systému MGUS dle Rajkumara, splňovalo kritéria nízkého rizika 56 (29,3%) jedinců, nízkého-středního rizika 87 jedinců (45,5%), vysokého-středního rizika 45 (23,6%) a vysokého rizika pouze 3 (1,6%) jedinci (151).

Během šestiletého sledování došlo celkem u 11 (5,7%) jedinců k transformaci v některou z forem maligní monoklonální gamapatie, což odpovídá přibližné míře transformace 0,95%/rok z celého souboru. V 1 případě se jednalo o MGUS s izotypem IgM s následnou transformací ve Waldenströmovu makroglobulinémii, přičemž transformace byla spojena s nárůstem hladiny M-proteinu, poklesem hodnoty hemoglobinu, lymfadenomegalií a přítomností B-symptomů. V 10 pozorováních došlo k transformaci v MM, z toho v 1 případě v asymptomatickou formu, u které byla zaujata terapeutická strategie „watch and wait“. V dalších případech se jednalo o symptomatickou formu onemocnění, ve většině případů charakterizovanou nárůstem hladiny M-proteinu, anemizací a zejména vývinem kostních lézí, a u 1 jedince byla maligní transformace spojena dokonce i s hyperkalcémií a renální nedostatečností.

Na podkladě stratifikačního systému pro MGUS byli 4 transformující jedinci ve skupině nízkého středního rizika, 6 jedinců ve skupině vysokého-středního rizika a 1 jeden pacient ve skupině vysokého rizika. Při přepočtu na počty jedinců ve skupinách, procento transformace tedy odpovídá 0 vs. 4,5 vs. 13,3 vs. 33,3% v průběhu 6 let (tab. 9). Přejít v mnohočetný myelom byl u všech sledovaných pacientů spojen s různě vysokým vzestupem hladin volných lehkých řetězců a nárůstem patologie indexu klonality κ/λ při dominantní sekreci κ , resp. jeho prohloubením při dominantní sekreci λ (graf 2., 3.).

Tab. 9. Rozdělení souboru jedinců s MGUS (n=191) podle stratifikačního systému dle Rajkumara a počet transformujících pacientů během 6 let (151).

<u>Riziková skupina</u>	<u>Počet (%)</u>	<u>Počet jedinců v transformaci (%)</u>
Nízké riziko	56 (29,3%)	0 (0%)
Nízké – střední riziko	87 (45,5%)	4 (4,5%)
Vysoké – střední riziko	45 (23,6%)	6 (13,3%)
Vysoké riziko	3 (1,6%)	1 (33,3%)

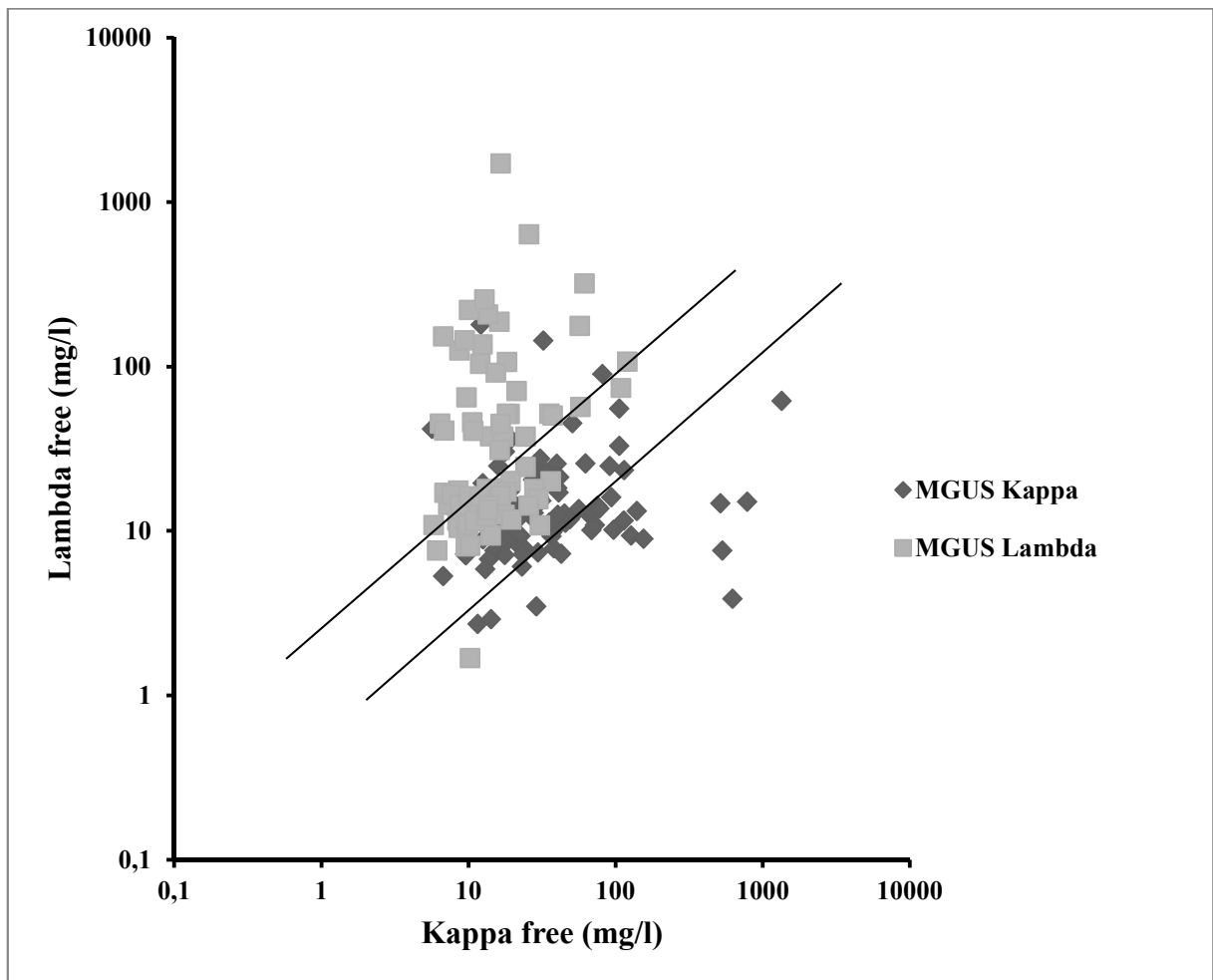
Diskuze

Výskyt patologie sérových hladin VLŘ zachycená v našem souboru odpovídá vcelku závěrům doposud zveřejněných studií, kdy procentuální výskyt abnormálních koncentrací představuje 64-78%. Je ale nutno podotknout, že stejně jako v našem případě, část jedinců vykazovalo elevaci obou LŘ tedy κ i λ , nejčastěji z důvodu přítomné renální nedostatečnosti (131, 151, 152). Procentuální výskyt patologie indexu κ/λ představuje podle doposud publikovaných prací 28-50%, 55,5% výskyt v našem souboru odpovídá spíše studiím s vyšším výskytem patologické hodnoty κ/λ indexu (151, 152, 153). Kromě elevace hladin VLŘ u renální insuficience, bývá přítomnost M-proteinu často asociována se systémovými onemocněními pojiva, hepatálním postižením a jinými stavy, kde dochází k polyklonální aktivaci lymfocytů, což má mnohdy za následek právě zvýšení hladin VLŘ a proto se jako ukazatel klonální produkce jeví citlivější index κ/λ , odrážející míru klonální produkce monoklonálními plazmatickými buňkami.

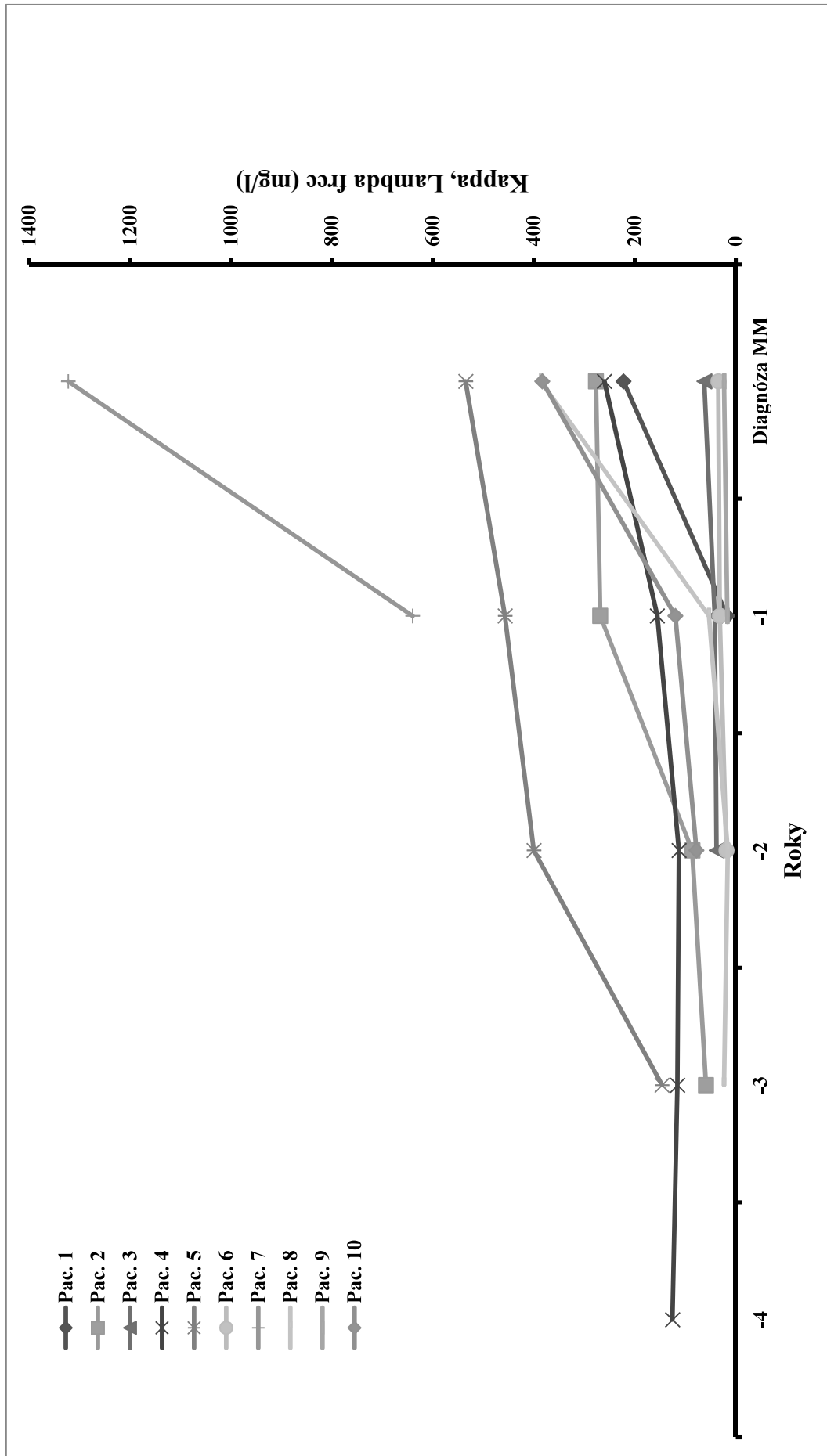
Poměrně rozsáhlá analýza 1148 jedinců s MGUS ve vztahu k rizikovým faktorům transformace byla publikována Rajkumarem (151). U známých parametrů - tedy kvantity a izotypu M-proteinu (IgA, IgM, biklonální IgA+IgM) dosahoval v multivariační analýze index relativního rizika hodnoty 2,4 resp. 2,5. Při analýze výše absolutních hladin VLŘ bylo zjištěno, že nemocní s elevací VLŘ vykazují mnohem vyšší riziko transformace do některé z forem maligní MG (index relativního rizika 2,1) než jedinci s nízkými hladinami. V multivariační analýze však mnohem přesvědčivěji vyzněla hodnota indexu κ/λ , přičemž jedinci s abnormální hodnotou indexu měli vyšší riziko transformace (index relativního rizika 2,6) než jedinci s indexem κ/λ v mezích normy. Tento parametr byl navíc nezávislý na ostatních vyhodnocených parametrech. Kombinací hodnoty indexu κ/λ , kvantity a izotypu M-proteinu jako diskriminačních parametrů, byl vytvořen a všeobecně akceptován diskutovaný stratifikační systém (151). Procento transformací zachycených v našem sledovaném souboru (0,95%/rok) odpovídá celkem údajům světového písemnictví, představující přibližně 1-1,5%/rok (144, 146). Je nutné podotknout, že všichni transformující jedinci patřili do skupiny středního a vysokého rizika, zatímco ve skupině jedinců s nízkým rizikem nebyl vývoj v maligní monoklonální gamapatii zaznamenán. Přepočtené roční procento transformací skupiny nízkého středního a vysokého středního rizika 0,8 a 2,2% přibližně odpovídá závěrům pilotní studie udávající procento transformací ve zmíněných skupinách 1,1 resp. 1,9% ročně (151, 154) . Stejně jako v publikovaných pracech i v našem případě byl vývoj

jedinců s MGUS v MM charakterizován nárůstem hladin volných lehkých řetězců, zejména ale navýšením resp. prohloubením indexu κ/λ (graf 2., 3.).

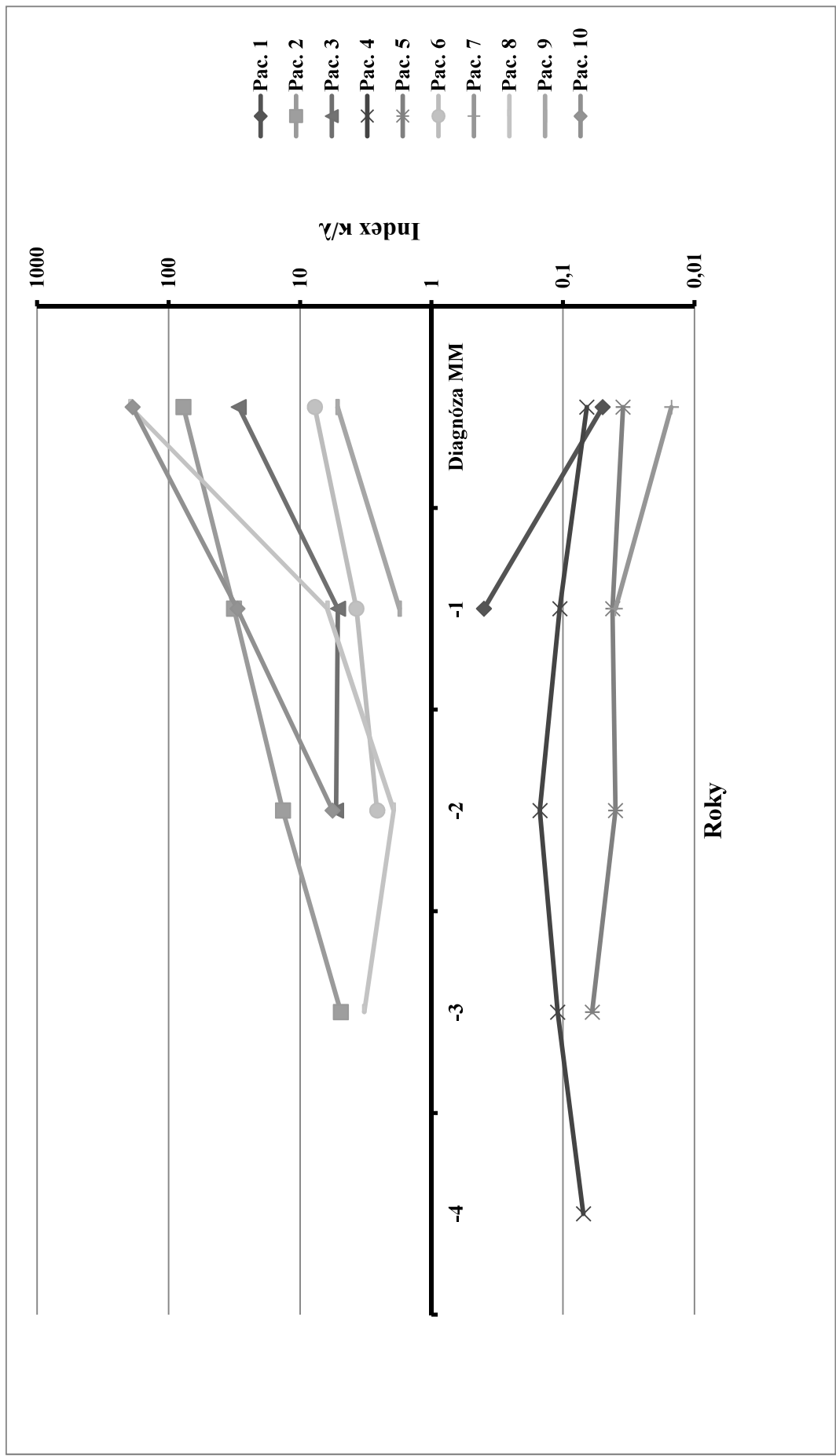
Výsledky analýz a výše zmíněný stratifikační systém byl inkorporován do doporučení IMWG a hladiny VLŘ v séru se stanovením indexu klonality κ/λ by měly být vyšetřeny vždy v době diagnózy nemoci pro stratifikaci nemocných a stanovení optimálního přístupu pro další sledování. Dříve akceptované doporučení publikované J.R. Berensonem předpokládá pravidelné laboratorní sledování hladiny M-proteinu u nemocných v 4-6 měsíčních intervalech po první 1-2 roky a následně v pravidelných 1-2 letých intervalech s ohledem na přítomnost dalších rizikových faktorů (156). Vyšetření VLŘ však nebylo v těchto doporučeních pevně zahrnuto a je bráno jako pomocný údaj pro stanovení rizika progresu. Recentně publikovaná doporučení IMWG R.A. Kylem ale jednoznačně definují přínos nového stratifikačního systému, který by měl být integrální součástí klinické praxe (157). U jedinců s nízkým rizikem není podle těchto doporučení zcela rutinně doporučováno vyšetření kostní dřeně a radiografické vyšetření skeletu, pokud i ostatní parametry (klinický stav, krevní obraz, hodnoty kreatininu a kalcia v séru) svědčí pro MGUS a měli by být znovu vyšetřeni elektroforézou séra po 6 měsících od doby diagnózy a dále pak v pravidelných 2-3 ročních intervalech nebo při klinickém podezření svědčícím pro možný přechod do maligní MG. U jedinců s se středním a vysokým rizikem by mělo být provedeno vyšetření kostní dřeně aspirací a/nebo histobiopsií, optimálně i s použitím technik cytogenetiky, FISH a průtokové cytometrie. Kontrolní elektroforéza séra a kompletní krevní obraz by měli následovat po 6 měsících a dále pak v pravidelných ročních intervalech. V případě jakékoliv změny klinického stavu musí ovšem pacient kontaktovat svého lékaře kdykoliv dříve. Pravidelné sledování hladin VLŘ není rutinně doporučeno, ale je známo, že progresu v MM je v naprosté většině případů spojena s nárůstem hladin VLŘ a změnou indexu κ/λ a oba parametry mohou sloužit jako pomocný dynamický ukazatel. Pravidelné stanovení VLŘ je ale jednoznačně nezbytné v případě MGUS s izolovanou přítomností lehkých řetězců, pro možnou transformaci v BJ-MM, nebo jinou maligní MG s přítomností lehkých řetězců. V těchto situacích je doporučeno pravidelné sledování hladin VLŘ v 6 měsíčních intervalech od diagnózy a dále pak v pravidelných ročních intervalech (158). Přínos IMWG algoritmu byl ověřen prací publikovanou G. Bianchi (159).



Graf 1. Sérové hladiny volných lehkých řetězců u monoklonální gamapatie nejistého významu (MGUS) (n = 191).



Graf. 2. Nárůst hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu κ resp. λ u 10 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu v průběhu transformace v mnohočetný myelom.



Graf 3. Nárůst resp. prohloubení indexu κ/λ volných lehkých řetězců imunoglobulinu u 10 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu během transformace v mnohočetný myelom.

6.2 Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u mnohočetného myelomu

6.2.1 Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u mnohočetného myelomu

Úvod

Mnohočetný myelom (MM) je zhoubné hematologické onemocnění charakterizované klonální proliferací a akumulací neoplasticky transformovaných elementů terminální fáze diferenciaci B-lymfocytů v kostní dřeni, s produkcí monoklonálního imunoglobulinu (MIG), detekovatelného v séru a/nebo v moči a provázeným orgánovým postižením definovaným zkratkou CRAB (hyperkalcémie, renální nedostatečnost, anémie a kostní postižení). Kromě kompletních molekul monoklonálního imunoglobulinu, secernují nádorové plazmocyty rovněž volné lehké řetězce imunoglobulinu, prokazatelné v moči jako Bence – Jonesova bílkovina (2, 5). Nově dostupné stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců významně rozšířilo armamentárium vyšetření používaných v diagnostice a sledování monoklonálních gamapatií (129, 135, 138).

Cílem studie bylo stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců v souboru nemocných s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem, porovnání jejich hladin mezi jednotlivými izotypy myelomu a zhodnocení přínosu u vybraných, méně obvyklých forem MM.

Soubor nemocných

Sledovaný soubor tvořilo 261 pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem, splňujících SWOG i IMWG kritéria, vyšetřených na III. interní klinice v rozmezí let 2004-2009 (5, 14). Popisné charakteristiky sledovaného souboru jsou shrnuty v tab. 10. Sérové hladiny volných lehkých řetězců κ a λ byly stanovovány systémem FreeLite™ (The Binding Site, Birmingham, Velká Británie). Pro statistickou analýzu bylo použito Spearmanovy analýzy a testů dle Kruskal-Wallise a Mann-Whitneyeho. Skupiny (sekrece) κ a λ byly z důvodu recipročního vztahu volných lehkých řetězců hodnoceny samostatně.

Tab. 10: Popisné charakteristiky sledovaného souboru nemocných s mnohočetným myelomem.

Počet: 261

M : Ž: 1,1 : 1

Medián věku: 67 let (32-90)

Typ sekrece:

IgG 164 (62,8%)

IgA 52 (19,9%)

Bence-Jonesův 36 (13,8%)

IgD 3 (1,2%)

Nesekretorický 6 (2,3%)

Typ lehkého řetězce:

κ 163 (62,5%)

λ 92 (35,2%)

Stádium dle Durieho – Salmona:

I 29 (11%)

II 91 (34,9%)

III 141 (54,1%)

A 204 (78,2%)

B 57 (21,8%)

Stádium dle ISS:

I 62 (23,8%)

II 79 (30,3%)

III 120 (45,9%)

Oligosekreční MM (MIG < 10 g/l):

16 (6,1%)

Výsledky

V celém analyzovaném souboru nemocných byly zaznamenány abnormální sérové hladiny dominantního VLŘ u 241 (94,5%) nemocných, přičemž patologické hodnoty indexu klonality κ/λ byly přítomny u 245 (96%) pacientů (graf 4). Suprese hladiny alternativního řetězce byla zaznamenána u 55 (21,5%) pacientů. Při porovnání sérových hladin VLŘ κ resp. λ , hodnoty κ/λ indexu a hladin MIG stanovených elektroforézou, nebyla mezi těmito parametry v obou skupinách prokázána statisticky významná vzájemná závislost – tab. 11, přičemž z analýzy bylo vyloučeno 6 nemocných s nesekretorickou formou myelomu.

Tab. 11. Vzájemná nezávislost sérových hladin volných lehkých řetězců a monoklonálního imunoglobulinu (r = korelační koeficient, p = signifikance, MIG – monoklonální imunoglobulin).

Skupina kappa (n= 163)	MIG
κ	$r = -0,1; p = 0,217$
Index κ/λ	$r = -0,04; p = 0,619$
Skupina lambda (n= 92)	
λ	$r = -0,207; p = 0,051$
Index κ/λ	$r = 0,044; p = 0,683$

Ve skupině „kappa“ byly při vzájemném porovnání výše hladin VLŘ a indexu κ/λ u jednotlivých izotypů sekrece zjištěny signifikantní rozdíly v následujících případech. Nemocní s IgG izotypem vykazovali vyšší hladiny VLŘ κ než jedinci s IgA izotypem ($p = 0,002$), avšak tento rozdíl nebyl zaznamenán v hodnotách indexu κ/λ . Pacienti s IgA a IgG izotypem onemocnění vykazovali v souladu s očekáváním významně nižší hladiny VLŘ κ ($p < 0,0001$ a $p < 0,0001$) i hodnoty indexu κ/λ ($p = 0,0002$ a $p = 0,001$) ve srovnání s B-J formou myelomu (graf 5). Rozdíly v hladinách alternativního řetězce λ nebyly zaznamenány ($p = 0,199$).

Ve skupině „lambda“ statistická analýza prokázala významně nižší hladiny VLŘ λ ($p = 0,017$ a $p = 0,001$) a vyšší hodnoty indexu κ/λ ($p = 0,043$ a $p = 0,001$) u izotypů IgA a IgG ve srovnání s B-J formou myelomu (graf 6). Rozdíly v hladinách alternativního řetězce κ opět nebyly zaznamenány ($p = 0,524$).

Diskuze

Je známo, že míra sekrece molekul MIG a VLŘ je u myelomových plazmocytů velmi variabilní a odráží vnitřní, nitrobuňkové charakteristiky nádorového klonu (128). Procento patologie hladin volných lehkých řetězců (94,5%) a indexu κ/λ (96%) zjištěné v našem souboru jednoznačně odpovídá závěrům prací publikovaných dříve, uvádějící míru patologie hladin VLŘ 95 – 96% a v případě indexu κ/λ 94 – 96,8% (160, 161, 162, 163). Nicméně stejně jako v našem případě, i v těchto studiích velmi malé procento nemocných vykazovalo normální hladiny VLŘ i indexu κ/λ , přičemž se vždy jednalo o nemocné s přítomností kompletních molekul MIG a to izotypů IgA, IgG a velmi vzácně IgD. Výše hladin VLŘ byla v našem souboru signifikantně vyšší u nemocných s izotypem IgG nežli u IgA izotypu, avšak pouze ve skupině se sekrecí lehkého řetězce κ . V obou skupinách však nebyly zaznamenány rozdíly v hodnotách indexu κ/λ . Tato skutečnost do jisté míry odporuje práci Meada et al., jenž nacházel vyšší hladiny VLŘ u izotypu IgA nežli IgG (160). Stejně jako v našem případě, koncentrace VLŘ izotypů IgA a IgG nepřevyšovaly hladiny u B-J formy myelomu, a které byly srovnatelné pouze se vzácným IgD izotypem.

Výše uvedená analýza rovněž potvrdila tu skutečnost, že hladiny VLŘ nekorelují s hladinami intaktního monoklonálního imunoglobulinu, což je plně v souladu s výsledky předchozích prací a je tedy nutno zdůraznit, že koncentrace VLŘ jsou nezávislým parametrem charakterizujícím nádorový proces u mnohočetného myelomu (160, 164).

Samotné hladiny VLŘ a hodnota indexu κ/λ stanovené v době diagnózy nemoci mají významný prognostický dopad. V práci zahrnující 94 pacientů s MM publikované Kyrtonisovou et al., nemocní s hodnotami indexu $\kappa/\lambda < 0,02$ a $> 3,6$ vykazovali 5-leté přežití 30% oproti 82% u ostatních nemocných (165). Snozková et al. ve své práci čítající 790 nemocných zjistila, že nemocní s hodnotou indexu κ/λ v rozmezí $< 0,03$ a > 32 přežívali jednoznačně déle než nemocní s výraznou patologií hodnoty indexu mimo toto rozmezí (30 vs. 39 měsíců) (161). Obě práce následně inkorporovaly toto kritérium do systému ISS, což

vedlo k další stratifikaci nemocných a samotný index κ/λ se jevil jako silný prognostický faktor. Limitací obou prací byla jistá nehomogenita terapie MM v obou souborech, zahrnující konvenční režimy s užitím alkylačních látek a kortikoidů, ale i přístupy vysokodávkované terapie. Van Rhee u nemocných léčených protokoly totální terapie, založených na kombinaci nových biologických působků, klasických cytostatik a vysokodávkované terapie zjistil, že nemocní s vysokými hladinami VLŘ (> 750 mg/l) měli významně kratší přežití (24 měsíců) nežli ostatní nemocní (166).

Vzhledem k velmi krátkému biologickému poločasu molekul VLŘ se předpokládalo, že jejich stanovením bude možno vyzorovat časnou reakci na léčbu ev. podchytit časný relaps/progrese onemocnění. Je pravdou, že část prací a kazuistických pozorování tyto předpoklady podporuje (162, 166, 167, 168, 169). Práce Dispenzieri et al. poukazuje na to, že redukce hladin VLŘ ve 2 měsících od zahájení terapie předpovídá míru konečné odpovědi definované hodnotou MIG, ale nemá vliv na celkové přežití či délky doby do progresu u léčených nemocných (162). Naopak Van Rhee et al uvádí, že rychlá redukce vysokých hladin VLŘ terapií svědčí spíše pro agresivní typ onemocnění (166). Pro monitorování efektu terapie není tedy stanovení hladin VLŘ u nemocných s intaktní molekulou imunoglobulinu obecně doporučováno, nicméně stanovení hladin VLŘ je využíváno k potvrzení stringentní kompletní remise (sCR) (29). Stringentní kompletní remise je definována jako nepřítomnost monoklonálního imunoglobulinu v séru a moči při užití detekčních technik imunofixační elektroforézy, nález normální hodnoty indexu κ/λ a nepřítomnost klonální myelomové populace v kostní dřeni definované imunohistochemicky, imunofluorescenčně či s pomocí multiparametrické průtokové cytometrie (29, 155). Z práce publikované Kumarem et al. vyplývá, že nemocní s imunofixační negativitou séra a moči po terapii, ale s abnormálními hodnotami indexu κ/λ vykazovali kratší přežití nežli nemocní s hodnotami indexu v mezích normy (170). Role sCR není zatím zcela úplně jasná a je potřeba dalších prací k posouzení vlivu hladin VLŘ na hloubku remise a zejména k posouzení převahy přínosu sCR nad CR (171, 172, 173, 174, 175). Další otázku taktéž vyvolává fakt, že v případě dosažení kompletní remise bývá často tranzientní přítomnost mono-/ oligoklonálních proužků, velmi často značící robustní remisi, přičemž zde až v 72% bývá přítomna patologie indexu κ/λ (176, 177, 178, 179, 180).

Stanovení hladin VLŘ v době relapsu/progrese není rutině doporučováno, ale známo, že vyšetření VLŘ dokáže podchytit nemocné relabující formou „light-chain escape“ fenoménu (155). Jako „light-chain escape (LCE)“ fenomén, tedy „únik“ nebo „průlom“ je označován

stav, kdy se relaps/progrese onemocnění vyznačuje masivní produkcí VLŘ detekovatelných v séru a/nebo v moči, avšak bez adekvátního nárůstu hladiny M-proteinu (181) (graf 7). Termín LCE byl poprvé použit J.R. Hobbsem, který popsal detekci LCE fenoménu v moči u části relabujících nemocných (182). V odborné literatuře jsou popisovány 2 typy LCE fenoménu: 1. Pravý typ – definovaný jako nárůst v hladinách VLŘ se stabilní nebo klesající hladinou M-proteinu a 2. parciální typ – definovaný jako masivní nárůst hladin VLŘ, avšak pouze s nízkým nárůstem hladiny M-proteinu (181). Vysvětlením pro tento fenomén je pravděpodobně přítomnost duální plazmocytární populace v kostní dřeni s jednou, produkující převážně kompletní molekuly M-proteinu, a s druhou, většinou méně diferencovanou, produkující ve vysoké míře převážně lehký řetězec imunoglobulinu. V době relapsu/progrese s možnou dediferenciací nádorového klonu dochází ke změně poměru nádorové populace v kostní dřeni ve prospěch klonu produkujícího pouze lehké řetězce, jak bylo demonstrováno pomocí dvojitých imunohistochemických technik (183). LCE fenomén je typický zejména pro nemocné s izotypem IgA, ale byl popsán již i u omezeného počtu nemocných s izotypem IgG, avšak většinou v jeho parciální formě (184, 185).

6.2.2 Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u nesekretorické formy mnohočetného myelomu

Pro identifikaci 6 nemocných se vzácnou nesekretorickou formou myelomu bylo použito IMWG kritérií: 1. absence M-proteinu v séru a/nebo v moči při imunofixačním vyšetření, 2. klonální plazmocytoza kostní dřeně $\geq 10\%$ nebo histologicky verifikovaný plazmocytom, 3. přítomnost ROTI (5). U 3 nemocných byla zjištěna elevace hladin VLŘ κ , u 1 nemocného řetězce λ , ve všech případech spolu se změnou indexu κ/λ mimo referenční mez. U 1 nemocného byly zjištěny normální hladiny obou VLŘ včetně κ/λ indexu, 1 nemocný vykazoval dokonce supresi hladin obou lehkých řetězců, rovněž s normální hodnotou κ/λ indexu. U 4 nemocných dosahovaly hladiny dominantního řetězce > 100 mg/l, umožňující pravidelné sledování nemoci (tab. 12, graf 8).

Tab. 12. Sérové hladiny volných lehkých řetězců u nemocných s nesekretorickou formou mnohočetného myelomu v době diagnózy nemoci.

Pacient:	κ (mg/l)	λ (mg/l)	Index κ/λ
1. 1948	274	6,3	43
2. 1944	5,53	17	0,3
3. 1945	10,3	222,6	0,05
4. 1931	112	21,2	5,3
5. 1942	520	9,2	58,51
6. 1937	2,92	3,22	0,91

Incidence nesekretorické formy myelomu v našem souboru odpovídá sestavám jiných autorů, avšak která se s nástupem citlivějších a dokonalejších technik stanovení M –proteinu stává stále méně obvyklou. První zkušenosti se stanovením volných lehkých řetězců u NSMM publikoval Drayson et al., v jehož souboru 28 nemocných s NSMM 19 nemocných (68%) vykazovalo elevaci κ nebo λ řetězce se změnou κ/λ indexu, 4 nemocní vykazovali supresi jednoho nebo obou řetězců a 5 nemocných vykazovalo normální hladiny volných lehkých

řetězců i κ/λ indexu (186). Ve studii publikované později Katzmannel et al. bylo vyšetřeno 20 nemocných s NSMM, z toho 5 vyšetřených v době záchytu onemocnění a 15 nemocných již během terapie (153). Ve skupině jedinců vyšetřených v době diagnózy byla zaznamenána ve všech případech abnormalita volných řetězců a zejména κ/λ indexu (100% abnormalita). Ve skupině nemocných v terapii byla pozitivita testu již jen 60%. V námi studovaném souboru byla pozitivita hladin volných lehkých řetězců a κ/λ indexu zaznamenána u 4 ze 6 nemocných (66%) vyšetřených při diagnóze MM, což odpovídá závěrům Draysona et al.. Jako velmi důležité je nutné podotknout, že všichni tito 4 nemocní měli hladiny dominantního řetězce vysoce nad hranicí 100 mg/l – což je dle platných kritérií hranice definující měřitelné onemocnění a umožňující tak pravidelné sledování onemocnění nejen během terapie, ale i v době remise/relapsu choroby a omezit frekventní, pro nemocného zatěžující, aspirační či histobiopické vyšetření kostní dřeně (28, 155). Stanovení VLŘ tedy umožňuje přídatně identifikovat sekreci volných lehkých řetězců u dříve, dle konvenčních kritérií definovaného nesekretorického typu MM. Naopak „pravý“ nesekretorický myelom – tedy onemocnění bez imunofixačního průkazu M-komponenty a s negativitou hladin VLŘ se stal raritním onemocněním (~ 1% všech MM) (187).

6.2.3 Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u Bence – Jonesovy formy mnohočetného myelomu

Při detailní analýze 36 nemocných s B-J formou myelomu byla zaznamenána ve všech (100%) případech přítomnost patologie hladin lehkých řetězců i indexu κ/λ , což odpovídá závěrům předchozích studií (188, 189). Samotná diagnóza B-J formy MM je mimo jiné založena na průkazu a kvantifikaci odpadu B-J bílkoviny v moči – což je mnohdy problematické, zejména v případě anurických nemocných, neboť akutní, rozvinutá forma B-J MM bývá často spojena s renální nedostatečností a anurií na podkladě obstrukce tubulů ledviny lehkými řetězci – tzv. odlitkové nefropatie („cast nephropathy“). Samotná exkrece lehkých řetězců do moči je závislá na typu lehkého řetězce a nutnosti překročení reabsorpčního maxima tubulů ledviny, kdy dochází k úniku lehkých řetězců do moči. Proto u části nemocných bývá onemocnění diagnostikováno až v pokročilém stádiu (128). Exkrece lehkých řetězců ledvinami je taktéž ovlivněna renálními funkcemi a proto pro výše uvedené důvody, lze vzájemnou závislost hladin VLŘ v séru a koncentracemi B-J bílkoviny v moči nalézt pouze u části nemocných, což bylo shledáno i u některých našich nemocných, kteří byli následně sledováni a léčeni na našem pracovišti (graf 9) (189, 190, 191). Stanovení VLŘ dovoluje kvantifikovat i velmi nízké koncentrace po úspěšné chemoterapii, které by již při vyšetření moči nebylo možno detekovat a proto je jako ukazatel minimální reziduální nemoci výhodnější. Stejně tak i v případě relapsu/progrese onemocnění, umožňuje stanovení hladin VLŘ odhalit nárůst dříve, nežli dojde k dosažení koncentrací nutných pro průnik do moči. Dle recentních doporučení IMWG pro diagnostiku monoklonálních gamapatií (kromě AL-amyloidózy) lze vyšetření moči vynechat a nahradit stanovením VLŘ v séru, avšak pro monitorování nemocných s B-J formou MM zůstává stanovení hladin VLŘ rezervované pro nemocné s neměřitelným onemocněním – tedy s exkrecí lehkých řetězců do moči v množství menším než-li 200mg/24 hodin (155, 192, 193, 194).

6.2.4 Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u IgD mnohočetného myelomu

U 3 nemocných s IgD formou myelomu byly ve všech případech zjištěny vysoce patologické hodnoty VLŘ κ resp. λ s abnormálními hodnotami indexu κ/λ . Vzhledem k velmi nízkým koncentracím MIG, splňujícím kritéria oligosekrečního onemocnění, bylo u 2 nemocných využito stanovení VLŘ pro pravidelné sledování onemocnění, třetí nemocný zmirá v důsledku kardiálního postižení při asociované AL amyloidóze 32 dní od stanovení diagnózy nemoci (tab. 13).

Tab. 13: Sérové hladiny volných lehkých řetězců u nemocných s IgD formou myelomu. (MIG – monoklonální imunoglobulin)

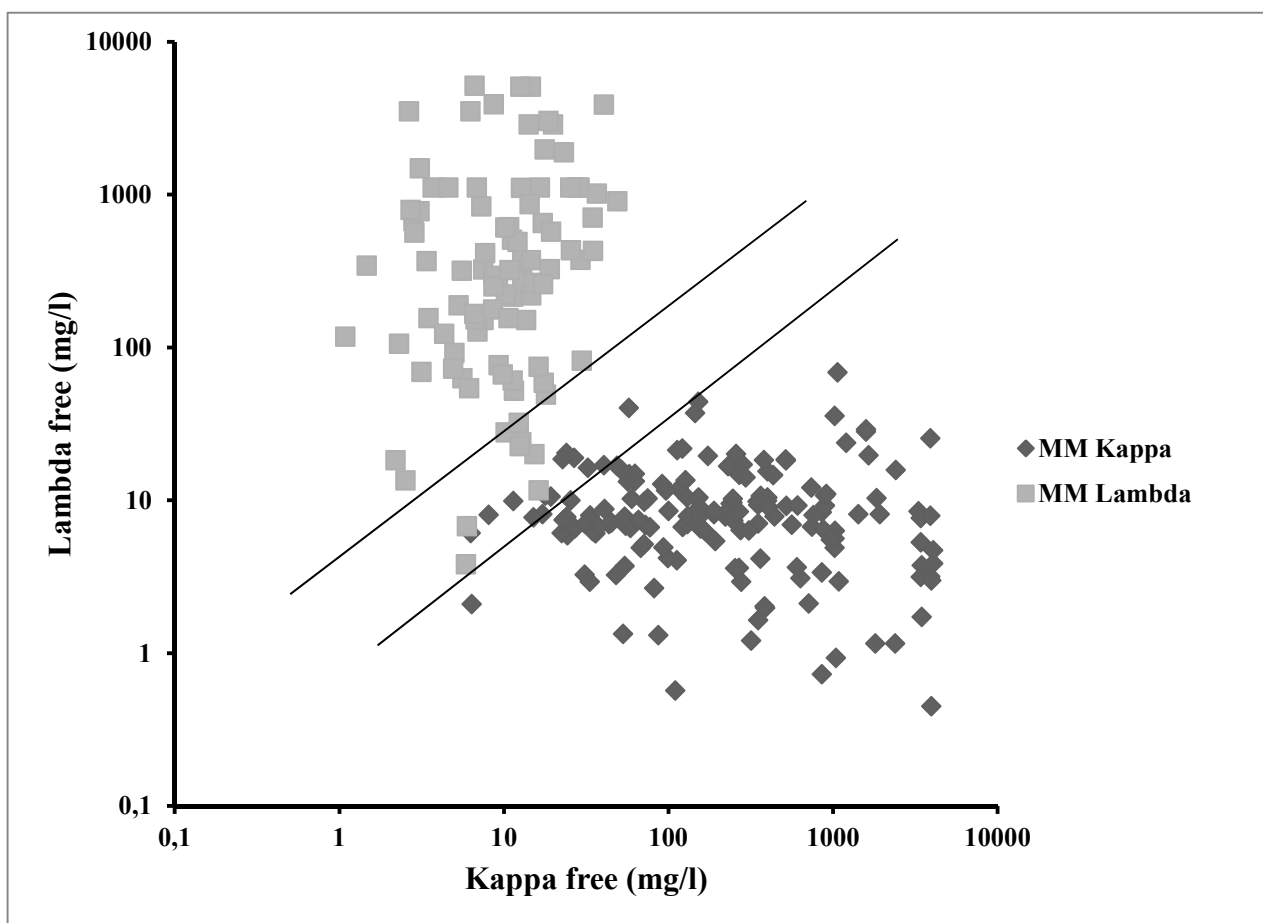
Pacient:	Typ	MIG (g/l)	κ resp. λ (mg/l)	Index κ/λ
1. 1940	IgD-lambda	3,4	1117	0,02
2. 1951	IgD-kappa	13,1	3900	493
3. 1959	IgD-kappa	2,5	3420	642,8

IgD forma myelomu patří mezi nepříznivý typ onemocnění, často spojený s plazmoblastickou morfologií plasmocytů, oligosekrečním charakterem onemocnění s přítomností B-J urie, rezistencí na terapii a velmi často i renálním postižením (195). Stanovení hladin VLŘ umožňuje pravidelné sledování nemocných ve vztahu k průběhu onemocnění s volbou optimální terapie.

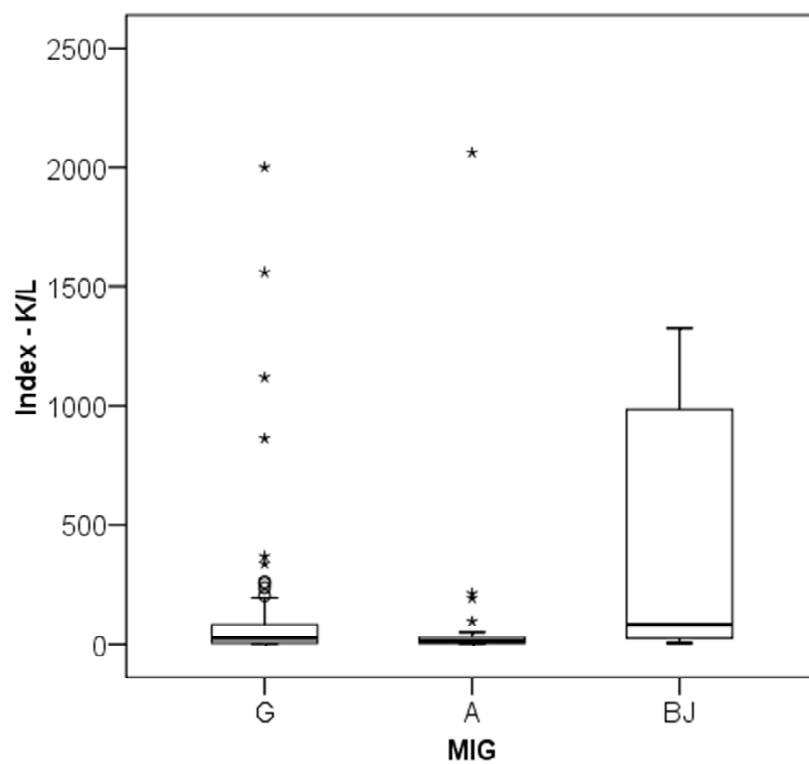
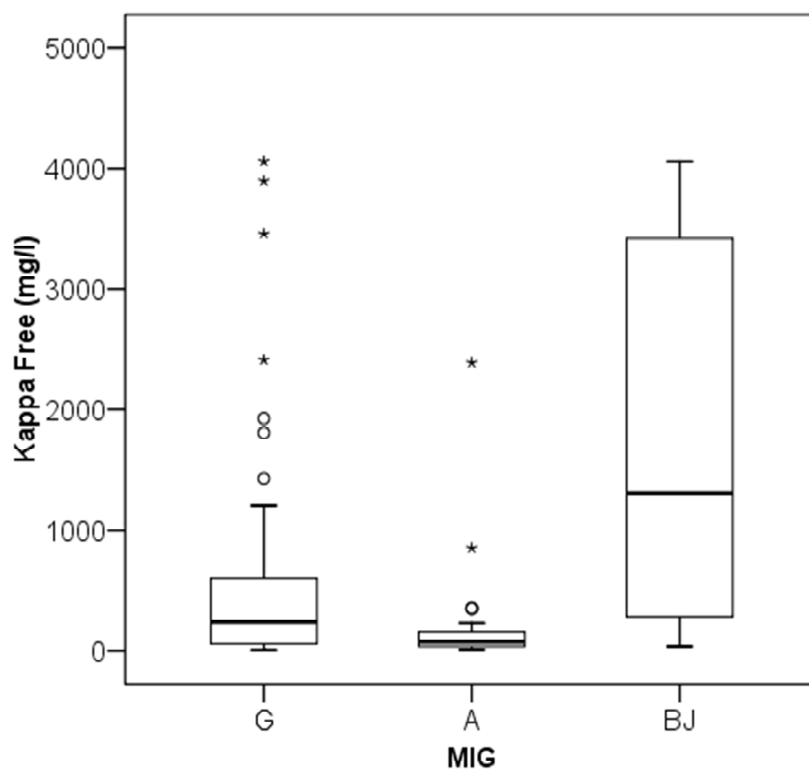
6.2.4 Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u oligosekreční formy mnohočetného myelomu

V celém souboru bylo rovněž identifikováno 16 nemocných s koncentracemi MIG < 10g/l, tedy s oligosekrečním typem onemocnění (28, 155). Koncentrace MIG se u těchto nemocných pohybovaly v rozmezí 1,2 – 9,4 g/l (medián 6,7 g/l). U 14 (87,5%) nemocných byly zachyceny abnormálně elevované hladiny dominantního VLŘ, přičemž u 11 (69%) pacientů dosahovaly koncentrace > 100 mg/l. Patologie indexu κ/λ byla zaznamenána u 15 (94%) nemocných.

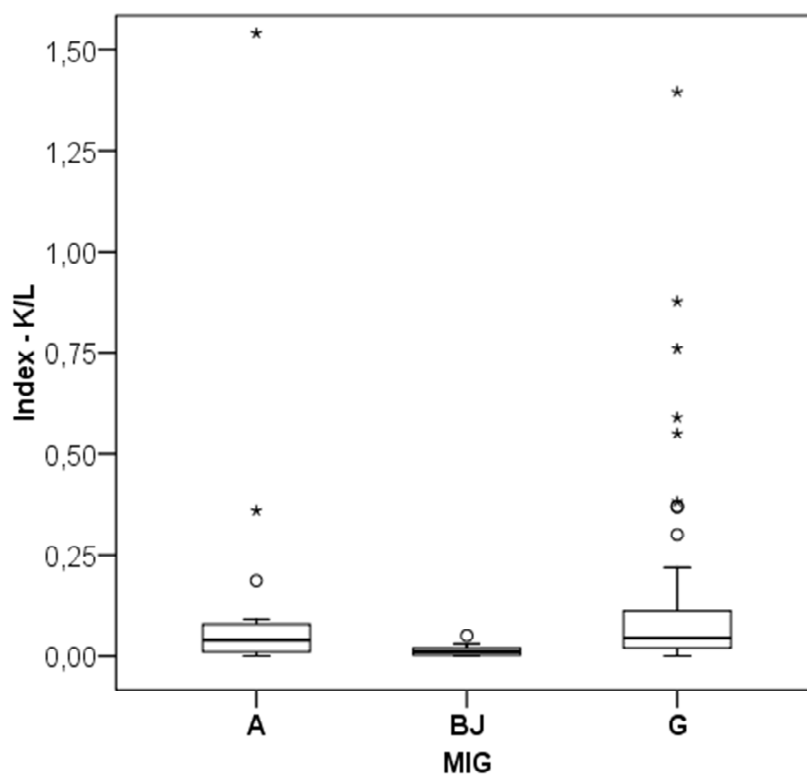
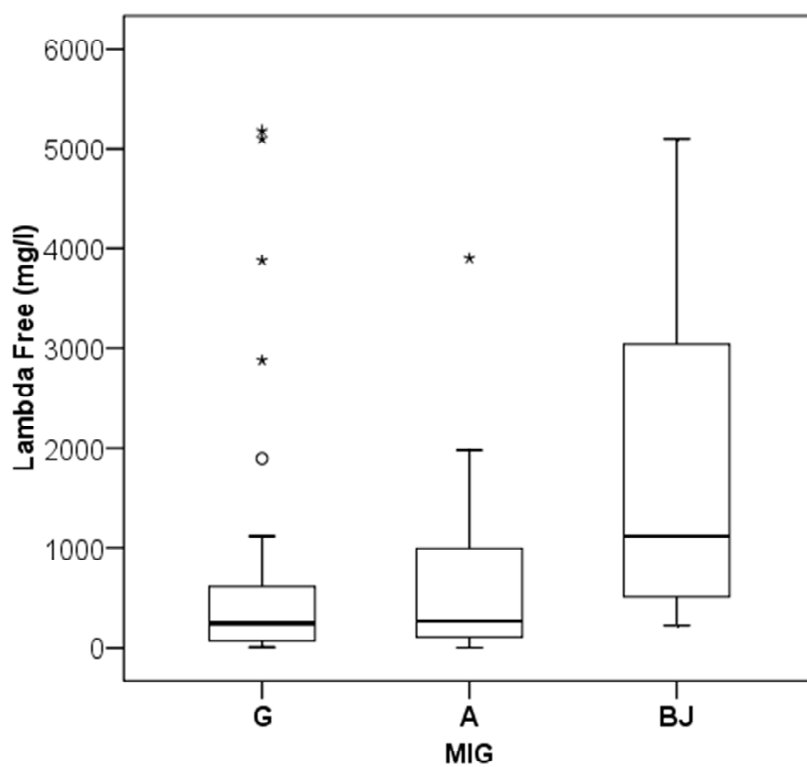
Sledování průběhu onemocnění u pacientů s velmi nízkými koncentracemi MIG je velmi svízelné z důvodů obtížné interpretace změn hladin MIG při reakci na terapii či v době relapsu/progrese choroby. Pokud by bylo užito konvenčních IMWG kritérií pro sekretorické onemocnění, tak by změny (25%, 50%, 90% redukce ev. nárůst) hladiny MIG mnohdy nedosahovaly ani 1 g/l, tedy detekčního limitu elektroforetického vyšetření. Proto byla IMWG definována léčebná kritéria pro oligosekretorické onemocnění s využitím stanovení VLŘ v séru. Jako měřitelné onemocnění je pokládán stav, kdy hladiny VLŘ v séru dosahují ≥ 100 mg/l spolu s abnormálním indexem κ/λ (28, 155). Parciální remise je definována 50% poklesem hodnoty v rozdílu hladin mezi dominantním a alternativním lehkým řetězcem, naopak progrese je definována jako 50% nárůst. Stringentní kompletní remise je definována stejně jako u sekretorického onemocnění, tedy negativita imunofixační elektroforézy, normální index κ/λ a absence klonální populace v kostní dřeni (155). V našem případě bylo možno využít hladin VLŘ u 2/3 nemocných s oligosekretorickým onemocněním, což by jinak s užitím konvenčních technik bylo velmi obtížné.



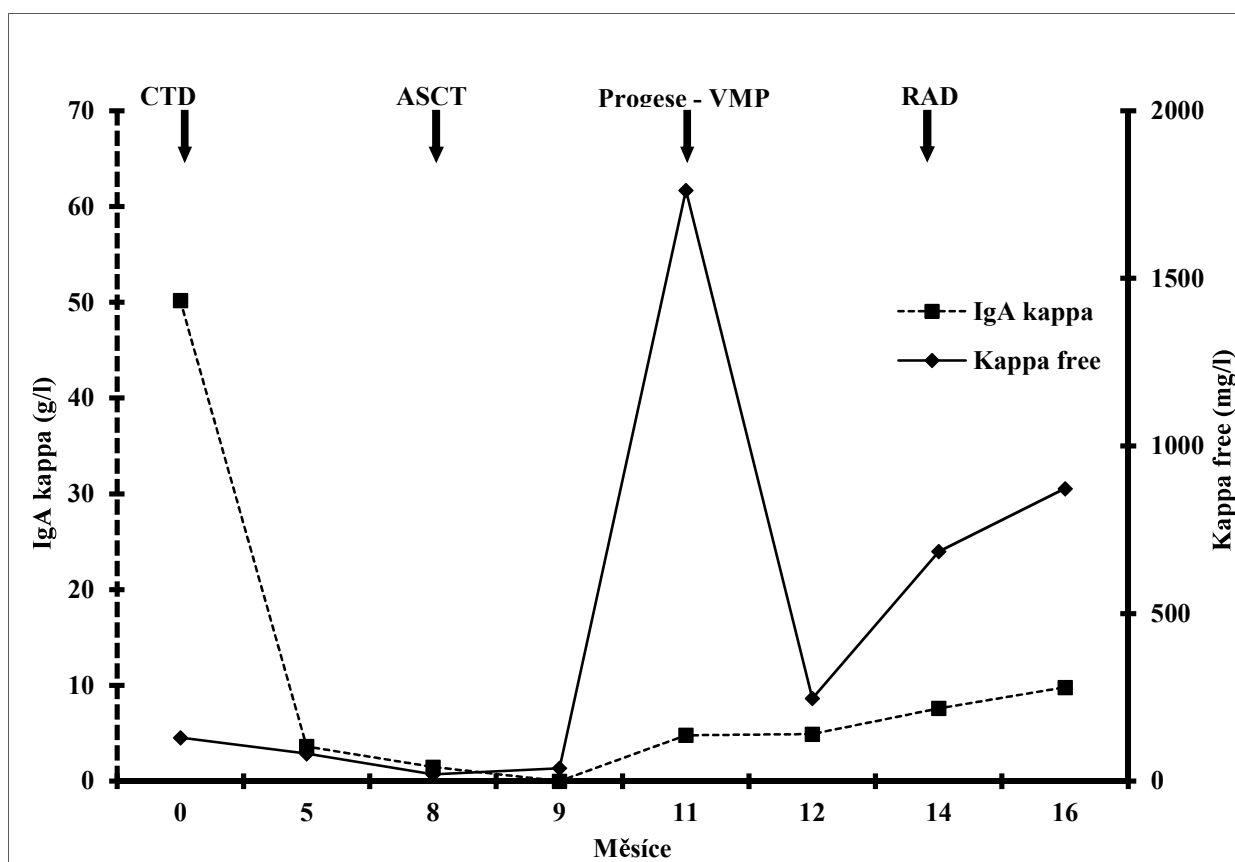
Graf 4. Sérové hladiny volných lehkých řetězců u mnohočetného myelomu (MM) (n = 255).



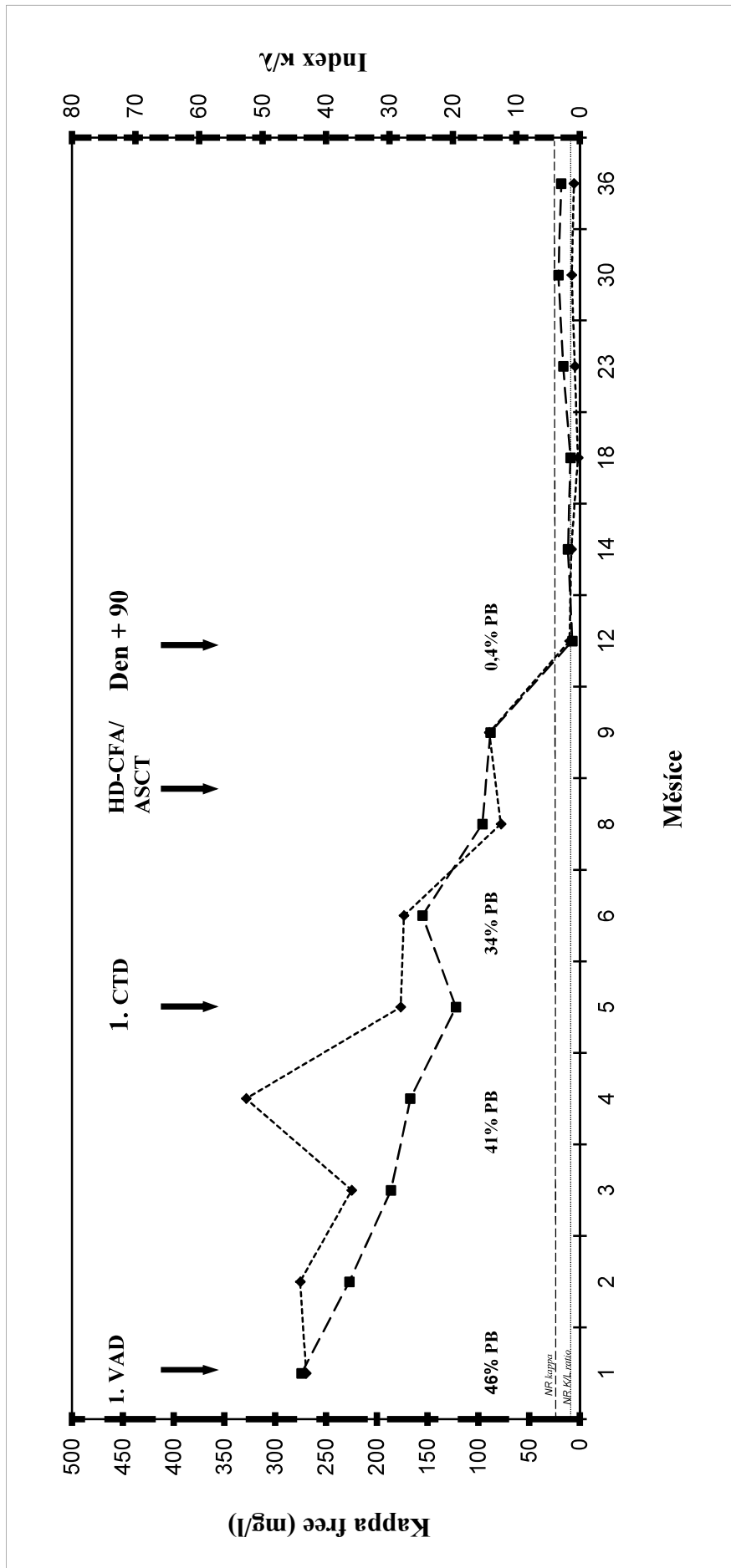
Graf 5. Sérové hladiny volných lehkých řetězců κ a hodnoty κ/λ indexu u izotypů mnohočetného myelomu – skupina „kappa“. (MIG – monoklonální imunoglobulin)



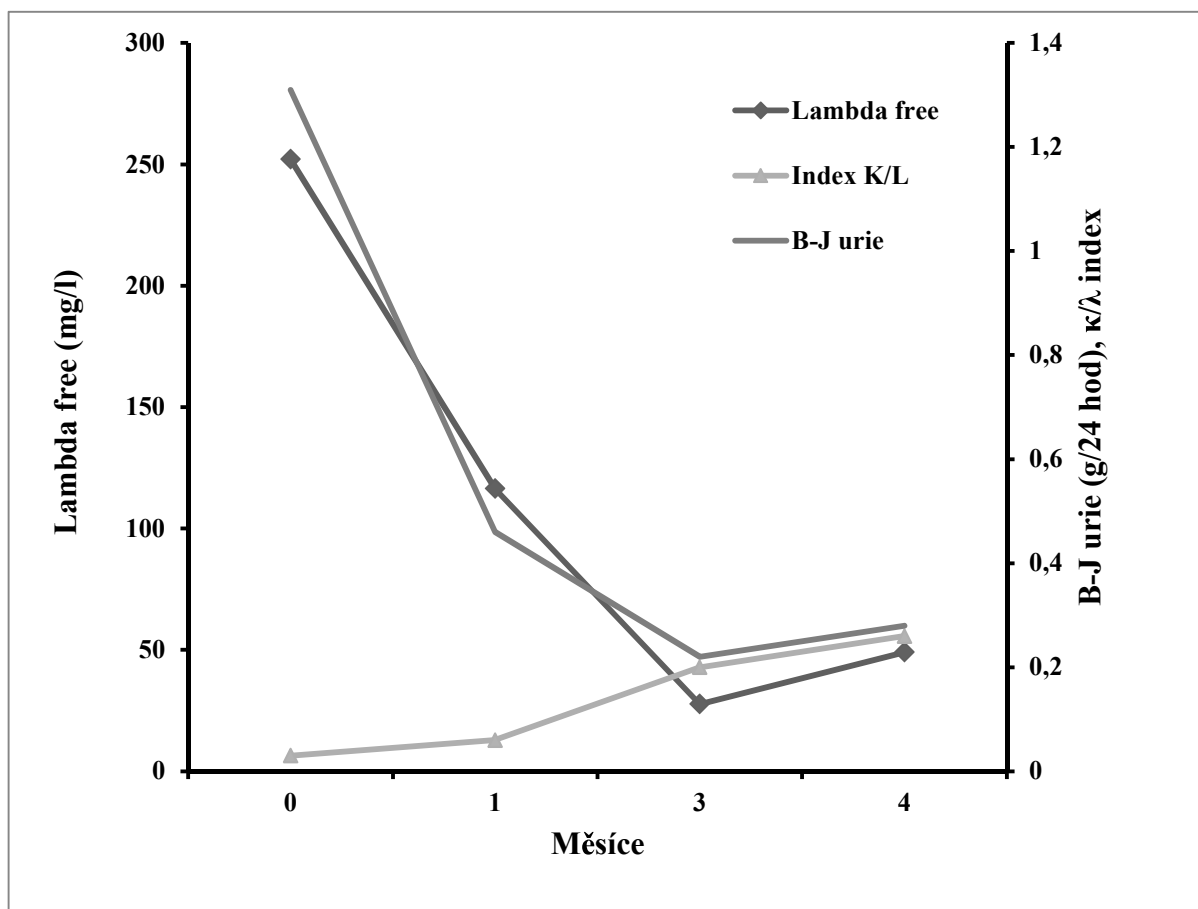
Graf 6. Sérové hladiny volných lehkých řetězců λ a hodnoty κ/λ indexu u izotypů mnohočetného myelomu – skupina „lambda“. (MIG – monoklonální imunoglobulin)



Graf 7. Průběh mnohočetného myelomu IgA kappa, III-A, s progresí formou parciálního „light-chain escape“ fenoménu, srovnání hladiny paraproteinu IgA kappa a volných lehkých řetězců κ (Kappa free). CTD junior (Cyklofosamid, Thalidomid, Dexametazon), ASCT (vysokodávkovaná chemoterapie s podporou autologního štěpu), VMP junior (Bortezomib, Melfalan, Prednizon), RAD (Lenalidomid, Adriablastin, Dexametazon).



Graf 8. Průběh onemocnění hodnocený pomocí hladin volných lehkých řetězců κ (Kappa free) a indexu κ/λ: Nesekretorický myelom (podle konvenčních kritérií), kappa free, léčený vysokodávkovanou terapií s podporou autologního štěpu s následným dosažením kompletní remise. (VAD – Vinkristin, Adriablastin, Dexametazon; CTD – Cyklofosfamid, Thalidomid, Dexametazon; ASCT – autologní transplantace krevetvorných buněk; PB – plazmocyty).



Graf 9. Mnohočetný myelom B-J lambda, II-A, vztah sérových hladin volných lehkých řetězců λ (Lambda free), B-J urie a indexu κ/λ během indukční chemoterapie VAD (Vinkristin, Adriablastin, Dexametazon).

6.3 Přínos sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu v diferenciální diagnostice monoklonální gamapatie nejistého významu a mnohočetného myelomu

Úvod

Odlišení monoklonální gamapatie nejistého významu jako premaligního stavu od mnohočetného myelomu je v některých případech velmi obtížné. Samotné určení správné diagnózy je pro nemocného rozhodující a vyžaduje mnohdy maximální využití všech dostupných vyšetřovacích metod. Kromě tradičních ukazatelů, zakomponovaných v diagnostických kritériích obou stavů, se v poslední době uplatňují i novější metody jako multiparametrická průtoková cytometrie, celotělová magnetická rezonance či pozitronová emisní tomografie (5, 39, 40, 65, 72).

Cílem práce je porovnání sérových hladin volných lehkých řetězců a indexu κ/λ u monoklonální gamapatie nejistého významu a mnohočetného myelomu, jeho iniciálními a pokročilými formami definovanými stádii dle D-S a ISS, se zohledněním možného přínosu metody v diferenciální diagnostice obou stavů.

Soubor nemocných

Vyšetřená sestava zahrnovala 255 nemocných s mnohočetným myelomem podrobně charakterizovaných v kapitole 6.2.1, tedy kompletní soubor, vyjma 6 nemocných s nesekretorickým typem onemocnění. Sledovaný soubor MGUS čítal 166 jedinců s izotypem sekrece IgG, IgA, IgD a B-J formy, charakterizovaných v kapitole 6.1. Údaje jedinců s IgM sekrecí a biklonálním typem postižení nebyly pro analýzu z důvodu rozdílného typu možné transformace (IgM izotyp v naprosté většině transformuje ve Waldenströmovu makroglobulinémii) použity. Sérové hladiny volných lehkých řetězců κ a λ byly stanovovány systémem FreeLiteTM (The Binding Site, Birmingham, Velká Británie). Pro statistickou analýzu bylo použito testu dle Manna-Whitneyeho. Skupiny (sekrece) κ a λ byly z důvodu recipročního vztahu volných lehkých řetězců hodnoceny samostatně.

Výsledky

Hodnoty mediánů a rozmezí zjištěných sérových hladin VLŘ a indexu κ/λ u jednotlivých porovnávaných skupin jsou uvedeny v tab. 14 a 15.

Tab. 14. Skupina „kappa“: mediány a rozmezí sérových hladin volných lehkých řetězců a indexu κ/λ v porovnávaných skupinách.

Skupina	κ (mg/l)	λ (mg/l)	κ/λ index
MGUS (n = 96)	27,8 (5,7 – 1343)	11,8 (2,72 – 180,7)	2,13 (0,07 – 161)
MM (n = 163)	226 (6,3 – 4060)	7,91 (0,45 – 68,7)	25 (1 – 8800)
D-S I (n = 19)	48,8 (15 – 1646)	10,7 (2,95 – 40,2)	4,12 (1,4 – 368)
D-S II+III (n = 144)	238 (6,3 – 4060)	7,8 (0,45 – 68,7)	26,7 (1 – 8800)
ISS I (n = 37)	110 (15,1 – 3960)	7,7 (0,45 – 68,7)	23,3 (1,17 – 8800)
ISS II+III (n = 126)	238,4 (6,3 – 4060)	8,0 (0,73 – 44,1)	25,8 (1 – 2000)

Tab. 15. Skupina „lambda“: mediány a rozmezí sérových hladin volných lehkých řetězců a indexu κ/λ v porovnávaných skupinách.

Skupina	κ (mg/l)	λ (mg/l)	κ/λ index
MGUS (n = 70)	13,5 (5,8 – 119)	20,1 (1,69 – 1721)	0,068 (0,01 – 6,06)
MM (n = 92)	10,7 (1,1 – 48,9)	321 (3,83 – 5180)	0,034 (0 – 1,54)
D-S I (n = 10)	11,2 (2,3 – 40,5)	89,5 (11,6 – 3881)	0,06 (0,01 – 1,4)
D-S II+III (n = 82)	10,7 (1,1 – 48,9)	368 (3,83 – 5180)	0,30 (0 – 1,54)
ISS I (n = 25)	9,9 (2,3 – 29,8)	106,2 (3,83 – 3520)	0,66 (0,001 – 1,54)
ISS II+III (n = 67)	11 (11 – 48,9)	374,8 (18,32 – 5180)	0,028 (0 – 0,76)

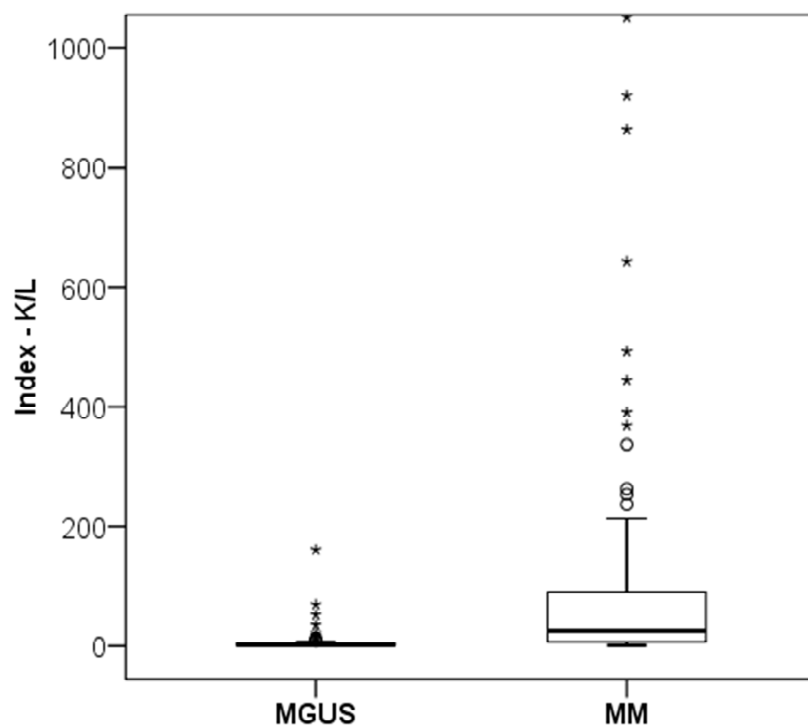
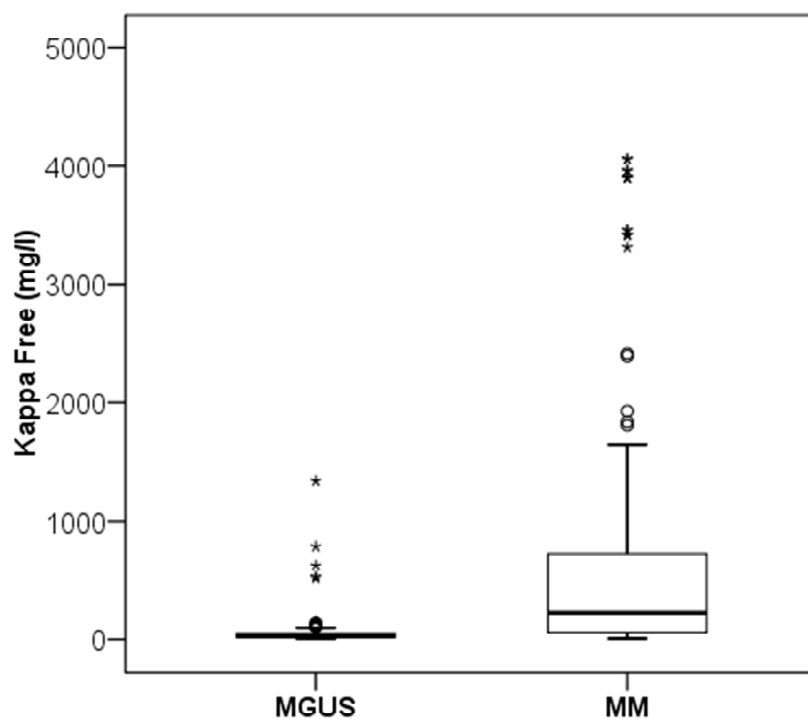
Při srovnání sérových hladin VLŘ a indexu κ/λ byly ve skupině „kappa“ zjištěny následující rozdíly. V souboru jedinců s MGUS byly zjištěny signifikantně nižší hladiny VLŘ κ ($p < 0,0001$) i hodnoty κ/λ indexu ($p < 0,0001$) a vyšší hladiny VLŘ λ ($p < 0,0001$) ve srovnání se souborem nemocných s MM (graf 10). Při srovnání souboru MGUS s iniciálními stádii MM definovanými dle D-S a ISS kritérií (I. stádium), byly v případě MGUS zjištěny významně nižší hladiny VLŘ κ ($p = 0,016$) a indexu κ/λ ($p = 0,023$) nežli u D-S I, v případě ISS I byly rovněž v souboru MGUS zaznamenány nižší hladiny VLŘ κ ($p < 0,0001$), κ/λ indexu ($p < 0,0001$) a vyšší hladiny VLŘ λ ($p < 0,0001$) (graf 11). Při srovnání s pokročilými stádii myelomu (D-S II+III, ISS II+III), byly u jedinců s MGUS v obou analýzách zjištěny významně nižší hladiny VLŘ κ ($p < 0,0001$), κ/λ indexu ($p < 0,0001$) a vyšší hladiny VLŘ λ ($p < 0,0001$).

Ve skupině „lambda“, v souboru jedinců s MGUS byly zjištěny signifikantně vyšší hladiny VLŘ κ ($p < 0,0001$) i hodnoty κ/λ indexu ($p < 0,0001$) a nižší hladiny VLŘ λ ($p < 0,0001$) ve srovnání se souborem nemocných s MM. Při srovnání souboru MGUS s iniciálními stádii MM definovanými dle D-S a ISS kritérií (I. stádium), byly v případě MGUS zjištěny významně nižší hladiny VLŘ λ ($p = 0,031$) a vyšší hodnoty indexu κ/λ ($p = 0,006$) nežli u D-S I, v případě ISS I byly rovněž v souboru MGUS zaznamenány vyšší hladiny VLŘ κ ($p = 0,009$), κ/λ indexu ($p = 0,002$) a nižší hladiny VLŘ λ ($p < 0,0001$) (graf 12). Při srovnání s pokročilými stádii myelomu (D-S II+III, ISS II+III), byly u jedinců s MGUS v obou analýzách zjištěny významně vyšší hladiny VLŘ κ ($p = 0,002$ resp. $p = 0,009$), κ/λ indexu ($p < 0,0001$) a nižší hladiny VLŘ λ ($p < 0,0001$).

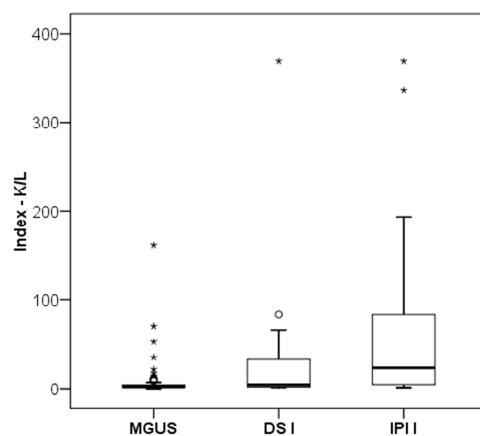
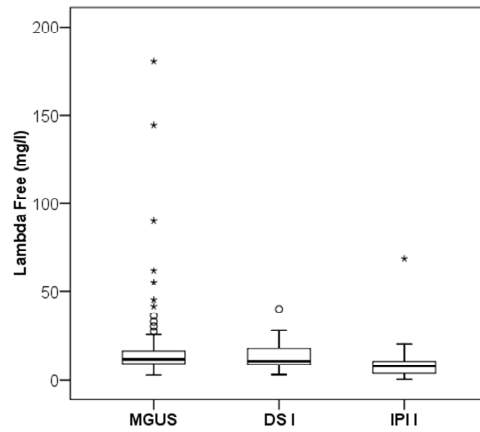
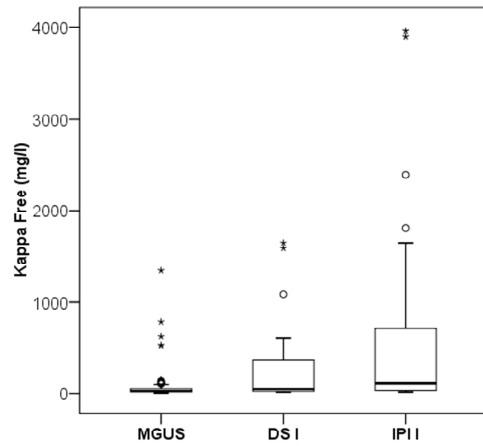
Diskuze

Výše uvedená analýza potvrdila statisticky významné rozdíly v hladinách dominantních VLŘ i indexu κ/λ při srovnání jedinců s MGUS a pacientů s mnohočetným myelomem. Vysoké hladiny VLŘ jsou u nemocných s MM obrazem sekrečního potenciálu nádorových buněk a do jisté míry vyjadřují objem nádorové masy, což je patrné zejména u pokročilých stádií nemoci (127, 128). Nicméně míra sekrece VLŘ plazmocyty je u každého jedince přísně individuální, dána biologickými charakteristikami daného klonu a jak je výše patrné, samotné hladiny VLŘ nenapomáhají v jednotlivých případech spolehlivě odlišit MGUS od MM vzhledem k významnému, vzájemnému překrývání hodnot v obou skupinách. Relativně méně významné rozdíly v hladinách dominantních VLŘ byly zjištěny při srovnání s iniciálním stádiem I dle

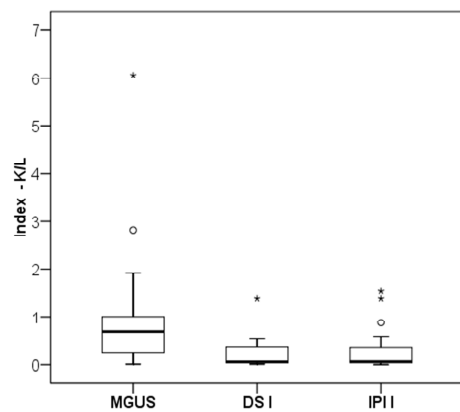
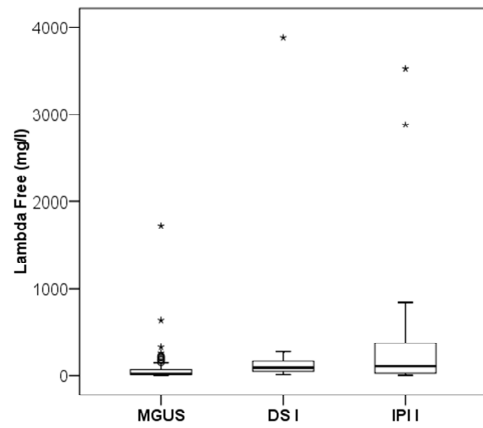
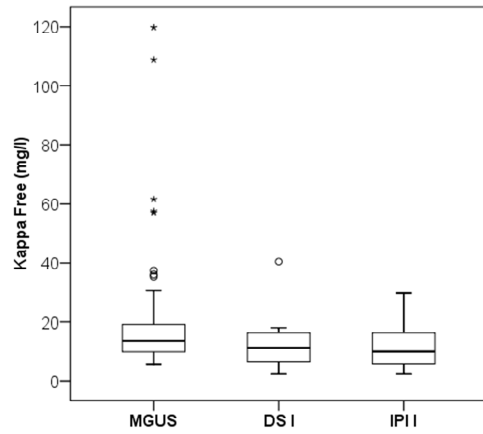
D-S, což jsou jedinci v naprosté většině s doutnajícím, asymptomatickým onemocněním, avšak i v tomto případě stanovení hladin VLŘ k vzájemnému odlišení nepřispívá. V obou skupinách nemocných s MM byla zjištěna významná suprese alternativního řetězce, což souvisí s útlakem reziduální polyklonální plazmocelulární populace nádorovou masou, často registrovanou v poklesu hladin polyklonálních imunoglobulinů. Významná suprese alternativního řetězce však nebyla zaznamenána v případě doutnajícího/asymptomatického onemocnění (D-S I) s minimálním stupněm imunitní parézy. Výsledná dysbalance mezi hladinou řetězce dominantního a alternativního se projevuje ve vzrůstající patologii K/L indexu, který se ve výsledné analýze jevil jako nejcitlivější parametr. Recentní studie uvádějí, že právě míra patologie indexu K/L je jedním z rizikových faktorů možné maligní evoluce monoklonální gamapatie nejistého významu, nezávislé na výši a typu M-proteinu v séru, ale s prognostickým významem i v případě nově zjištěného rozvinutého MM či jeho doutnající, asymptomatické formy (151, 161, 165, 196). S jistou rezervou lze tedy říci, že stanovení hladin VLŘ s výpočtem indexu klonality κ/λ , lze použít jako pomocného ukazatele v rámci ostatních parametrů užívaných k odlišení MM od MGUS, přičemž v případě normálních hladin VLŘ a indexu κ/λ je diagnóza MM nepravděpodobná, nicméně vzhledem k významnému vzájemnému překrývání hodnot k odlišení MGUS od MM nepřispívá.



Graf 10. Srovnání sérových hladin volných lehkých řetězců κ (Kappa free) a κ/λ indexu u jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS) a pacientů s mnohočetným myelomem (MM) – skupina „kappa“.



Graf 11: Srovnání sérových hladin volných lehkých řetězců κ (Kappa free), λ (Lambda free) a κ/λ indexu u jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS) a iniciálními stádii mnohočetného myelomu dle Durieho-Salmona (DS) a International Staging System (IPI) – skupina „kappa“.



Graf 12: Srovnání sérových hladin volných lehkých řetězců κ (Kappa free), λ (Lambda free) a κ/λ indexu u jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS) a iniciálními stádii mnohočetného myelomu dle Durieho-Salmona (DS) a International Staging System (IPI) – skupina „lambda“.

6.4 Vztah sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu ke stupni pokročilosti mnohočetného myelomu

Úvod

Mnohočetný myelom se vyznačuje proliferací a akumulací klonu neoplasticky transformovaných plasmocytů, které v naprosté většině případů produkují monoklonální imunoglobulin prokazatelný v séru a/nebo v moči (1, 2, 5). Kromě kompletních molekul imunoglobulinu produkují plasmocyty také volné lehké řetězce kappa a lambda, které nejsou vázané v molekule MIg a jejichž produkce je asi o 40% vyšší, nežli řetězců vázaných (128). Volné lehké řetězce, běžně stanovované v moči jako Bence – Jonesův protein, jsou v posledních letech nově vyšetřovány v séru kvantitativně s použitím nefelometrické techniky (129). Mnoho autorů potvrdilo, že sérové hladiny VLŘ jsou rozdílné v různých fázích průběhu nemoci (153, 160, 162, 167, 169). Řada sdělení se zabývala vzájemnou korelací hodnot sérových VLŘ s dalšími biochemickými a kinetickými ukazateli choroby, ale zatím však pouze ve velmi omezené míře ve vztahu ke klinickým stádiím nemoci (160, 189, 190, 191).

Cílem předložené studie bylo srovnání hodnot sérových hladin VLŘ κ a λ a jejich vzájemného poměru (κ/λ index) k jednotlivým stádiím nemoci vyhodnocených s pomocí stážovacího systému dle Durieho – Salmona (D-S) a International Staging System (ISS) (21, 23).

Soubor nemocných

Vyšetřená sestava zahrnovala 255 nemocných s mnohočetným myelomem podrobně charakterizovaných v kapitole 6.2.1, tedy kompletní soubor, vyjma 6 nemocných s nesekretorickým typem onemocnění. Sérové hladiny volných lehkých řetězců κ a λ byly stanovovány systémem FreeLite™ (The Binding Site, Birmingham, Velká Británie). Pro statistickou analýzu bylo použito testu dle Manna-Whitneyeho. Skupiny (sekrece) κ a λ byly z důvodu recipročního vztahu volných lehkých řetězců hodnoceny samostatně.

Výsledky

Hodnoty mediánů a rozmezí zjištěných sérových hladin VLŘ a indexu κ/λ v porovnávaných skupinách u jednotlivých stádií obou stážovacích systémů jsou uvedeny v tab.16 a 17.

Tab. 16. Skupina „kappa“: mediány a rozmezí sérových hladin volných lehkých řetězců a indexu κ/λ u jednotlivých porovnávaných stádií stážovacích systémů D-S a ISS.

Skupina	κ (mg/l)	λ (mg/l)	κ/λ index
Stážovací systém D-S:			
D-S I (n = 19)	48,8 (15 – 1646)	10,7 (2,95 – 40,2)	4,12 (1,4 – 368)
D-S II (n = 50)	156 (6,3 – 3900)	8,02 (1,16 – 68,7)	21,5 (1 – 1559)
D-S III (n = 94)	270 (6,4 – 4060)	7,43 (0,45 – 44)	28,7 (1 – 8800)
A (n = 128)	189 (6,3 – 4060)	7,88 (0,45 – 68,7)	23,7 (1 – 8800)
B (n = 35)	283 (33,5 – 4060)	8,13 (1,31 – 35,7)	28,7 (2,9 – 1324)
Stážovací systém ISS:			
ISS I (n = 37)	110 (15,1 – 3960)	7,7 (0,45 – 68,7)	23,3 (1,17 – 8800)
ISS II (n = 51)	348 (6,3 – 3460)	8,0 (0,73 – 21,8)	25,8 (1 – 2000)
ISS III (n = 76)	205 (6,4 – 4060)	7,93 (1,31 – 44,1)	19,9 (1,4 – 1324)

Tab. 17. Skupina „lambda“: mediány a rozmezí sérových hladin volných lehkých řetězců a indexu κ/λ u jednotlivých porovnávaných stádií stážovacích systémů D-S a ISS.

Skupina	κ (mg/l)	λ (mg/l)	κ/λ index
Stážovací systém D-S:			
D-S I (n = 10)	11,2 (2,3 – 40,5)	89,5 (11,6 – 3881)	0,06 (0,01 – 1,4)
D-S II (n = 39)	12,9 (1,5 – 48,9)	368 (3,83 – 5100)	0,04 (0 – 1,54)
D-S III (n = 43)	9,74 (1,1 – 34,76)	378 (6,8 – 5180)	0,02 (0 – 0,876)
A (n = 71)	10,2 (1,1 – 48,9)	222 (3,83 – 5100)	0,049 (0 – 1,54)
B (n = 21)	12,7 (3,7 – 40,5)	1117 (20 – 5180)	0,02 (0 – 0,76)
Stážovací systém ISS:			
ISS I (n = 25)	9,9 (2,3 – 29,8)	106,2 (3,83 – 3520)	0,66 (0,001 – 1,54)
ISS II (n = 26)	10,43 (2,7 – 34,8)	370,9 (32,29 – 2880)	0,03 (0 – 0,382)
ISS III (n = 41)	11,49 (1,1 – 48,9)	640 (18,32 – 5180)	0,02 (0 – 0,760)

Při srovnání jednotlivých stádií dle D-S stážovacího systému byly ve skupině „kappa“ nalezeny statisticky významné rozdíly v hladinách dominantního řetězce κ ($p = 0,037$) a κ/λ indexu ($p = 0,002$) mezi stádii I a III (tab. 18, graf 13). Ve stádiu I byly nalezeny rovněž významně vyšší hladiny alternativního řetězce λ nežli ve stádiu II ($p = 0,04$), resp. III ($p = 0,003$). S přihlédnutím k aktuálnímu stavu renální funkce (podstádium A a B), nebyly zjištěny významné rozdíly v hladinách obou VLŘ i indexu κ/λ . Při srovnání jednotlivých stádií dle ISS stážovacího systému nebyly zjištěny významné rozdíly v hladinách obou VLŘ i indexu κ/λ .

Ve skupině „lambda“ byl při použití stážovacího systému D-S nalezeny významně vyšší hladiny dominantního řetězce λ ve stádiu I nežli III ($p = 0,043$), další významné rozdíly nebyly zachyceny (tab. 19). Při porovnání podstádií A a B, byly v podstádiu A zjištěny významně nižší hladiny dominantního řetězce λ ($p = 0,0001$) a vyšší hodnoty indexu κ/λ ($p = 0,003$) nežli v podstádiu B (graf 14). Při použití systému ISS, byly při porovnání stádia I a III,

nalezeny významně nižší hladiny dominantního řetězce λ ($p = 0,001$) a vyšší hodnoty indexu κ/λ ($p < 0,0001$) ve stádiu I (graf 15). Další rozdíly mezi jednotlivými stádii nalezeny nebyly.

Tab. 18. Skupina „kappa“: porovnání sérových hladin VLŘ κ , λ a κ/λ indexu mezi stádii stážovacích systémů D-S a ISS. (NS – nesignifikantní)

	κ	λ	κ/λ index
Stážovací systém D-S:			
I vs. II	NS	$p = 0,04$	NS
I vs. III	$p = 0,037$	$p = 0,003$	$p = 0,002$
II vs. III	NS	NS	NS
A vs. B	NS	NS	NS
Stážovací systém ISS:			
I vs. II	NS	NS	NS
I vs. III	NS	NS	NS
II vs. III	NS	NS	NS

Tab. 19. Skupina „lambda“: porovnání sérových hladin VLŘ κ , λ a κ/λ indexu mezi stádii stážovacích systémů D-S a ISS. (NS – nesignifikantní)

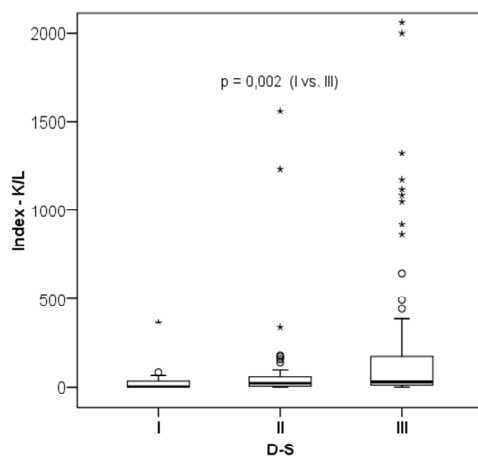
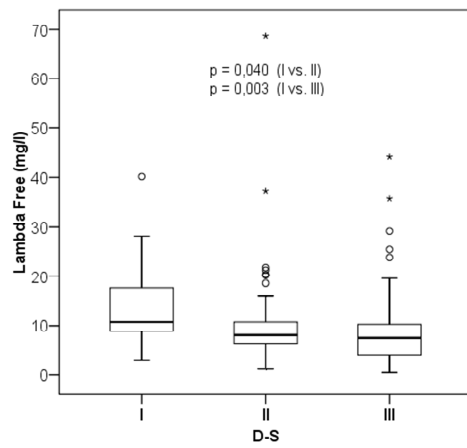
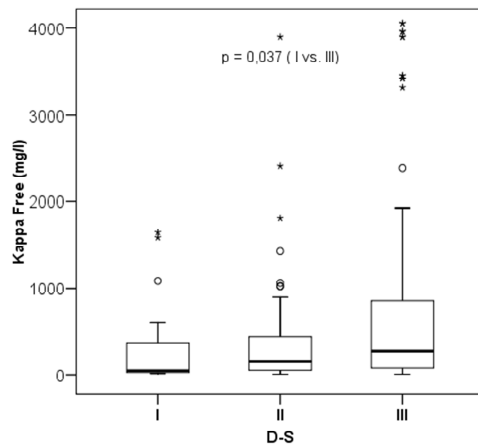
	κ	λ	κ/λ index
Stážovací systém D-S:			
I vs. II	NS	NS	NS
I vs. III	NS	p = 0,043	NS
II vs. III	NS	NS	NS
A vs. B	NS	p = 0,0001	p = 0,003
Stážovací systém ISS:			
I vs. II	NS	NS	NS
I vs. III	NS	p = 0,001	p \square 0,0001
II vs. III	NS	NS	NS

Diskuze

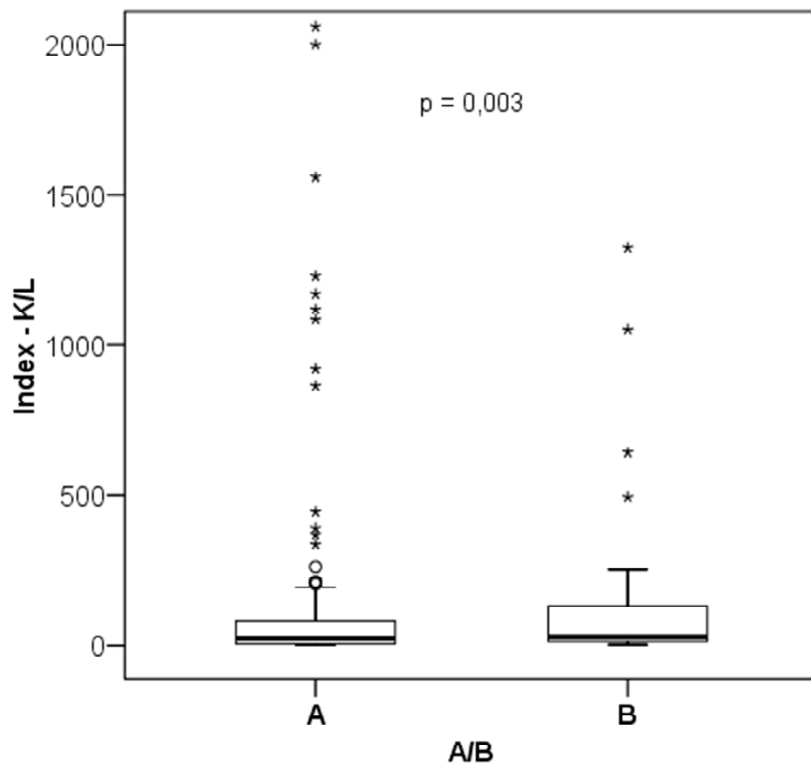
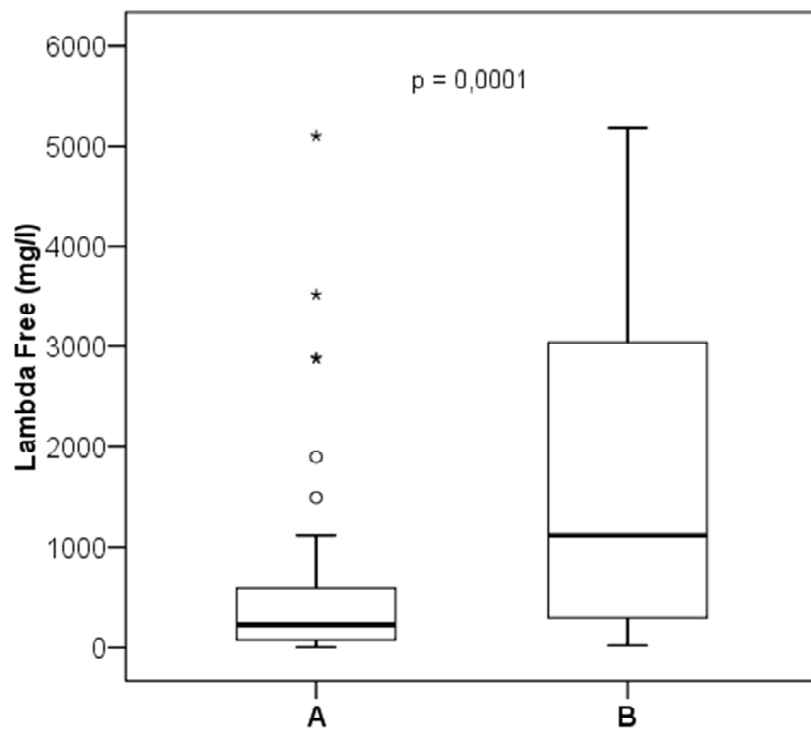
Sérové hladiny VLŘ jsou stejně jako molekuly intaktního imunoglobulinu ukazatelem masy a klonální plazmocelulární proliferace, ale s mnohem výraznější dynamikou (poločas v séru 2-6 hodin) nežli molekuly monoklonálního imunoglobulinu (katabolický poločas IgG ~ 20 dní, IgA ~ 6 dní), avšak je nutné zdůraznit, že míra intenzity sekrece VLŘ nádorovými buňkami je individuální pro každou nádorovou buněčnou linii, charakterizovanou svými vnitřními biologickými vlastnostmi (128). Je známo, že míra sekrece VLŘ se liší u jednotlivých typů MM (IgG, IgA, IgD) a závěry některých prací svědčí i o závislosti na cytogenetické výbavě nádorového klonu (160, 197, 198, 199). Při srovnání sérových hladin VLŘ a κ/λ indexu mezi stádii stážovacího systému D-S byly v našem souboru nalezeny rozdíly pouze mezi stádii I a III, tedy iniciálním a pokročilým onemocněním. D-S systém do jisté míry vystihuje velikost nádorové (buněčné) masy a nalezené rozdíly v hladinách VLŘ tedy odráží i velikost nádorové infiltrace, avšak signifikantní rozdíly v hladinách VLŘ mezi stádii I a II a stádii II a III nebyly nalezeny. Vysvětlením pro tento jev je opět variabilní míra sekrece VLŘ nádorovými plazmocyty jednotlivého klonu (128). Navíc stěžejní kritéria systému dle D-S jsou založena na ukazatelích, odrážející stupeň pokročilosti nemoci s určitou setrvačností a malou

pohotovostí ke změně velikosti nádorové masy. Hodnoty MIG a hemoglobinu odrážejí rozsah nádorové masy reagující na změnu nádorové tkáně s určitou latencí, závislou na dlouhém katabolickém poločase MIG a v případě tíže anémie na době nezbytné k restituci erythropoezy při změnách stupně infiltrace kostní dřeně myelomovými buňkami. Ještě závažnější příčinou je ale praktická nevratnost osteolytického poškození skeletu, činící stážovací systém dle D-S nevhodným k hodnocení ústupu velikosti nádorové masy v případě příznivé odezvy k léčbě (21). Při porovnání sérových hladin VLŘ u nemocných s postižením ledvin (podstádium A a B) byly zjištěny významné rozdíly v hladinách řetězce λ a κ/λ pouze u nemocných se sekrecí dominantního řetězce λ , v případě sekrece κ tyto rozdíly zachyceny nebyly. Jako vysvětlení pro tyto nálezy se nabízí ta skutečnost, že VLŘ λ jsou v séru přítomny v dimerické formě a tudíž jejich clearance oproti monomerickým VLŘ κ je poněkud delší a v případě poškození ledvin se sníženou filtrační schopností glomerulu spolu s poškozením systému tubulů, dochází tedy k nárůstu hladin VLŘ spolu s ovlivněním indexu κ/λ (128,200). Tento nález byl v našem souboru podpořen zjištěním korelací hladin VLŘ λ ($r = 0,472$, $p = 0,0001$) a κ/λ indexu ($r = -0,322$, $p = 0,002$) s hladinami kreatininu ve skupině s dominantní sekrecí λ . Tento nález je však v jistém rozporu se závěry jiných autorů, předpokládající přibližně symetrický nárůst obou VLŘ při renálním postižení s minimálním ovlivněním indexu κ/λ (132, 201).

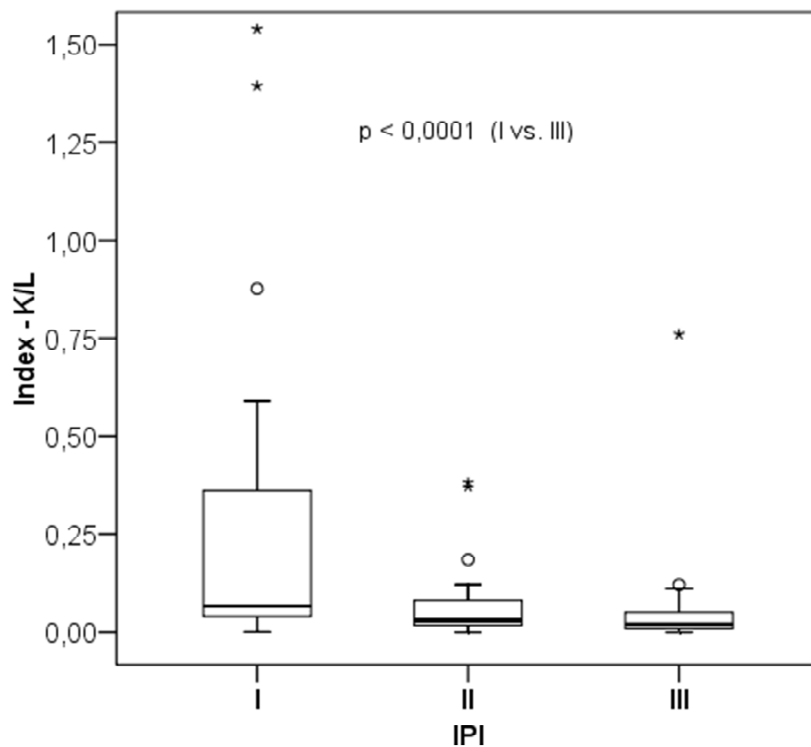
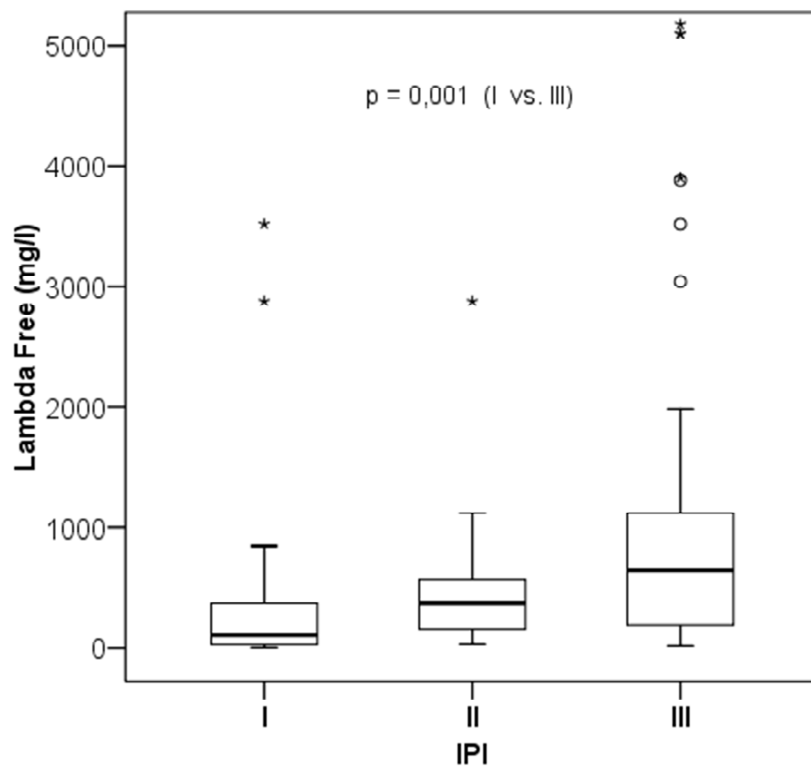
Při provnání sérových hladin VLŘ a jednotlivých stádií MM definovaných dle ISS kritérií nebyly zjištěny významnější rozdíly což podporuje závěry jiných autorů (161, 165). ISS systém je založený na užití hodnot sérového albuminu a β_2 -mikroglobulinu, což jsou poměrně dynamické parametry reflektující změnu rozsahu nádorové tkáně mnohem pružněji nežli ukazatele sloužící jako kritéria stážovacího systému D-S (23). Ačkoliv existoval předpoklad možné souvislosti hladin VLŘ a stádií dle ISS, detailní analýzy tuto hypotézu vyvrátily a stejně jako v našem případě byla potvrzena nezávislost hladin VLŘ a κ/λ indexu a stádií dle ISS (161, 165). Při detailní analýze obou klíčových parametrů ISS systému byla zjištěna vzájemná nezávislost hladin VLŘ a sérového albuminu, což je plně v souladu i s naším pozorováním, kdy nebyla potvrzena vzájemná korelace obou parametrů. β_2 -mikroglobulin, stejně jako hladiny VLŘ, je především ukazatelem nádorové masy, je poměrně rychle vylučován ledvinami a v případě renálního postižení jeho hladiny narůstají, avšak závěry některých prací vypovídají o vzájemné nezávislosti obou těchto parametrů (161, 165). Naopak kombinace systému ISS a hodnot indexu κ/λ má významný prediktivní význam a představuje nový stratifikační model (161, 165, 202, 203).



Graf 13. Srovnání sérových hladin volných lehkých řetězců κ (Kappa free), λ (Lambda free) a κ/λ indexu mezi stádii stážovacího systému dle Durieho – Salmona (D-S) – skupina „kappa“.



Graf 14. Srovnání sérových hladin volných lehkých řetězců λ (Lambda free) a κ/λ indexu mezi podstádii A a B stážovacího systému dle Durieho – Salmona – skupina „lambda“.



Graf 15. Srovnání sérových hladin volných lehkých řetězců λ (Lambda free) a κ/λ indexu mezi stádii stážovacího systému International Staging System (IPI) – skupina „lambda“.

6.5 Vztah sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu a vybraných biologických ukazatelů mnohočetného myelomu

Úvod

Mnohočetný myelom je zhoubné hematologické onemocnění charakterizované nekontrolovanou proliferací a akumulací neoplasticky transformovaných plazmocytů, produkcí monoklonálního imunoglobulinu detekovatelného v séru a/nebo v moči a v různém stupni vyjádřeným orgánovým postižením (hyperkalcemie, renální insuficience, osteolytické kostní léze ev. osteoporóza, anémie, imunodeficit)(1, 2). Kromě kompletních molekul monoklonálního imunoglobulinu, plazmatické buňky produkují rovněž samotné volné lehké řetězce, které nejsou vázány v molekule MIG (126, 128). Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců se za posledních několik let stalo pro svou nezastupitelnou roli součástí algoritmu vyšetření v diagnostice, sledování a hodnocení léčebné odpovědi nejen u nemocných s mnohočetným myelomem, ale i u dalších maligních ev. potencionálně maligních monoklonálních gamapatií (134). Mikroprostředí kostní dřene, ve vztahu k patologické plasmocelulární infiltraci je charakterizováno velmi rozsáhlou sítí mezibuněčných a cytokinových interakcí mezi stromálními buňkami kostní dřene, kostními elementy a samotnými nádorovými buňkami, mající intimní vztah k vlastním biologickým vlastnostem onemocnění (204, 205, 206). Některé méně obvykle sledované biochemické parametry se jeví jako možné budoucí ukazatele nejen případné neoplastické transformace potencionálně maligní monoklonální gamapatie nejistého významu, ale i jejího odlišení od počátečních stádií MM, případně i jako ukazatelů pokročilosti, progresu a sledování léčebné odezvy u nemocných s mnohočetným myelomem (207, 208). Náplní předložené studie je porovnání vztahu sérových hladin VLŘ a vybraných, biologických parametrů u nemocných s mnohočetným myelomem vyšetřených při stanovení diagnózy nemoci.

Soubor nemocných

Vyšetřená sestava zahrnovala 255 nemocných s mnohočetným myelomem podrobně charakterizovaných v kapitole 6.2.1, tedy kompletní soubor, vyjma 6 nemocných s nesekretorickým typem onemocnění. Sérové hladiny volných lehkých řetězců κ a λ byly stanovovány systémem FreeLiteTM (The Binding Site, Birmingham, Velká Británie). Sérové hladiny vyšetřovaných parametrů byly stanovovány následujícími metodami: β_2 mikroglobulin

(β_2m) metodou enzymoimunoneeseje (ELISA, normální rozmezí 0-2,5 mg/l), thymidinkináza (TK) metodou radioenzymatickou (REA, 0-6 IU/l), intercellular C-terminal telopeptide collagen-I (ICTP, m: 2,1-5,0, ž: 2,1-5,6 $\mu\text{g/l}$) a N-terminal peptide procollagen-I (PINP, m: 21-78, ž: 19-102 $\mu\text{g/l}$) metodou RIA; vascular cell adhesive molecule-1 (VCAM, 395-714 ng/ml), intercellular cell adhesive molecule-1 (ICAM, 269-691 ng/ml), solubilní forma IL-6R (IL-6R, 10-90 ng/ml) a solubilní osteoprotegerin (OPG, 3,7-4,4 $\mu\text{mol/l}$) metodou enzymoimunoneeseje; hepatocyte growth factor (HGF, 671-1992 pg/ml), vascular endothelial growth factor (VEGF, 62-707 pg/ml), syndecan-1/sCD138 (Syn-1, 37-123 ng/ml) a Fas antigen (Fas, 4792-1750 pg/ml) byly stanovovány pomocí metody kvantitativní sendvičové enzymatické imunoeseje. Ke statistickému vyhodnocení bylo užito Spearmanovy korelační analýzy. Skupiny (sekrece) κ a λ byly z důvodu recipročního vztahu volných lehkých řetězců hodnoceny samostatně.

Výsledky

Při analýze hladin biologických ukazatelů byly zaznamenány abnormální hladiny β_2m v 95,1%, TK v 58,8%, IL-6R v 68,6%, VCAM v 74%, ICAM v 32,6%, ICTP v 72,7%, PINP v 21% případů; abnormální hladiny (pod i nad normální rozmezí) byly zamenány v případě OPG v 97,3%, HGF v 39,3%, VEGF v 7,7%, Syn-1 v 69,4% a v případě antigenu Fas v 3,8%. Při statistické analýze skupiny „kappa“ byla mezi hladinami dominantního VLŘ κ a FAS zjištěna silná pozitivní korelace, slabá pozitivní korelace byla zjištěna v případě hladin β_2m , TK, ICTP, PINP a HGF. Slabá negativní korelace byla zjištěna v případě IL-6R. V případě hodnocení indexu κ/λ byla prokázána slabá pozitivní korelace s hladinami β_2m , TK, ICTP, PINP, HGF, Syn-1 a Fas (tab. 20) (graf 16, 17).

Ve skupině „lambda“ korelační analýza prokázala středně silnou pozitivní korelaci s ICTP a β_2m , slabou korelaci s hladinami PINP, OPG, HGF, VEGF a Fas. V případě indexu κ/λ byla zaznamenána středně silná negativní korelace s hladinami β_2m , ICTP, PINP, OPG, HGF, Syn-1 a Fas (tab. 21) (graf 18, 19). V obou skupinách nebyla zjištěna vzájemná závislost hladin VLŘ a hodnot sérového albuminu.

Tab. 20. Skupina „kappa“: vztah sérových hladin VLŘ a vybraných biologických ukazatelů mnohočetného myelomu. (NS – nesignifikantní)

	κ	κ/λ index
Korelační koeficient		
Signifikance		
β₂m	0,215 p = 0,006	0,177 p = 0,024
TK	0,216 p = 0,006	0,213 p = 0,007
IL-6R	-0,189 p = 0,04	-0,101 NS
ICAM	0,197 NS	0,161 NS
VCAM	0,161 NS	0,122 NS
ICTP	0,296 p = 0,0001	0,233 p = 0,004
PINP	0,224 p = 0,006	0,192 p = 0,018
OPG	0,017 NS	-0,046 NS
HGF	0,279 p = 0,001	0,309 p = 0,001
VEGF	0,020 NS	-0,064 NS
Syn-1	0,164 NS	0,213 p = 0,015
FAS	0,405 p = 0,0001	0,352 p = 0,001
Albumin	-0,039 NS	-0,023 NS

Tab. 21. Skupina „lambda“: vztah sérových hladin VLŘ a vybraných biologických ukazatelů mnohočetného myelomu. (NS – nesignifikantní)

	λ	κ/λ index
Korelační koeficient		
Signifikance		
β_2m	0,496 p = 0,0001	-0,406 p = 0,0001
TK	0,092 NS	-0,195 NS
IL-6R	0,074 NS	-0,174 NS
ICAM	0,183 NS	-0,172 NS
VCAM	0,239 NS	-0,134 NS
ICTP	0,504 p = 0,0001	-0,364 p = 0,0001
PINP	0,365 p = 0,0001	-0,328 p = 0,002
OPG	0,239 p = 0,044	-0,310 p = 0,009
HGF	0,318 p = 0,004	-0,285 p = 0,011
VEGF	0,220 p = 0,049	-0,095 NS
Syn-1	0,181 NS	-0,291 p = 0,01
FAS	0,345 p = 0,013	-0,363 p = 0,009
Albumin	-0,103 NS	0,115 NS

Diskuze

Výsledky naší studie poukazují na vzájemný vztah hladin sérových VLŘ κ resp. λ a κ/λ indexu a některých vybraných netradičních biologických ukazatelů mnohočetného myelomu. Ačkoliv několik studií publikovaných dříve nepotvrdilo vzájemný vztah sérových hladin VLŘ a β_2m , v našem souboru byla zachycena jistá závislost obou parametrů (161, 165). Vysvětlení pro tuto skutečnost vyplývá nejen z biologických vlastností obou parametrů (nárůst hladin v případě renální insuficience, polymerizace), ale i z okolností, že oba parametry jsou ukazatelem velikosti nádorové masy. Intervalové hladiny β_2m , jako významného prognostického faktoru u MM, jsou součástí nových stážovacích a stratifikačních systémů – ISS a SWOG (22, 23). Analýzy publikované dříve a i naše samotné zjištění (viz kapitola 6.4) nepotvrdilo vzájemnou závislost hladin VLŘ a stádií systému ISS (161, 165). Dalším diskriminujícím parametrem určujícím spolu s hladinami β_2m jsou koncentrace sérového albuminu, přičemž hladiny albuminu jsou zcela nezávislé na koncentracích VLŘ v séru. Lze tedy konstatovat, že ač byla v našem souboru zachycena jistá, slabá, vzájemná závislost hladin VLŘ, indexu κ/λ a sérových hladin β_2m , nebyl prokázán vztah ke stádiím ISS systému a lze tyto parametry (systém ISS a hladiny VLŘ) považovat za vzájemně nezávislé. Je známo, že kombinace systému ISS a indexu κ/λ vykazuje aditivní prognostický význam oproti samotnému ISS (161, 165, 202, 203).

Sérová thymidinkináza bývá, ač se jedná o relativně nespecifický proliferační ukazatel, zvýšená u aktivního onemocnění a její vysoké hladiny jsou často spojeny s agresivním, často i extramedulárním průběhem onemocnění a bývá rovněž asociována s méně diferencovaným, anaplastickým a rychle proliferujícím buněčným fenotypem (209). Proto zachycený vztah VLŘ a hladin TK může být vysvětlen právě spojitostí s vyšším sekrečním potenciálem VLŘ u méně diferencované buněčné populace s aktivní, pokročilou formou nemoci. Navíc je nutno podotknout, že byl zaznamenán vztah sérových hladin VLŘ a stádií stážovacího systému OLOMOUC, u kterého jsou užity kromě hladiny β_2m i sérové hladiny TK (210, 211).

Zjištěný vztah parametrů kostního obratu ICTP, PINP a částečně i OPG a hladin VLŘ, lze rovněž vysvětlit vztahem těchto ukazatelů nejen ke stupni kostního postižení, ale i k pokročilosti a prognóze onemocnění (212, 213, 214, 215, 216, 217, 218). Ačkoliv stejně jako hladiny VLŘ jsou i tyto parametry do jisté míry ovlivněny renálními funkcemi, přesto byla zjištěna poměrně výrazná korelace i se samotným indexem κ/λ .

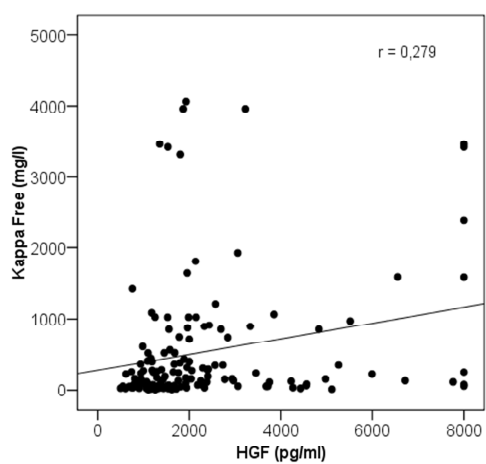
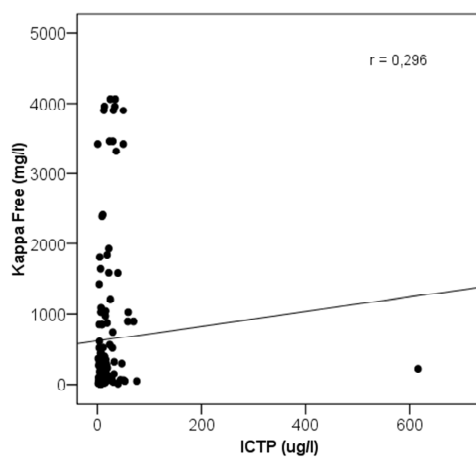
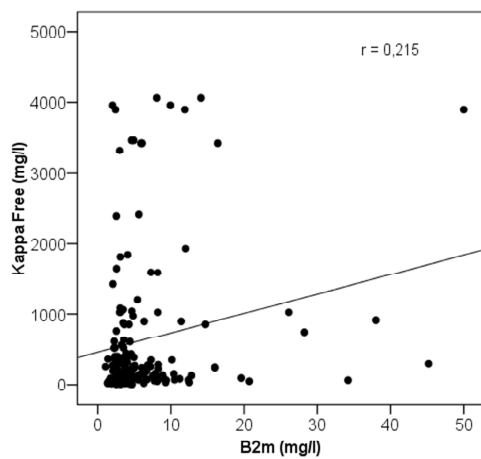
V případě hladin Syn-1 byl zjištěn zcela minimální vztah k hodnotám indexu κ/λ , což potvrzuje unikátnost tohoto méně obvyklého parametru. Syndecan-1 je proteoglykan, který je

uvolňován z povrchu žijících maligních plazmocytů, podílející se ve velké míře na procesu proliferace a apoptózy nejen nádorových, ale i kostních buněk a s tím související kostní postižení. Ve značné míře ovlivňuje přímo i nepřímo cytokinovou síť v podmínkách mikroprostředí kostní dřeně (219, 220, 221). Jedná se o jednu z nejdůležitějších molekul v patobiologii mnohočetného myelomu (222, 223). Syndecan-1 se jeví jako nový, důležitý prognostický ukazatel, rovněž i jako podpurný parametr pro odlišení monoklonální gamapatie nejistého významu od mnohočetného myelomu (207, 224, 225).

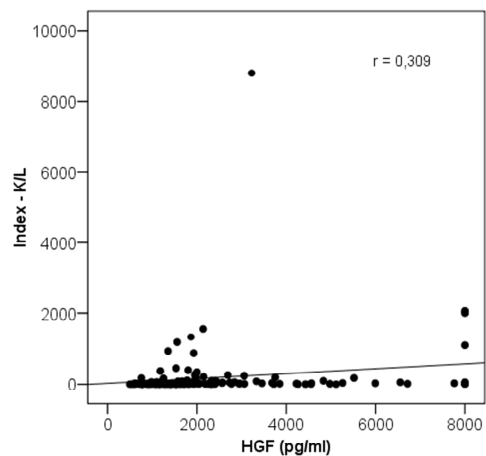
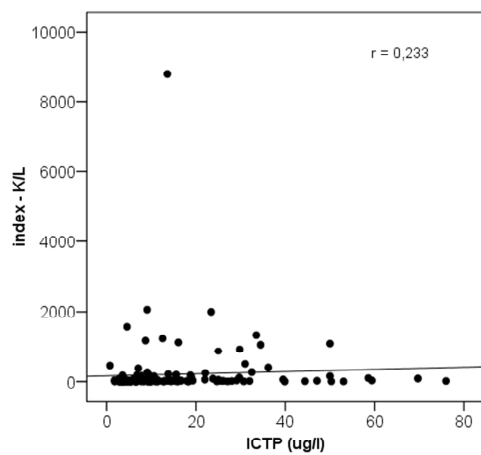
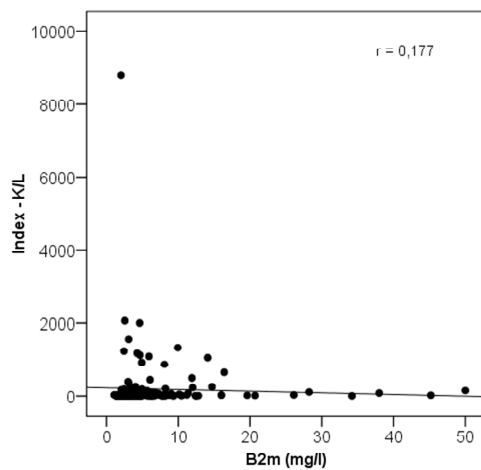
Jako velmi přínosné lze pokládat zjištění vzájemných významných závislostí hladin VLŘ κ , λ i κ/λ indexu a hladin HGF. HGF je jeden z nejdůležitějších cytokinů produkovaných myelomovými buňkami a má vliv na neoangiogenezu, proliferaci epiteliálních buněk a aktivaci osteoklastů a s tím související rozvoj kostního postižení (226, 227, 228). HGF má zpětnovazebný vliv na proliferaci a diferenciaci plazmocytů a jeho hladiny korelují s tíží nemoci (229). Některé práce poukazují na možnost využití sérových hladin HGF jako pomocného faktoru pro stanovení aktivity, progresu, remise či pro predikci léčebné odpovědi (230, 231).

Zjištěný vztah hladin VLŘ, κ/λ indexu a hladin Fas má v současnosti spíše akademický význam, který bude dále sledován. Solubilní Fas antigen je významnou součástí antiapoptotických mechanismů, podílejících se na immortalitě nádorové buněčné linie a patogeneze anémie u myelomu (232, 233).

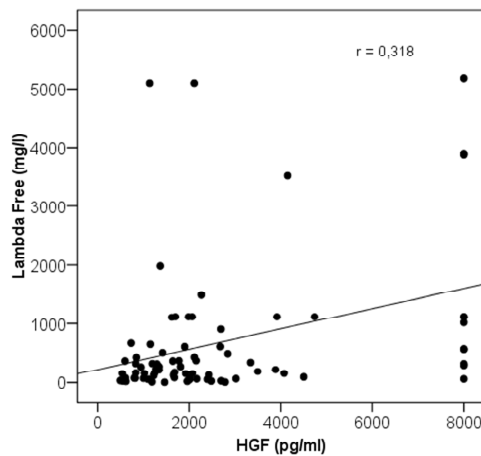
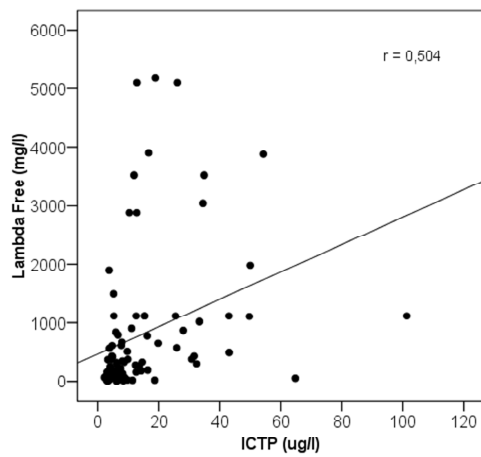
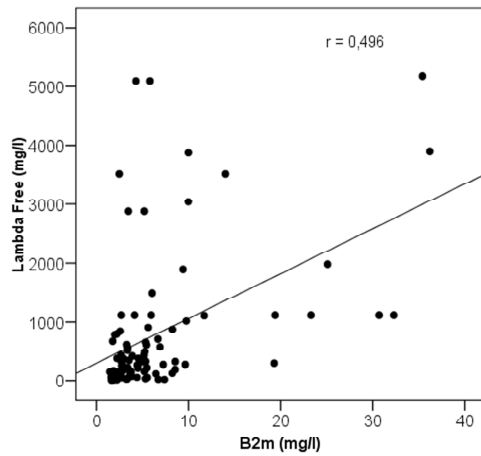
Z dosažených výsledků vyplývá, že vztah většiny biologických, námi vyšetřených působků k sérovým hladinám VLŘ κ a λ a jejich vzájemného poměru, přispívá především k hlubšímu poznání patobiologie MM a s výjimkou obohacení stážovacího systému ISS nemá významější přínos pro klinickou praxi. Ukazuje se, že budoucí analýza by měla být zaměřena do oblasti GEP analýzy, případně i k vyšetření vztahu k tak významné molekule v patogenezi MM jako je NF-kappaB.



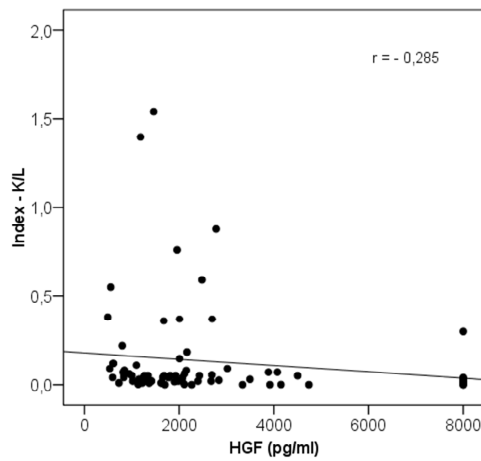
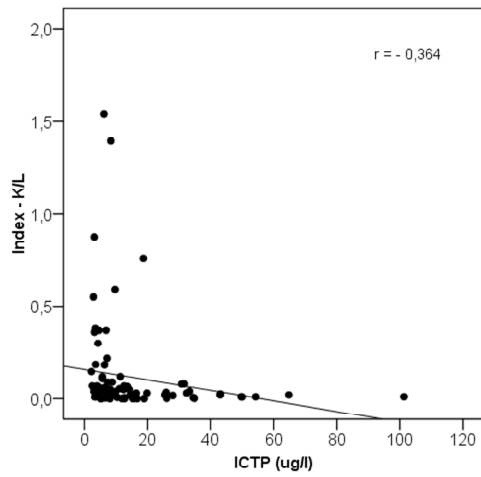
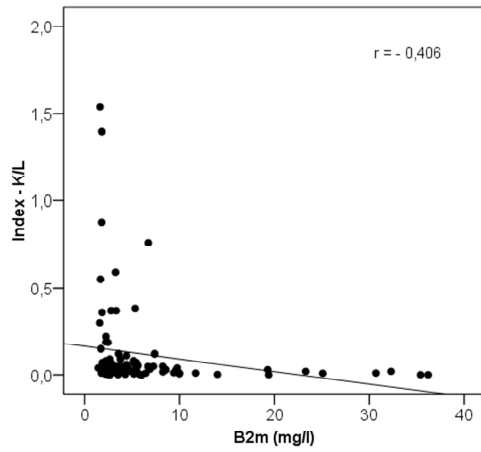
Graf 16. Skupina „kappa“: vztah sérových hladin VLŘ κ (Kappa free) a β_2m , ICTP a sHGF.



Graf 17. Skupina „kappa“: vztah hodnot indexu κ/λ (Index - K/L) a β_2m , ICTP a sHGF.



Graf 18. Skupina „lambda“: vztah sérových hladin VLŘ λ (Lambda free) a β_2m , ICTP a sHGF.



Graf 19. Skupina „lambda“: vztah hodnot indexu κ/λ (Index - K/L) a β_2m , ICTP a sHGF.

6.6 Prognostický význam sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu u mnohočetného myelomu

Úvod

Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců se za posledních několik let stalo pro svou nezastupitelnou roli součástí algoritmu vyšetření v diagnostice, sledování a hodnocení léčebné odpovědi nejen u nemocných s mnohočetným myelomem, ale i u dalších maligních ev. potencionálně maligních monoklonálních gamapatií (134, 135, 138). Několik recentních studií potvrdilo vliv výše počátečních hladin VLŘ κ , λ a κ/λ indexu na přežití nemocných s mnohočetným myelomem, přičemž právě κ/λ index se jeví jako nejcitlivější parametr (161, 165, 166, 203). Cílem předložené studie bylo porovnání vlivu iniciálních hodnot κ/λ indexu na přežití nemocných s MM a dále pak v závislosti na zvolené léčebné strategii - konvenční terapii (KT) nebo vysokodávkované terapii s podporou autologního štěpu (ASCT).

Sledovaný soubor

Sledovaný soubor tvořilo 239 pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem, splňujících SWOG i IMWG kritéria symptomatického onemocnění, vyšetřených na III. interní klinice v rozmezí let 2004-2010 (5, 14). Popisné charakteristiky sledovaného souboru jsou shrnuty v tab. 22. Sérové hladiny volných lehkých řetězců κ a λ byly stanovovány systémem FreeLite™ (The Binding Site, Birmingham, Velká Británie). Pro hodnocení přežití byly zvoleny jako diskriminační meze indexu κ/λ intervaly dle stěžejních prací Kyrtonisové et al. ($<0,02;3,6>$, $<0;0,02$) a ($\geq 3,6$) a Snozkové et al. ($<0,03;32>$, $<0;0,03$) a (≥ 32) (155, 161, 165). Pro statistickou analýzu byl použit Log Rank test. Konvenční terapie zahrnovala režimy na bázi klasické chemoterapie (VAD, CED), ale i kombinovaná schémata s využitím nových, biologicky působících léků – thalidomidu, bortezomibu či lenalidomidu (CTD, VCD, MPT, MPV či RD). Jako indukčních režimů před vysokodávkovanou chemoterapií bylo využíváno nejčastěji režimu VAD či CTD junior, pouze u několika pacientů bylo možno použít indukční režim na bázi bortezomibu. Samotná ASCT byla provedena po přípravě pomocí vysokodávkovaného melfalanu ($200\text{mg}/\text{m}^2$) s následným převodem autologního štěpu. Nemocní, u kterých bylo použito tandemové ASCT byli z analýzy vyřazeni, stejně tak byli z analýzy vyřazeni pacienti s nesekretorickým typem onemocnění. Jako terapie následných

progresí/relapsů bylo opět použito kombinovaných režimů zahrnující některý z nových, biologicky působících léků.

Tab. 22: Popisné charakteristiky souboru nemocných se symptomatickým mnohočetným myelomem.

Počet: 239

M : Ž: 1,17 : 1

Medián věku: 65 let (32-90)

Typ sekrece:

IgG 152 (63,7%)

IgA 48 (20%)

Bence-Jonesův 36 (15%)

IgD 3 (1,3%)

Typ lehkého řetězce:

κ 153 (64%)

λ 86 (36%)

Stádium dle Durieho – Salmona:

I 10 (4,2%)

II 89 (37,2%)

III 140 (58,6%)

A 184 (77%)

B 55 (23%)

Stádium dle ISS:

I 47 (19,7%)

II 82 (34,3%)

III 110 (46%)

Konvenční terapie: 180 (75,3%)

Vysokodávkovaná terapie s podporou autologního štěpu: 59 (24,7%)

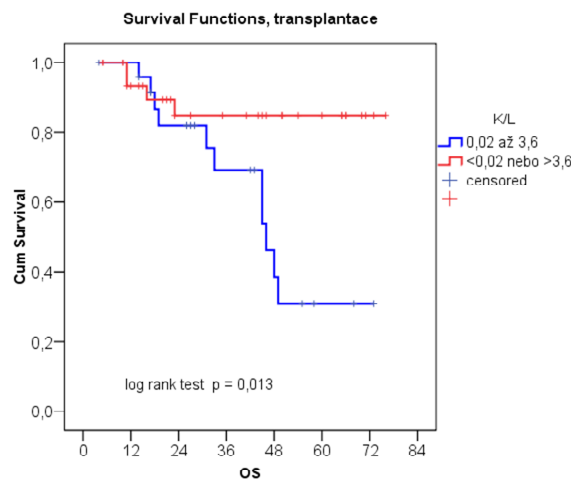
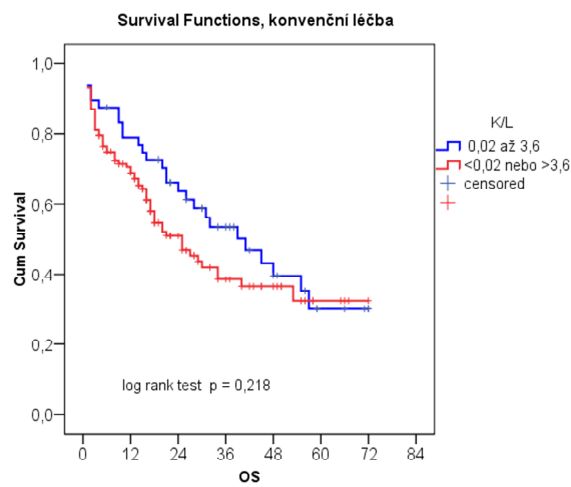
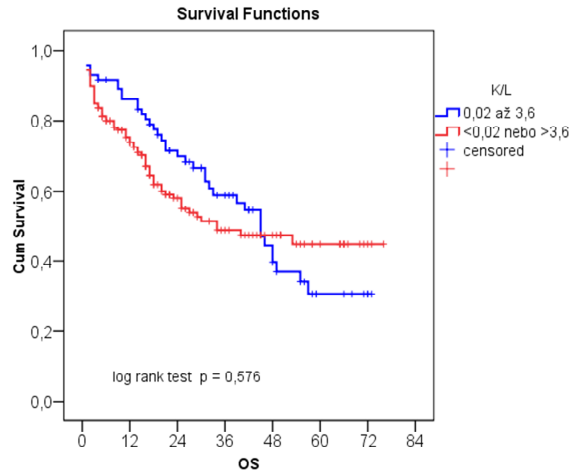
Výsledky

Při zhodnocení přežití nemocných s využitím hodnot κ/λ indexu $<0,02;3,6>$ vs. $<0;0,02)$ a $(\geq 3,6)$ byl při analýze celé sledované skupiny zjištěn delší medián přežití u nemocných s méně patologickými hodnotami κ/λ indexu ($<0,02;3,6>$) nežli u nemocných s vyšší mírou patologie – 45 vs. 34 měsíců ($p = 0,57$). Při separátním hodnocení nemocných léčených konvenční terapií byl tento trend výraznější a rozdíl v mediánu přežití byl 41 oproti 25 měsícům ($p = 0,218$). Avšak při hodnocení nemocných léčených ASCT tento trend zachycen nebyl, respektive jevil se jako opačný – medián přežití u nemocných s hodnotou κ/λ indexu $<0,02;3,6>$ dosahoval 46 měsíců, avšak ve skupině nemocných s hodnotami mimo tento interval medián přežití zatím nebyl dosažen ($p = 0,013$) (graf 20). Při zhodnocení přežití nemocných dle hodnot κ/λ indexu $<0,03;32>$ vs. $<0;0,03)$ a (≥ 32) byl v celé sledované skupině opět zjištěn delší medián přežití u nemocných s hodnotami κ/λ indexu $<0,03;32>$ nežli u nemocných s hodnotami mimo tento interval – 45 vs. 40 měsíců ($p = 0,328$). U nemocných léčených KT byl tento rozdíl výraznější a medián přežití dosahoval 31 vs. 20 měsíců ($p = 0,363$). Ve skupině nemocných léčených ASCT zatím nebyl v obou skupinách medián přežití dosažen, nicméně křivky poukazují opět na opačný trend (graf 21). Je však nutno zdůraznit, že při výše uvedené analýze nebyla v naprosté většině případů dosažena hladina významnosti, ač rozdílný trend je patrný, zřejmě z důvodu velmi krátkého období sledování a početně omezeného souboru nemocných.

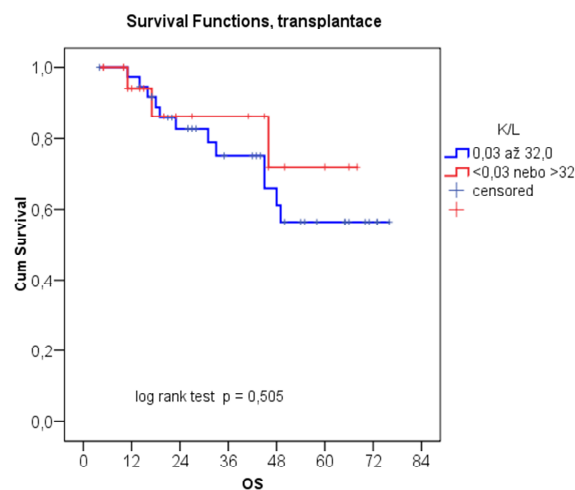
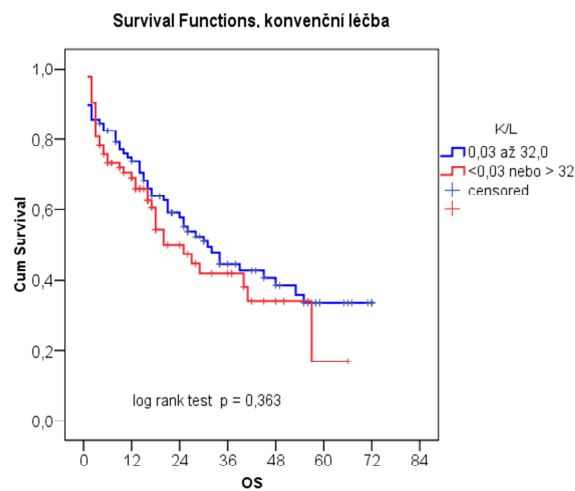
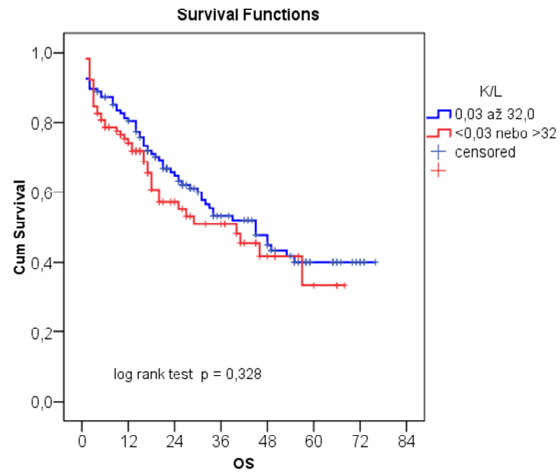
Diskuze

Je známo, že intenzivní terapie MM s využitím vysokodávkované chemoterapie s podporou autologního štěpu stírá prognostický význam mnoha klasických faktorů, jenž mají vliv na hodnocení prognózy nemocných léčených konvenční terapií (90, 92, 95). Využití hladin volných lehkých řetězců κ , λ a jejich poměru (κ/λ indexu) jako prognostického ukazatele u MGUS, solitárního plazmocyтому či asymptomatického/doutnajícího myelomu je zcela nezpochybnitelný (151, 196, 234). Prvotní práce Kyrtonisové et al. zahrnovala 94 nemocných s myelomem, léčených režimy MP, VAD a pouze 13 pacientů podstoupilo ASCT. Studie navíc zahrnovala i 28 nemocných s asymptomatickou formou myelomu. Je nutné podotknout, že ač se jednalo o pilotní studii na limitovaném vzorku nemocných, s nehomogenním léčebným přístupem, výsledky práce poukázaly na možný prognostický význam indexu κ/λ a zejména jeho aditivní přínos k systému ISS (165, 203). Následně

publikovaná práce Snozkové et al. zahrnovala poměrně rozsáhlý soubor 790 nemocných s nově diagnostikovaným symptomatickým MM, sérové hladiny VLŘ byly stanovovány retrospektivně na zamražených sérech nemocných z let 1985 – 1998, přičemž dominantním léčebným schématem byl režim VBMCP. Bylo zjištěno, že nemocní s hodnotami indexu κ/λ mimo rozmezí $<0,03;32>$ mají signifikantně kratší přežití nežli ostatní nemocní (30 vs. 39 měsíců). Stejně jako u předchozí práce byl potvrzen aditivní prognostický přínos k systému ISS (161). Vzhledem k těmto okolnostem bylo předmětem naší práce právě ověření prognostického významu indexu κ/λ v našem limitovaném souboru nemocných a posouzení vlivu vysokodávkované terapie. Z analýzy vyplývá, že při hodnocení celého sledovaného souboru nemocných s využitím obou zmíněných stratifikací byl zjištěn obdobný trend jako v předchozích pracích, přičemž nemocní s větší patologií indexu κ/λ měli i kratší medián přežití (45 vs. 34 resp. 45 vs. 40 měsíců). Při separátním hodnocení skupin nemocných léčených konvenční terapií byl tento rozdíl výraznější a je plně v souladu s předchozím pozorováním (41 vs. 25 resp. 31 vs. 20 měsíců). Nicméně při hodnocení přežití nemocných léčených ASCT tento trend zachycen nebyl. Je ale nutno podotknout, že se zatím jedná o analýzu předběžnou a v souboru s krátkým odstupem od diagnózy nemoci, takže většinou mediánu přežití nebylo doposud dosaženo. Obdobné pozorování bylo později publikováno Maltezasem et al. v rozsáhlé multicentrické studii zahrnující 350 nemocných s MM, přičemž prognostický význam indexu κ/λ v kombinaci se systémem ISS zůstává platný u nemocných léčených konvenční terapií včetně nových biologických působků, ale zcela selhává v případě nemocných podstupujících vysokodávkovanou terapii s ASCT (235). Je však nutné podotknout, že MM je onemocnění především starší populace s volbou konvenční terapie a proto i u většiny nemocných zůstává prognostický význam indexu κ/λ zachován. U mladých nemocných se zdá, že HD-T/ASCT stírá prognostický význam indexu κ/λ , stejně jako dalších faktorů, a je proto nutné hledání dalších nových prognostických ukazatelů, vycházejících z hlubšího poznání vnitřních biologických vlastností myelomové buňky, případně jejího vztahu k mikroprostředí kostní dřene. Je nasnadě, že stále sofistikovanější léčebné postupy, založené na cíleném zásahu do sítě metabolických drah, zajišťujících viabilitu a proliferaci neoplastických plazmocytů si vyžadují odhalení nových prognostických faktorů rozpoznatelných s pomocí molekulárně biologických metod, např. GEP či proteomiky. Definitivní statistické zhodnocení našeho souboru bude možné teprve v delším časovém odstupu.



Graf 20. Prognostický význam indexu κ/λ s diskriminačními hodnotami $<0,02;3,6>$ vs. $<0;0,02>$ a $(\geq 3,6)$ ve skupině nemocných se symptomatickým myelomem ($n = 239, 73$ vs. 166), léčených konvenční terapií ($n = 180, 48$ vs. 132) či vysokodávkovanou terapií s autologní transplantací ($n = 59, 25$ vs. 34).



Graf 21. Prognostický význam indexu κ/λ s diskriminačními hodnotami $\langle 0,03;32 \rangle$ vs. $\langle 0;0,03 \rangle$ a ≥ 32 ve skupině nemocných se symptomatickým myelomem (n = 239, 135 vs. 104), léčených konvenční terapií (n = 180, 97 vs. 83) či vysokodávkovanou terapií s autologní transplantací (n = 59, 38 vs. 21).

6.7 Stanovení sérových hladin párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonálních gamapatií

Úvod

Pro skupinu onemocnění zvaných monoklonální gamapatie je typická přítomnost molekul monoklonálního imunoglobulinu nebo jejich fragmentů (lehkých, těžkých řetězců), detekovatelných v séru a/nebo v moči. Mezi základní vyšetření běžně využívaná k detekci M-proteinu v séru patří elektroforéza (gelová, kapilární zónová) dovolující kvantifikaci a imunofixace (IFE), která představuje citlivější metodu umožňující typizaci M-proteinu, avšak s možností pouze kvalitativního, nikoliv kvantitativního stanovení (25, 26). Nejnovějším testem ve spektru vyšetření monoklonálního proteinu je systém HevyLite™, principiálně založený na užití dvojice specifických protilátek proti junkčním epitopům mezi doménami těžkého a lehkého řetězce v konstantní oblasti řetězců imunoglobulinu (HLC) (139). V závislosti na typu použité soupravy metoda umožňuje stanovení hladin HLC u různých izotypů imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM), poskytuje reproduktibilní, kvantitativní výsledky i v případě pouhé imunofixační positivity M-proteinu a analogicky jako v případě vyšetření sérových hladin volných lehkých řetězců umožňuje výpočet poměru HLC – indexu klonality $Ig\kappa/Ig\lambda$. Metoda taktéž eliminuje omezení konvenční elektroforézy zejména v případech změny hematokritu nebo překrytí části spektra M-proteinu transferinem, haptoglobinem či C3 složkou komplementu (139, 141, 236). Náplní předloženého sdělení jsou první zkušenosti se systémem HevyLite™ u nemocných s monoklonálními gamapatiemi s IgA a IgG typem M-proteinu.

Cílem práce bylo zavedení metody HevyLite™ pro vyšetřování sér pacientů s MG typu IgA a IgG na nefelometru BN II s následnou korelací získaných výsledků s hladinami M-proteinu, celkovými hladinami IgA resp. IgG imunoglobulinu a následně i s klinickou fází onemocnění.

Vyšetřený soubor

Vyšetřený soubor nemocných s IgA monoklonální gamapatií tvořilo v rámci iniciační fáze studie 24 nemocných s mnohočetným myelomem, z nichž 18 bylo v aktivní fázi onemocnění a 6 nemocných po proběhlé chemoterapii s dosaženou kompletní remisí (negativní

imunofixace séra) (28). Dále bylo vyšetřeno 7 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu, z čehož bylo 6 jedinců s „high-intermediate“ a „high risk“ typem dle klasifikace Rajkumara, vycházející z typu a hladiny M-proteinu a hodnoty indexu κ/λ volných lehkých řetězců (151). Poměr sekrece izotypu $\kappa:\lambda$ byl v celém souboru 1,4:1. Vyšetřený soubor nemocných s IgG monoklonální gamapatií tvořilo 27 nemocných s aktivní formou myelomu, 3 nemocní s dosaženou kompletní remisí a 1 jedinec s „low-intermediate“ typem MGUS s poměrem sekrece izotypu $\kappa:\lambda$ 2,44 : 1. Pro stanovení sérových hladin HLC bylo použito nefelometru BN II (Siemens Healthcare Diagnostics) a souprav HevyLite™ IgA κ , IgA λ resp. IgG κ , IgG λ (The Binding Site, Velká Británie). Primární ředění vzorků bylo 1:100, v případě potřeby byly vzorky dále doředovány buď 1:20 nebo 1:400, k získání konkrétní koncentrace. Poměr HLC IgA κ /IgA λ resp. IgG κ /IgG λ byl získán výpočtem. Referenční rozmezí bylo převzato od výrobce souprav HevyLite™: IgA κ (0,48 – 2,82 g/l), IgA λ (0,36 – 1,98 g/l) a indexu IgA κ /IgA λ (0,8 - 2,04); IgG κ (4,03 – 9,78 g/l), IgG λ (1,97 – 5,71 g/l) a IgG κ /IgG λ (0,98 – 2,75) (139). Celkové hladiny imunoglobulinu IgA a IgG byly stanovovány rovněž nefelometricky na analyzátoru BNII s užitím diagnostického antiséra (N antiserum to Human IgA, IgG). Stanovení hladin M-proteinu bylo prováděno na přístroji Sebia Hydrasys s užitím souprav Sebia Hydragel 30 Protein(e) s následnou kvantifikací monoklonálního gradientu pomocí skeneru Epson 1680 Pro. Pro imunofixační analýzu bylo použito souprav Hydragel 4 IF. Vzhledem k nenormální distribuci dat byla závislost parametrů posouzena pomocí Spearmanovy korelační analýzy.

Výsledky

U nemocných s aktivní formou onemocnění byly v obou skupinách zjištěny vysoce patologické hladiny dominantního imunoglobulinu Ig κ nebo Ig λ , se supresí hladin alternativního imunoglobulinu Ig κ nebo Ig λ a s výrazným ovlivněním poměru Ig κ /Ig λ . Ve skupině nemocných s IgA monoklonální gamapatií, byl u 5 nemocných, kteří dosáhli kompletní remise zaznamenán normální poměr IgA κ /IgA λ , avšak 1 nemocný vykazoval supresi obou typů IgA, zřejmě z důvodu krátkého odstupu od předchozí chemoterapie, se změnou poměru IgA κ /IgA λ . U všech jedinců s MGUS byly zjištěny abnormální hladiny i poměr IgA κ /IgA λ , přičemž u jedince s low-risk typem byla hodnota poměru IgA κ /IgA λ pouze nadhraniční (graf 22). Při srovnání výsledků stanovení MIG metodou HevyLite™ a elektroforézou, Spearmanova korelační analýza potvrdila velmi těsnou korelaci hladin MIG a

IgA κ ($r= 0,946$, $p < 0,0001$), přičemž medián diferencí hladin IgA κ k hladině M-proteinu byl 3,5 g/l (min-max: 0,36-13,50 g/l). Obdobně vyzněla analýza v případě IgA λ a MIG ($r= 0,872$, $p= 0,0001$), s mediánem diferencí 1,0 g/l (min-max: -12,0 až +16,5 g/l). Nutno podotknout, že největší rozdíly v hladinách paraproteinu stanovených elektroforézou a metodou HevyLite™ byly v oblastech vysokých hladin, v případě nižších koncentrací byl vzájemný rozdíl hodnot minimální. Součty hladin dominantního i alternativního páru IgA imunoglobulinu významně korelovaly s celkovou hladinou imunoglobulinu IgA stanoveného nefelometricky ($r= 0,994$, $p < 0,0001$) s mediánem diferencí -0,32 g/l (min-max: -5,69 až +7,73 g/l) (graf 24).

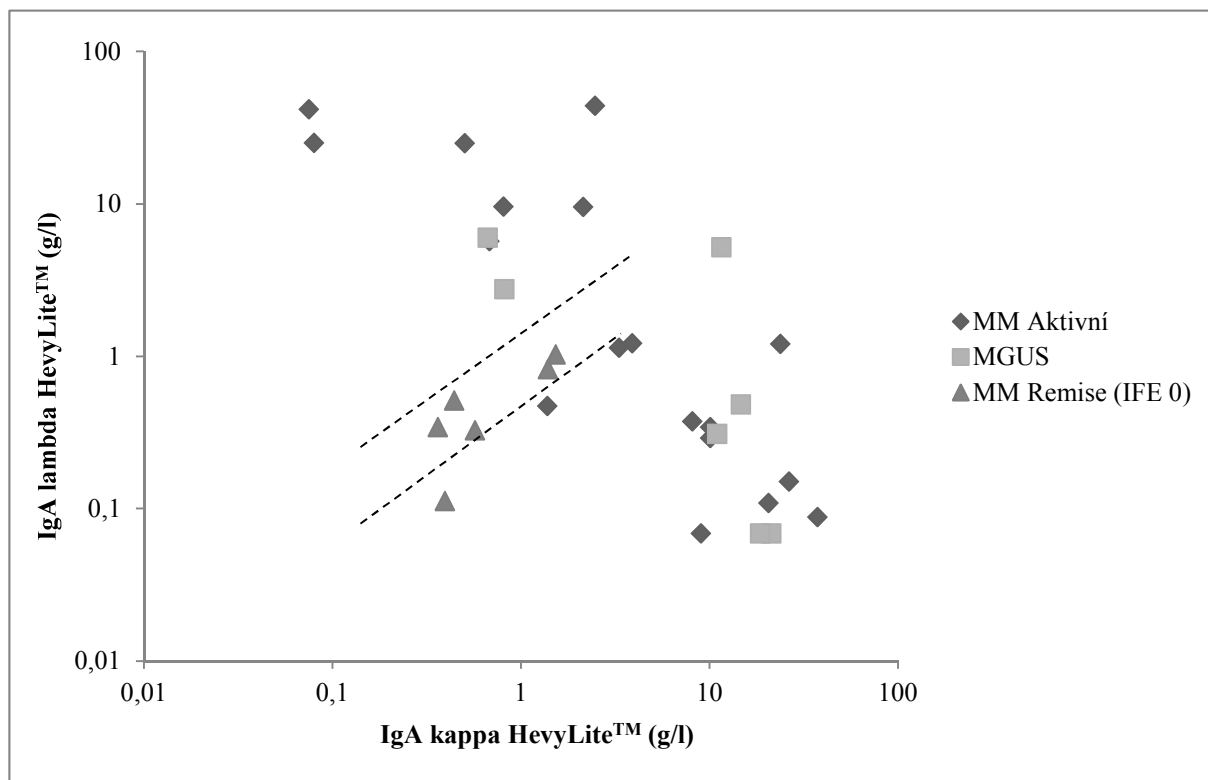
Při analýze souboru nemocných s IgG gamapatií byly u 3 pacientů, kteří dosáhli kompletní remise, zjištěny normální hodnoty hladin IgG κ , IgG λ i poměru IgG κ /IgG λ . U jedince s „low-intermediate risk“ typem MGUS byla zjištěna elevace dominantního páru IgG λ , se supresí alternativního páru IgG κ a se změnou indexu IgG κ /IgG λ (graf 23). Při srovnání výsledků stanovení MIG metodou HevyLite™ a elektroforézou, Spearmanova korelační analýza potvrdila velmi silnou korelaci hladin MIG a IgG κ ($r= 0,970$, $p < 0,0001$), přičemž medián diferencí hladin IgG κ k hladině MIG byl 0,61 g/l (min-max: -5,97 až +16,50 g/l). Obdobně vyzněla analýza v případě IgG λ a MIG ($r= 0,998$, $p < 0,0001$), s mediánem diferencí 0,23 g/l (min-max: -4,5 až +3,29 g/l). Součty hladin dominantního i alternativního páru IgG imunoglobulinu významně korelovaly s celkovou hladinou imunoglobulinu IgG stanoveného nefelometricky ($r= 0,955$, $p < 0,0001$) s mediánem diferencí 3,93 g/l (min-max: -1,91 až +22,5 g/l) (graf 25).

Diskuze

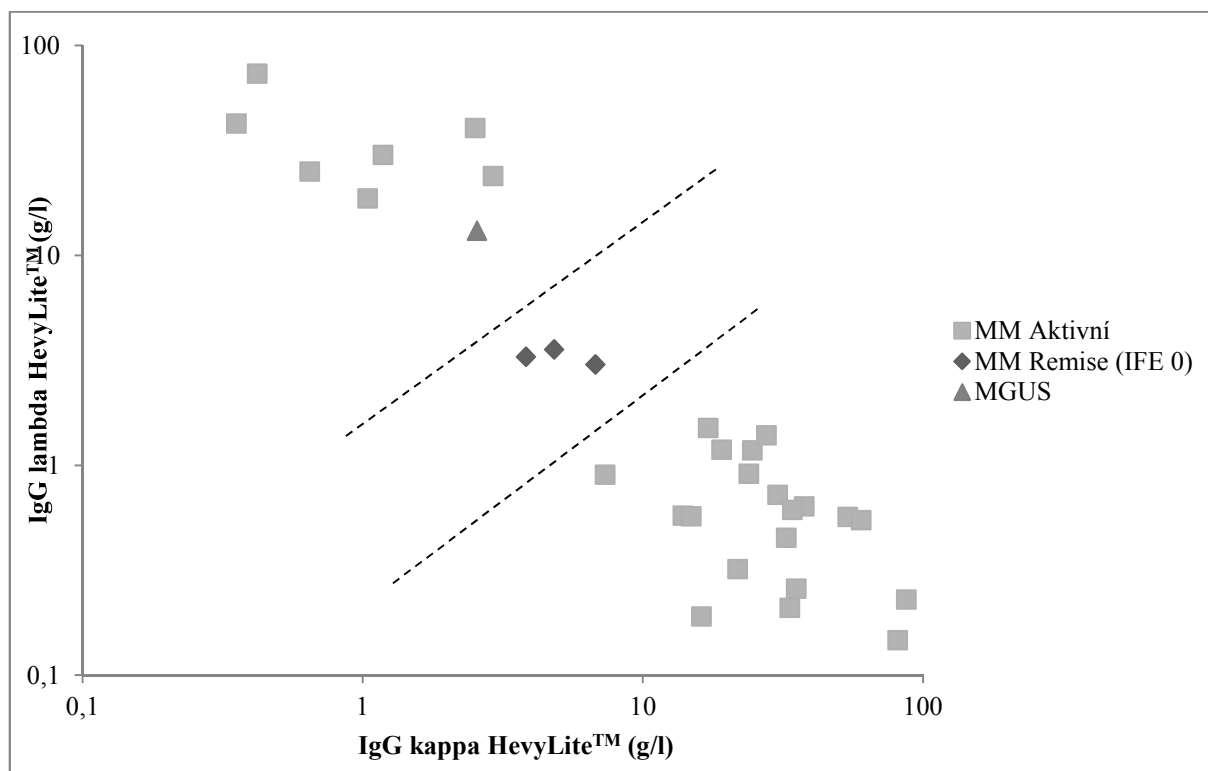
Systém HevyLite™ je nepochybně nadějnou, principiálně odlišnou metodou pro detekci a kvantifikaci monoklonálního imunoglobulinu, než dosavadní zavedené elektroforetické a imunofixační techniky. Metodicky je založený na využití specifických, ovčích polyklonálních protilátek proti junkčním epitopům mezi doménami těžkého a lehkého řetězce v konstantní oblasti řetězců imunoglobulinu, následně vzniklé komplexy je možné detekovat nefelometricky či turbidimetricky. Doposud jsou soupravy koncipované pro nefelometrický systém BN II (Siemens Healthcare Diagnostics) a turbidimetrický systém SPA_{plus} (The Binding Site). Cílem naší pilotní studie bylo zavedení vyšetření pro pacienty s MG IgA a IgG izotypem právě na platformě BN II. Samotná instalace systému, vyhotovení kalibračních křivek a zahájení sériového vyšetření vzorků se neshledala s významnějšími obtížemi, avšak

vzhledem k iniciálnímu výběru vyšetřovaných vzorků (rozptyl od nulových hodnot paraproteinu po 51 g/l) bylo potřeba dalšího naředování vzorků sér mimo základní ředění k dosažení určitých konkrétních hodnot hladin Ig κ nebo Ig λ a k následnému výpočtu indexu Ig κ /Ig λ . U všech našich analyzovaných sér od nemocných s aktivním mnohočetným myelomem, stejně tak i monoklonální gamapatií nejistého významu byla zjištěna shoda mezi typem paraproteinu a elevací hladiny dominantního HLC páru, stejně tak i poměrem Ig κ /Ig λ . Vzhledem k tomu, že systém HevyLite™ je nejen citlivější než konvenční elektroforéza, ale taktéž poskytuje numerické výsledky u pacientů s pouhou imunofixační pozitivitou, bylo součástí našeho souboru 9 nemocných s dosažením kompletní remise po terapii, tedy s negativní imunofixační elektroforézou. U 8 pacientů byl zjištěn normální index Ig κ /Ig λ , pouze u jednoho nemocného, byla zjištěna suprese obou izotypů imunoglobulinu se změnou indexu IgA κ /IgA λ , zřejmě z důvodu krátkého odstupu od vysokodávkované chemoterapie s podporou autologního štěpu s následnou přetrvávající polyklonální supresí, doposud bez restituce „imunitní parézy“. Předpokládaný velký potenciál vyšetření HevyLite™ v případech pouhé positivity/negativity imunofixační analýzy je nyní na předním místě zájmu klinických pracovišť, neboť se ukazuje, že tato metoda dovoluje mnohem citlivěji detekovat nejen reziduální onemocnění, ale i časný relaps/progresi choroby a to mnohem dříve, než konvenční techniky (139, 141, 236). Při srovnání absolutních hladin M-proteinu stanovených pomocí metody HevyLite™ a elektroforézou byla zjištěna vysoce významná korelace obou metod ve shodě s údaji předchozích autorů. Větší rozdíl hodnot byl zaznamenán se vzrůstající hladinou paraproteinu a to zejména ve skupině s IgA izotypem, avšak většinou ve prospěch nefelometrického stanovení. Vysvětlením může být dodatečná detekce skryté frakce paraproteinu, např. v β -zóně, či technická limitace jednotlivých metod; samozřejmě v potaz nutno vzít i možnou chybu vzniklou při dodatečném doředění vzorků. Podobné pozorování bylo zjištěno i jinými autory a nutno podotknout, že cílová oblast nízkých koncentrací paraproteinu byla diferencí ovlivněna zcela minimálně (237, 238). Finální částí naší studie bylo srovnání celkových hladin IgA resp. IgG imunoglobulinu stanovených nefelometricky a hladin celkového IgA resp. IgG imunoglobulinu daných součtem hladin IgA κ a IgA λ resp. IgG κ a IgG λ stanovených metodou HevyLite™, a i v tomto případě bylo dosaženo velmi významných korelací mezi oběma metodami, což bylo v souladu se studiemi, které hodnotily jak séra od zdravých dárců, tak vzorky sér od pacientů s monoklonálními gamapatiemi. Doposud publikovaná data však nezahrnují výsledky analýzy sér od nemocných s autoimunitními či chronickými zánětlivými chorobami a je možné, že v případě stavů spojených s elevací polyklonálních imunoglobulinů dojde i ke změně samotných hladin a

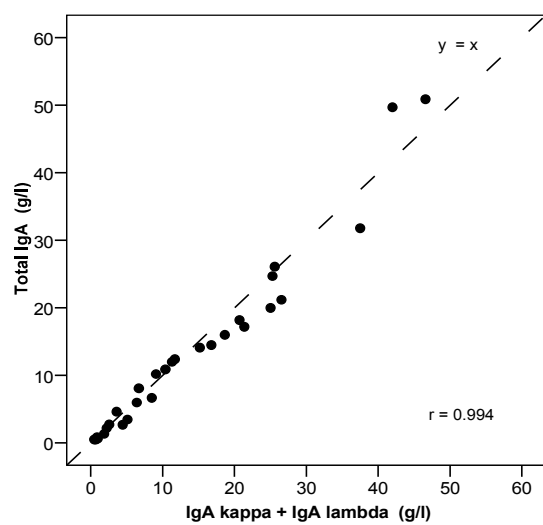
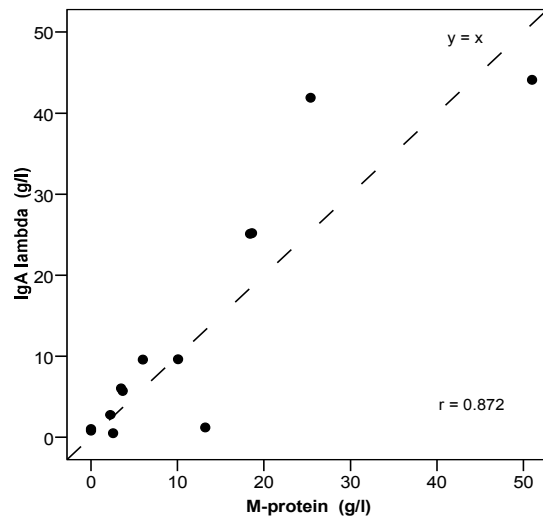
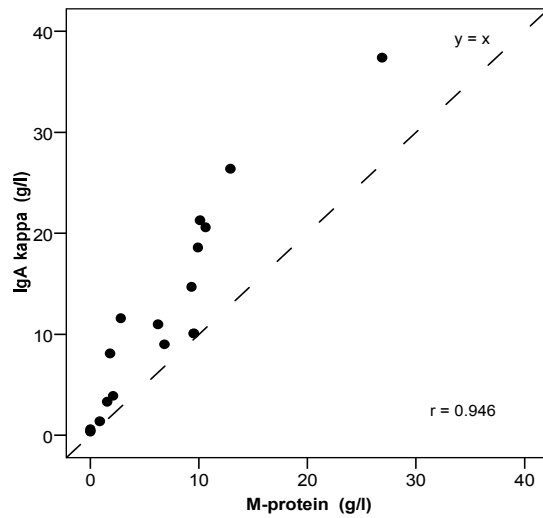
následně i indexu $Ig\kappa/Ig\lambda$, ač se předpokládá, že stejně jako v případě systému FreeLite™, hodnoty vzájemného poměru $Ig\kappa/Ig\lambda$ nebudou ovlivněny (139). Samotné hodnoty $Ig\kappa/Ig\lambda$ indexu či v kombinaci s hladinami β_2 -mikroglobulinu vykazují jistý prognostický význam pro přežití nemocných s mnohočetným myelomem i rizikový faktor progresu monoklonální gamapatie nejistého významu do symptomatické formy myelomu, ale taktéž jako faktor trvání období fáze nemoci do progresu. Je však nutné podotknout, že výše uvedené analýzy vyzněly přesvědčivěji pro IgG nežli IgA typ imunoglobulinu a je potřeba dalších prospektivních studií na dostatečně rozsáhlých souborech nemocných k ověření reálného přínosu indexu $Ig\kappa/Ig\lambda$ jako prognostického ukazatele u nemocných s jednotlivými typy monoklonálních gamapatií (139, 236, 239, 240).



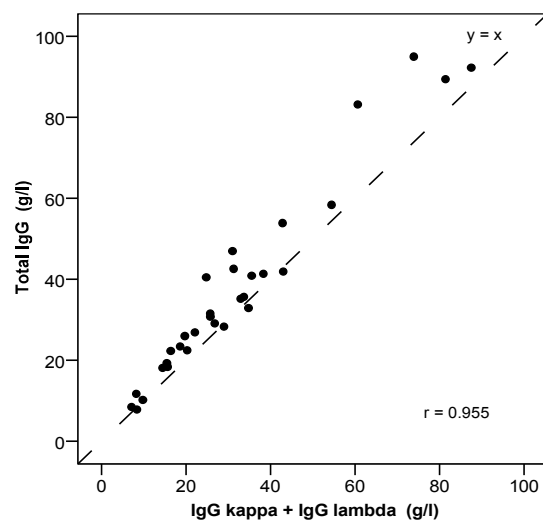
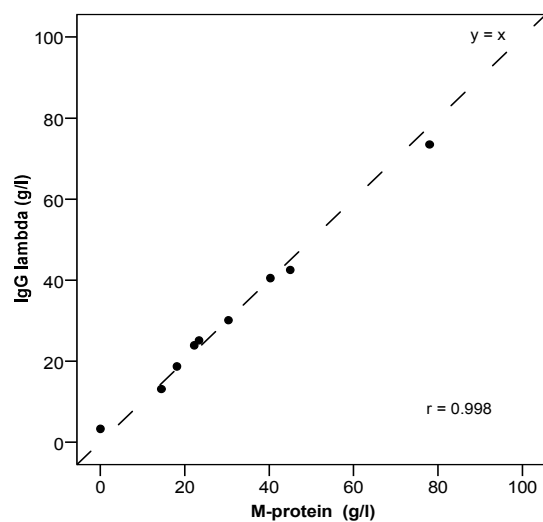
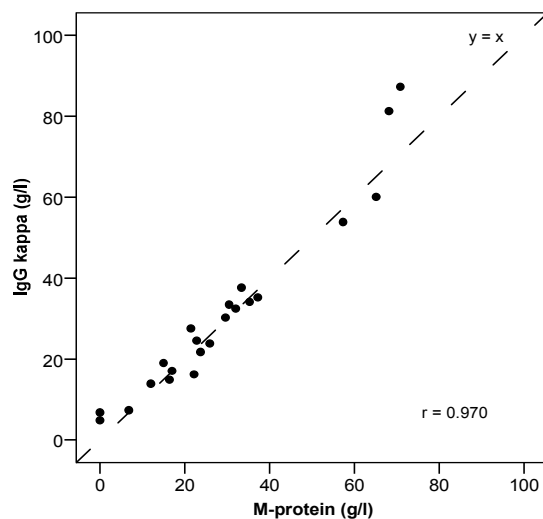
Graf. 22: HevyLite™ vyšetření u 24 nemocných s IgA mnohočetným myelomem (MM) a 7 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS).



Graf. 23: HevyLite™ vyšetření u 30 nemocných s IgG mnohočetným myelomem (MM) a 1 jedince s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS).



Graf. 24: Spearmanova korelace hladin M-proteinu a IgA κ resp. IgA λ stanovených metódou HevyLiteTM; korelace sumace IgA κ a IgA λ s celkovými hladinami IgA.



Graf. 25: Spearmanova korelace hladin M-proteinu a $\text{IgG}\kappa$ resp. $\text{IgG}\lambda$ stanovených metódou HevyLite™; korelace sumace $\text{IgG}\kappa$ a $\text{IgG}\lambda$ s celkovými hladinami IgG .

7.0 Závěry disertační práce

7.1 Zhodnocení přínosu stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu u mnohočetného myelomu a monoklonální gamapatie nejistého významu

7.1.1/ Ve skupině jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu byly zachyceny patologické hladiny volných lehkých řetězců κ a λ u 62% jedinců, při vyhodnocení indexu κ/λ byly v 55,5% případů zachyceny patologické hodnoty. Během šestiletého sledování došlo u 11 jedinců k transformaci v maligní formu monoklonální gamapatie, což odpovídá přibližně 0,95% případů za rok. S užitím stratifikačního systému pro MGUS, založeném na kvantitě, izotypu M-proteinu a hodnotě indexu κ/λ byly identifikovány rizikové skupiny jedinců s MGUS, přičemž právě míra zaznamenané transformace odpovídala tíži rizika. Vývoj MGUS v MM byl spojen s nárůstem hladin volných lehkých řetězců a zejména s nárůstem míry patologie indexu κ/λ . Práce tedy potvrdila praktický význam stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců u MGUS a zejména pak jejich přínos pro identifikaci rizikových forem s určením optimálního sledování.

7.1.2/ Míra patologie hladin volných lehkých řetězců κ , λ a κ/λ indexu zachycené v poměrně rozsáhlém souboru nemocných vyšetřených v době diagnózy nemoci odpovídá 95 resp. 96%, přičemž bylo prokázáno, že se jedná o parametr zcela nezávislý na hodnotě M-proteinu. Míra sekrece volných lehkých řetězců je u MM velmi variabilní, přičemž nejvyšší je předpokládáně u Bence –Jonesovy formy a zčásti i u IgG izotypu. Stanovení VLŘ u mnohočetného myelomu s intaktní měřitelnou komponentou má v době stanovení diagnózy spíše doplňkový charakter, nicméně je zcela nenahraditelné při stanovení hloubky remise a v případě abruptivní formy relapsu charakterizované „ligh-chain escape“ fenoménem. V případě nesekretorického myelomu dovoluje vyšetření VLŘ v 66% dodatečně identifikovat sekreci volných lehkých řetězců u části nemocných a umožňuje jejich další sledování ve vztahu k průběhu nemoci. Vyšetření VLŘ tedy dovoluje další subklasifikaci nesekretorické formy MM rozpoznané dle konvenčních kritérií nesekretorického onemocnění, a dovoluje identifikovat „pravé“ nesekretorické typy. V případě oligoskrečního onemocnění, v 70% stanovení hladin VLŘ umožňovalo další sledování průběhu onemocnění, obdobně pak u všech nemocných se vzácnou IgD formou nemoci. Práce tedy potvrdila přínos stanovení VLŘ u MM, zejména pak u jeho méně obvyklých forem, tedy nesekretorické formy, IgD a oligosekrečního typu.

7.1.3/ Při porovnání sérových hladin VLŘ κ , λ a κ/λ indexu u monoklonální gamapatie nejistého významu byly zjištěny vysoce signifikantní rozdíly v hladinách dominantního lehkého řetězce i indexu κ/λ , ale rovněž i ve významné míře suprese řetězce alternativního svědčící o výrazné imunitní paréze u nemocných s mnohočetným myelomem. Nicméně výsledky ukázaly, že stanovení hladin VLŘ s výpočtem indexu klonality, lze použít jako pomocného ukazatele v rámci ostatních parametrů k odlišení MM od MGUS, přičemž v případě normálních hladin je diagnóza MM nepravděpodobná, nicméně vzhledem k významnému vzájemnému překrývání hodnot k odlišení MGUS od MM významně nepřispívá.

7.1.4/ Při srovnání sérových hladin VLŘ κ , λ a κ/λ indexu ve vztahu ke stádiu pokročilosti MM definovanými dle stážovacích systému dle Durieho-Salmona a International Staging System nebyl zjištěn významnější rozdíl v hladinách, kromě časného a velmi pokročilého stadia dle systému D-S. Bylo potvrzeno, že hladiny VLŘ jsou poměrně nezávislý parametr, daný zejména jejich variabilní mírou sekrece a rychlým katabolismem a mohou tedy být užity jako doplňující parametr stážovacích systémů.

7.1.5/ Při analýze vztahů sérových hladin VLŘ κ , λ a κ/λ indexu, byly zjištěny vzájemné závislosti s hladinami β_2m , TK, parametrů kostního metabolismu, HGF, Syn-1 a Fas. Z dosažených výsledků ale vyplývá, že vztah většiny biologických, námi vyšetřených působků k sérovým hladinám VLŘ κ a λ a jejich vzájemného poměru, přispívá především k hlubšímu poznání patobiologie MM a nemá zřejmě významější přínos pro klinickou praxi.

7.1.6/ Předběžná analýza hodnotící vliv indexu klonality κ/λ a přežití nemocných s MM potvrdila známý vztah míry patologie a délky přežití u léčených pacientů se symptomatickým onemocněním. Při detailní analýze souboru však bylo zjištěno, že tento prognostický vliv platí pouze pro nemocné léčené konvenční terapií, včetně začlenění nových, biologicky působících léků. U nemocných léčených vysokodávkovanou terapií s podporou autologního štěpu tento trend zachycen nebyl a dá se říci, že intenzivní terapie stírá prognostický význam indexu klonality κ/λ a u takto léčených nemocných je nutné hledání a identifikace nových, vhodných prognostických ukazatelů.

7.2 Zavedení stanovení sérových hladin párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonálních gamapatií a provedení pilotní analýzy získaných výsledků

Ve FN Olomouc bylo jako v 1. centru v České republice zavedeno stanovení vyšetření sérových hladin párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu (HLC) (systém HevyLite™) na platformě nefelometru BN II. Iniciální analýza na doposud početně omezeném souboru nemocných s MGUS a MM typu IgA a IgG potvrdila vztah HLC k aktivitě onemocnění, byly prokázány silné korelace hodnot HLC k hladinám M-proteinu stanovených elektroforézou séra a k celkovému IgG resp. IgA stanovených nefelometricky. Jako velmi přínosné se jeví výsledky stanovení u nemocných s dosaženou léčebnou odpovědí, umožňující detailní stanovení velmi nízkých hladin MIG. Získané výsledky posloužily v současnosti jako podklad k získání grantové studie IGA MZ ČR.

8. Literatura

1. Špička I et al. Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Galén 2005, Praha, s. 39-60.
2. Adam Z, Ščudla V, Neubauer J. Mnohočetný myelom. In: Adam Z, Vorlíček J et al. Hematologie II: Přehled maligních hematologických nemocí. Grada publishing, Praha, 2001, s. 461-502.
3. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. Blood 2008; 111: 2962-2972.
4. Rajkumar SV. Multiple myeloma. Curr Probl Cancer 2009; 33: 7-64.
5. The International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. Brit J Haematol 2003; 121: 749-757.
6. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. Incidence of multiple myeloma in Olmsted County, Minnesota. Cancer 2004; 101: 2667-74.
7. Bergsagel DE, Wong O, Bergsagel PL et al. Benzene and multiple myeloma: appraisal of the scientific evidence. Blood 1999; 94: 1174-1182.
8. Lynch HT, Ferrara K, Barlogie B et al. Familial myeloma. N Engl J Med 2008; 359: 152-7.
9. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. Blood 2009; 113: 5412-5417.
10. Gonzáles D, Burg M, García-Sanz R et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. Blood 2007; 110: 3112-3121.
11. Huff CA, Matsui W. Multiple myeloma cancer stem cells. J Clin Oncol 2008; 26: 2895-2900.
12. Hideshima T., Bergsagel PL, Kuehl M, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. Blood 2004; 104: 607-618.
13. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process. Blood 1998; 91: 3-21.
14. Durie BGM, Salmon SE. Multiple myeloma, macroglobulinemia and monoclonal gammopathies. In: Hoffbrand AV, Blain MC, Hirsh J. Recent advances in hematology. Churchill Livingstone, 1977, New York, p. 243-261.

15. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Brit J Haematol* 2003; 121: 749-757.
16. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23: 3-9.
17. Česká myelomová skupina. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. *Trans Hemat dnes* 2009; 15: 3-80.
18. Molle P. Current trends in the diagnosis, therapy and monitoring of the monoclonal gammopathies. *Clin Biochem Rev* 2009; 30: 93-103.
19. Bladé J, Dimopoulos M, Rosinol L, Rajkumar SV, Kyle RA. Smoldering (Asymptomatic) multiple myeloma: current diagnostic criteria, new predictors of outcome, and follow-up recommendation. *J Clin Oncol* 2009; 28: 690-697.
20. Kyrtsolis M-C, Maltezas D, Tzenou T, Kouleris E, Bradwell AR. Staging systems and prognostic factors as a guide to therapeutic decision in multiple myeloma. *Semin Hematol* 2009; 46: 110-117.
21. Durie BGM, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer* 1975; 36: 842-854.
22. Jacobson JL, Hussein MA, Barlogie B, Durie BGM, Crowley JJ. A new staging system for multiple myeloma patients based on the Southwest Oncology Group (SWOG) experience. *Brit J Haematol* 2003, 122: 441 – 450.
23. Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J et al. International Staging System for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3412 – 3420.
24. Smith A., Wisloff F, Samson D. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. *Brit J Haematol* 2005; 132: 410-451.
25. Tichý M. Laboratorní analýza monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů). Český Těšín: FINIDR s.r.o., 1997, ISBN 80-902022-1-7.
26. Tichý M, Maisnar V. Laboratorní průkaz monoklonálních imunoglobulinů. *Vnitř Lék* 2006; 52: 41-45.
27. Bladé J et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation *Brit J Haematol* 1998; 102: 1115-1123.

28. Durie BGM, Harousseau J-L, Miguel JS et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006; 20: 1467-1473.
29. Rajkumar SV, Miguel JS, Harousseau J-L. Guidelines for the uniform reporting of clinical trials: Report of the 2008 International Myeloma Workshop Consensus Panel I. <http://myeloma.org>
30. Ščudla V, Adam Z. Diagnostický význam a úskalí hodnocení roztěrového preparátu kostní dřeně u mnohočetného myelomu. *Vnitř Lék* 2006; 52: 55-65.
31. Fabian P, Moulis M. Možnosti histologického vyšetření kostní dřeně při diagnostice mnohočetného myelomu. *Vnitř Lék* 2006; 52: 66-70.
32. Ng AP, wei A, Bhurani D et al. the senzitivity of CD138 immunostaining of bone marrow trephine specimens for quantifying marrow involvement in MGUS and myeloma, including samples with a low percentage of plasma cells. *Haematologica* 2006; 91: 972-975.
33. Chee ChW, Kumar S, Larson DR et al. The importance of bone marrow examination in determining complete response to therapy in patients with multiple myeloma. *Blood*; 114: 2617-2618.
34. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008; 93: 431-438.
35. Paiva B, Vidriales MB, Pérez JJ et al. Multiparameter flow cytometry quantification of bone marroe plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assesment in myeloma patients. *Haematologica* 2009; 94: 1599-1602.
36. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002; 99: 1853-1856.

37. Paiva B, Vidriales MB, Mateo G et al. The persistence of immunophenotypically normal residual bone marrow plasma cells at diagnosis identifies a good prognostic subgroup of symptomatic multiple myeloma patients. *Blood* 2009; 114: 4369-4372.
38. Paiva B, Vidriales MB, Cerveró J et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood* 2008; 112: 4017-4023.
39. Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G et al. 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* 2007; 110: 2586-2592.
40. Kovářová L, Burešová I, Buchler T et al. Phenotype of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Neoplasma* 2009; 56: 526-532.
41. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009; 23: 2210-2221.
42. Liebisch P, Dohner H. Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006; 42: 1520-1529.
43. Henry T, Fonseca R. Genomics and proteomics in multiple myeloma and Waldenström macroglobulinemia. *Curr Opin Hematol* 2007; 14: 369-374.
44. Avet-Loiseau H. Role of genetic prognostication in myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 625-635.
45. Lai JL, Zandecki M, Mary JY et al. Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood* 1995; 85: 2490-2497.
46. Smadja NV, Bastard Ch, Brigaudeau Ch et al. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2001; 98: 2229-2238.

47. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood* 2007; 109: 3489-3495.
48. Sibley K, Fenton JAL, Dring AM et al. A molecular study of the t(4;14) in multiple myeloma. *Brit J Haematol* 2002; 118: 514-520.
49. Fonseca R, Blood EA, Oken MM et al. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood* 2002; 99: 3735-3741.
50. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B et al. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 2002; 99: 2185-2191.
51. Stewart AK, Chang H, Trudel S et al. Diagnostic evaluation of t(4;14) in multiple myeloma and evidence of clonal evolution. *Leukemia* 2007; 21: 2358-2359.
52. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA et al. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* 2003; 101: 1520-1529.
53. Hanamura I, Stewart JP, Huang Y et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescent 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: 1724-1732.
54. Sonneveld P. Gain of 1q21 in multiple myeloma: from bad to worse? *Blood* 2006; 108: 1426-1427.
55. Ross FM, Chiecchio L, Dagrada GP et al. The t(14;20) is a poor prognostic factor in myeloma but is associated with long-term stable disease in monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Haematologica* 2010; 95: 1221-1225.
56. Lodé L, Eveillard M, Trichet V et al. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica* 2010; 95: 1973-1976.

57. Chng WJ, Mulligan G, Bryant B et al. Survival of genetic subtypes of relapsed myeloma may be modulated by secondary events. *Blood* 2007; 109: 3610-3611.
58. Fonseca R, Blood E, Harrington D et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in multiple myeloma. *Blood* 2003; 101: 4569-4575.
59. Stewart AK, Bergsagel PL, Greipp PR et al. A practical guide to defining high-risk myeloma for clinical trials, patients counseling and choice of therapy. *Leukemia* 2007; 21: 529-534.
60. Kumar SK, Mikhael JR, Buadi FK et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo stratification of myeloma and risk-adapted therapy (mSMART) consensus guidelines. *Mayo Clin Proc* 2009; 84: 1095-1110.
61. Dimopoulos M, Terpos E, Comenzo RL 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; 23:1545-1556.
62. Horger M, Claussen CD, Bross-Bach U et al. Whole-body low-dose multidetector row-CT in the diagnosis of multiple myeloma: an alternative to conventional radiography. *Eur J Radiol* 2005; 54: 289-297.
63. Neubauer J, Repko M. Metodika kostních biopsií perkutánním způsobem za navigace CT. *Vnitř Lék* 2006; 52: 71-75.
64. Mysliveček M, Nekula J, Bačovský J. Zobrazovací metody v diagnostice a sledování mnohočetného myelomu. *Vnitř Lék* 2006; 52: 46-54.
65. Heřman M, Hrbek J, Ščudla V et al. Korelace nálezů celotělové MR se stážovacím systémem Durie/Salmon u pacientů s monoklonální gamapatií nejistého významu a mnohočetným myelomem. *Čes Radiol* 2010; 64: 203-212.
66. Hillengass J, Fechtner K, Weber M-A et al. Prognostic significance of focal lesions in whole-body magnetic resonance imaging in patients with asymptomatic multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1606-1610.

67. Durie BGM. The role of anatomic and functional staging in myeloma: description of Durie/Salmon plus staging system. *Eur J Cancer* 2006; 42: 1539-1543.
68. Bacovsky J, Scudla V, Myslivecek M et al. Scintigraphy using (99m)Tc-MIBI, a sensitive parameter of activity of multiple myeloma. *Neoplasma* 2005; 52: 306-306.
69. Bacovsky J, Myslivecek M, Scudla V et al. Tc-99m MIBI scintigraphy in multiple myeloma: prognostic value of different Tc-99m MIBI uptake patterns. *Clin Nucl Med* 2010; 35: 667-670.
70. Balleari E, Villa G, Garré S et al. Technetium-99m-sestaMIBI scintigraphy in multiple myeloma and related gammopathies: a useful tool for the identification and follow-up of myeloma bone disease. *Haematologica* 2001; 86: 78-84.
71. Martín MG, Colás MSR, Sahún MVD et al. Baseline Tc-MIBI scanning predicts survival in multiple myeloma and helps to differentiate this disease from monoclonal gammopathy of unknown significance. *Haematologica* 2005; 90: 1141-1143.
72. Adam Z, Bolcak K, Stanicek J et al. Fluorodeoxyglucose positron emission tomography in multiple myeloma, solitary plasmocytoma and monoclonal gammopathy of unknown significance. *Neoplasma* 2007; 54: 536-540.
73. Zamagni E, Nanni C, Patriarca F et al. A prospective comparison of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography, magnetic resonance imaging and whole-body planar radiographs in the assesment of bone disease in newly diagnosed multiple myeloma. *Haematologica* 2007; 92: 50-55.
74. Harousseau J-L, Attal M, Avet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. *Blood* 2009; 114: 3139-3146.
75. Kyle RA, Leong T, Li S et al. Complete response in multiple myeloma. *Cancer* 2006; 106: 1958-1966.
76. Barlogie B, Anaissie E, Haessler J et al. Complete remission sustained 3 years from treatment initiation is a powerful surrogate for extended survival in multiple myeloma. *Cancer* 2008; 113: 355-359.

77. Dingli D, Pacheo JM, Nowakowski GS et al. Relationship between depth of response and outcome in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4933-4937.
78. Dingli D, Pacheo JM, Dispenzieri A et al. Serum M-spike and transplant outcome in patients with multiple myeloma. *Cancer sci* 2007; 98: 1035-1040.
79. Lahuerta JJ, Martinez-Lopez J, De La Serna J et al. Remission status defined by immunofixation vs. electrophoresis after autologous transplantation has a major impact on the outcome of multiple myeloma patients. *Brit J Haematol* 2000; 109: 438-446.
80. Chanan-Khan AA, Giralt S. Importance of achieving a complete response in multiple myeloma, and the impact of novel agents. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2612-2624.
81. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008; 111: 2516-2520.
82. San-Miguel J, Harousseau J-L, Joshua D, Anderson KC. Individualizing treatment of patients with myeloma in the era of novel agents. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2761-2766.
83. Rajkumar SV, Dispenzieri A, Fonseca R et al. Thalidomide for previously untreated indolent or smoldering multiple myeloma. *Leukemia* 2001; 15: 1274-1276.
84. Bladé J, Rosinol L, Cibeira MT et al. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma beyond 2010. *Blood* 2010; 115: 3655-3663.
85. Bensinger W. Stem-cell transplantation for multiple myeloma in the era of novel drugs. *J Clin Oncol* 2008; 26: 480-492.
86. Kumar S, Giralt S, Stadtmauer EA et al. Mobilization in myeloma revisited: IMWG consensus perspectives on stem cell collection following initial therapy with thalidomide-, lenalidomide- or bortezomib-containing regimens. *Blood* 2009; 114: 1729-1735.
87. DiPersio JF, Stadtmauer EA, Nadermanee A et al. Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood*; 113: 5720-5726.

88. Tosi P, Zamagni E, Ronconi S et al. Safety of autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma and chronic renal failure. *Leukemia* 2000; 14: 1310-1313.
89. López-Pérez R, García-Sanz R, González D et al. The detection of contaminating clonal cells in apheresis products is related to response and outcome in multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia*, 2000; 14: 1493-1499.
90. Krejci M, Hajek R, Buchler T et al. Simple variables predict survival after autologous transplantation: a single centre experience in 171 multiple myeloma patients. *Neoplasma* 2007; 54: 143-148.
91. Lahuerta JJ, Mateos MV, Martínez-López J et al. Influence of pre- and post-transplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5775-5782.
92. Moreau P, Misbahi R, Milpied N et al. Long-term results (12 years) of high-dose therapy in 127 patients with de novo multiple myeloma. *Leukemia* 2002; 16: 1838-1843.
93. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 2005; 106: 2837-2840.
94. Chang H, Qi XY, Samiee S et al. Genetic risk identifies multiple myeloma patients who do not benefit from autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 793-796.
95. Desikan R, Barlogie B, Sawyer J et al. Results of high-dose therapy for 1000 patients with multiple myeloma: durable complete remissions and superior survival in the absence of chromosome 13 abnormalities. *Blood* 2000; 95: 4008-4010.
96. Gahrton G, Björkstrand B. Allogeneic transplantation in multiple myeloma. *Haematologica* 2008; 93: 1295-1300.

97. Bensinger WI Role of autologous and allogeneic stem cell transplantation in myeloma. *Leukemia* 2009; 23: 442-448.
98. Lokhorst H, Einsele H, Vesole D et al. International myeloma working group consensus statement regarding the current status of allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4521-4530.
99. Kumar S, Witzig TE, Dispenzieri A et al. Effect of thalidomide therapy on bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia* 2004; 18: 624-627.
100. Giralt S. A TAD better for myeloma therapy? *Blood* 2010; 115: 1109.
101. Zemanova M, Scudla V, Adam Z et al. Low-dose thalidomide regimens in therapy of relapsed or refractory multiple myeloma. *Neoplasma* 2008; 55: 345-349.
102. Moehler TM, Neben K, Benner A et al. Salvage therapy for multiple myeloma with thalidomide and CED. *Blood* 2001; 98: 3846-3848.
103. Minnema MC, Bretkreutz I, Auwerda JJA et al. Prevention of venous thromboembolism with low molecular-weight heparin in patients with multiple myeloma treated with thalidomide and chemotherapy. *Leukemia* 2004; 18: 2044-2046.
104. San Miguel J, Bladé J, Boccadoro M et al. A practical update on the use of bortezomib in the management of multiple myeloma. *The Oncologist* 2006; 11: 51-61.
105. Popat R, Oakerwee HE, Hallam S et al. Bortezomib, doxorubicin and dexamethasone (PAD) front-line treatment of multiple myeloma: updated results after long-term follow-up. *Brit J Haematol* 2008; 141: 512-516.
106. Jagannath S, Richardson PG, Sonneveld P et al. Bortezomib appears to overcome the poor prognosis conferred by chromosome 13 deletion in phase 2 and 3 trials. *Leukemia* 2007; 21: 151-157.
107. Sagaster V, Ludwig H, Kaufmann H et al. Bortezomib in relapsed multiple myeloma: response rates and duration of response are independent of chromosome 13q-deletion. *Leukemia* 2007; 21: 164-168.

108. Terpos E, Sezer O, Croucher P, Dimopoulos MA. Myeloma bone disease and proteasome inhibition therapies. *Blood* 2007; 110: 1098-1104.
109. Cavaletti G, Jakubowiak AJ. Peripheral neuropathy during bortezomib treatment of multiple myeloma: a review of recent studies. *Leuk Lymphoma* 2010; 51: 1178-1187.
110. Rajkumar SV, Hayman SR, Lacy MQ et al. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood* 2005; 106: 4050-4053.
111. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007; 357: 2123-32.
112. Herrera GA, Sanders PW. Paraproteinemic renal diseases that involve the tubulointerstitium. *Contrib Nephrol* 2007; 153: 105-115.
113. Adam Z, Pour L, Krejčí M et al. Poškození ledvin při mnohočetném myelomu a dalších monoklonálních gamapatiích. *Vnitř Lék* 2008; 54: 847-861.
114. Dimopoulos MA, Terpos E, Chanan-Khan A et al. Renal impairment in patients with multiple myeloma: A consensus statement on behalf of the International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4976-4984.
115. Adam Z, Krejčí M, Tichý M et al. Léčba selhání ledvin u mnohočetného myelomu. *Vnitř Lék* 2009; 55: 570-582.
116. Kastiris E, Anagnostopoulos A, Roussou M et al. Reversibility of renal failure in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high dose dexamethasone-containing regimens and the impact of novel agents. *Haematologica* 2007; 92: 546-549.
117. Chanan-Khan A, Kaufman JL, Mehta J et al. Activity and safety of bortezomib in multiple myeloma patients with advanced renal failure: a multicenter retrospective study. *Blood* 2007; 109: 2604-2606.
118. Ludwig H, Drach J, Graf H et al. Reversal of acute renal failure by bortezomib-based chemotherapy in patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2007; 92: 1411-1414.

119. Hutchison CA, Cockwell P, Reid S et al. Efficient removal of immunoglobulin free light chains by hemodialysis for multiple myeloma: In vitro and In vivo studies. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 886-895.
120. Hutchison CA, Bradwell AR, Cook M et al. Treatment of acute renal failure secondary to multiple myeloma with chemotherapy and extended high cut-off hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 745-754.
121. Ludwig H, Zojer N. Supportive care in multiple myeloma. *Best Pract res Clin Haem* 2007; 20: 817-835.
122. Lacy MQ, Dispenzieri A, Gertz MA et al. Mayo clinic consensus statement for the use of bisphosphonates in multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 1047-1053.
123. Repko M, Chaloupka R, Grosman R et al. Možnosti operačního řešení myelomového postižení páteře. *Vnitř Lék* 2006; 52: 32-40.
124. Hořejší V, Bartůňková J. *Základy imunologie*. Triton, 1998, Praha, s. 44-49.
125. Harfenist EJ, Murray RK. Plasmatické proteiny, imunoglobuliny a krevní koagulace. In: *Harperova biochemie*. H&H, Praha, s. 701-724.
126. Hammerton K, Cooper DA, Duckett M, Penny R. Biosynthesis of immunoglobulin in human immunoproliferative diseases: I. kinetics of synthesis and secretion of immunoglobulin and protein by bone marrow cells in myeloma. *J Immunol* 1978; 121: 409-417.
127. Hannam-Harris AC, Gordon J, Smith JL. Immunoglobulin synthesis by neoplastic B lymphocytes: free light chain synthesis as a marker of B cell differentiation. *J Immunol* 1980; 125: 2177-2181.
128. Bradwell AR. *Serum free light chain analysis (4th edition)*. The Binding Site Ltd. , Birmingham, UK 2006; ISBN: 0704425297, p. 12-28.
129. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001; 47: 673-680.

130. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RAS et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free κ and free λ immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem* 2002; 48: 1437-1444.
131. Tate JR, Gill D, Cobcroft R, Hickman PE. Practical considerations of the measurement of free light chains in serum. *Clin Chem* 2003; 49: 1252-1257.
132. Hutchison CA, Basnayake K, Cockwell P. Serum free light chain assessment in monoclonal gammopathy and kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5: 621-627.
133. Abadie JM, van Hoeven KH, Wells JM. Are renal reference intervals required when screening for plasma cell disorders with serum free light chains and serum protein electrophoresis? *Am J Clin Pathol* 2009; 131: 166-171.
134. Bradwell AR. Serum free light chain measurements move to center stage. *Clin Chem* 2005; 51: 805-807.
135. Pratt G. The evolving use of serum free light chain assays in haematology. *Brit J Haematol* 2008; 141: 413-422.
136. Katzmann JA. Screening panel for monoclonal gammopathies: time to change. *Clin Biochem Rev* 2009; 30: 105-111.
137. Ščudla V, Vytřasová M, Minařík J. Klinický význam hodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonálních gamapatií. *Trans Hemat dnes* 2005; 11: 47-53.
138. Ščudla V, Schneiderka P, Pika T et al. Klinický význam hodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonálních gamapatií. *Klin Biochem Metab* 2008; 16: 84-88.
139. Bradwell AR. Analysis of immunoglobulin heavy chain/light chain pairs (Hevylite™). In: Bradwell A.R: Serum free light chain analysis, 6th edition. Birmingham: The Binding Site Ltd., 2010, s. 301-320.
140. Keren DF. Heavy/light chain analysis of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009, 55: 1606-08.

141. Ščudla V, Pika T, Heřmanová Z. Hevylite – nová analytická metoda v diagnostice a hodnocení průběhu monoklonálních gamapatií. *Klin Biochem Metab* 2010; 39: 62-68.
142. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006; 354: 1362-9.
143. Weiss BM, Abadie J, Verma P et al. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009; 113: 5418-5422.
144. Ščudla V, Pika T. Monoklonální gamapatie nejistého významu ve světle současných poznatků. *Klin Biochem Metab* 2009; 38: 62-71.
145. Mailankody S, Mena E, Yuan CM et al. Molecular and biologic markers of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Leuk Lymph* 2010; 51: 2159-2170.
146. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002; 346: 564-569.
147. Baldini L, Guffanti A, Cesana BM et al. Role of different hematologic variables in defining the risk of malignant transformation in monoclonal gammopathy. *Blood* 1996; 87: 912-918.
148. Cesana C, Klersy C, Barbarano L et al. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1625-1634.
149. Veneri D, Agel H, Franchini M et al. Malignant evolution of monoclonal gammopathy of undetermined significance: analysis of 633 consecutive cases with a long term follow-up. *Haematologica* 2004; 89: 876-878.
150. Sackmann F, Pavlovsky MA, Corrado C et al. Prognostic factors in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* 2008; 93: 153-154.
151. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005; 106: 812-817.

152. Marien G, Oris E, Bradwell AR et al. Detection of monoclonal proteins in sera by capillary zone electrophoresis and free light chain measurement. *Clin Chem* 2002; 48: 1600-1601.
153. Katzmman JA, Abraham RS, Dispenzieri A et al. Diagnostic performance of quantitative κ and λ free light chain assays in clinical practice. *Clin Chem* 2005; 51: 878-881.
154. Weiss BM, Kuehl WM. Advances in understanding monoclonal gammopathy of undetermined significance as a precursor of multiple myeloma. *Expert Rev hematol* 2010; 3: 165-174.
155. Dispenzieri A, Kyle RA, Merlini G et al. International myeloma working group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009; 23: 215-224.
156. Berenson JR, Anderson KC, Audell RA et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: a consensus statement. *Brit J Haematol* 2010; 150: 28-38.
157. Kyle RA, Durie BGM, Landgren O et al. 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* 2010; 24: 1121-1127.
158. Dispenzieri A, Katzmman JA, Kyle RA et al. Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance. a retrospective population-based cohort study. *Lancet* 2010; 375: 1721-1728.
159. Bianchi G, Kyle RA, Colby CL et al. Impact of optimal follow-up of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) on early diagnosis and prevention of myeloma-related complications. *Blood* 2010; 116: 2019-2025.
160. Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT et al. Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. *Brit J Haematol* 2004; 126: 348-54.

161. Snozek CLH, Katzmann JA, Kyle RA et al. Prognostic value of the serum free light chain ratio in newly diagnosed myeloma: proposed incorporation into the international staging system. *Leukemia* 2008; 22: 1933-1937.
162. Dispenzieri A, Zhang L, Katzmann JA et al. Appraisal of immunoglobulin free light chain as a marker of response. *Blood* 2008; 111: 4908-4915.
163. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009; 55: 1517-1522.
164. Bradwell AR. Serum free light chain analysis (6th edition). The Binding Site Ltd. , Birmingham, UK 2010; ISBN: 9780704427969, p. 86-94.
165. Kyrtsolis MC, Vassilakopoulos TP, Kafasi N et al. Prognostic values of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma. *Brit J Haematol* 2007; 137: 240-243.
166. Van Rhee F, Bolejack V, Hollmig K et al. High serum-free light chain levels and their rapid reduction in response to therapy define an aggressive multiple myeloma subtype with poor prognosis. *Blood* 2007; 110: 827-832.
167. Van Gysel M, Marien G, Verhoef G et al. Free light chain testing in follow-up of multiple myeloma. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 1044-1046.
168. Walker R, Rasmussen E, Cavallo F et al. Correlation of suppression of FDG PET uptake with serum free light chain levels – both FDG PET-CT and serum clonal free light chain response precede and predict the likelihood of subsequent complete remission in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2005; 106, a3493.
169. Pratt G, Mead GP, Godfrey KR et al. The tumor kinetics of multiple myeloma following autologous stem cell transplantation as assessed by measuring serum-free light chains. *Leuk Lymph* 2006; 47: 21-28.
170. Kumar S, Dispenzieri A, Larson D et al. Normalization of the serum free light chain (FLC) ratio is associated with superior overall survival among myeloma patients achieving immunofixation negative state: results supporting incorporation of serum FLC ratio in stringent CR definition. *Blood* 2008; 112: a1692.

171. Mead GP, Drayson MT. Sensitivity of serum free light chain measurement of residual disease in multiple myeloma patients. *Blood* 2009; 114: 1717.
172. Allen S, Vickrey E, Mehta J et al. The relationship between serum free light chain levels and serum immunofixation electrophoresis: implications for the definition of „stringent CR“ in myeloma. *Blood* 2008; 112: a2724.
173. Asenova S, Bacher U, Gerritzen A et al. Role of free light chain assay ratio to distinguish between CR according EBMT criteria or stringent complete remission (sCR) according IMWG in multiple myeloma patients. *Blood* 2009; 114: a1787.
174. Kröger N, Asenova S, Gerritzen A. Questionable role of free light assay ratio to determine stringent complete remission in multiple myeloma patients. *Blood* 2010; 115: 3413-3414.
175. De Larrea CF, Cibeira MT, Elena M et al. Free light chain assay and stringent complete remission in multiple myeloma: more questions than answers. *Blood* 2010; 115: 3414-3415.
176. Hall SL, Tate J, Gill D et al. Significance of abnormal protein bands in patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Clin Biochem Rev* 2009; 30: 113-118.
177. De Larrea CF, Tovar N, Cibeira MT et al. Emergence of oligoclonal bands in patients with multiple myeloma in complete remission after induction chemotherapy: association with the use of novel agents. *Haematologica* 2011; 96: 171-173.
178. Maisnar V, Tichý M, Smolej L et al. Isotype class switching after transplantation in multiple myeloma. *Neoplasma* 2007; 54: 225-228.
179. Mark T, Jayabalan D, Coleman M et al. Atypical serum immunofixation patterns frequently emerge in immunomodulatory therapy and are associated with a high degree of response in multiple myeloma. *Brit J Haematol* 2008; 143: 654-660.
180. De Larrea CF, Cibeira MT, Elena M et al. Abnormal serum free light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission has strong association with

the presence of oligoclonal bands: implication for stringent complete remission definition. *Blood* 2009; 114: 4954-4956.

181. Bradwell AR. Free light chain escape. In: Bradwell AR. Serum free light chain analysis. 6th edition, The Binding site group Ltd., UK 2010; ISBN: 9780704427969, p 104-105.
182. Hobbs JR. Growth rates and responses to treatment in human myelomatosis. *Brit J Haematol* 1969; 16: 607-618.
183. Ayliffe MJ, Davies FE, de Castro D, Morgan GJ. Demonstration of changes in plasma cell subsets in multiple myeloma. *Haematologica* 2007; 92: 1135-1138.
184. Kühnemund A, Liebisch P., Bauchmüller K et al. Light-chain escape-multiple myeloma – an escape phenomenon from plateau phase: report of the largest patients series using LC-monitoring. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 477-84.
185. Mead G, Hobbs J, Sharp K, Harding S, Drayson M. Incidence of light chain escape in myeloma patients at relapse. *Brit J Haematol* 2008; 141 (Suppl. 1): 35.
186. Drayson M, Tang LX, Drew R et al. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood* 2001;97:2900-2902.
187. Shaw GR. Nonsecretory plasma cell myeloma – becoming even more rare with serum free light-chain assay: a brief review. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(8):1212-1215.
188. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP et al. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* 2003; 361: 489-491.
189. Nowrousian MR, Brandhorst D, Sammet C et al. Serum free light chain analysis and urine immunofixation electrophoresis in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8706- 8714.
190. Alyanakian MA, Abbas A, Delarue R et al. Free immunoglobulin light-chain serum levels in the follow-up of patients with monoclonal gammopathies: correlation with 24-hr urinary light-chain excretion. *Am J Hematol* 2004; 75: 246-248.
191. Abraham RS, Clark RJ, Bryant SC et al. Correlation of serum immunoglobulin free light chain quantification with urinary Bence Jones protein in light chain myeloma. *Clin chem* 2002; 48: 655-657.

192. Hill PG, Forsyth JM, Rai B et al. Serum free light chains: An alternative to the urine Bence Jones proteins screening test for monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2006; 52: 1743-1748.
193. Fulton RB, Fernando SL. Serum free light chain assay reduces the need for serum and urine immunofixation electrophoresis in the evaluation of monoclonal gammopathy. *Ann Clin Biochem* 2009; 46: 407-412.
194. Katzmann JA, Dispenzieri A, Kyle RA et al. Elimination of the need for urine studies in the screening algorithm for monoclonal gammopathies by using serum immunofixation and free light chain assay. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 1575-1578.
195. Maisnar V, Hajek R, Scudla V et al. High-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation changes prognosis of IgD multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2007; 79: 305-309.
196. Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA et al. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood* 2008; 111: 785 – 789.
197. Cavallo F, Rasmussen E, Zangari M et al. Serum Free-Lite chain (sFLC) assay in multiple myeloma (MM): Clinical correlates and prognostic implications in newly diagnosed MM patients treated with total therapy 2 or 3 (TT2/3). *Blood* 2005; 106: a3490.
198. Kumar S, Zhang L, Dispenzieri A et al. Association of high levels of free light chain and the presence of IgH translocations in multiple myeloma and prognostic implications. *Blood* 2008; 112: a1677.
199. Kumar S, Zhang L, Dispenzieri A et al. Relationship between elevated immunoglobulin free light chain and the presence of IgH translocations in multiple myeloma. *Leukemia* 2010; 24: 1498 – 1505.
200. Bradwell AR. Serum free light chain analysis (6th edition). The Binding Site Ltd. , Birmingham, UK 2010; ISBN: 9780704427969, p 111-125, 175 - 183.
201. Hutchison C, Plant T, Drayson M et al. Serum free light chain measurement aids the diagnosis of myeloma in patients with severe renal failure. *BMC Nephrology* 2008; 9: 11.
202. Kyrtsolis MC, Vassilakopoulos TP, Kafasi N et al. Prognostic implication of the combination SFLCR and ISS in MM. *Haematologica* 2007; 92 (s2): 207.

203. Kyrtsolis MC, Vassilakopoulos TP, Kafasi N et al. The addition of sFLCR improves ISS prognostication in multiple myeloma. *Blood* 2007; 110: a1490.
204. Bačovský J, Ščudla V: Cytokinová síť u mnohotného myelomu. *Vnitř Lek* 1994; 40: 517-520.
205. Lauta VM. A review of the cytokine network in multiple myeloma. *Cancer* 2003; 97: 2440 – 52.
206. Urbanska-Rys H, Wierzbowska A, Robak T. Circulating angiogenic cytokines in multiple myeloma and related disorders. *Eur Cytokine Netw* 2003; 14: 40-51.
207. Ščudla V, Budíková M, Pika T et al. Srovnání sérových hladin vybraných biologických ukazatelů u monoklonální gamapatie nejistého významu a mnohočetného myelomu. *Vnitř Lek* 2006; 52: 232-240.
208. Turesson I, Abildgaard N, Ahlgren T et al. Prognostic evaluation in multiple myeloma: an analysis of the impact of new prognostic factors. *Brit J Haematol* 1999; 106: 1005-1012.
209. Ščudla V, Bačovský J, Papajík T et al. Tymidinkináza séra u mnohotného myelomu. Vztah k vybraným laboratorním ukazatelům nemoci. *Vnitř Lek* 1994; 40: 151-156.
210. Ščudla V, Bačovský J, Vyřasová M et al. Prognostické faktory a klinické stážovací systémy u mnohočetného myelomu v souboru 237 nemocných léčených v období 1991-2002 konvenční chemoterapií. *Klin Onkol* 2002; 15: 7-14.
211. Pika T, Zemanová M, Minařík J et al. Vztah sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu ke stupni progresu mnohočetného myelomu. *Vnitř Lek* 2006; 52: 1120.
212. Bačovský J, Ščudla V, Vyřasová M et al. Monitoring of bone resorption and bone formation in multiple myeloma. *Biomed Papers* 2002; 146: 59-61.
213. Fonseca R, Trendle MC, Leong T et al. Prognostic value of serum markers of bone metabolism in untreated multiple myeloma patients. *Brit J Haematol* 2000; 109: 24-29.
214. Abildgaard N, Bentzen SM, Nielsen JL et al. Serum markers of bone metabolism in multiple myeloma: prognostic value of the carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP). *Brit J Haematol* 1997; 96: 103-110.

215. Corso A, Arcaini L, Mangiacavali S et al. Biochemical markers of bone disease in asymptomatic early stage multiple myeloma. A study on their role in identifying high risk patients. *Haematologica* 2001; 86: 394-398.
216. Sezer O, Heider U, Zavrski I et al. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood* 2003; 101: 2094-2098.
217. Seidel C, Hjertner O, Abildgaard N et al. Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood* 2001; 98: 2269-2271.
218. Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* 2001; 98: 3534-3540.
219. Jourdan M, ferlin M, Legouffe E et al. The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Brit J Haematol* 1998; 100: 637-646.
220. Kyrtonis MC, Vassilakopoulos TP, Siakantaris MP et al. Serum syndecan-1, basic fibroblast growth factor and osteoprotegerin in myeloma patients at diagnosis and during the course of the disease. *Eur J Haematol* 2004; 72: 252-258.
221. Seidel C, Borset M, Hjertner O et al. High levels of soluble syndecan-1 in myeloma-derived bone marrow: modulation of hepatocyte growth factor activity. *Blood* 2000; 96: 3139-3146.
222. Yang Y, Yaccoby S, Liu W et al. Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood* 2002; 100: 610-617.
223. Dhodapkar MV, Sanderson RD. Syndecan-1 (CD 138) in myeloma and lymphoid malignancies: A multifunctional regulator of cell behavior within the tumor microenvironment. *Leuk Lymph* 1999; 34: 35-43.
224. Seidel C, Sundan A, Hjørh M et al. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood* 2000; 95: 388-392.
225. Maisnar V, Toušková M, Tichý M et al. The significance of soluble CD138 in diagnosis of monoclonal gammopathies. *Neoplasma* 2006; 53: 26-29.
226. Seidel C, Borset M, Turesson I et al. Elevated serum concentration of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma. *Blood* 1998; 91: 806-812.
227. Standal T, Abildgaard N, Fagerli UM et al. HGF inhibits BMP-induced osteoblastogenesis: possible implications for the bone disease of multiple myeloma. *Blood* 2007; 109: 3024-3030.
228. Holt RU, fagerli UM, Baykov V et al. Hepatocyte growth factor promotes migration of human myeloma cells. *Haematologica* 2008; 93: 619-622.

229. Alexandrakis MG, Passam FH, Sfiridaki A et al. Elevated serum concentrations of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma: correlation with markers of disease activity. *Am J Hematol* 2003; 72: 229-233.
230. Seidel C, Lenhoff S, Brabrand S et al. Hepatocyte growth factor in myeloma patients treated with high-dose chemotherapy. *Brit J Haematol* 2002; 119: 672-676.
231. Iwasaki T, Sano H. Predicting treatment responses and disease progression in myeloma using serum vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor levels. *Leuk Lymph* 2003; 44: 1275-1279.
232. Silvestris F, Tucci M, Cafforio P, Dammaco F. Fas-L up-regulation by highly malignant myeloma plasma cells: role in the pathogenesis of anemia and disease progression. *Blood* 2001; 97: 115-1164.
233. Villuger A, Egle A, Marschitz I et al. Constitutive expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand on multiple myeloma cells: a potential mechanism of tumor-induced suppression of immune surveillance. *Blood* 1997; 90: 12-20.
234. Dingli D, Kyla RA, Rajkumar SV et al. Immunoglobulin free light chains and solitary plasmacytoma of bone. *Blood* 2006; 108: 1979-1983.
235. Maltezas D, Dimopoulos MA, Katodritou I et al. The prognostic impact of sFLCr-ISS combination is concerned in MM patients treated with new agents but not in those that underwent ASCT. *Haematologica* 2001; 96(s1): 88.
236. Bradwell AR, Harding S, Fourrier NJ et al. Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin kappa/lambda ratios. *Clin Chem* 2009; 55: 1646-55.
237. Eckhold J, Poenisch W, Kratzsch J et al. Analytical validation of Hevylite IgA assay for the diagnosis of monoclonal gammopathies. *Hematology Reports* 2010; 2(s2), p. 52.
238. Rodríguez- Molina JJ, Navarro J, Fernández-Cruz E. Quantification of IgA- κ and IgA- λ immunoglobulins in 54 serum samples with detectable IgA monoclonal component. *Hematology Reports* 2010; 2(s2), p. 54.
239. Katzmann J, Clark R, Dispenzieri A et al. Isotype-specific heavy/light chain (HLC) suppression as a predictor of myeloma development in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Blood* 2009; 114: a1788.

240. Avet-Loiseau H, Harousseau J-L, Moreau P et al. Heavy/Light Chain Specific Immunoglobulin Ratios at Presentation Are Prognostic for Progression Free Survival in the IFM 2005-01 Myeloma Trial. *Blood* 2009; 114: a1818.

9. Přehled publikační a přednáškové činnosti

9.1 Práce související s tématem dizertační práce

9.1.1 Původní práce – 1. autor:

1. Vztah sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu ke stupni pokročilosti mnohočetného myelomu.
Pika T., Zemanová M., Minařík J., Schneiderka P., Bačovský J., Ščudla V.
Trans Hemat dnes 2007; 13: 12-15.
2. Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u mnohočetného myelomu a monoklonální gamapatie nejistého významu
Pika T., Minařík J., Zemanová M., Schneiderka P., Bačovský J., Šlézar J., Ščudla V.
Klin Biochem Metab 2008; 16 (37), No 2: 102-105.
3. The correlation of serum immunoglobulin free light chain levels and selected biological markers in multiple myeloma
Pika T., Minarik J., Schneiderka P., Budikova M., Langova K., Lochman P., Bacovsky J., Farbiakova V., Scudla V.
Biomed Pap Med Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2008, 152: 61-64.
4. Přínos vyšetření sérových hladin volných lehkých řetězců pro subklasifikaci nesekretorické formy mnohočetného myelomu
Pika T., Minařík J., Lochman P., Bačovský J., Ščudla V.
Klin Biochem Metab 2010; 18: 77-79.
5. Náhlá progrese mnohočetného myelomu charakterizovaná parciálním „light-chain escape“ fenoménem a sekundární translokací t(8;14)
Pika T., Balcárková J., Lochman P., Minařík J., Jarošová M., Raida L., Bačovský J., Ščudla V.
Trans Hemat dnes 2011; 17: 30-35.

6. Systém HevyLite™ u IgA monoklonálních gamapatií – první zkušenosti

Pika T., Heřmanová Z., Lochman P., Zapletalová J., Minařík J., Bačovský J., Ščudla V.

Klin Biochem Metab 2011; 19: 86 – 91. (v tisku)

9.1.2 Původní práce – spoluautor:

1. Význam sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu v diagnostice a hodnocení aktivity mnohočetného myelomu a vybraných monoklonálních gamapatií
Ščudla V., Minařík J., Schneiderka P., Kouřil M., Kapustová M., Vytřasová M., Bačovský J., Pika T.
Vnitř Lék 2005; 51: 1249-1259.
2. Klinický význam hodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonálních gamapatií
Ščudla V., Schneiderka P., Pika T., Minařík J., Bačovský J., Farbiaková V.
Klin Biochem Metab 2008; 16: 76-83.
3. The importance of serum levels of selected biological parameters in the diagnosis, staging and prognosis of multiple myeloma
Ščudla V., Pika T., Budíková M., Petrová J., Minařík J., Bačovský J., Langová K., Živná J.
Neoplasma 2010; 57: 102-110. **(IF)**
4. Low-dose thalidomide regimens in therapy of relapsed or refractory multiple myeloma
Zemanová M, Ščudla V, Adam Z, Gregora E, Pour L, Minařík J, Pavlíček P, Pika T, Bačovský J.
Neoplasma 2008; 55: 345-349. **(IF)**
5. Hevylite – nová analytická metoda v diagnostice a hodnocení průběhu monoklonálních gamapatií.
Ščudla V., Pika T., Heřmanová Z.
Klin Biochem Metab 2010; 18: 62-68.

9.1.3 Přednášky a postery - sborníky a abstrakta v časopisech

1. Hodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců u mnohočetného myelomu a jejich vztahu k vybraným ukazatelům nemoci
Pika T., Bačovský J.
Vnitř Lék 2005; 51 (5): 604
2. Vztah sérových hladin volných lehkých řetězců ke stupni pokročilosti mnohočetného myelomu
Pika T., Zemanová M., Minařík J., Ščudla V.
Vnitř Lék 2006; 52 (5): 531
3. Vztah sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu ke stupni progresu mnohočetného myelomu
Pika T., Zemanová M., Minařík J., Langová K., Ščudla V.
Vnitř Lék 2006; 52 (11): 1120.
4. Relationship of serum free light chain levels to degree of multiple myeloma progression
Pika T., Scudla V., Minarik M.,
Haematologica 2006; 91 (s1): 279. **(IF)**
5. Vztah sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu a vybraných biologických parametrů u mnohočetného myelomu
Pika T., Minařík M., Bačovský J., Budíková M., Ščudla V.
Vnitř Lék 2007; 53 (5), 589.
6. Relationship of serum free light chain levels and selected biological parameters in patients with multiple myeloma
Pika T., Minarik J., Zemanova M., Budikova M., Bacovsky J., Scudla V.
Haematologica 2007; 92 (s1). **(IF)**

7. Vysocedávkovaná chemoterapie s podporou autologního štěpu stírá prognostický význam sérových hladin volných lehkých řetězců i kappa/lambda indexu u mnohočetného myelomu
Pika T., Faber E., Minařík J., Bačovský J., Schneiderka P., Šlézar J., Langová K., Indrák K., Ščudla V.
Trans Hematol dnes, 15, 2009, p 81.
8. Užití systému HevyLite™ u monoklonálních gamapatií – první zkušenosti
Pika T., Heřmanová Z., Hobbs J., Lochman P., Minařík J., Bačovský J., Ščudla V.
Trans Hematol dnes 2010; 16 (s2): 92-93.
9. System Hevylite™ and IgA monoclonal gammopathy- first experience
Pika T., Hermanova Z., Lochman P., Zapletalova J., Minarik J., Scudla V.
Hematology reports 2010; 2 (s2): 52.
10. Serum heavy/light chain levels strongly correlate with SPE and disease status in IgA and IgG multiple myeloma
Pika T., Hermanova Z., Lochman P., Zapletalova J., Minarik J., Bacovsky J., Scudla V.
Haematologica 2011; 96 (s1): 43. **(IF)**

9.1.3 Přednášky a postery - sborníky a abstrakta mimo časopisy

1. Vztah sérových hladin volných lehkých řetězců ke stupni pokročilosti mnohočetného myelomu
Konference vědeckých prací studentů DSP, Olomouc 2006.
2. Stanovení hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu – zkušenost tří let
Tradiční pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy, Prostějov 2006
3. Hodnocení vztahu sérových hladin volných lehkých řetězců ke stupni pokročilosti mnohočetného myelomu
XX. Olomoucké hematologické dny 2006
4. Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu u mnohočetného myelomu – zkušenost tří let
IV. Košické hematologické a transfuziologické dny 2007
5. Vztah sérových hladin volných lehkých řetězců a vybraných biologických parametrů u nemocných s mnohočetným myelomem
XXI. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí 2007
6. Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců u monoklonálních gamapatií – zkušenosti jednoho pracoviště
VI. konference na téma monoklonálních gamapatií, Hradec Králové 2007
7. Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců u mnohočetného myelomu – zkušenosti jednoho pracoviště
Pracovní konference Freelite – Hevylite, Liblice 2009
11. Přínos vyšetření volných lehkých řetězců pro subklasifikaci „nesekretorické“ formy mnohočetného myelomu
VIII. konference na téma monoklonálních gamapatií, Hradec Králové 2009

9.2. Přehled další publikační a přednáškové činnosti – 1. autor

9.2.1 Původní práce

1. Osteoporóza jako dominantní projev nesekreторické formy mnohočetného myelomu
Pika T., Zemanová M., Ščudla V., Tichá V., Mysliveček M.
Interní Med 2006;6: 296-298.
2. Osteoporóza – dominantní iniciální projev nesekreторické formy mnohočetného myelomu
Pika T., Zemanová M., Kraina T., Hrabovský D., Ščudla V.
Osteologický bulletin 2006; 11: 48-50.
3. Postižení srdce při AL amyloidóze
Pika T., Vymětal J., Metelka R., Flodr P., Lochman P., Minařík J., Bačovský J., Ščudla V.
Interní Med 2008; 10: 466-469.
4. Unusual manifestation of multiple myeloma: focal affection of central nervous systém in a patient with chronic lymphocytic leukaemia
Pika T., Bacovsky J., Vaverka M., Hrbek J., Hubacek J., Spurna D., Scudla V.
Biomed Pap 2009; 153: 271-273.
5. Systém HevyLiteTM – nové možnosti stanovení monoklonálního imunoglobulinu
Pika T., Heřmanová Z., Ščudla V.
FONS Bulletin 2010; 3:14.

9.2.2 Přednášky a postery - sborníky a abstrakta v časopisech

1. AL amyloidóza – mnoho příznaků, jedna diagnóza
Pika T., Minařík J., Žamboch K., Bačovský J., Ščudla V.
Interní Med pro praxi 2008; 10 (Supl.A): 9.
2. Změny sérových hladin vybraných biologických parametrů po autologní transplantaci u nemocných s mnohočetným myelomem
Pika T., Minařík J., Budíková M., Zemanová M., Bačovský J., Ščudla V.
Vnitř Lék 2008; 54: 572-573.
3. Alteration of selected biological parameters after autologous transplantation in multiple myeloma patients
Pika T., Minařík J., Budíková M., Bačovský J., Ščudla V.
Haematologica 2008; 93 (s1): 501. **(IF)**
4. The comparison of serum levels of selected biomarkers and cytogenetic changes in multiple myeloma
Pika T., Balcarkova J., Holzerova M., Minarik J., Budikova M., Langova K., Bacovsky J., Jarosova M., Scudla V.
Haematologica 2009; 94 (s2): 377. **(IF)**
5. Vztah sérových hladin vybraných biologických ukazatelů a cytogenetických změn u mnohočetného myelomu
Pika T., Balcárková J., Holzerová M., Minařík J., Budíková M., Langová K., Bačovský J., Jarošová M., Ščudla V.
Trans Hemat dnes 2009; 15 (s1): 81.
6. Postižení srdce při AL-amyloidóze
Pika T., Vymětal J.
Trans Hemat dnes 2009; 15 (s1): 81.

7. Nesekreční myelom – sekreční potenciál a cytogenetické změny
Pika T., Balcárková J., Lochman P., Minařík J., Mikula P., Žmolíková J., Bačovský J., Jarošová M., Ščudla V.
Trans Hemat dnes 2010; 16 (s2): 48.

8. Nonsecretory myeloma – secretory potential and cytogenetic changes
Pika T., Balcarkova J., Lochman P., Minarik J., Mikula P., Zmolikova J., Bacovsky J., Jarosova M., Scudla V.
Haematologica 2010; 95 (s2): 569. **(IF)**

9. Cardiac impairment by AL-amyloidosis
Pika T., Vymetal J., Metelka R., Kozak J., Lochman P., Minarik J., Bacovsky J., Scudla V.
Haematologica 2010; 95 (s2): 592. **(IF)**

10. Cardiac impairment and AL-amyloidosis
Pika T., Vymetal J., Metelka R., Lochman P., Minarik J., Bacovsky J., Scudla V.
Haematologica 2011; 96 (s1): 175. **(IF)**

9.3. Citace u jiných autorů

1. Osteoporóza jako dominantní projev nesekretorické formy mnohočetného myelomu
Pika T., Zemanová M., Ščudla V., Tichá V., Mysliveček M.
Interní Med 2006; 6: 296-298.
In: Adam Z., Krejčí M., Vorlíček J. et al.: Hematologie, přehled maligních hematologických nemocí. Grada Publishing 2008, Praha.
2. Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u mnohočetného myelomu a monoklonální gamapatie nejistého významu
Pika T., Minařík J., Zemanová M., Schneiderka P., Bačovský J., Šlězár J., Ščudla V.
Klin Biochem Metab 2008; 16: 102-105.
In: Šálek T.: Laboratorní diagnostika mnohočetného myelomu.
Interní Med 2008;10 (9): 407 – 409.
3. Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u mnohočetného myelomu a monoklonální gamapatie nejistého významu
Pika T., Minařík J., Zemanová M., Schneiderka P., Bačovský J., Šlězár J., Ščudla V.
Klin Biochem Metab 2008; 16: 102-105.
In: Šolcová L., Maisnar V., Tichý M.: Pozdní diagnostika mnohočetného myelomu – kazuistiky
Klin Biochem Metab 2010; 18: 88-89.
4. Práce uvedené v monografii *A.R. Bradwell: Serum free light chain analysis, 6th edition, The Binding Site, Birmingham, UK, 2010:*
Relationship of serum free light chain levels and selected biological parameters in multiple myeloma. *Haematologica* 2007; 92: 1113a.
The correlation of serum immunoglobulin free light chain levels and selected biological markers in multiple myeloma. *Biomed Papers* 2008; 152: 61-64.
Serum free light chain immunoglobulin levels in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Klin Biochem Metab* 2008; 16: 102-105.

9.4. Původní práce v časopise s IF – spoluautor

1. Prognostic significance of apoptotic index in multiple myeloma patients treated by conventional therapy and novel agents, thalidomide and bortezomib
Minarik J, Scudla V, Ordeltova M, Bacovsky J, Pika T, Langova K.
Eur J Haematol 2009; 83: 528-534. **(IF)**
2. Monitoring of plasma cell proliferative and apoptotic indices in the course of multiple myeloma
Minarik J, Scudla V, Ordeltova M, Bacovsky J, Pika T, Langova K.
Leukemia Lymphoma 2009; 50: 1983-1991. **(IF)**
3. Thalidomide and bortezomib overcome the prognostic significance of proliferative index in multiple myeloma
Minarik J, Scudla V, Bacovsky J, Zemanova M, Pika T, Ordeltova M, Langova K.
Neoplasma 2010; 57: 8-14. **(IF)**
4. Tc-99m MIBI scintigraphy in multiple myeloma: Prognostic value of different Tc-99m MIBI uptake patterns
Bacovsky J, Myslivecek M, Scudla V, Koranda P, Buriankova E, Minarik J, Pika T, Zapletalova J.
Clin Nucl Med 2010; 35: 667-670. **(IF)**

10.0 Anglický název práce, klíčová slova, souhrn

Evaluation of serum levels of immunoglobulin free light chains in multiple myeloma and their relationship with selected clinical and laboratory disease indicators

Dissertation summary

The presented dissertation deals with the issue of determining the serum levels of free light chains (FLC) of κ and λ immunoglobulin in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and multiple myeloma (MM). The theoretical part provides a brief overview of the current scope of knowledge in the epidemiology, pathogenesis, diagnostics and therapy of MM, with attention focused on the possibilities of monoclonal immunoglobulin determination. The actual dissertation is divided in 6 chapters devoted to the evaluation of the clinical benefits of determining the serum levels of immunoglobulin free light chains and their relationship with selected clinical and laboratory aspects of MGUS and MM. One chapter is concerned with a pilot study of serum levels of pairs of immunoglobulin heavy/light chains in monoclonal gammopathy.

In the first chapter on the determination of FLC serum levels in MGUS, 191 patients with MGUS were examined, whereas the pathological levels of FLC and κ/λ clonality ratio were ascertained in 62, i.e. in 55.5% of cases. During the six-year monitoring, 11 patients experienced transformation into the malignant form of monoclonal gammopathy, which corresponded to approximately 0.95% cases a year. By means of the MGUS stratification system based on quantity, M-protein isotype and κ/λ ratio value, risk groups of MGUS patients were identified, whereas it was the level of recorded transformation that corresponded to the seriousness of the risk. The development of MGUS in MM was associated with increasing levels of free light chains and in particular with the rise of the κ/λ ratio pathology. Thus, the dissertation confirmed the importance of determining the serum levels of free light chains in MGUS, and especially their benefits for identifying high-risk forms, including the decision regarding optimal monitoring.

In the chapter discussing the determination of FLC serum levels in MM, the group of 261 patients revealed pathology of FLC levels and κ/λ ratio in 96% of cases, and proof was established that it was a parameter completely independent of the M-protein value. The irreplaceable contribution was confirmed for less common forms of MM such as the non-secretory or oligo-secretory type as well as the IgD type. Partly, the chapter also covered the issue of the "light-chain escape" phenomenon.

The third chapter specialised in comparing the serum levels of FLC and κ/λ ratio in monoclonal gammopathy of undetermined significance, and established highly significant differences in the levels of the dominant light chain as well as κ/λ ratio and, simultaneously, in the relevant rate of the alternative chain suppression, which proved the considerable immune paresis by patients with multiple myeloma. Nevertheless, results showed that determining the FLC levels with clonality index calculation could be used as a complementary indicator assisting the other parameters in distinguishing MM from MGUS. In this context, MM diagnosis is unlikely in case of normal levels, however, the contribution of this indicator is not crucial due to the considerable mutual overlap of values while distinguishing MGUS from MM.

The next chapter analysing the serum levels of FLC and κ/λ ratio in relation to the advanced stage of MM, as defined by the staging system according to Durie-Salmon and the International Staging System, did not reveal any notable differences in their levels. The FLC levels were confirmed to be a relatively independent parameter, mainly on account of their variable secretion rate and fast catabolism, making them usable as a complementary parameter of staging systems.

In the fifth chapter, the analysis of relationships of FLC serum levels and κ/λ ratio, multiple mutual dependencies were discovered with the levels of β_2 microglobulin, thymidine kinase, bone metabolism parameters, hepatocyte growth factor, Syndecan-1, and Fas antigen. As the accomplished results revealed, however, the relationship between the majority of biological agents examined by us and the serum levels of FLC, κ and λ and their mutual ratio, contributes in the first place to the extension of knowledge in the scope of MM pathobiology, and it is of minor importance for clinical practice.

In the chapter dealing with the prognostic impact of FLC on the survival rate of MM patients, the preliminary analysis confirmed the relation between the κ/λ ratio pathology level and the life expectancy of patients treated for symptomatic disease. Yet, a detailed analysis of the

group found the prognostic impact to be applicable only for patients undergoing conventional therapy, including the integration of new drugs with biological effects. There was no indication of the trend by patients subjected to high-dose therapy supported by an autologous graft. It could be assumed that intensive therapy removes the prognostic significance of κ/λ clonality ratio, and new, suitable prognostic indicators have to be found and identified for such patients.

In the last chapter on determining the levels of pairs of immunoglobulin light/heavy chains (HLC) using the HevyLite™ method, the initial analysis of the group of patients with MGUS and MM of the IgA and IgG type, still limited in number, confirmed the relationship between HLC and disease activity, proving the strong correlation of HLC values to M-protein levels determined by serum electrophoresis, and to the total IgG levels, i.e. IgA determined nephelometrically. The determination results seem to be very helpful for patients with accomplished treatment response, allowing a detailed determination of very low levels of MIG.

Overview of key words

multiple myeloma - monoclonal gammopathy of undetermined significance – monoclonal gammopathy – immunoglobulin free light chains – diagnosis - staging systems – biological indicators – prognosis – pairs of immunoglobulin heavy/light chains