

## **Analýza moderních prognostických faktorů na buněčné a molekulární úrovni určujících riziko transformace monoklonální gamapatie nejasného významu do mnohočetného myelomu**

**Říhová L.<sup>1,2</sup>, Sandecká V.<sup>4</sup>, Klincová M.<sup>4</sup>, Varmužová T.<sup>1,2</sup>, Suská R.<sup>1</sup>, Zarbochová P.<sup>1,2,3</sup>, Mikulášová A.<sup>1,2,3</sup>, Smetana J.<sup>2,3</sup>, Grešliková H.<sup>2</sup>, Kupská R.<sup>2</sup>, Němec P.<sup>2,3</sup>, Bartoňová J.<sup>1,2</sup>, Kuglík P.<sup>2,3</sup>, Penka M.<sup>1</sup>, Hájek R.<sup>1,2,4</sup>**

<sup>1</sup>Oddělení klinické hematologie, FN Brno - PMDV, Brno

<sup>2</sup>Babáková myelomová skupina při Ústavu patologické fyziologie, LF MU, Brno

<sup>3</sup>Ústav experimentální biologie, PŘF MU, Brno

<sup>4</sup>Interní hematologická klinika, FN Brno - PMDV, Brno

### **SOUHRN**

*Cíl studie:* Vytvoření stratifikačního modelu s cílem identifikace vysoce rizikových osob s MGUS, u kterých bude možno zvažovat včasnou léčebnou intervenci.

*Typ studie:* Retrospektivní studie

*Název a sídlo pracoviště:* Interní hematologická klinika, FN Brno - PMDV, Brno

*Materiál a metody:* Na souboru 314 osob s MGUS zařazených do Registru monoklonálních gamapatií (RMG) byla provedena pilotní statistická analýza. Byla využita základní klinická data se zaměřením na prognostické parametry stávající (typ monoklonálního proteinu - MIG, hladina MIG, poměr sérových volných lehkých řetězců – FLC ratio) i nové (přítomnost cytogenetických aberací, flowcytometrické stanovení množství klonálních plazmocytů a přítomnost imunoparézy).

*Výsledky:* Vyšší zastoupení morfoloogicky identifikovaných plazmocytů a nález >95 % PC aberantního fenotypu CD19<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> se statisticky významně častěji pojí s transformací MGUS do MM ( $p < 0,05$ ). Také přítomnost jakékoliv imunoparézy či imunoparézy postihující oba nepostižené imunoglobuliny byla statisticky významně častěji detekována u transformací MGUS do MM ( $p = 0,001$ ). První analýza stávajících a nových prognostických faktorů u MGUS dosáhla senzitivity stratifikace cca 50 % během 2 let.

*Závěr:* Byl potvrzen význam hodnocení PC pomocí morfologie a průtokové cytometrie a důležitou úlohu hraje také přítomnost imunoparézy. Stratifikační modely budou dále vylepšovány s cílem dosažení senzitivity 90 % v rámci 2 let a obdobná analýza bude provedena také u asymptomatických myelomů (aMM).

*Klíčová slova:* monoklonální gamapatie nejasného významu, mnohočetný myelom, prognóza, průtoková cytometrie, chromozomální aberace

### **SUMMARY**

**Rihova L., Sandecká V., Klincova M., Varmuzova T., Suska R., Zarbochova P., Mikulasova A., Smetana J., Greslikova H., Kupska R., Nemecek P., Bartonova J., Kuglik P., Penka M., Hajek R.: Analysis of Modern Prognostic Factors on Cellular and Molecular Level Determining Risk of Transformation of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance into Multiple Myeloma**

*Objective:* The creation of the stratification model and identification of high-risk individuals with MGUS, which should be considered to an early therapeutic intervention.

*Design:* The retrospective study

*Settings:* Department of Internal Medicine - Hematooncology, University Hospital Brno

*Material and Methods:* The pilot statistical analysis of 314 MGUS subjects from Registry of Monoclonal Gammopathies (RMG) was done. Basic clinical data were used together with existing (type of monoclonal protein - MIG, level of MIG, serum free light chain ratio – FLC ratio) and new prognostic parameters (presence of cytogenetic abnormalities, flow cytometry enumeration of clonal plasma cells and presence of immunoparesis).

*Results:* Higher number of plasma cells according to the morphology and presence of >95 % PC with aberrant phenotype CD19<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> as well were more frequently associated with transformation of MGUS into MM ( $p < 0,05$ ). Also, the presence of any immunoparesis and/or immunoparesis affecting both uninvolved immunoglobulins was more frequently detected in transformed MGUS ( $p = 0,001$ ). The first analysis of existing and new prognostic factors in MGUS achieved sensitivity of the stratification about 50 % within 2 years.

*Conclusion:* The significance of morphological and flow cytometry assessment of PCs was confirmed and presence of the immunoparesis plays an important role as well. Model of stratification will be further developed with the aim of achieving 90 % sensitivity within 2 years and a similar analysis will be performed also for asymptomatic multiple myeloma (aMM).

*Key words:* monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, prognosis, flow cytometry, chromosomal aberrations

## Úvod

Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) je prekanceróza charakteristická přítomností klonálních plazmocytů (PC) produkujících monoklonální Ig protein (MIG), přičemž nejsou naplněna kritéria mnohočetného myelomu (MM), Waldeströmovy makroglobulinémie (WM), amyloidózy (AL) či jiného lymfoproliferativního onemocnění [1]. Vznik MGUS a její vývoj nelze předvídat, a proto jsou stále hledány nové prognostické markery, které by mohly napomoci určit vysoce rizikovou skupinu pacientů a u nich zabránit transformaci do nádorového onemocnění [2- 6].

„Tradiční“ prognostické parametry vypovídající o riziku transformace MGUS do MM jsou známy, s vyšším rizikem se pojí sérová koncentrace monoklonálního proteinu (MIG) >15g/l a jiný izotyp MIG než IgG [3]. K novějším parametrům je řazeno stanovení poměru volných lehkých řetězců (FLC) v séru [8]. Na základě uvedených parametrů byl sestaven model rizikové stratifikace [2]. Současně byla publikována teorie evolving a non-evolving typu MGUS, založená na rychlosti nárůstu a izotypu MIG [9]. Tyto prognostické parametry, založené na dlouhodobém sledování osob s MGUS, však nejsou dostatečné pro vymezení skupiny s vysokým rizikem transformace v čase do 3 let od stanovení diagnózy.

Naopak stanovení počtu patologických PC pomocí průtokové cytometrie je rychlejší a navíc má přesnější výpovědní hodnotu [10]. Bylo zjištěno, že kostní dřeň osob s MGUS obsahuje směs polyklonálních PC a klonálních PC s aberantním fenotypem, zatímco u MM je nalézána naprostá převaha patologických PC [11, 12]. Nález  $\geq 95\%$  patologických PC (poměr abnormálních PC a všech nalézáných PC, A-PC) je nezávislým prediktivním parametrem, který vypovídá o riziku progresu MGUS či aMM do symptomatické formy. Při srovnání s parametrem popisujícím vývoj monoklonální komponenty bylo riziko transformace zjištěné pomocí imunofenotypizace dokonce popsáno lépe [10].

Je také známo, že u MGUS jsou nalézány shodné genetické změny jako u MM, přestože v nižší míře [13]. Lze proto předpokládat, že přítomnost nebo míra určitých abnormalit může mít vztah k možné transformaci MGUS do MM. Jestliže průtoková cytometrie řeší stanovení klonálních plazmocytů pouze na buněčné úrovni, pak cytogenetická analýza může poskytnout přesnější informaci. Je totiž možné, že fenotypově polyklonální PC již na molekulární úrovni nemusí splňovat kritérium „normality“.

Cílem této práce tedy bylo prověřit stávající a potvrdit případné nové prognostické parametry se vztahem k transformaci MGUS do MM. Na jejich základě pak sestavit stratifikační model, který by s dostatečnou senzitivitou dokázal odhalit osoby s vysokým rizikem progresu, tyto pak častěji sledovat a případně zahájit dříve léčbu, čímž by se předešlo nepříznivým projevům rozvinutého MM.

## Soubor analyzovaných osob a metody

Do analýzy bylo zahrnuto 314 osob s MGUS sledovaných na Interní hematologické klinice FN Brno. Medián sledování souboru byl 50,7 měsíce (6,3-264,0). Diagnóza byla stanovena dle kritérií IMWG [1]. V souboru došlo k 37 transformacím do nádorového onemocnění, z toho k 27 progresím (PG) do MM. Všichni pacienti před odběrem kostní dřeně (KD) podepsali informovaný souhlas a vzorky byly tentýž den zpracovány pro analýzu na průtokovém cytometru či pro cytogenetické vyšetření. Ze statistických analýz pak byli vyřazeni pacienti, u nichž byla flowcytometrická nebo cytogenetická analýza provedena více než rok od stanovení diagnózy, a to s pozitivním nálezem ( $\geq 95\%$  klonálních PC nebo záchyt kterékoliv aberace v jakémkoliv zastoupení). Základní parametry souboru jsou uvedeny v Tabulce č. 1.

**Table 1.** Characteristics of MGUS subjects.

MGUS (n=314)	
<b>Men</b>	162 (51.6%)
<b>Women</b>	152 (48.4%)
<b>Age (in time of diagnosis)</b>	61 (25-87)
<b>Type of paraprotein (n=311)</b>	
IgG	212 (68.2%)
IgM	50 (16.1%)
IgA	42 (13.5%)
biclonal	4 (1.3%)
LC	3 (1.0%)
<b>Immunoparesis (n=299)</b>	69 (23.1%)
<b>FLC ratio (n=145)</b>	1.6 (0.0-3363.0)
<b>MIG [g/l] (n=302)</b>	10.2 (0.0-33.7)
<b>% PC by morphology (n=249)</b>	2.0 (0.0-10.0)
<b>% PC by flow cytometry (n=150)</b>	0.4 (0.0-8.8)
<b>Cytogenetic analyses (%)</b>	60 (19.1%)

### Průtoková cytometrie

Odebraná KD byla inkubována s následujícími monoklonálními protilátkami (MoAb): CD38-FITC, CD138-PE, CD45-ECD, CD56-PC5, CD19-PC7 (vše Beckman Coulter) a lyzována pomocí Verzalyse (Beckman Coulter) či chloridu amonného. Vzorky byly analyzovány pomocí multiparametrické průtokové cytometrie na flow cytometru FC500 Cytomics (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA). Počet analyzovaných buněk se pohyboval mezi 250-500 tisíci, přičemž minimální počet analyzovaných plazmocytů překračoval 100 událostí. Hodnoceno bylo procentuální zastoupení CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> plazmatických buněk v rámci leukocytů, a na této populaci pak byla dále sledována exprese znaků CD19 a CD56. Výsledek zastoupení PC v KD byl, v souladu s doporučením European Myeloma Network (EMN), udáván jako poměr normálních či abnormálních plazmatických buněk a všech plazmatických buněk, a tedy jako procentuální zastoupení CD19<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> (N-PC) a CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+/+</sup> (A-PC) buněk v rámci všech PC [14].

## Cytogenetika

Molekulárně cytogenetické vyšetření chromozomových abnormalit metodou interfázni fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH) bylo prováděno v rámci suspenze KD obohacené o PC tak, jak se vyvíjely metodiky dostupné na pracovišti. Minoritně bylo využito kombinace imunofluorescenčního barvení cytoplazmatických lehkých řetězců imunoglobulinů PC a I-FISH na mononukleárních buňkách kostní dřeně [15, 16]. Tato metoda byla později nahrazena prováděním I-FISH na magneticky separovaných PC, přičemž nejúspěšnějším a nejčastěji použitým přístupem pak byla fluorescenční separace s následným I-FISH vyšetřením [17]. Pro I-FISH byly využívány následující komerčně dodávané DNA sondy: LSI 13(13q14) SpectrumGreen Probe (Abbott-Molecular), LSI p53(17p13.1) SpectrumOrange Probe (Abbott-Molecular), XL IGH break apart (Alogo), XL IGH/CCND1 dual fusion (Alogo), XL IGH/FGFR3 dual fusion (Alogo), XL IGH/MAF dual fusion (Alogo), XL 1q21/1p32 locus specific (Alogo), LSI D5S23/D5S721, CEP9, CEP15 Multi-Color Probe (Abbott-Molecular), CEP9 SpectrumAqua Probe (Abbott-Molecular). Pozitivní nález byl posuzován na 20% hodnotě cut-off dle standardů Laboratoře molekulární cytogenetiky.

## Statistická analýza

Pro testování významu vybraných parametrů z hlediska predikce transformace byl použit ML Chi-Square test v rámci programu SPSS Statistics (IBM). Zhodnocení výsledků multiparametrických analýz bylo provedeno neparametrickým Mann-Whitney U testem pomocí SW Statistica 10 (StatSoft, Inc.). Všechny testy byly provedeny na 5% hladině významnosti.

## Výsledky

Při srovnání skupin osob vzhledem k transformaci do MM, bylo zjištěno, že mezi faktory spojené se statisticky významně vyšším rizikem transformace patří sérová koncentrace MIG >15g/l; LDH > 3,75  $\mu$ kat/l; morfologicky stanovený počet PC > 5%; flowcytometricky stanovený počet abnormálních PC  $\geq$  95% (Tabulka 2).

Ostatní analyzované proměnné (typ MIG, hladina albuminu,  $\beta_2$  mikroglobulinu, hemoglobinu, kreatininu a počet trombocytů) pak neukázaly statisticky významný rozdíl při srovnání osob s transformací a bez transformace.

Při rozdělení do rizikových skupin dle Rajkumara (2005), na základě kombinace 3 nezávislých prognostických parametrů (hladina sérového MIG, typ MIG a FLC index), bylo rovněž potvrzeno, že se závažností rizika se významně zvyšuje počet progresí do MM (Tabulka 3).

V rámci analýzy imunoparézy, a tedy poklesu ostatních polyklonálních imunoglobulinů pod hranici normy, bylo zjištěno, že jakákoliv imunoparéza nebo imunoparéza postihující oba imunoglobuliny se u progresí do MM vyskytuje statisticky významně častěji (Tabulka 4).

Vyšetření pomocí multiparametrické průtokové cytometrie bylo provedeno u 150 osob. Transformace do jiného nádorového onemocnění proběhla u 13 osob, přičemž v 9 případech se jednalo o MM. Znak CD19 byl v těchto analýzách klíčovým markerem umožňujícím rozlišení mezi CD19<sup>+</sup> N-PC a CD19<sup>-</sup> A-PC. U osob s transformací do MM bylo zjištěno statisticky významné zvýšení počtu flowcytometricky identifikovaných CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> PC [1,0% (0,2-8,8) vs. 0,4% (0,0-4,2); p<0,01] a také snížení počtu normálních CD19<sup>+</sup> PC [3,8% (0,9-33,4) vs. 25,9% (0,2-87,2); p<0,002] oproti osobám bez transformace. Zvýšení exprese CD56 na patologických PC u osob s transformací MGUS do MM však nedosáhlo statisticky významného rozdílu [59,0% (1,2-98,0) vs. 26,4% (0,4-98,2); p<0,139].

Při analýze vztahu prognostických parametrů k transformaci do MM byly identifikovány jako významné následující parametry: morfologicky stanovený počet PC >5%; flowcytometricky stanovený počet abnormálních PC  $\geq$  95% a přítomnost imunoparézy (Tabulka 5). Abnormální FLC index a evolving typ MGUS překvapivě nebyly ve vztahu k transformaci do MM.

Cytogenetická analýza odhalila u 60 osob s MGUS v různé míře všechny sledované chromozomové aberace [del(13)(q14), del(17)(p13), přestavba 14q32, t(11;14), t(4;14), t(14;16), zisk 1q21 a hyperdiploidie], avšak vzhledem k tomu, že transformace do MM nebyla potvrzena u žádné osoby z této skupiny, nebylo možno posoudit prognostický význam sledovaných aberací.

**Table 2.** Parameters related to higher risk of transformation into MM.

Parameter	Without PG	PG into MM	p
<b>Serum MIG (g/l), n=292</b>			
normal $\leq$ 15g/l (n=213)	203 (76.3%)	10 (38.5%)	<b>&lt;0.001</b>
abnormal >15g/l, (n=79)	63 (23.7%)	16 (61.5%)	
<b>LDH (ukat/l), n=300</b>			
normal $\leq$ 3.75ukat/l, (n=141)	135 (48.9%)	6 (25.0%)	<b>0.021</b>
abnormal >3.75ukat/l, (n=159)	141 (51.1%)	18 (75.0%)	
<b>Morphology - PC (%), n=241</b>			
normal $\leq$ 5%, (n=210)	200 (95.2%)	10 (50.0%)	<b>&lt;0.001</b>
abnormal >5%, (n=31)	21 (67.7%)	10 (50.0%)	
<b>Flow cytometry - A-PC (%), n=146</b>			
abnormal PCs <95%, (n=129)	125 (91.2%)	4 (44.4%)	<b>0.001</b>
abnormal PCs $\geq$ 95%, (n=17)	12 (8.8%)	5 (55.6%)	

**Table 3.** Stratification according to Rajkumar and its relation to the risk of transformation into MM. Distribution into groups according to risk factor abnormalities (MIG >15 g/l, non-IgG isotype and abnormal FLC) and their combinations, which corresponds to the low risk (all factors normal), low-intermediate risk (1 factor abnormal), high-intermediate risk (2 factors abnormal), and high risk (all factors abnormal).

Risk groups, n=168	without PG	PG into MM	p
low risk, (n=38)	37 (97.4 %)	1 (2.6 %)	<b>0.014</b>
low-intermediate risk, (n=62)	57 (91.9 %)	5 (8.1 %)	
high-intermediate risk, (n=61)	51 (83.6 %)	10 (12.4 %)	
high risk, (n=7)	4 (57.1 %)	3 (42.9 %)	

**Table 4.** Frequency of immunoparesis and its relation to the transformation into MM.

Immunoparesis, n=301	without PG	PG into MM	p
<b>Immunoparesis - any type</b>			
not present, (n=225)	214 (93.0 %)	11 (7.0 %)	<b>0.001</b>
present, (n=69)	56 (81.2 %)	13 (18.8 %)	
<b>Immunoparesis 1 (one Ig decreased)</b>			
not present, (n=236)	220 (93.2 %)	16 (6.8 %)	0.182
present, (n=58)	50 (86.2 %)	8 (13.8 %)	
<b>Immunoparesis 2 (both Ig decreased)</b>			
not present, (n=283)	264 (93.3 %)	19 (6.7 %)	<b>0.001</b>
present, (n=11)	6 (54.5 %)	5 (45.5 %)	

**Table 5.** The relationship between prognostic parameters and transformation into MM.

Parameter	AUC (95% IS) <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>	Sensitivity	Specificity
Infiltration of BM >5 % PC	0.701 (0.504; 0.898)	0.035	50.0%	90.2 %
Abnormal PCs ≥ 95 %	0.734 (0.532; 0.936)	0.019	55.6%	91.2 %
Immunoparesis - any type	0.667 (0.545; 0.790)	0.007	54.2%	79.3 %

<sup>1</sup> area under the ROC curve and its 95 % confidence interval

<sup>2</sup> statistical significance of an area under the ROC curve

Na základě získaných výsledků byl definován skórovací systém, kdy za každý následující pozitivní parametr byl přidělen 1 bod: non IgG izotyp MIG, MIG > 15g/l, albumin < 35g/l,  $\beta_2$  mikroglobulin > 3mg/l, hemoglobin < 120g/l, LDH > 3,75  $\mu$ kat/l, trombocyty < 150x10<sup>9</sup>/l, kreatinin > 115  $\mu$ mol/l, přítomnost imunoparézy, evolving typ, abnormální FLC poměr, morfologicky stanovený počet PC > 5 %; flowcytometricky stanovený počet abnormálních PC ≥ 95 %. Dle skórovacího systému pak byl vytvořen model rizikového skóre vycházející z transformace onemocnění do MM (obr. 1). Je zřejmé, že tento model je schopen předpovědět transformaci do MM se senzitivitou cca 50 %, kdy ve skupině s nejvyšším počtem bodů (4-8) bylo u MGUS bez transformace 52/277 (17,1 %) osob a u MGUS s transformací do MM to bylo již 14/27 (51,9 %) osob (p=0,001).

## Diskuse

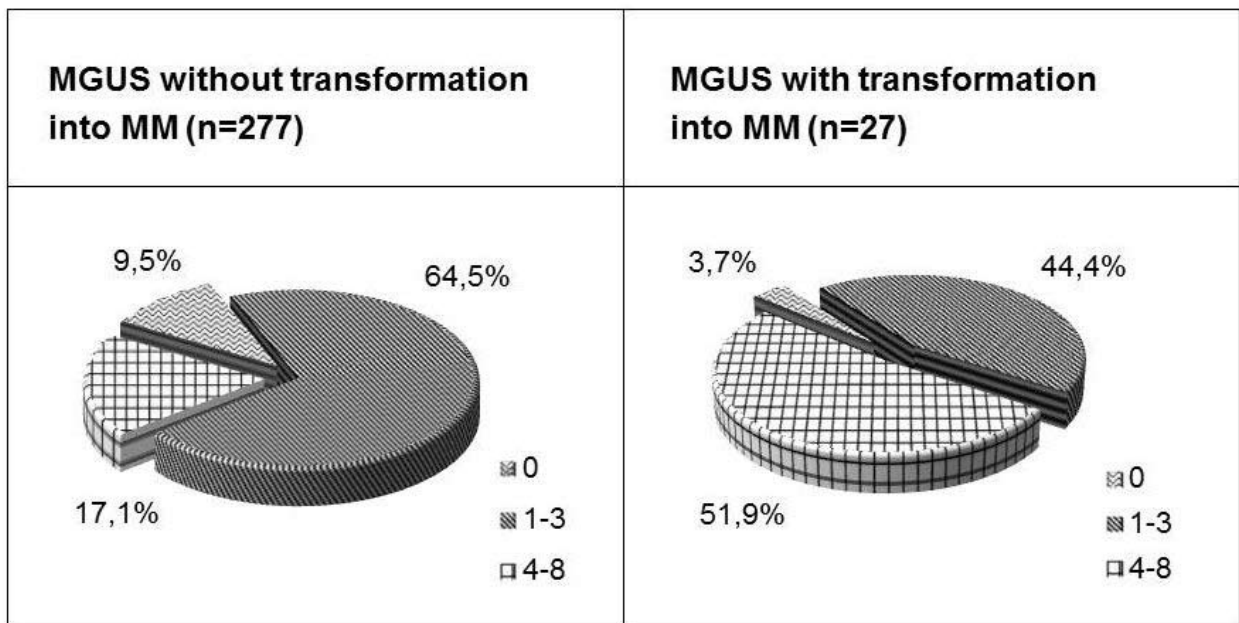
Byla provedena pilotní retrospektivní analýza dat u osob s MGUS s cílem potvrdit stávající a nalézt případné nové parametry se vztahem k transformaci tohoto onemocnění do MM. Bylo potvrzeno, že zvýšená hodnota sérového MIG a vyšší % morfologicky

stanoveného zastoupení PC jsou parametry pojící se s vyšším rizikem transformace, což je v souladu s již publikovanou analýzou [3]. Nicméně dalším parametrem, jehož vstupní vyšetření se zdá být přínosné pro predikci transformace, je hladina LDH, která byla zvýšena u 75 % osob s transformací. U dalších analyzovaných parametrů, jako např. non-IgG izotyp MIG nebo abnormální FLC index, nebyla potvrzena souvislost s transformací MGUS do MM, přestože při rozdělení do rizikových skupin dle Rajkumara byly nalezeny statisticky významné rozdíly, které jsou tedy zřejmě založeny jen na hladině MIG [2]. Také parametr popisující nárůst monoklonální komponenty v séru, zprostředkávající rozdělení na tzv. evolving a non-evolving typ MGUS, se v analýze neukázal jako přínosný. Naopak přítomná imunoparéza, a to zejména potlačení obou polyklonálních imunoglobulinů, byla potvrzena jako parametr pojící se ve vyšší míře s rizikem transformace do MM, což je opět v souladu s dostupnou literaturou [10].

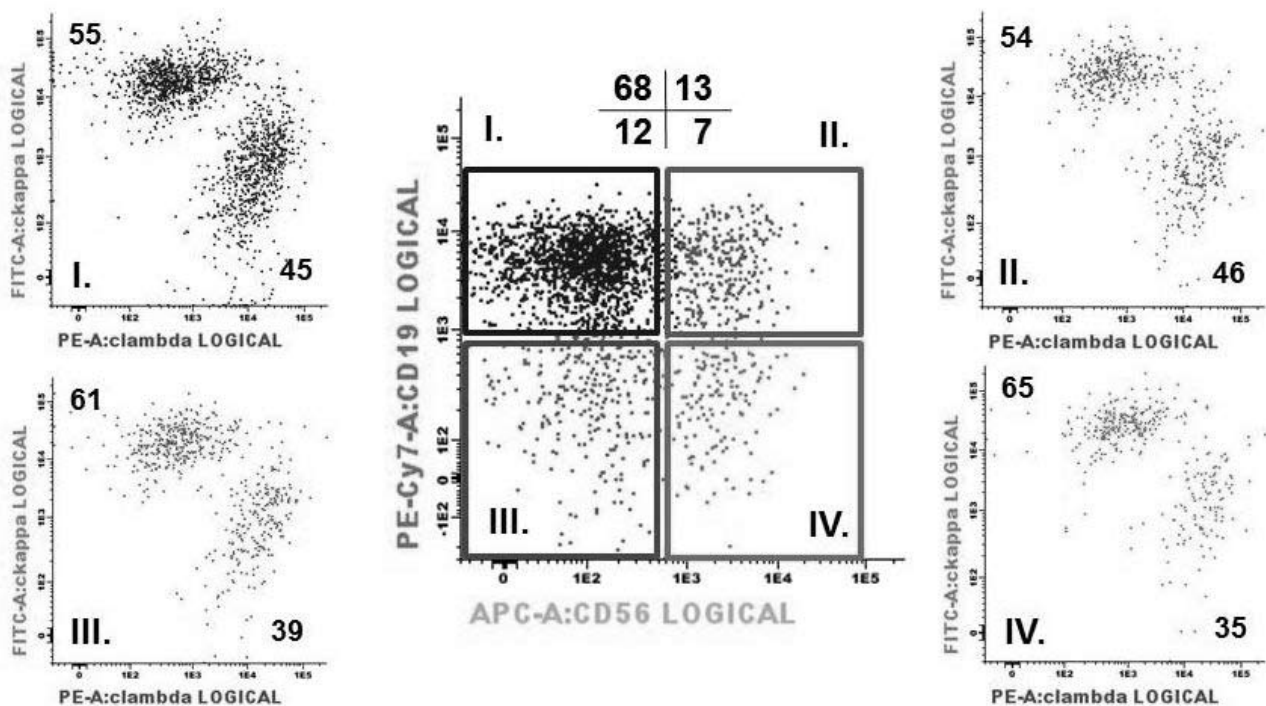
Získané výsledky z oblasti průtokové cytometrie a cytogenetiky byly limitovány nejen nízkým počtem osob s transformací, ale zejména nedostupností některých údajů, neboť níže uvedené použité metodiky či jejich části byly na našem pracovišti ve stádiu zavádění.

Průtoková cytometrie je metoda, která v posledních





**Figure 1.** The risk score model according to the transformation into MM. Total of 304 subjects was scored according to the defined parameters.



**Figure 2.** Flow cytometric analysis of normal and abnormal PCs together with clonality assessment. Different subpopulations according to the expression of CD19 and CD56 are visualised on CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> PCs in the middle of the picture. Clonality assessment is shown for each of them with finding only polyclonal PCs. Relative number of individual cell populations is shown (%).

letech zažívá bouřlivý rozvoj. Možnost jednoznačně identifikovat PC a rozlišit jejich subpopulace pomocí imunofenotypizace je jednoznačným přínosem nejen v diagnostice monoklonálních gamapatií [18]. Stanovení zastoupení normálních a abnormálních PC bylo - dříve i v této analýze - postaveno prakticky pouze expresi znaku CD19 na PC. Se získanými znalostmi a také se zlepšujícím se technickým vybavením se však jeví jako nezbytné prověřit také klonalitu zjištěných subpopulací PC pomocí analýzy cytoplazmatické exprese lehkých

řetězců imunoglobulinů [19]. Použitá flowcytometrická data tedy vycházela ze staršího principu hodnocení a je možné, že s využitím nových postupů hodnocení - analýza pomocí polychromatické flow cytometrie a standardizovaného Euroflow protokolu apod. - se údaj o počtu nejen pouze aberantních, ale rovnou klonálních PC, ještě více zpřesní, což povede k získu potenciálního prognostického parametru s vysokou výpovědní hodnotou (obr. 2). Nicméně již ve stávajícím nastavení má průtoková cytometrie významný podíl na predikci

transformace MGUS do MM, kdy nález  $\geq 95\%$  patologických PC vesměs odpovídá transformaci MGUS do MM, což je v souladu literárními údaji [10, 20]. Lze předpokládat, že v následných analýzách bude možno využít také další markery, např. CD27, CD28, CD117 nebo cytoplazmatickou expresi nestinu [12, 21].

V rámci cytogenetické analýzy nebylo k dispozici mnoho výsledků, což bylo dáno původním nedostatkem buněk pro FISH analýzy. Nízké zastoupení PC u osob s MGUS, a tedy nemožnost jejich separace pomocí magneticky aktivovaného třídění buněk (MACS), bylo klíčovým problémem, který však byl vyřešen zavedením fluorescenční aktivovaného třídění buněk (FACS) [22, 23]. Při využití fluorescenčně separovaných patologických PC pak bylo molekulárně cytogenetické vyšetření I-FISH prováděno na dostatečném počtu patřičně purifikovaných PC. Přínos tohoto postupu se však projevuje až v budoucích analýzách, po získání dostatečného datového souboru. Je samozřejmě možné, že samotná metodika I-FISH nebude u osob s MGUS dostačující, jelikož umožňuje sledovat jen předem známé geny. Proto stoupá význam celogenomových technik, jako je např. komparativní genomová hybridizace na mikročipu (array-CGH), která umožňuje odhalit všechny ztráty a zisky v celém nádorovém genomu [24].

Celkově lze tedy shrnout, že vzhledem k možnosti predikce transformace MGUS do MM byly potvrzeny stávající prognostické parametry, a to zejména celkové % PC stanovené morfologicky a % patologických PC stanovené flowcytometricky. Významnou úlohu hraje též přítomnost imunoparézy. Na základě získaných výsledků byl vytvořen pilotní stratifikační model, jehož optimalizace a následná validace bude předmětem dalšího výzkumu, stejně tak jako analýza dalších případných prognostických parametrů.

## Literatura

1. **International Myeloma Working Group.** Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br. J. Haematol.*, 2003, roč. 121, č. 5, s. 749-757.
2. **Rajkumar, S. V., Kyle, R. A., Therneau, T. M. et al.** Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 2005, roč. 106, č. 3, str. 812-817.
3. **Kyle, R.A., Rajkumar, S.V.** Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: emphasis on risk factors for progression. *Br. J. Haematol.*, 2007, roč. 139, č. 5, str. 730-743.
4. **Sandacká, V., Radocha, J., Maisnar, V., Hájek, R.** MGUS 2010 – výzkumný projekt zaměřený na identifikaci vysoce rizikové prekancerózy. *Klin. Biochem. Metab.*, 2009, roč. 17, č. 2, str. 75-76.
5. **Bladé, J., Cibeira, M.T., Fernández de Larrea, C., Rosiñol, L.** Multiple myeloma. *Ann. Oncol.*, 2010, roč. 21, Suppl 7, str. vii313-vii319
6. **Klincová, M., Sandacká, V., Mikulášová, A., Radocha, J., Maisnar, V., Hájek, R.** Monoclonal gammopathy of undetermined significance: introduction and current clinical issues. *Klin. Onkol.*, 2011, roč. 24, Supplementum 1, str. 14-17.
7. **Landgren, O., Rajkumar, S. V.** Development of early treatment strategies for high-risk myeloma precursor disease in the future. *Semin. Hematol.*, 2011, roč. 48, č. 1, str. 66-72.
8. **Rajkumar S. V., Kyle R. A., Therneau T. M. et al.** Presence of monoclonal free light chains in the serum predicts risk of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br. J. Haematol.*, 2004, roč. 127, č. 3, str. 308-310.
9. **Rosiñol, L., Cibeira, M., T., Montoto, S. et al.** Monoclonal gammopathy of undetermined significance: predictors of malignant transformation and recognition of an evolving type characterized by a progressive increase in M protein size. *Mayo Clin. Proc.*, 2007, roč. 82, č. 4, str. 428-434.
10. **Pérez-Persona, E., Vidriales, M., B., 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, roč. 110, č. 7, str. 2586-2592.
11. **Ocqueteau, M., Orfao, A., Almeida, J. et al.** Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am. J. Pathol.*, 1998, roč. 152, č. 6, str.1655-1665.
12. **Kovářová, L., Varmuzová, T., Zarbochová, P., et al.** Flow cytometry in monoclonal gammopathies. *Klin. Onkol.*, 2011, roč. 24, Supplement 1, s. 24-29.
13. **López-Corral L., Gutiérrez N. C., Vidriales M. B., et al.** The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells. *Clin. Cancer. Res.*, 2011, roč. 17, č. 7, str. 1692-1700.
14. **Rawstron, A., C., Orfao, A., Beksac, M. et al.** Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*, 2008, roč. 93, č. 3, str. 431-438.
15. **Ahmann, G. J., Jalal S. M., Juneau A. L., et al.** A novel three-color, clone-specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1998, roč. 101, č. 1, str. 7-11.
16. **Greslíková H., Zaoralova R., Filkova H., et al.** Negative prognostic significance of two or more cytogenetic abnormalities in multiple myeloma patients treated with autologous stem cell transplantation. *Neoplasma*, 2010, roč. 57, č. 2, str. 111-117.
17. **Bochtler, T., Hegenbart, U., Cremer, F. W., et al.** Evaluation of the cytogenetic aberration pattern in amyloid light chain amyloidosis as compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance reveals common pathways of karyotypic instability. *Blood*, 2008, roč. 111, č. 9, s. 4700-4705.
18. **Kovářová, L., Hájek, R.** Prognostický význam imunofenotypizace u nemocných s monoklonální gamapatií nejasného významu a mnohočetným myelomem. *Klin. Biochem. Metab.*, 2011, roč. 19, č. 2, str. 96-100.
19. **Kovarova, L., Buresova. I., Buchler, T. et al.** Phenotype of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Neoplasma*, 2009, roč. 56, č. 6, str. 526-532.
20. **Pérez-Persona, E., Mateo, G., García-Sanz, R. et al.** Risk of progression in smoldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: comparative analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells. *Br. J. Haematol.*, 2010, roč. 148, č. 1, str. 110-114.

21. **Svachova, H., Pour, L., Sana, J., Kovarova, L., Raja, K. R., Hajek, R.** Stem cell marker nestin is expressed in plasma cells of multiple myeloma patients. *Leuk. Res.*, 2011, roč. 35, č. 8, s. 1008-1013.
22. **Cumova, J., Kovarova, L., Potacova, A. et al.** Optimization of immunomagnetic selection of myeloma cells from bone marrow using magnetic activated cell sorting. *Int. J. Hematol.*, 2010, roč. 92, č. 2, s. 314-319.
23. **Burešová, I., Kyjovská, D., Kovářová, L. et al.** Algoritmus separace plazmatických buněk ze vzorků kostní dřeně. *Klin. Onkol.*, 2011, roč. 24, č. 1, s. 35-40.
24. **Smetana, J., Fröhlich, J., Vranová, V., Mikulášová, A., Kuglík, P., Hájek, R.** Oligonucleotide-based array CGH as a diagnostic tool in multiple myeloma patients. *Klin. Onkol.*, 2011, roč. 24, Supplement 1, s. 43-48.

*Práce byla podpořena následujícími projekty: GAČR 301/09/P457, MSMT LC06027, MSM0021622434, IGA NS10408-3, IGA NS10406-3, IGA NS10207-3, IGA NT12425 a GAČR GAP 304/10/1395.*

Do redakce došlo 1. 3. 2012

*Adresa pro korespondenci  
Mgr. Lucie Říhová, Ph.D.  
Oddělení klinické hematologie  
FN Brno-PMDV  
Jihlavská 20  
625 00 Brno*