

Analýza sérových hladin vybraných biologických ukazatelů u monoklonální gamapatie nejistého významu a mnohočetného myelomu

Analysis of Serum Levels of Selected Biological Parameters in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Multiple Myeloma

Ščudla V.¹, Budíková M.², Petrová P.², Minařík J.¹, Pika T.¹, Bačovský J.¹, Adamová D.³, Langová K.⁴, Česká myelomová skupina

¹ III. interní klinika LF UP a FN, Olomouc

² Oddělení klinické biochemie FN, Olomouc

³ Hematologické a transfúzní oddělení Slezské nemocnice, Opava

⁴ Ústav lékařské biofyziky LF UP, Olomouc

Souhrn

Východiska: Cílem studie bylo hodnocení sérových hladin 18 vybraných ukazatelů u monoklonální gamapatie nejistého významu a iniciální, asymptomatické fáze mnohočetného myelomu, a to i z případného potenciálního přínosu pro odlišení obou stavů. **Materiál a metody:** Analyzovaný 119členný soubor sestával z 59 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu a z 60 nemocných s mnohočetným myelomem vyšetřených při diagnóze nemoci před nasazením léčby. K vyšetření sérových hladin byla použita radioenzymatická metoda (thymidinkináza), metoda imunoradiometrie (IGF-1), technika enzymoimunoeseje (osteokalcin, osteoprotegerin, ICTP), metoda elektrochemiluminiscence (PINP), technika kvantitativní sendvičové enzymatické imunoeseje (MIP-1 α a MIP-1 β , IL-17, osteopontin, HGF, VEGF, angiogenin, endostatin, syndekan 1/CD₁₃₈) a systém FreeliteTM pro vyhodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců κ a λ . Statistické šetření bylo provedeno s pomocí Pearsonova χ^2 -testu a U-testu dle Manna-Whitneye ($p < 0,05$). **Výsledky:** Statisticky vysoce významné rozdíly sérových hladin mezi monoklonální gamapatií nejistého významu a mnohočetným myelomem byly zjištěny v případě TK (0,0002), ICTP (0,001), MIP-1 α (0,002), osteopontinu ($< 0,0001$), HGF ($< 0,0001$), syndekanu-1 ($< 0,0001$) a poměru volných lehkých řetězců κ/λ (0,0002), v méně významné míře při srovnání sérových hladin angiogeninu (0,031) a endostatinu (0,011). Statisticky nevýznamně vyznělo srovnání souborů monoklonální gamapatie nejistého významu a mnohočetného myelomu při vyšetření IGF-1, osteokalcinu, bALP, PINP, OPG, MIP-1 β , IL-17, parathormonu a VEGF. **Závěr:** Statistická analýza odhalila významnou rozdílnost hladin u 9 z 18 vyšetřených ukazatelů, ale vzhledem k výraznému překrývání naměřených hodnot u monoklonální gamapatie nejistého významu a mnohočetného myelomu se nevyznačuje žádný z těchto parametrů schopností spolehlivého rozlišení obou srovnávaných stavů. Určitým příspěvkem k diskriminaci mnohočetného myelomu od monoklonální gamapatie nejistého významu je nález enormně zvýšených sérových hladin TK, MIP-1 α , OPN, HGF a výrazná patologie indexu VLŘ κ/λ .

Klíčová slova

monoklonální gamapatie nejistého významu – mnohočetný myelom – angiogeneze – cytokiny – metabolismus

Podpora grantu IGA MZ ČR NR 9489, NR 9500 a VVZ MSM 6198959205.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



prof. MUDr. Vlastimil Ščudla, CSc.
III. interní klinika LF UP
a FN Olomouc
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
e-mail: vlastimil.scudla@fnol.cz

Obdrženo/Submitted: 23. 3. 2010
Přijato/Accepted: 13. 4. 2010

Summary

Backgrounds: The aim of the study was to evaluate the serum levels of 18 selected parameters in monoclonal gammopathy of undetermined significance, and the initial, asymptomatic phase of multiple myeloma, also from the point of view of the potential contribution to the differentiation of these two units. **Materials and Methods:** The analyzed 119-patient group consisted of 59 individuals with monoclonal gammopathy of undetermined significance and 60 patients with multiple myeloma assessed at the time of diagnosis before the start of the treatment. For the evaluation of serum levels we used radioenzyme assay (thymidine kinase), immunoradiometry (IGF-1), enzyme immunoassay (osteocalcin, osteoprotegerin, ICTP), electrochemiluminescence (PINP), quantitative sandwich enzyme immunoassay (MIP-1 α and MIP-1 β , IL-17, osteopontin, HGF, VEGF, angiogenin, endostatin, syndecan-1/CD₁₃₈), and for the assessment of serum levels of free light chains κ and λ , the Freelite™ system. Statistical evaluation was done using the Pearson chi-quadrat test and the U-test according to Mann-Whitney ($p < 0.05$). **Results:** Statistically significant differences between monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma were found in the case of serum levels of thymidine kinase (0.0002), ICTP (0.001), MIP-1 α (0.002), osteopontin (< 0.0001), HGF (< 0.0001), syndecan-1 (< 0.0001), and the κ/λ ratio (0.0002), while lower significance was found in the case of angiogenin (0.031) and endostatin (0.011). Statistically non-significant differences between multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance were within the serum levels of IGF-1, osteocalcin, bALP, PINP, OPG, MIP-1 β , IL-17, parathormon and VEGF. **Conclusion:** Statistical analysis revealed significant differences between monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in 9 of the 18 evaluated parameters. However, due to the significant overlapping of the measured values, none of the parameters is unambiguously able to distinguish between the units. A certain contribution in the discrimination of multiple myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance was found in markedly increased serum levels of thymidine kinase, MIP-1 α , osteopontin, HGF and significant pathology of the κ/λ index.

Key words

monoclonal gammopathy of undetermined significance – multiple myeloma – angiogenesis – cytokines – metabolism

Úvod

Problematicke spolehlivé diagnostiky jednotlivých typů monoklonálních gamapatií (MG) jako východiska specificky pojaté léčby je věnována v současnosti značná pozornost. Dokládá to nejen koncepce „multistep“ etiopatogeneze mnohočetného myelomu (MM) zahrnující plejádu postupných změn od monoklonální gamapatie nejistého významu (MGNV) k rozvinuté formě MM [1,2], ale i vypracování IMWG (International Myeloma Working Group) kritérií MGNV a MM [3]. Tato diskriminační kritéria jsou v podstatě založena na kvantitativním hodnocení konvenčních parametrů vyjadřujících zejména nálož plazmocelulární populace s vynecháním ukazatelů vyjadřujících vnitřní biologické vlastnosti plazmatických buněk i změny v mikroprostředí kostní dřeně. Takto pojatý diagnostický systém je tedy neúplný, nereflktuje současný stav poznání a neumožňuje vždy spolehlivé diagnostické rozlišení hraničních stavů.

Cílem předložené práce bylo vyšetření sérových hladin 18 biologických působků uplatňujících se v patobiologii MM a posouzení jejich případného přínosu pro rozšíření dosavadních znalostí o rozdílnosti MGNV a MM, a případně i pro odlišení obou stavů. Vlastní pozornost se soustředila jednak na ukazatele se vztahem k proliferacím vlastnostem plazmatických buněk (TK – thymidinkináza

a IGF-1, tj. inzulinu podobný růstový faktor-1), dále na markery kostního obratu (OC – osteokalcin, bALP – kostní izoenzym alkalické fosfatázy, PINP – N-terminální propeptid prokolagenu typu-I, OPG – osteoprotegerin, ICTP – karboxyterminální telopeptid kolagenu typu-I, MIP-1 α a -1 β – zánětlivý makrofágový faktor typu -1 α a -1 β , OPN – osteopontin, IL-17 – interleukin-17 a PTH – parathormon), na ukazatele s významným vztahem k angiogenezi (HGF – hepatocytární růstový faktor, VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor, ANG – angiogenin, ES – endostatin), ale i na zhodnocení významu vyšetření hladiny syndecanu-1/CD₁₃₈ a indexu monoklonality plazmocytů založeného na stanovení poměru koncentrací volných lehkých řetězců v séru (VLŘ) κ/λ . Předložená studie si tedy vytkla ve srovnání s našimi předchozími analýzami podstatně širší cíl s důrazem na biologické ukazatele, kterým nebyla, a to ani ve světovém odborném písemnictví, věnována dostatečná pozornost [4–8].

Soubor pacientů a metody

Analyzovanou sestavu 119 nemocných tvořilo 59 jedinců s MGNV a 60 nemocných s MM splňujících IMWG kritéria myelomu, kteří byli vyšetřeni při diagnóze nemoci před zahájením cytostatické léčby [3]. Věkový medián souboru MGNV byl 67 (31–84) let, poměr

muži/ženy (M/Ž) byl 0,88. V souboru nemocných s MM byl věkový medián 68 (32–86) let a poměr M/Ž byl 1,0. Standardní charakteristiky obou souborů, včetně zastoupení jednotlivých imunochemických typů, vyplývají z tabelárního přehledu (tab. 1). Je zřejmé, že mezi oběma porovnávanými soubory byly statisticky významné rozdíly v parametrech používaných v diagnostice a stážování MM [3,9–11]. Při hodnocení stupně pokročilosti nemoci s pomocí stážovacího systému dle Durieho-Salmona (D-S) [9] bylo stadium 1 zastoupeno ve 12 % (n=7), stadium 2 ve 35 % (n=21) a stadium 3 v 53 % (n=32); podstadium A v 83 % (n=50) a B v 17 % (n=10), při použití IPI indexu (International Prognostic Index) [10,11] bylo stadium 1 zastoupeno ve 40 % (n=24), stadium 2 ve 30 % (n=18) a stadium 3 ve 30 % (n=18).

K vyšetření hladiny thymidinkinázy v séru (TK) (0–10 IU/L) byla použita radioenzymatická metoda (REA kit, Immunotech, Praha), k vyšetření hladiny inzulinu podobného růstového faktoru-1 (IGF-1) (< 269 ng/mL) bylo použito imunoradiometrické stanovení kitem Immunotech, Praha. Sérová hladina osteokalcinu (OC) (> 50 let 14–46 ng/mL) byla vyšetřena kitem Cobas 6000, Roche Diagnostic, osteoprotegerinu (OPG) (1,8–6,4 pmol/L) kitem ELISA BioVendor GmbH, C-terminální telopeptid kolagenu typu-1 (ICTP) (0,3–6,0 mg/L) byl vyšetřen

Tab. 1. Srovnání základních charakteristik mezi soubory MGNV a MM vyšetřených při diagnóze nemoci.

	MGNV (n = 59)				MM (dg.) (n = 60)				MGNV vs MM (dg.)
	medián	(rozmezí)	$\bar{x}$	($\pm$ SD)	medián	(rozmezí)	$\bar{x}$	($\pm$ SD)	
věk	67	(31–84)	64,6	($\pm$ 12,0)	68	(32–86)	66,5	($\pm$ 10,9)	NS
Hb (g/L)	136	(84–173)	133	($\pm$ 17,0)	109	(59–141)	109,1	($\pm$ 18,7)	< 0,0001
Pb (%)	3	(1–10)	3,6	($\pm$ 2,5)	26	(1–94)	31,9	($\pm$ 22,3)	< 0,001
Alb (g/L)	44,8	(32–50)	43,9	($\pm$ 4,1)	38,3	(27–50)	38,4	($\pm$ 6,1)	< 0,0001
kreatinin (mmol/L)	74	(50–246)	82,9	($\pm$ 31,4)	97,5	(50–489)	119,8	($\pm$ 73,4)	0,0002
Ca (mmol/L)	2,3	(2,1–2,7)	2,3	($\pm$ 0,1)	2,3	(1,9–3,6)	2,3	($\pm$ 6,27)	NS
MIG (g/L)	10	(1,2–27,2)	9,9	($\pm$ 6,2)	24,2	(0–108,9)	26,6	($\pm$ 22,7)	< 0,0001
β_2 -M (mg/L)	2	(1,2–11,7)	2,4	($\pm$ 1,5)	3,9	(1,7–2,0)	4,9	($\pm$ 3,4)	< 0,0001
IgG n/%	45	(76,2)			37	(61,7)			
IgA	6	(10,2)			10	(16,7)			
BJ	0	0			11	(18,3)			
IgD	1	(1,7)			0	0			
Bikl	1	(1,7)			1	(1,7)			
IgM	6	(10,2)			0	0			
NS	0	0			1	(1,7)			
κ	30	(52,6)			44	(73,3)			
λ	27	(47,4)			15	(25)			
Bikl	0	0			1	(1,7)			

MGNV – monoklonální gamapatie nejistého významu, MM – mnohočetný myelom, β_2 M - β_2 -mikroglobulin, NS – nesekreční forma

kitem ELISA, Orion Diagnostica Espoo, Finland, hladina kostní alkalické fosfatázy (bALP) (muži 7,3–15,9 mg/L, ženy 7,8–17,2 mg/L) byla vyšetřena s pomocí kvantitativní imunoradiometrie soupravou Immunotech, Beckman Coulter Company, zatímco sérová hladina aminokoncového propeptidu prokolagenu typu-1 (PINP) (16,3–73,9 mg/L) byla vyšetřena s pomocí elektrochemiluminiscenčního imunostanovení ECLIA, soupravou Cobas, Roche Diagnostic. Sérová hladina parathormonu (PTH) (10–69 ng/L) byla stanovena oboustrannou chemiluminiscenční enzymovou imunochemickou reakcí na analyzátoru IMMULITE 2000, soupravou Siemens. Analýza sérové hladiny makrofágového zánětlivého faktoru-1 (CCL3/MIP-1 α) (< 46,9 pg/mL), MIP-1 β (< 212 pg/mL), osteopontinu (OPN) (49,2–175 ng/mL), interleukinu-17 (IL-17) (< 31,2 pg/mL), hepatocytárního růstového faktoru (HGF) (671–1992 pg/mL), vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF)

(62–707 pg/mL), angiogeninu (ANG) (196 000–437 000 pg/mL), endostatínu (ES) (58–232 ng/mL) a syndecanu-1/sCD₁₃₈ (Syn-1) (37–123 ng/mL) byla provedena technikou kvantitativní sendvičové enzymatické imunoeseje, kity Quantikine R&D Systems, Minneapolis, USA. K vyhodnocení sérových hladin VLŘ v séru typu κ a λ byl použit systém Freelite™ (The Binding Site^{LD}) s rozmezím poměru řetězců κ/λ 0,26–1,65 [12]. Veškerá měření byla prováděna podle doporučení výrobce duplikátním způsobem a byla reprodukovatelná. Ke statistickému hodnocení byl použit Pearsonův χ^2 -test, neparametrický pořadový U-test dle Manna-Whitneye a Studentův dvouvýběrový t-test na hranici významnosti $p < 0,05$.

Výsledky

Z analýzy vyplynulo, že jedinci s MGNV se vyznačují ve srovnání s nemocnými s nově stanovenou diagnózou MM odlišnými, většinou nižšími sérovými hla-

dinami 9 z 18 vyšetřených ukazatelů, zatímco u zbývajících 9 analyzovaných působků nebyly zjištěny zřetelné rozdíly. Výskyt patologicky zvýšených hodnot vyšetřených ukazatelů v souborech 59 jedinců s MGNV a 60 pacientů s MM vyplývá z grafu 1. Je zřejmé, že z hlediska procentuálního výskytu abnormálně zvýšených hodnot byla zaznamenána jasná rozdílnost mezi MGNV a MM především v případě osteopontinu (2 vs 33 %) a MIP-1 α (0 vs 9 %), v menší míře při porovnání TK, HGF, syndecanu-1, angiogeninu a endostatínu. Vysoký, více než 50 % výskyt abnormálních hodnot byl zaznamenán u nemocných s MM v případě ICTP, TK a HGF, zatímco nízká, < 10 % frekvence, byla zaznamenána v případě MIP-1 α , MIP-1 β , VEGF a IGF-1. Neočekávaným nálezem bylo zjištění častějšího výskytu patologicky zvýšené sérové hladiny VEGF ve skupině MGNV než MM (11 vs 4 %). K zajímavému nálezu patří i velmi podobná frekvence zvýšené hodnoty sérové hladiny bALP, PTH, OPG

Tab. 2. Srovnání rozdílnosti sérových hladin vybraných parametrů mezi soubory MGNV a MM, vyšetřené při diagnóze.

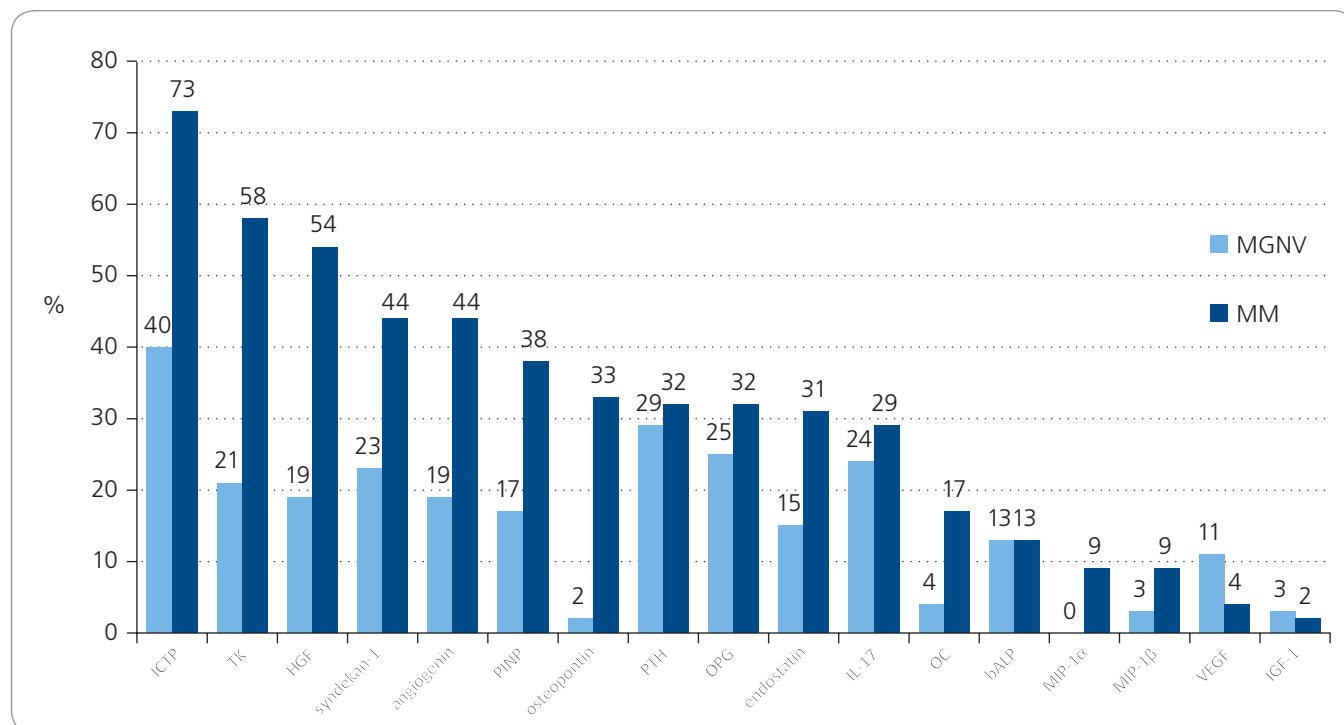
	MGNV					MM (dg.)					MGNV vs MM (dg.)
	N	medián	(rozmezí)	$\bar{x}$	($\pm$ SD)	N	medián	(rozmezí)	$\bar{x}$	($\pm$ SD)	stat. významnost
TK (IU/L)	58	6,5	(2–26)	7,8	($\pm$ 5,2)	57	9,8	(2–64)	15,4	($\pm$ 15,0)	0,0002
IGF-1 (ng/mL)	57	131	(25–305)	138,6	($\pm$ 51,6)	57	146	(17–284)	141,7	($\pm$ 45,0)	NS
OC (ng/mL)	56	20	(4–49,9)	21,7	($\pm$ 10,9)	60	24,2	(6,8–129)	31,1	($\pm$ 24,6)	NS
bALP (mg/L)	55	9,9	(2–131)	12,3	($\pm$ 17,1)	52	9,3	(0,2–30)	10,5	($\pm$ 5,9)	NS
PINP (mg/L)	58	43,1	(7–233)	50,9	($\pm$ 38,8)	60	58,3	(4–299)	66,5	($\pm$ 49,7)	NS
OPG (pmol/L)	56	5,4	(1,8–10,7)	5,4	($\pm$ 1,7)	59	5,1	(3,0–12,5)	6	($\pm$ 2,4)	NS
ICTP (mg/L)	57	5,3	(1,8–47)	8,8	($\pm$ 9,6)	56	9,1	(0,7–54)	14,4	($\pm$ 12,8)	0,001
MIP-1 α (pg/mL)	58	10	(10–37,4)	13,6	($\pm$ 6,4)	58	14,5	(10–1500)	48,6	($\pm$ 195,6)	0,002
MIP-1 β (pg/mL)	59	80,8	(11–354)	95,4	($\pm$ 62,7)	57	82,3	(11–750)	110,8	($\pm$ 118,8)	NS
OPN (ng/mL)	58	55,1	(8,1–288)	64,7	($\pm$ 38,5)	55	119,5	(3,0–441)	140,7	($\pm$ 100,9)	< 0,0001
IL-17 (pg/mL)	58	15	(15–106)	29,9	($\pm$ 26,1)	59	15	(15–105)	30,2	($\pm$ 24,5)	NS
PTH (ng/L)	57	53	(11–146)	58,6	($\pm$ 30,3)	58	52,5	(4–1 657)	86,7	($\pm$ 214,6)	NS
HGF (pg/mL)	57	1 329	(476–7 234)	1 564	($\pm$ 989)	55	2 039	(607–55 178)	3 688	($\pm$ 7 356,8)	< 0,0001
VEGF (pg/mL)	35	353,6	(64,7–2 000)	451,1	($\pm$ 376,9)	23	185,4	(33–1250)	308,3	($\pm$ 284,6)	NS
ANG (pg/mL)	59	346 000	(121 980–682 668)	360 087	($\pm$ 118 099)	55	390 780	(190 852–800 000)	407 889	($\pm$ 127 855)	0,031
ES (ng/mL)	59	154,4	(70,9–328)	167,7	($\pm$ 63,5)	57	184	(73,5–432)	203	($\pm$ 81,8)	0,011
Syn-1 (ng/mL)	57	39,6	(8–439)	59,4	($\pm$ 74,0)	50	101	(13,2256)	130,9	($\pm$ 94,8)	< 0,0001
κ/λ index	59	1,9	(0,11–74,2)	5,6	($\pm$ 12,4)	59	26,9	(0,001–8 800)	381,5	($\pm$ 1 217,8)	0,0002

TK – thymidinkináza, IGF-1 – inzulinu podobný růstový faktor-1, OC – osteokalcin, bALP – kostní izoenzym alkalické fosfatázy, PINP – N-terminální propeptid prokolagenu typu-I, OPG – osteoprotegerin, ICTP – karboxy-terminální telopeptid kolagenu typu-I, MIP-1 α – makrofágový zánětlivý faktor typu-1 α , OPN – osteopontin, IL-17 – interleukin-17, PTH – parathormon, HGF – hepatocytární růstový faktor, VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor, ANG – angiogenin, ES – endostatin, Syn-1 – syndecan-1

a IL-17 u obou srovnávaných diagnostických skupin. Podrobná statistická analýza zaznamenala vysoce významné rozdíly sérových koncentrací vyšetřovaných působků mezi souborem MGNV

a souborem s MM především v případech TK, ICTP, MIP-1 α , OPN, HGF, syndecanu-1/CD₁₃₈ a indexu VLŘ κ/λ , v méně významné míře i v případě angiogeninu a endostatinu (tab. 2). Statisticky

významný rozdíl nebyl zaznamenán při srovnání hladin MGNV vs MM v případech IGF-1, OC, bALP, PINP, OPG, MIP-1 β , IL-17, PTH a VEGF (tab. 2). Hlubší analýza ukázala, že i v případech statisticky vysoce vý-



Graf 1. Grafické srovnání četnosti výskytu zvýšených hodnot jednotlivých biologických parametrů u jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGNV), nemocných s asymptomatickou formou mnohočetného myelomu (MM) (stadium I dle Durieho-Salmona) vyšetřené při diagnóze před nasazením léčby. OPG – osteoprotegerin, ICTP – C-terminální telopeptid kolagenu typu-I, TK – thymidinkináza, HGF – hepatocytární růstový faktor, PINP – N-terminální peptid prokolagenu typu-I, PTH – parathormon, IL-17 – interleukin-17, OC – osteokalcin, bALP – kostní isoenzym alkalické fosfatázy, MIP-1α – makrofágový zánětlivý protein-1α, VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor, IGF-1 – inzulinu podobný růstový faktor-1

znamných rozdílů sérových koncentrací ($< 0,0001$) mezi MGNV a MM, tj. u TK, OPN, HGF a Syndekanu-1 je přítomno význačné překrývání jednotlivě naměřených hodnot omezující uvažované obohacení standardně využívaných IMWG diskriminačních kritérií v odlišení MGNV od MM (graf 2). Z hlubšího rozboru navíc vyplynulo, že v případě sérové hladiny TK > 26 IU/L, MIP-1α $> 37,4$ pg/mL, OPN > 288 ng/mL, HGF $> 7\,234$ pg/mL a indexu VLŘ $\kappa/\lambda < 0,11$ nebo $> 74,2$ je možno pomýšlet s vysokou náležitostí na MM, neboť hodnoty nad tuto mez nebyly v námi analyzovaném souboru MGNV zachyceny (tab. 2, graf 2). Tento závěr se ovšem týká jen malé části nemocných s MM, protože hodnoty vyšší než nejvyšší hodnoty zachycené v souboru MGNV byly pozorovány u MM v případě TK ve 13,7 %, u MIP-1α ve 12 %, u OPN ve 12,7 %, u HGF v 9,1 %, ale v případě indexu VLŘ κ/λ ve 49,1 %. Analýza zaměřená na srovnání výskytu ukazatelů hodnot vyjadřujících intenzitu kostní novotvorby snížených naopak

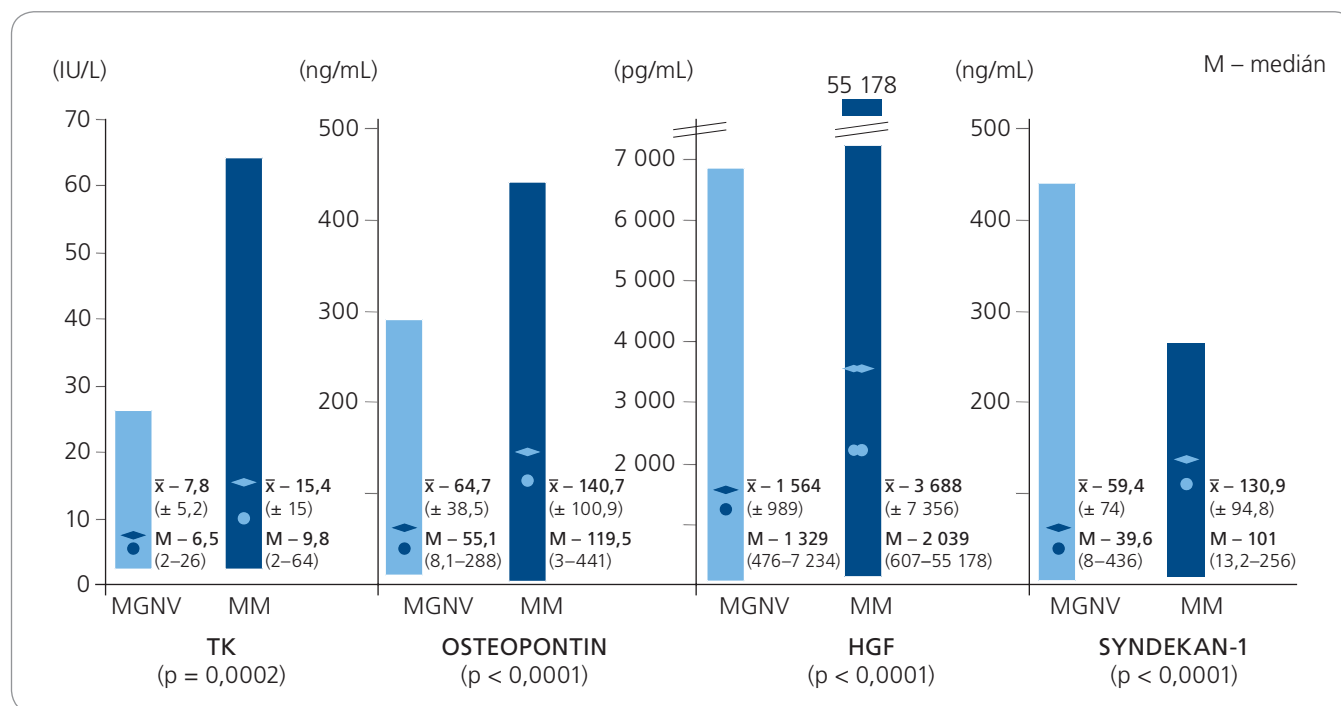
pod dolní hranici referenčního rozmezí prokázala určité rozdíly mezi jedinci s MGNV a nemocnými s MM. U MGNV byl zaznamenán vesměs častější výskyt snížené kostní novotvorby s vyšší frekvencí subnormální hladiny příslušných působků než u MM: OC – 25 % vs 20 %, bALP – 30,5 % vs 13,5 %, PINP – 13,5 % vs 3,3 %, ale v případě OPG 15,2 % vs 15 %.

Diskuze

Je všeobecně známo, že v rámci rozlišení MGNV od MM neexistuje žádný spolehlivý ukazatel, který by umožňoval v případě hraniční situace při použití IMWG kritérií jednoznačně odlišit oba prognosticky a léčebně zásadně odlišné stavy [4,7,13]. Zatímco MGNV je pouze potenciálně maligní diskrétní klonální expanze plazmocelulárních elementů vyznačující se stabilitou a klinicky asymptomatickým průběhem, jenž nevyžaduje cytostatickou léčbu, je MM i v současnosti vesměs progresivní, stále nevléčitelné onemocnění. Předložená studie se proto soustředila na analýzu 18 ukazatelů

se vztahem k patogenezi MM a/nebo k jeho integrálním klinickým a laboratorním projevům.

Rozvoj MM se vyznačuje progredující monoklonální proliferací a diseminací patologických plazmocytů s poklesem jejich apoptózy, přičemž v expanzi nádorové tkáně se uplatňují i změny aktivity řady působků vytvářených samotnými maligními plazmatickými buňkami a/nebo elementy mikroprostředí kostní dřeně ovlivňující proliferaci a apoptotickou homeostázu plazmatických buněk [14]. VEGF zasahuje do patogeneze MM modulací účinku nukleárního faktoru κB (NF- κB) podílejícího se na vzestupu resorpční aktivity osteoklastů, zatímco podpora angiogeneze se podílí na zvýšení proliferace, migrace a přežití myelomových buněk [15,16]. HGF, pleiotropní cytokin, podporuje proliferaci a diseminaci myelomových buněk v kostní dřeni (KD), zatímco v důsledku navozené inhibice osteoblastů se uplatňuje v rozvoji myelomové kostní nemoci i na vzrůstu denzity kapilární sítě



Graf 2. Grafické srovnání sérových hladin thymidinkinázy (TK), osteopontinu, hepatocytárního růstového faktoru (HGF) a syndekanu-1 v souborech jedinců s monoklonální gamapatií nejistého původu (MGNV, n=59) a mnohočetného myelomu (MM, n=60).

v KD [6,17]. Syndekan-1 (CD₁₃₈), exprimovaný myelomovými buňkami a uvolňovaný z jejich povrchu do oběhu, ovlivňuje migraci a invazivitu myelomových buněk prostřednictvím modulaace metaloproteinázy 2 a 9 [18]. Diferenciace a aktivita osteoblastů závisí na výši poměru RANKL/osteoprotegerin (liganda aktivátoru receptoru nukleárního faktoru-κB). Mezi uznávané, i když nepřilíží spolehlivé předpovědní faktory neoplastické transformace MGNV používané v klinické praxi patří mimo vysokou hodnotu M-proteinu v séru a/nebo v moči, sníženou koncentraci normálních imunoglobulinů, rozvoj anémie, zvýšený výskyt atypických plazmocytů v KD, výskyt cirkulujících monoklonálních plazmocytů v obvodové krvi i vyšetření imunofenotypického profilu se srovnáním zastoupení normálních-polyklonálních plazmocytů v KD včetně buněčné expanze N-CAM/CD₅₆ (cytoadhezivní molekula nervových buněk), rovněž ale i zvýšení proliferčního indexu plazmatických buněk, známky zvýšené kostní remodelace zjištělné na podkladě elevace hodnot ukazatelů kostního obratu (ICTP, izoenzymu 5b-tartrát rezistentní kyselý fosfatázy) či patologického nálezu při vy-

šetření skeletu a kostní dřeně s pomocí ¹⁸FDG-PET/CT, celotělové MRI i nálezu patologické hodnoty indexu monoklonality VLŘ κ/λ [4,11–13,19–21]. V současnosti platí, že molekulární mechanismy, uplatňující se při přechodu MGNV v MM zůstávají přes podstatné dílčí pokroky stále do značné míry neobjasněny, takže v klinické praxi je nezbytné, aby v hraniční situaci rozhodlo při odlišení MGNV od MM dlouhodobé sledování stability klinicko-laboratorního obrazu [2,4].

Z předložené studie vyplynulo, že z 18 analyzovaných biologických působků uplatňujících se v patobiologii MM byly zjištěny statisticky významné rozdílné sérové koncentrace v souborech MGNV a MM pouze u 9 ukazatelů. I nyní, stejně jako předchozí analýza [5,6], ověřila významnost rozdílných hladin TK u MGNV oproti MM. Prakticky reálné využití má však omezený prostor nejen pro významné překrývání naměřených hodnot, ale i pro nízkou specifitu tohoto ukazatele s možností zvýšených sérových hladin v rámci přidruženého imunopatologického a/nebo zánětlivého stavu. Nutno ovšem upozornit na skutečnost, že v případě hodnoty TK > 26 IU/L nešlo v našem souboru

nikdy o MGNV, ale o MM. Je nasnadě, že tento poznatek vyžaduje ověření na rozsáhlejší souboru nemocných.

Již z definice MGNV a MM vyplývá, že naprosto stěžejním kritériem v rozlišení obou stavů jsou projevy myelomové kostní nemoci (MKN) jako následku poruchy funkční homeostázy osteoklastů a osteoblastů v důsledku disharmonie osy RANKL/OPG [19,22,23]. Myelomové elementy podílející se na vzestupu poměru RANKL/OPG v mikroprostředí KD indukují rozvoj osteoklastogeneze, takže lze očekávat, že již v iniciální fázi MM a v předstihu změn prokazatelných na skeletu s pomocí sofistikovaných zobrazovacích metod lze počítat se zvýšenou hladinou působků se vztahem k osteoresorpci a osteoformaci. Ověřeným a citlivým indikátorem rozdílnosti intenzity kostní resorpce u MGNV a MM je ICTP [23–25]. I tato, obdobně jako předchozí studie [5,6,8], zaznamenala abnormálně zvýšené hladiny ICTP u 73 % nemocných s MM, překvapivě ale i u 40 % jedinců s MGNV. Přes statisticky významnou rozdílnost sérových hladin ICTP u MGNV a MM nelze tohoto ukazatele pro značné vzájemné překrývání zvýšených hodnot v diskriminaci obou stavů využít.

MIP-1 α a MIP-1 β jsou nízkomolekulární pluripotentní chemokiny s prozánětlivými vlastnostmi, jež hrají významnou roli v biologii, patogenezi a klinickém obraze MM [19,26]. Vedle stěžejní úlohy v diferenciaci osteoklastů z preosteoklastických buněk stromatu a jejich aktivaci vedoucí k osteoklastické resorpci a rozvoji MKN se podílejí na snížení syntézy imunoglobulinů. MIP-1 α jako potentní modulator hematopoézy indukuje útlum erytropoézy, zatímco MIP-1 β indukuje apoptózu pre-B buněk [27–29]. Biologické účinky MIP-1 α jsou regulovány prostřednictvím FGFR3 (receptor č. 3 fibroblastického růstového faktoru) a spojeny s aktivací RAS-MAPK signální dráhy, což ovlivňuje mj. proliferaci, migraci a přežití myelomových buněk a rychlost nádorového růstu. Byl rovněž zaznamenán vztah k délce celkového přežití [30,31]. MIP-1 α je i chemoatraktivním působkem monocytů uplatňujícím se v rozvoji neoangiogeneze KD [28,32]. Vysoká exprese MIP-1 α v myelomových plazmocyttech byla prokázána u 59%, střední u 13% a chybějící u 28% nemocných s MM, a to s dobrou korelací k hladině MIP-1 α v séru i ke stupni denzity kapilární sítě v KD [32]. Bylo prokázáno, že chemokiny MIP-1 α a MIP-1 β secernované myelomovými plazmocyty mají úzký vztah k tíži kostních změn [19,27,28,33]. Nemocní s MM se vyznačují zvýšenou sérovou hladinou nejen MIP-1 α , ale i angiogeninu a VEGF oproti zdravým jedincům, zatímco v případě hladin bALP a OC bylo pozorováno jejich snížení [32]. Exprese MIP-1 α i MIP-1 β myelomovými plazmocyty stejně jako koncentrace MIP-1 α v plazmě KD byla podstatně vyšší v aktivní než ve stabilní fázi myelomu stadia III i než ve stadiu I [28]. Bylo popsáno, že u nemocných s projevy MKN byla vysoká sekrece MIP-1 α a MIP-1 β myelomovými plazmocyty provázána zvýšenou exkrecí deoxypyrolidinu močí bez zvýšení hladiny bALP a OC v séru [33]. V určitém souladu se závěry Terpose [34], který našel chybějící expresi MIP-1 α v plazmocyttech u MGNV, vyzněl i výsledek naší studie prokazující statisticky významně nižší hodnoty MIP-1 α v séru u MGNV oproti nemocným s MM. Avšak z hlediska odlišení MM od MGNV by mohl hrát určitou diskriminační roli pouze

nález neobvykle zvýšené hodnoty MIP-1 α .

Osteopontin (OPN) je fosfoglykoprotein extracelulární matrix chovající se jako multifunkční cytokin s širokou škálou biologických účinků. Je exprimován a secernován buňkami kostní tkáně, ledvin, endoteliálními elementy, T-lymfocyty, makrofágy i buňkami řady nádorů. OPN se uplatňuje v procesu adheze, chemotaxe, invaze, migrace, růstu a zábrany apoptózy normálních i neoplastických buněk, v regulaci aktivace T-lymfocytů a syntézy imunoglobulinů B-lymfocytů, v produkci prozánětlivých i protizánětlivých cytokinů. Rovněž byla prokázána jeho role v angiogenezi a remodelaci kostí a tkáně. Byla popsána i jeho významná úloha v regulaci buněčných signálních cest v procesu neoplastické transformace jako mediátoru nádorové progresi a metastatického šíření [35]. Stupeň imunohistochemické exprese i zvýšená hladina OPN v plazmě je významným biomarkerem klinického stadia, léčebné odezvy, prognózy a délky celkového přežití u mnoha neoplastických stavů, včetně akutní myeloidní leukémie [36]. OPN byl původně izolován z extracelulární kostní matrix a identifikován v osteoblastech jako protein modulující mineralizaci kosti. Je zapojen do procesu osteoresorpce, inhibice krystalogeneze, avšak za klíčovou je považována jeho úloha v procesu osteoklastogeneze. Podílí se na zvýšené expresi MMP-9 (matrixové metaloproteinázy-9) v nádorových buňkách mající úzký vztah k nádorové progresi, takže je v současnosti testován jako jeden z terčů protinádorové léčby [35]. Při analýze angiogenního potenciálu myelomových buněk podle intenzity imunohistochemické exprese VEGF a OPN byla zjištěna dobrá korelace exprese VEGF ke stupni neoangiogeneze a OPN k aktivaci NF- κ B/p65 [37]. OPN spolu s IL-6 hraje stěžejní úlohu v růstu a přežití myelomových buněk a v rozvoji myelomové kostní nemoci [38]. Imunocytochemická analýza prokázala výraznou pozitivitu OPN v plazmatických buňkách u nemocných s rozvinutou formou MM, nikoliv u MGNV. Kultury plazmatických buněk nemocných s pokročilou formou MM produkovaly více OPN

než plazmocyty nemocných s doutnající formou MM nebo MGNV, rovněž hladina OPN v plazmě byla u pacientů s MM významně vyšší než u jedinců s MGNV [39]. Výše uvedené poznatky, ale i nedostatečná dosavadní pozornost věnovaná úloze OPN u MM nás vedla k porovnání jeho sérových hladin u MGNV a MM. Za významné považujeme zjištění, že v souboru s MGNV byla přítomna zvýšená koncentrace OPN v séru pouze u 2% jedinců, zatímco u MM u 33% nemocných, přičemž průměrná hladina OPN v séru byla u MGNV dvojnásobně nižší než v souboru s MM, což přináší v případě významně zvýšených hladin OPN v séru i jistý diferenciálně-diagnostický potenciál.

Mezi nálezy odlišující MGNV od MM patří i hustota kapilární sítě v KD, neboť MGNV je považována za stav „preangiogenní“, zatímco MM za stav „vaskulární“, v němž angiogeneze kostní dřene je kritickým mechanismem v patogenezi MM [15,40]. Stupeň neoangiogeneze je pak výsledkem souboje mezi pozitivními a negativními regulátory novotvorby kapilární sítě [41]. Zvýšená denzita kapilární sítě v KD u MM je vyvolána zejména nadměrnou produkcí potentních proangiogenních cytokinů typu VEGF, HGF a bazického fibroblastického růstového faktoru (bFGF) klonálními plazmocyty [15,16,40], stimulačními vaskulogenní diferenciací CD34+ buněk, zatímco migrace a proliferace endotelových buněk je tlumena produkcí antiangiogenních cytokinů [2,42,43]. Koncentrace HGF v plazmě periferní krve i v plazmě kostní dřene nemocných vyšetřených při diagnóze MM je u nemocných s dosažením kompletní nebo velmi dobré partiální remise významně nižší než u nemocných s dosažením pouze částečné léčebné odezvy, a to jak s použitím vysocedávkované terapie s autologní transplantací krvetvorných buněk, tak i ve skupině relabujících nemocných léčených bortezomibem [41,42]. Tento závěr platil i pro vysokou hodnotu trombospodinu-1 v plazmě KD, nikoliv ale pro VEGF, bFGF, endostatin a angiostatin [41,42]. Z nynější stejně jako z předchozích našich studií vyplynulo, že sérové hladiny HGF byly zvýšeny u nadpoloviční části nemocných s MM, zatímco v souboru

s MGNV pouze u jedné pětiny nemocných [5,6,44]. Přestože statistická analýza vyzněla při srovnání hladin HGF mezi MGNV a MM vysoce významně, je diferenciálnědiagnostický přínos pro odlišení obou stavů v důsledku vzájemného překrývání hodnot velmi omezený. Pozitivním vkladem pro odlišení obou stavů je u určité části jedinců nález vysoké koncentrace HGF u MM, který se u MGNV nevyskytuje.

Angiogenin (ANG), neglykosylovaný polypeptid patřící do skupiny ribonukleáz s angiogenní a ribonukleázovou aktivitou, se uplatňuje v procesu nádorového růstu, hojení kostí i dalších patologických stavech. Je exprimován buňkami endotelu cév, fibroblasty, lymfocyty i elementy některých zhoubných tumorů. V procesu angiogeneze se uplatňuje prostřednictvím vazby na aktin a stimulaci aktivátoru tkáňového plazminogenu. Tvorba plazminu vede k degradaci membránového lamininu a fibronektinu a k narušení struktury bazální membrány cév, což disponuje k migraci endoteliálních buněk v průběhu neovaskularizace. Cirkulující ANG je přítomen v normálním séru, avšak podstatně zvýšené hodnoty se vyskytují např. u tepenných uzávěrových procesů a nádorů pankreatu, nebyl však prokázán vztah hladiny ANG ke stupni pokročilosti karcinomu ledviny [45]. Zato u primární makroglobulinémie koreluje výše ANG v séru s klinickým obrazem a u non-hodgkinských lymfomů byly prokázány zvýšené hodnoty bez poklesu po chemoterapii [46]. Prakticky jediné předchozí sdělení věnované poměrům u MM prokázalo zvýšené sérové hladiny ANG, VEGF, angiopoetinu a bFGF v krvi u nemocných s MM a jejich významný pokles po absolvování léčby [34]. V námi analyzovaném souboru byla sérová hladina ANG zvýšena u 44 % nemocných s MM, ale i u 17 % jedinců s MGNV, přičemž průměrné hladiny i rozmezí naměřených hodnot se podstatně nelišily, takže statistické šetření prokázalo pouze lehkou odlišnost. Vyšetřování sérové hladiny ANG tedy neosvědčilo přínos pro odlišování MGNV od MM.

Endostatin (ES), C-koncový proteolytický fragment kolagenu XVIII, je specifický endogenní inhibitor angiogeneze nacházející se v bazální zóně membrány

cév různých orgánů. Vstupuje do interakce s různými molekulami endoteliálních buněk, což vede v důsledku snížení anti-apoptotických proteinů Bcl-2 a Bcl-Xl k jejich apoptóze. Molekulární mechanismus jeho účinku není doposud plně objasněn, pravděpodobně však souvisí s vazbou heparin/heparan sulfátu na integriny. ES je produkován endotelovými buňkami a stejně jako ostatní inhibitory angiogeneze, tj. fibronectin, thrombospondin-1, angiostatin a destičkový faktor-4, se spolu s proangiogenními faktory podílí na udržování angiogenní rovnováhy a přiměřené tvorbě cévních struktur [47]. ES inhibuje novotvorbu cév prostřednictvím svého antiproliferativního a antimigratorního účinku na endoteliální buňky, což vede ke stabilizaci cévní stěny a k útlumu nádorového růstu, takže je považován za negativní biomarker nádorové progresy [47,48]. Úloha ES u MM je doposud nejasná a této problematice byla věnována v odborných publikacích prozatím jen omezená pozornost [16]. Zvýšené sérové hodnoty endostatinu v naší studii byly zjištěny u 15 % jedinců s MGNV a u 31 % pacientů s MM. I v této analýze bylo zjištěno významné vzájemné překrývání hodnot, přičemž průměrná koncentrace ES v séru se mezi oběma stavy lišila jen s mírnou, ale statisticky vyjádřenou významností. Vyšetřování sérových hladin ES se tedy jeví z pohledu praktického přínosu pro odlišení MGNV a MM jako nepřínosné.

Syndekan-1 (sCD_{138}), tento transmembránový glykoprotein uvolňovaný z povrchu neoplastických plazmocytů, je jedním z ústředních regulačních působků uplatňujících se v patogenezi MM, neboť se podílí na vazbě komponent extracelulární matrix, v modulaci mnoha působků cytokinové sítě i na zpětném ovlivnění chování myelomových buněk i na stimulaci aktivity osteoblastů a útlumu činnosti osteoklastů [49–51]. Předchozí studie prokázaly vztah zvýšené hodnoty syndekanu-1 v séru k hodnotě β_2 -mikroglobulinu, MIG v séru, k výši odpadu Bence-Jonesovy bílkoviny močí, k prognóze MM, k rozsahu nádorové masy, k tíži infiltrace KD myelomovými plazmocyty i k aktivitě nemoci [49,51,52]. Výskyt zvýšených hodnot syndekanu-1 v séru ne-

mocných s MM kolísá v rozmezí 35–79 % [6,7,49,51], v hodnoceném souboru byly zvýšené hodnoty u 44 % nemocných. Předložená analýza prokázala statisticky vysoce významný rozdíl v hladinách syndekanu-1 mezi MGNV a MM, jeho využití v diferenciální diagnostice ovšem brání v souladu s předchozími zjištěními výrazné vzájemné překrývání naměřených hodnot [53,54].

Sérové hladiny VLŘ a/nebo poměr κ/λ u MGNV jsou u ~ 81 % mimo rozmezí normálních hodnot [12,55]. Na podkladě analýzy 1 148 nemocných s MGNV bylo zjištěno, že nemocní s abnormálním indexem VLŘ κ/λ měli významně vyšší riziko progresy než nemocní s normální hodnotou, přičemž riziko maligní transformace narůstalo s výší κ/λ poměru [56,57]. Výše abnormality κ/λ indexu, tj. poměru dominantního a suprimovaného VLŘ, zřejmě odráží klonální evoluci plazmatických buněk [12]. Je nasnadě, že vzhledem k výskytu patologického indexu κ/λ u převážné většiny jedinců s MGNV a normálním hodnotám indexu κ/λ u ~ 4–6 % nemocných s MM [12,58,59] není vyšetření tohoto indexu vhodné k diferenciaci MGNV od MM. I když v námi analyzované sestavě se patologické hodnoty indexu κ/λ vyskytovaly u MGNV v 75 % a u MM v 89 %, statistické vyhodnocení celé sestavy přesto prokázalo vysoce významný rozdíl mezi výší tohoto indexu u obou srovnávaných stavů. Zjištěný rozdíl je zřejmě podmíněn převažujícím zastoupením nemocných s MM, u nichž patologická výše nebo naopak patologické snížení indexu monoklonality κ/λ překračovaly okrajové hodnoty naměřené v souboru s MGNV (v naší sestavě $\kappa/\lambda > 74,2$ a $< 0,11$). Z uvedeného vyplývá, že pozitivním příspěvkem k diferenciální diagnostice mezi MGNV a MM je pouze nález významně patologické hodnoty indexu κ/λ .

Při srovnání sérové hladiny VEGF u MGNV a MM nebyla zjištěna statisticky významná rozdílnost, přestože tento vysoce potentní proangiogenní peptid se uplatňuje nejen v akceleraci angiogeneze, rozvoji myelomové kostní nemoci a celkové progresy choroby [21,34]. Naše analýza prokázala překvapivou, statisticky významně sníženou hodnotu VEGF v séru u MM oproti MGNV. K ob-

dobnému závěru dospěla rovněž i studie Sezera [43], jež zaznamenala klesající koncentraci VEGF se stupněm pokročilosti MM (stadia 1–3), jiné analýzy ovšem pozorovaly opačný trend [21]. Mezi příčiny tohoto úkazu lze vedle chybění přirozené rozdílnosti obou srovnávaných stavů přiřadit i použitý typ analytické metody a možnost ovlivnění hladin VEGF z jiných zdrojů, např. z krevních destiček.

Pátrání po případné rozdílnosti sérových hladin působků zasahujících do kostního metabolismu, tj. IGF-1, OC, bALP, PINP, OPG, MIP-1 β , IL-17 a PTH u MGNV a MM, se ukázalo jako nepřínosné. Naše výsledky nepotvrdily předchozí pozorování, že nemocní s MM mají význačně nižší hladinu osteokalcinu než jedinci s MGNV [20,60], ani nález význačně vyšší koncentrace bALP v séru u MGNV než u MM [60]. Nutno ale uvést, že podrobnější analýza prokázala vyšší hladiny bALP a PICP u nemocných s MM především v případě přítomnosti kostních fraktur, což ale neplatilo pro hladinu OC [20].

IGF-1, tento cytokin charakteru inzulínu podobného růstového faktoru-1, je parakrinním růstovým faktorem myelomových buněk indukujícím jejich proliferaci, pokles apoptózy, invazi a migraci, případně i lékovou rezistenci, podílí se ale i na afinitě myelomových plazmocytů ke KD [61,62]. Interakce IGF-1/IGF-1R hraje důležitou roli v patogenezi MM a účinek IGF-1 je stejný jako v případě IL-6 zprostředkovanou aktivací ras-MAPK a PI3K/Akt-1 signální kaskády a setrvalou aktivací NF- κ B [62]. Je zajímavé, že imunohistochemická analýza prokázala aktivaci AKT-kinázy v plazmatických buňkách u MM, nikoliv ale u MGNV [63]. V předchozí studii bylo prokázáno významné snížení hladiny IGF-1 v séru u MM a MGNV oproti zdravým jedincům, přičemž nemocní s MM měli podstatně nižší hladiny než jedinci s MGNV [64]. Do tohoto pilotního zjištění zapadá i námi pozorované pouze sporadické zvýšení sérové hladiny jak u MGNV, tak u MM, i chybějící rozdílnost úrovně sérových hladin. Je zřejmé, že vyšetřování sérových hladin IGF-1 není pro odlišení MGNV a MM přínosné a je vysvětlitelné nesouladem mezi nízkou hladinou sérových hodnot a vysokou ex-

presí IGF-1 myelomovými plazmocyty prokázanou v předchozích studiích.

V případě PINP, tedy ukazatele vyjadřujícího stupeň osteoblastické aktivity a kostní novotvorby, odpovídají dosažené výsledky závěrům předchozích studií s chybějící rozdílností sérových hladin mezi MGNV a MM. Výskyt subnormálních hodnot byl ale u MGNV čtyřikrát častější než u MM (13,5 % vs 3,3 %), což napovídá, že nízký stupeň osteoblastické aktivity je u MGNV zřetelně častější než u MM [5,6,20,24].

I nadále existuje poměrně nepřehledná situace v hodnocení sérových hladin OPG, neboť bylo popsáno, že u MM jsou sérové hladiny OPG sníženy [65,66], ale v některých studiích v souladu s našimi závěry zvýšeny (32 % MM), a to i u MGNV (25 %), přičemž nebyl zjištěn mezi oběma stavy žádný významný rozdíl [5,6,67]. Mezi příčiny rozdílných nálezů patří zřejmě i skutečnost, že stanovení sérové hladiny cirkulující solubilní formy OPG není pouze odrazem aktivity OPG v mikroprostředí KD, ale i důsledkem možného původu OPG v kapilární síti a závislosti sérové hladiny na stavu renální funkce.

Interleukin-17 je z chemického hlediska disulfidický homodimer vytvářený aktivovanými paměťovými T-buňkami považovaný za prostředníka mezi imunitním a hematopoetickým systémem. Tento prozánětlivý cytokin stimuluje fibroblasty k tvorbě IL-6, IL-8, ICAM-1 a G-CSF a podporuje proliferaci a aktivaci T-buněk. Indukce polyfunkčních T-pomahačských buněk vytvářejících IL-17 v kostní dřeni nemocných s MM je zprostředkována dendritickými buňkami. Ačkoliv většina cirkulujících Th-17 buněk produkuje pouze IL-17, případně IL-2, buňky indukované dendritickými buňkami jsou polyfunkční s koexpresí IL-17 a IFN-gama (Th-17-1 buňky) [68]. Bylo zjištěno, že kostní dřeň nemocných s MM obsahuje oproti MGNV vysoký podíl Th-17-1 buněk. Interakce apoptotických myelomových buněk s dendritickými elementy vede k vysoké indukci Th-17-1 buněk. Naše analýza neodhalila žádné odlišnosti v hodnocení sérových hladin IL-17 u MGNV a MM, a to jak z hlediska zastoupení jedinců s patologicky zvýšenou hodnotou, tak i z hlediska koncentrace tohoto cytokinu v séru.

Závěr

Z předložené studie vyplývá, že rozšíření IMWG kritérií o další ukazatele, které by prohloubily a zjemnily diagnostiku MGNV a MM, zůstává i nadále problémem, a to zřejmě i proto, že mezi MGNV a iniciální, asymptomatickou („dřímající“) formou MM existuje přirozená, plynulá linie přechodných stavů, vyznačujících se různou fází maligní proměny. Z širokého setu 18 biologických ukazatelů, jejichž sérové koncentrace byly porovnány mezi MGNV a MM, prokázaly statisticky vysoce významnou rozdílnost pouze 4 molekuly, tj. OPN, HGF, syndekan-1 a index VLŘ κ/λ , ve zřetelně menší míře i TK, ICTP, MIP-1 α , ANG a ES a chybějící rozdíl IGF-1, OC, bALP, PINP, OPG, MIP-1 β , IL-17, PTH a VEGF. Praktické využitelnosti ukazatelů s prokázanou, vysoce významně odlišnou hodnotou sérových hladin u MGNV a MM ovšem brání význačné vzájemné překrývání individuálně naměřených hodnot. Z tohoto rezervovaného hodnocení potenciálního přínosu pro zlepšení rozpoznání MM se do jisté míry vymyká pouze 5 z 18 analyzovaných ukazatelů, v případě použití horní hranice mezní koncentrace zaznamenané v souboru MGNV, tj. TK (> 26 IU/L), MIP-1 α ($> 37,4$ pg/ml), OPN (> 288 ng/mL), HGF ($> 7\,234$ pg/mL) a odchylné hodnoty indexu VLŘ κ/λ ($< 0,11$ nebo $> 74,2$). Vzhledem k tomu, že pouze u velmi malé části nemocných s MGNV bylo zjištěno zvýšení hodnoty OPN (u 2 %), osteokalcinu (4 %) a u MIP-1 α dokonce chybění zvýšené sérové hladiny, lze jako podpůrné kritérium pro diagnózu MM rozšiřující standardní IMWG kritéria [3] považovat i výrazně vysoké sérové hladiny těchto působků. Je nasnadě, že molekuly, které s mnohem významnější diskriminační schopností přispějí k rozlišení MGNV od iniciální/asymptomatické fáze MM, snad odhalí teprve budoucí studie založené na použití molekulárně-biologických technik, genové expresní analýzy či proteomiky. Ze studie vyplynulo, že snaha zaměřená na vyšetření v současnosti snadno metodicky dostupných sérových ukazatelů se neukázala v reálném světle, neboť jde o ukazatele „odvozené“, reagující nepřímo na vnitřní buněčné biologické děje, procesy v mik-

roprostředí kostní dřeně, nebo rozsah plazmocelulární masy, a nevystihuje proto klíčové rozdílnosti mezi MGNV a MM.

Literatura

1. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl MW et al. Advances in biology of multiple myeloma: Clinical applications. *Blood* 2004; 104(3): 607–618.
2. Urashima M, Chen BP, Chen S et al. The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow. *Blood* 1997; 90(2): 754–765.
3. 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(5): 749–757.
4. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering multiple myeloma: emphasis on risk factor for progression. *Brit J Haematol* 2007; 139(5): 730–743.
5. Ščudla V, Budíková M, Píka T et al. Srovnání sérových hladin vybraných biologických ukazatelů u monoklonální gamapatie nejistého významu a mnohočetného myelomu. *Vnitř Lék* 2006; 52(3): 232–240.
6. Ščudla V, Budíková M, Píka T et al. Srovnání sérových hladin vybraných biologických působků u monoklonální gamapatie nejistého významu a mnohočetného myelomu. *Čas Lék čes* 2009; 148: 315–322.
7. Scudla V, Píka T, Budíková M et al. The importance of serum levels of selected biological parameters in the diagnosis, staging and prognosis of multiple myeloma. *Neoplasma* 2010; 57(2): 102–110.
8. Scudla V, Píka T, Budíková M et al. The relationship between some soluble osteogenic markers, angiogenic cytokines/other biological parameters and the stages of multiple myeloma evaluated according to the Durie-Salmon and International Prognostic Index stratifications systems. *Biomed Pap Med* 2009; 153(4): 275–282.
9. Durie BGM, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975; 36(3): 842–854.
10. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23(15): 3412–3420.
11. Hájek R, Adam Z, Maisnar V et al. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. Doporučení vypracované Českou myelomovou skupinou a Myelomovou sekcí České hematologické společnosti a Slovenskou myelomovou společností pro diagnostiku a léčbu mnohočetného myelomu. *Transfúze Hematol dnes* 2009; 15 (Suppl. 2): 1–80.
12. Bradwell AR. Serum free light chain analysis (plus Hevlyte). 5th ed. Birmingham: The Binding Site Ltd 2008.
13. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 2006; 134(6): 573–589.
14. Yacoby S, Pearce RN, Johnson CL et al. Myeloma interacts with the bone marrow microenvironment to induce osteoclastogenesis and is dependent on osteoclast activity. *Br J Haematol* 2002; 116(2): 278–290.
15. Vacca A, Ria R, Ribatti D et al. A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. *Haematologica* 2003; 88(2): 176–185.
16. Pour L, Hájek R, Buchler T et al. Angiogeneze a antiangiogenní terapie u nádorů. *Vnitř Lék* 2004; 50(12): 930–938.
17. Holt RU, Fagerli UM, Baykov V et al. Hepatocyte growth factor promotes migration of human myeloma cells. *Haematologica* 2008; 93(4): 619–622.
18. Seidel C, Børset 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(9): 3139–3146.
19. Heider U, Fleissner C, Zavrski I et al. Bone markers in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006; 42(11): 1544–1553.
20. Fonseca R, Trendle MC, Leong T et al. Prognostic value of serum markers of bone metabolism in untreated multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 2000; 109(1): 24–29.
21. Alexandrakis MG, Passam FH, Boula A et al. Relationship between circulating serum soluble interleukin-6 receptor and the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in multiple myeloma. *Ann Hematol* 2003; 82(1): 19–23.
22. Giuliani N, Colla S, Rizzoli V. New insight in the mechanism of osteoclast activation and formation in multiple myeloma: Focus on the receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL). *Exp Hematol* 2004; 32(8): 685–691.
23. Roux S, Meignin V, Quillard J et al. RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) and RANKL expression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2002; 117(1): 86–92.
24. Abildgaard N, Bentzen SM, Nielsen JL, for the Nordic Myeloma Study Group (NMSG). Serum markers of bone metabolism in multiple myeloma: Prognostic value of the carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP). *Br J Haematol* 1997; 96(1): 103–110.
25. Špička I, Cieslar P, Procházka B et al. Prognostické faktory a markery aktivity u mnohočetného myelomu. *Čas Lék čes* 2001; 139: 208–212.
26. Terpos E, Politou M, Szydlo R et al. Serum levels of macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) correlate with the extent of bone disease and survival in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2003; 123(1): 106–109.
27. Abe M, Hiura K, Wilde J et al. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 β in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood* 2002; 100(6): 2195–2202.
28. Choi SJ, Cruz JC, Craig F et al. Macrophage inflammatory protein 1-alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. *Blood* 2000; 96(2): 671–675.
29. Graham GJ, Wright EG, Hewick R et al. Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature* 1990; 344(6265): 442–444.
30. Lentzsch S, Gries M, Janz M et al. Macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1 α) triggers migration and signaling cascades mediating survival and proliferation in multiple myeloma (MM) cells. *Blood* 2003; 101(9): 3568–3573.
31. Hata H. Bone lesions and macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) in human multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2005; 46(7): 967–972.
32. Terpos E, Tasidou A, Roussou M et al. Increased expression of macrophage inflammatory protein-1 α on trephine biopsies correlates with advanced myeloma, extensive bone disease and elevated microvessel density in newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2009; 94 (Suppl 2): 146.
33. Hashimoto T, Abe M, Oshima T et al. Ability of myeloma cells to secrete macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 β correlates with lytic bone lesions in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004; 125(1): 38–41.
34. Terpos E, Anagnostopoulos A, Kastritis E et al. The combination of bortezomib melphalan, dexamethasone and intermittent thalidomide (VMDT) is an effective regimen for relapsed/refractory myeloma and reduces serum levels of RANKL, MIP1A and angiogenic cytokines. *Haematologica* 2006; 91: 84.
35. Johnston NI, Gunasekharan VK, Ravindranath A et al. Osteopontin as a target for cancer therapy. *Front Biosci* 2008; 13: 4361–4372.
36. Lee CY, Tien HF, Hou HA et al. Marrow osteopontin level as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2008; 141(5): 736–739.
37. Štifter S, Valković T, Načinović-Duletić A et al. Vascular endothelial growth factor, osteopontin and NF- κ B/P65 expression in multiple myeloma. *Haematologica* 2008; 93 (Suppl. 1): 80.
38. Robbani DF, Colon K, Ely S et al. Osteopontin dysregulation and lytic bone lesions in multiple myeloma. *Hematol Oncol* 2007; 25(1): 16–20.
39. Saeki Y, Mima T, Ishii T et al. Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma: clinical and pathogenic implications. *Brit J Haematol* 2003; 123(2): 263–270.
40. Rajkumar SV, Mesa RA, Fonseca R et al. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res* 2002; 8(7): 2210–2216.
41. Pour L, Svachova H, Adam Z et al. Pretreatment hepatocyte growth factor and thrombospondin-1 levels predict response to high-dose chemotherapy for multiple myeloma. *Neoplasma* 2010; 57(1): 29–33.
42. Pour L, Svachova H, Adam Z et al. Treatment response to bortezomib in multiple myeloma correlates with plasma hepatocyte growth factor concentration and bone marrow thrombospondin concentration. *Eur J Haematol* 2009; 84(4): 332–336.
43. Sezer O, Jakob C, Eucker J et al. Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2001; 66(2): 83–88.
44. Seidel C, Børset M, Turesson I et al, for the Nordic Myeloma Study Group. Elevated serum concentrations of hepatocyte growth factor in patients with multiple myeloma. *Blood* 1998; 91(3): 806–812.
45. Hlavkova D, Kopecky O, Lukesova S et al. Monitoring of serum levels of angiogenin, ENA-78 and GRO chemokines in patients with renal cell carcinoma (RCC) in the course of the treatment. *Acta Medica* 2008; 51(3): 185–190.
46. Passam FH, Sfridakis A, Pappa C et al. Angiogenesis-related growth factors and cytokines in the serum of patients with B non-Hodgkin lymphoma; relation to clinical features and response to treatment. *Int J Labor Hematol* 2008; 30(1): 17–25.
47. Ergün S, Kilic N, Wurmback JH et al. Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes. *Angiogenesis* 2001; 4(3): 193–206.
48. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88(2): 277–285.
49. Dhodapkar MV, Kelly T, Theus A et al. Elevated levels of shed syndecan-1 correlate with tumour mass and decreased matrix metalloproteinase-9 activity in the serum of patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 1997; 99: 368–371.
50. Maisnar V, Toušková M, Malý J et al. Význam vybraných sledovaných laboratorních ukazatelů pro diferenciální diagnostiku a sledování aktivity mnohočetného myelomu. *Vnitř Lék* 2002; 48: 290–297.
51. Seidel C, Sundan A, Hjorth M et al. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood* 2000; 95(2): 388–392.
52. Kyrstsonis MC, Vassilakopoulos TP, Siakantaris MP et al. Serum syndecan-1, basic fibroblast growth factor and osteoprotegerin in multiple myeloma patients at diagnosis and during the course of the disease. *Eur J Haematol* 2004; 72(4): 252–258.
53. Schaaf CG, Vermeer HJ, Wijermans PW et al. Serum syndecan-1 in patients with newly diagnosed mo-

noclonal proteinaemia. *Haematologica* 2005; 90(10): 1437–1438.

54. Witzig TE, Kimlinger T, Stenson M et al. Syndecan-1 expression on malignant cells from the blood and marrow of patients with plasma cell proliferative disorders and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998; 31(1–2): 167–175.

55. Tate JR, Gill D, Cobcroft R et al. Practical considerations for the measurement of free light chains in serum. *Clin Chem* 2003; 49(8): 1252–1257.

56. Rajkumar VS. MGUS and smoldering multiple myeloma: update on pathogenesis, natural history, and management. *Am Soc Hematol Educ Program* 2005; 2005(1): 340–345.

57. 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(3): 812–817.

58. Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT et al. Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004; 126(3): 348–354.

59. Dispenzieri A, Zhang L, Katzmann J et al. Appraisal of immunoglobulin free light chain as a marker of response. *Blood* 2008; 111(10): 4908–4915.

60. Corso A, Arcaini L, Mangiacavalli 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(4): 394–398.

61. Renzulli MR, Terragna C, Testoni N et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) is overexpressed in multiple myeloma plasma cells (PC) and regulates the expression of the IGF-1 receptor. *Haematologica* 2006; 91: 87.

62. Menu E, van Valckenborgh E, van Camp B et al. The role of the insulin-like growth factor 1 receptor axis in multiple myeloma. *Arch Physiol Biochem* 2009; 115(2): 49–57.

63. Hsu JH, Shi Y, Krajewski S et al. The AKT kinase is activated in multiple myeloma tumor cells. *Blood* 2001; 98(9): 2853–2855.

64. Greco C, Vitelli G, Vercillo G et al. Reduction of serum IGF-1 levels in patients affected with monoclonal gam-

mopathies of undetermined significance or multiple myeloma. Comparison with bFGF, VEGF and κ -ras gene mutation. *J Exp Clin Cancer Research* 2009; 28: 35.

65. Seidel C, Hjertner Ø, Abildgaard N et al, for Nordic Myeloma Study Group. Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood* 2001; 98: 2269–2271.

66. Terpos E, Szydlo R, Apperley JF et al. Soluble receptor activator of nuclear factor κ -B ligand – osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood* 2003; 102(3): 1064–1069.

67. Corso A, Dovio A, Rusconi C et al. Osteoprotegerin serum levels in multiple myeloma and MGUS patients compared with age and sex-matched healthy controls. *Leukemia* 2004; 18(9): 1555–1557.

68. Dhodapkar KM, Barbuto S, Matthews P et al. Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. *Blood* 2008; 112(7): 2878–2885.