

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

**POROVNÁNÍ IMUNOFENOTYPŮ NORMÁLNÍCH A
PATOLOGICKÝCH PLASMATICKÝCH BUNĚK - URČENÍ MÍRY
RIZIKA PROGRESE PACIENTŮ S MGUS**

Diplomová práce

Školitel: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Konzultantka: Mgr. Vladimíra Vroblová, Ph.D.

Hradec Králové 2012

Bc. Jiří Kozelka

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

.....

podpis

Poděkování

Děkuji své konzultantce Mgr. Vladimíře Vroblové, Ph.D. za odborné vedení a připomínky při sepsání této diplomové práce, za cenné rady při zpracování a hodnocení naměřených dat a za odbornou revizi hotové práce. Dále bych chtěl poděkovat PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za připomínky týkající se především formální úpravy diplomové práce.

Obsah

1	Zadání diplomové práce – cíle práce	- 9 -
2	Úvod.....	- 10 -
3	Současný stav řešené problematiky	- 11 -
3.1.	Antigeny.....	- 11 -
3.2.	Imunoglobuliny.....	- 11 -
3.3.	Polyklonální a monoklonální protilátky	- 13 -
3.4.	B-lymfocyty	- 13 -
3.4.1.	Vývoj B-lymfocytu	- 14 -
3.4.2.	Receptory B-lymfocytů.....	- 15 -
3.4.3.	Geny kódující imunoglobuliny	- 15 -
3.4.4.	Protilátková imunitní reakce	- 16 -
3.5.	Plazmatické buňky (PC)	- 17 -
3.5.1.	Imunofenotypizace PC.....	- 19 -
3.6.	Průtokový cytometr.....	- 21 -
3.6.1.	Základní součásti průtokového cytometru	- 22 -
3.6.2.	Výstup z cytometru a gating	- 23 -
3.6.3.	Fluorescenční barviva	- 23 -
3.7.	Monoklonální gamapatie	- 25 -
3.7.1.	Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) a doutnající mnohočetný myelom (SMM).....	- 26 -
3.7.2.	Mnohočetný myelom	- 28 -
3.7.3.	Waldenströmova makroglobulinemie.....	- 33 -
3.7.4.	Primární AL-amyloidóza	- 35 -
4	Materiál a metodika	- 37 -
4.1.	Soubor pacientů a vstupní materiál.....	- 37 -
4.2.	Stanovení exprese povrchových znaků.....	- 39 -
4.3.	Stanovení exprese cytoplazmatických znaků	- 42 -
5	Výsledky	- 44 -
5.1.	Porovnání exprese jednotlivých hodnocených znaků na normálních a patologických PC.....	- 45 -
5.1.1.	Expres znanu CD138 hodnocená metodou MFI.....	- 45 -
5.1.2.	Expres znanu CD38 hodnocená metodou MFI.....	- 46 -

5.1.3.	Expresí znaku CD19 hodnocená metodou MFI.....	- 47 -
5.1.4.	Expresí znaku CD19 hodnocená procentuální metodou	- 48 -
5.1.5.	Expresí znaku CD56 hodnocená metodou MFI.....	- 49 -
5.1.6.	Expresí znaku CD56 hodnocená procentuální metodou	- 50 -
5.1.7.	Expresí znaku CD45 hodnocená metodou MFI.....	- 51 -
5.1.8.	Expresí znaku CD45 hodnocená procentuální metodou	- 52 -
5.1.9.	Expresí znaku CD20 hodnocená metodou MFI.....	- 53 -
5.1.10.	Expresí znaku CD20 hodnocená procentuální metodou	- 54 -
5.1.11.	Expresí znaku CD27 hodnocená metodou MFI.....	- 55 -
5.1.12.	Expresí znaku CD27 hodnocená procentuální metodou	- 56 -
5.2.	Zhodnocení věku pacientů	- 57 -
5.3.	Procentuální zastoupení pacientů podle exprese CD znaků	- 58 -
6	Diskuse.....	- 59 -
7	Závěry	- 65 -
8	Seznam zkratk	- 66 -
9	Literatura.....	- 68 -

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Jiří Kozelka

Školitel: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Konzultantka: Mgr. Vladimíra Vroblová, Ph.D.

Název diplomové práce: **Porovnání imunofenotypů normálních a patologických plazmatických buněk - určení míry rizika progresu pacientů s MGUS**

Čtyřbarevná průtoková cytometrie je dnes nedílnou součástí při imunofenotypizaci plazmatických buněk. Umožňuje s velkou přesností určit jejich počet a na základě hodnocení povrchových a cytoplazmatických znaků, rozlišit normální a patologické buňky. V této práci byla sledována exprese povrchových znaků CD138, CD38, CD19, CD56, CD45, CD20 a CD27. Dále byla sledována exprese cytoplazmatických lehkých řetězců κ a λ k potvrzení monoklonality plazmatických buněk u pacientů s mnohočetným myelomem nebo monoklonální gamapatií nejasného významu, respektive k potvrzení polyklonality u kontrolní skupiny pacientů. Bylo zhodnoceno 47 vzorků pacientů s diagnostikovaným mnohočetným myelomem nebo monoklonální gamapatií nejasného významu a 22 vzorků pacientů se zvýšeným zastoupením plazmatických buněk, ale bez přítomnosti hematologického onemocnění plazmatických buněk, které byly použity k porovnání rozdílu mezi normálními a patologickými buňkami. Bylo zjištěno, že v expresi znaků CD138, CD38, CD19, CD56, CD45 a CD27 je mezi normálními a patologickými buňkami statisticky významný rozdíl. Pouze v expresi znaku CD20 není statisticky významný rozdíl. Míru exprese znaků CD138, CD38, CD19, CD56, CD45 a CD27 lze tedy využít k posouzení normality, popřípadě abnormality plazmatických buněk u pacientů s podezřením na mnohočetný myelom, či monoklonální gamapatii nejasného významu.

Klíčová slova: plazmatické buňky, mnohočetný myelom, monoklonální gamapatie nejasného významu, průtoková cytometrie, imunofenotypizace.

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Jiří Kozelka

Supervisor: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Consultant: Mgr. Vladimíra Vroblová, Ph.D.

Title of diploma thesis: **Comparison of the immunophenotypes of normal and pathological plasma cells - determination of the rate of risk of progression in patients with MGUS**

Four-color flow cytometry is a necessary part of plasma cell immunophenotyping today. It allows to define plasma cell count with a high accuracy and to distinguish normal and pathologic cell on the base of surface and cytoplasmatic markers expression. An expression of the following surface markers, CD138, CD38, CD19, CD56, CD45 CD20 and CD27, was monitored in this dissertation. An expression of the cytoplasmatic light chain κ and λ followed which confirmed monoclonality of the plasma cells in patients with multiple myeloma or with monoclonal gammopathy of undetermined significance. In reference group of patients the expression of light chain κ and λ confirmed polyclonality. 47 samples of patients with diagnosed multiple myeloma or with monoclonal gammopathy of undetermined significance and 22 samples from patients with increased count of plasma cell, but without present hematological disease of plasma cells, these were used for comparison differences between normal and pathological plasma cells, were evaluated. A statistically significant difference between normal and pathological plasma cells was found in expressions of markers CD138, CD38, CD19, CD56, CD45 and CD27. There was not a statistically significant difference in expression CD20 on normal and pathological plasma cells. It is possible to use the rate of expression of markers CD138, CD38, CD19, CD56, CD45 a CD27 to distinguish normality or abnormality of plasma cells in patients with suspected multiple myeloma or monoclonal gammopathy of undetermined significance.

Key words: plasma cells, multiple myeloma, monoclonal gamopathy of undetermined significance, flow cytometry, immunophenotypisation.

1 Zadání diplomové práce – cíle práce

Na základě exprese povrchových znaků CD38 a CD138 stanovit počet plazmatických buněk v periferní krvi (PK) nebo kostní dřeni (KD) u pacientů s podezřením na MGUS/MM a u pacientů bez hematologického podezření.

Prokázat polyklonalitu resp. monoklonalitu plazmatických buněk stanovením intracelulární exprese lehkých řetězců kappa a lambda.

Stanovit expresi znaků CD19, CD56, CD20, CD27 a CD45 na povrchu plazmatických buněk pomocí procentuálního zastoupení a vyjádřením hodnot MFI.

Zhodnotit souvislost povrchové exprese znaků CD19, CD56, CD20, CD27, CD45, CD38 a CD138 na plazmatických buňkách s jejich polyklonalitou resp. monoklonalitou.

Vyjádřit se k možnosti použití jednotlivých sledovaných znaků jako markerů normality resp. abnormality plazmatických buněk.

2 Úvod

Jako monoklonální gamapatie se označují onemocnění, u kterých se v séru vyskytuje zvýšené množství monoklonálních imunoglobulinů, které jsou dále příčinou různých příznaků. Monoklonální imunoglobulin je produkován maligně zvrhlými plazmatickými buňkami. Mezi monoklonální gamapatie se řadí např. mnohočetný myelom, nebo monoklonální gamapatie nejasného významu. Mnohočetný myelom je závažné onemocnění. Tvoří asi 1 % všech nádorových onemocnění. Monoklonální gamapatie nejasného významu není tak závažné onemocnění, u pacientů s tímto stavem však existuje riziko zvrhnutí v mnohočetný myelom.

Při vývoji plazmatické buňky z B-lymfocytu se mění skladba CD znaků. Zjišťování exprimovaných CD znaků se nazývá imunofenotypizace. Na základě imunofenotypu lze jednak identifikovat jednotlivá vývojová stádia krevních buněk, a jednak na základě exprese některých charakteristických znaků rozhodovat o malignitě, respektive normalitě, např. plazmatických buněk. U patologicky změněných plazmatických buněk dochází ke zvýšení, nebo snížení exprese některých znaků, popřípadě mohou exprimovat znaky typické pro jiné linie krevních buněk. Ke sledování exprese těchto znaků se využívá imunofenotypizace plazmatických buněk pomocí vícebarevné průtokové cytometrie.

Cílem práce bylo zhodnotit rozdíly v expresi povrchových znaků CD138, CD38, CD19, CD56, CD45 CD20 a CD27 a rozdíly v expresi cytoplazmatických lehkých řetězců κ a λ mezi plazmatickými buňkami pacientů s monoklonální gamapatií a plazmatickými buňkami pacientů bez hematologického onemocnění plazmatických buněk.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1. Antigeny

Antigeny (Ag) jsou makromolekulární látky přirozeného nebo syntetického původu, které jsou rozpoznávány imunitním systémem. Antigeny, které jsou schopny v těle vyvolat imunitní reakci s tvorbou protilátek, se nazývají imunogeny. Mezi antigeny můžeme zařadit i hapteny, což jsou nízkomolekulární látky, které ovšem samy o sobě nejsou schopny vyvolat imunitní reakci. Toho mohou docílit pouze, jsou-li navázány na vysokomolekulární nosič (např. bílkovinu).

Molekuly s molekulární hmotností větší nebo rovnou 500 kDa jsou dobré imunogeny, snadno reagují s imunitním systémem. Molekuly s velikostí od 5 do 10 kDa jsou málo imunogenní a molekuly menší 5 kDa vyvolají imunitní reakci jen zřídka (Šterzl, 2005). Jako antigeny vystupují nejčastěji bílkoviny a polysacharidy. Mohou jimi být i nukleové kyseliny (NK) a lipidy, ale dostatečně imunogenní jsou jen při vazbě na bílkovinu nebo polysacharid.

Imunogeny obsahují krátké skupiny, tvořené několika aminokyselinami (AMK) nebo monosacharidovými jednotkami (5-8), které se nacházejí blízko sebe. Tyto úseky se nazývají antigenní determinanty neboli epitopy. Epitop je krátký úsek řetězce antigenu, několik AMK, nebo monosacharidů. Každý antigen má několik vlastních specifických epitopů (Lochmanová, 2006).

Podle původu se Ag dělí na autoantigeny a aloantigeny. Autoantigeny mají původ ve vlastním organismu a imunitním systémem jsou za fyziologických okolností tolerovány. Za zvláštních okolností mohou vyvolat imunitní odpověď. V případě, že imunitní systém tvoří protilátky proti vlastním strukturám, hovoříme o autoimunitních onemocněních. Aloantigeny jsou antigeny pocházející z okolního prostředí, nejčastějšími jsou Ag bakteriální.

Ag, na které se v těle váží imunoglobuliny třídy E (IgE) a vyvolávají u vnímavých jedinců alergickou reakci, se nazývají alergeny. Míra imunitní reakce na přítomný Ag závisí na množství a době expozice, způsobu proniknutí do organismu nebo na způsobu podání.

3.2. Imunoglobuliny

Imunoglobuliny (Ig) jsou vysokomolekulární glykoproteiny. Molekula imunoglobulinu je tvořena dvěma lehkými (L) a dvěma těžkými (H) bílkovinnými

3.3. Polyklonální a monoklonální protilátky

Podle toho zda jsou protilátky produkovány pouze jedním či více klony B-lymfocytů, rozpoznáváme monoklonální a polyklonální protilátky. Polyklonální protilátky jsou vlastně směsí protilátek proti více epitopům jednoho antigenu. Jeden antigen může mít několik rozdílných epitopů (vazebných míst pro protilátky), takže aktivuje ke tvorbě protilátek několik klonů B-lymfocytů. Vzniká tak několik druhů protilátek, tedy polyklonální směs. Složení takto vzniklých protilátek je velmi variabilní, směs obsahuje protilátky různých vlastností. Polyklonální protilátky se získávají opakovanou imunizací zvířat (nejčastěji králíci, morčata, krysy). Po vytvoření protilátek se získává sérum zvířete, oddělí se z něj protilátky a pro jejich lepší funkci se ještě čistí. Při imunitní reakci zvířete produkuje každý klon B-lymfocytů pouze jeden druh specifické protilátky. Poněvadž každý jedinec má jiný imunitní systém, vzniká při imunizaci více zvířat stejným antigenem vždy unikátní protilátková směs. Množství této směsi je navíc omezeno množstvím krve zvířete. Nemůžeme tudíž zajistit stále stejné vazebné vlastnosti protilátek. Použití těchto protilátek je komplikované.

Monoklonální protilátky jsou protilátky produkované pouze jedním klonem B-lymfocytů. První krok výroby je stejný jako u polyklonálních protilátek, tedy imunizace zvířete. V druhém kroku se ze sleziny zvířete získají B-lymfocyty, izoluje se klon produkující žádanou specifickou protilátku. Dále probíhá klonování lymfocytu a tvorba protilátek *in vitro*. Nakonec se ještě provádí purifikace protilátek. Namnožený klon B-lymfocytu se může zamrazit a zachovat pro další použití. Takto se získá prakticky neomezený zdroj protilátek daných vlastností. Výroba je však náročná, zdoluhavá a nákladnější než výroba polyklonálních protilátek.

Pro potřeby imunofenotypizace a rozpoznávání znaků diferenciací skupiny (CD znaky Cluster of Differentiation) leukocytů se využívají specifitější monoklonální protilátky.

3.4. B-lymfocyty

B-lymfocyty (B-ly) jsou buňky, které se účastní specifické imunitní odpovědi imunitního systému na antigeny. Na rozdíl od fylogeneticky starší nespecifické imunity, při které jsou na antigenech rozpoznávány jen hrubé struktury, je specifická imunita zaměřena přímo proti konkrétní molekulové struktuře antigenu. Takovéto specifické receptory se v těle nacházejí pouze na lymfocytech.

3.4.1. Vývoj B-lymfocytu

B-lymfocyt má původ v pluripotentní hematopoetické kmenové buňce, která dává základ všem krevním buňkám. Tato buňka proliferuje a diferenciuje se do dvou vývojových linií (myeloidní a lymfoidní). Z lymfoidní mateřské kmenové buňky vznikají B-lymfocyty, T-lymfocyty, NK-buňky, ale i buňky podpůrného systému. NK-buňky jsou součástí nespecifické imunity.

Specifické receptory pro Ag nesou na svém povrchu jen T- a B-lymfocyty, získávají je však až během dalšího vývoje. Ke zrání dochází v primárních lymfatických orgánech. Pro T-lymfocyty je to thymus, B-lymfocyty vyzrávají v kostní dřeni. Během vývoje v kostní dřeni a thymu získávají lymfocyty povrchové antigeny. Na základě genetické informace jsou v lymfocytech syntetizovány povrchové receptory. Lymfocytům jsou předkládány tělní antigeny a lymfocyty se tak „učí“ rozpoznávat tělu vlastní antigeny. Lymfocyty, které nesou povrchové receptory nepřiměřeně reagující s předkládanými antigeny, podléhají apoptóze a jsou odstraněny. Ostatní se mohou dále vyvíjet. Lymfocyty, které jsou propuštěny k dalšímu vývoji, již mají na povrchu specifické receptory pro antigeny a odcházejí do sekundárních lymfatických orgánů (lymfatické uzliny, slezina, lymfatická tkáň sliznic a kostní dřeň). Část imunokompetentních buněk se dispersně usídí po celém těle. Lymfocyty, které se zatím neseťkaly se specifickým antigenem a neměly možnost se transformovat na paměťové nebo výkonné buňky, se nazývají panenské (naivní) lymfocyty.

V sekundární lymfatické tkáni spolu B- a T-lymfocyty kooperují a zaujímají konkrétní postavení. B-lymfocyty se koncentrují v lymfatických folikulech, které jsou obklopeny T-lymfocyty. Folikuly, které obsahují lymfocyty, jež zatím nebyly stimulovány antigenem, se nazývají primární folikuly. Pokud dojde ke stimulaci, začnou proliferovat, vytvoří ve středu folikulu tzv. germinální centrum, takovýto folikul se nazývá sekundárním. Lymfocyty neosidlují sekundární lymfatické orgány trvale. Většina periferních lymfocytů v těle cirkuluje lymfatickým a/nebo krevním systémem. Z krevního řečiště vystupují v oblasti vysokého endotelu postkapilárních venul.

Po setkání s antigenem a aktivaci se B-ly dále vyvíjí buď v paměťové buňky, nebo přes stádium plazmoblastu a proplazmocyty v plazmocyty, který je specializovaný na tvorbu protilátek. Při transformaci v plazmocyty dojde ke zvětšení objemu cytoplazmy buňky a jádro je vytlačeno na okraj. Podstatou posunu jádra je vznik rozměrného endoplazmatického retikula (ER). Vedle paměťových buněk vznikají v zárodečném

centru buňky, které cestují do kostní dřeně, kde mohou přetrvávat dlouhou dobu a secernovat protilátky.

Po prvním setkání s antigenem lze vytvářející se protilátky v séru prokázat kolem sedmého dne, maximum tvorby je kolem desátého dne. Tyto protilátky jsou převážně třídy IgM. Tato primární imunitní odpověď je většinou slabá. Při opakovaném kontaktu s daným antigenem dochází po interakci s paměťovými buňkami k mnohem rychlejší syntéze protilátek.

(Hořejší, a další, 2002), (Šterzl, 2005)

3.4.2. Receptory B-lymfocytů

B-lymfocyty nesou na povrchu několik typů receptorů. Jsou to B-buněčné receptory (BCR), což jsou receptory pro antigen. Receptory pro proteiny komplementu C3b a C3d a tkáňově nespecifický antigen lidských leukocytů DR (HLA DR).

Pro imunitní odpověď má největší význam BCR. Je tvořen molekulou imunoglobulinu, která je zodpovědná za specifické rozpoznávání antigenu. Receptor se skládá z povrchového imunoglobulinu (většinou třídy IgM, IgD), a přidružených signalizačních molekul. Povrchový imunoglobulin je složen ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců. Na C-konci těžkých řetězců transmembránového proteinu je oblast hydrofóbních aminokyselin, kterou je Ig ukotven v membráně. K tomuto Ig jsou přidruženy dva transmembránové bílkovinné řetězce $Ig\alpha$ (CD79 α) a $Ig\beta$ (CD79 β), ke kterým je připojena nekovalentní vazbou tyrosin-kináza. Při stimulaci receptoru začnou kinázy fosforylovat další cytoplazmatické proteiny, čímž se spustí signalizační kaskáda. Pokud buňka dostane další dostatečné signály, vedou tyto reakce ke změnám v transkripci některých genů, buněčnému dělení, diferenciaci B-buňky na plazmocyt a sekreci velkého množství rozpustných protilátek (Hořejší, a další, 2002).

3.4.3. Geny kódující imunoglobuliny

Geny pro bílkovinné řetězce imunoglobulinů jsou členěny do několika druhů úseků. Geny kódující těžké řetězce se nacházejí na 14. chromozomu. Dělí se na sekvenčně podobné „V“ (variabilní) úseky, krátké úseky „D“ (diverzní), krátké sekvence „J“ (joining) a tandemově uspořádané „C“ úseky pro konstantní část řetězce. Na konci úseků V, D a J jsou sekvence, které jsou rozpoznávány enzymy, které jsou zodpovědné za přeskupování genů. Po stranách C segmentu jsou úseky, které jsou rozpoznávány enzymy účastnícími se při izotypovém přesmyku. Struktura genů,

kódujících lehké řetězce, je jednodušší než u genů pro řetězce těžké. Obsahují menší počet úseků a chybí úsek „D“. (Hořejší, a další, 2002)

3.4.4. Protilátková imunitní reakce

B-ly rozpozná svým specifickým receptorem antigen. Při vhodných podmínkách, se buňka pomnoží, vzniknou její dceřiné klony a dále se diferencují v plazmatické buňky, které produkují velké množství protilátek. Podle toho, zda je při aktivaci B-ly přítomen T-ly, rozeznáváme T-ly dependentní a T-ly non-dependentní protilátkově zprostředkovanou imunitní reakci (Šterzl, 2005).

Při non-T-dependentní imunitní reakci mohou antigeny aktivovat B-ly bez spolupráce s T-ly. Tyto antigeny lze rozdělit do dvou skupin. Prvními takovými antigeny, T-independentní Ag 1 (TI-1), jsou především bakteriální lipopolysacharidy (LPS). LPS se nespecificky váží na BCR velkého množství B-ly a stimulují je k dělení bez ohledu na jejich antigenní specifitu. Do druhé skupiny, T-independentní Ag 2 (TI-2), patří molekuly s mnoha opakujícími se základními stavebními jednotkami (např. bakteriální povrchové polysacharidy). Molekula polymeru tedy obsahuje mnoho kopií stejného antigenu. Tyto antigeny reagují najednou s velkým počtem receptorů a tím vzniká dostatečný signál k proliferaci a diferenciaci B-ly v plazmocyty. Tato aktivace ale ve skutečnosti není zcela nezávislá na T-ly. B-ly sice nepotřebují přímý kontakt s Th-ly, ale vyžadují některé jejich cytokiny (IL-2, IL-3, IFN- γ) (Hořejší, a další, 2002).

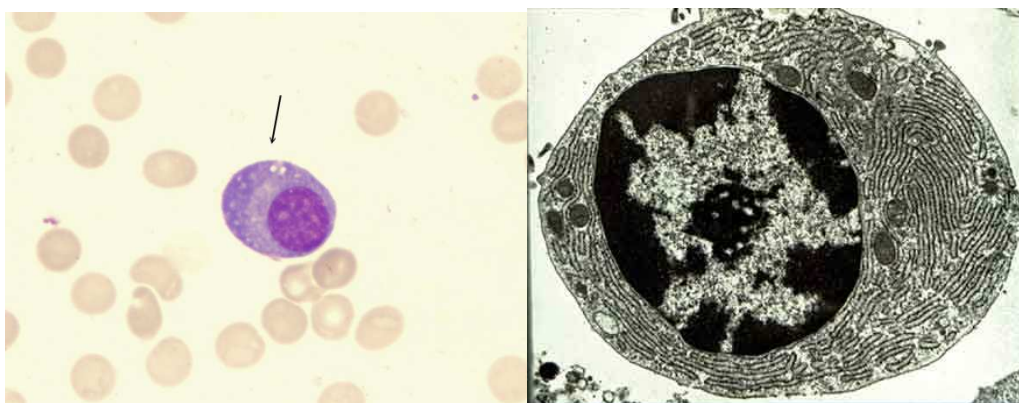
T-dependentní imunitní reakce probíhá typicky ve dvou fázích, primární a sekundární. Po takovéto imunizaci vznikají paměťové buňky. K primární fázi dochází při prvním setkání s antigenem. Antigen je jednak rozpoznán BCR a jednak zpracován antigen prezentujícími buňkami (APC), mezi APC patří dendritické buňky, makrofágy a B-ly. APC nesou na svém povrchu molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), pomocí kterých jsou části antigenu předkládány pomocným T-lymfocytům (Th-ly). Pokud dojde k aktivaci Th-ly určitým předloženým antigenem, vznikají antigenně specifické klony Th2-ly, tyto vyhledávají B-ly stimulované stejným antigenem a poskytují jim signál v podobě cytokinů. Dojde k množení B-ly a jejich diferenciaci v plazmatické buňky. Některé B-ly se nepřemění na plazmatické buňky, nýbrž dávají vznik paměťovým buňkám, které se uplatňují s kratším či delším časovým odstupem, pokud dojde k opětovnému kontaktu se stejným antigenem. Na počátku probíhající infekce (první 3-4 dny) produkují plazmocyty hlavně protilátky třídy IgM. Imunoglobuliny třídy M mají malou afinitu k antigenu (Hořejší, a další, 2002).

Proces rozeznání antigenu, aktivace a přeměny B-ly na plasmocyty probíhá v sekundární lymfatické tkáni. Plasmocyty jsou rozneseny pomocí oběhového systému po celém organismu, především do kostní dřeně. Protilátky se váží s antigenem a vytvářejí imunokomplexy, které jsou v lymfatických uzlinách a jiné sekundární lymfatické tkáni vychytávány na povrchu folikulárních dendritických buněk (FDC), kde slouží k aktivaci dalších B-ly. B-ly, které rozpoznaly imunokomplex na povrchu FDC, jsou stimulovány Th-ly, kterých je v okolí lymfatického folikulu dostatek a vstupují do dalšího cyklu dělení a diferenciaci, sekundární fáze. V aktivovaných B-ly dochází ke spontánním mutacím v genech pro variabilní část bílkovinných řetězců protilátek. Vznikají klony, které nesou pozměněné BCR. Na základě interakcí pozměněných BCR s imunokomplexy na povrchu FDC, jsou rozpoznány B-ly s vysokou afinitou k antigenu, které se mohou dále dělit a B-ly s malou afinitou k Ag, které hynou. Při tomto ději vzniká z primárního lymfatického folikulu vytvořením germinálního centra, které obsahuje dělící se a uhynulé buňky, folikul sekundární. Dále dochází v buňkách k izotypovému přesmyku, což je proces, při kterém dochází k záměně těžkých řetězců ve vznikajících protilátkách. Při sekundární imunitní reakci tak vznikají i další třídy Ig molekul (IgA, IgD, IgE, IgG), které mají v porovnání s IgM vyšší afinitu k Ag. Tyto dvě fáze probíhají bezprostředně po sobě. Nejedná se zde o primární a sekundární odpověď na prvotní a opakovanou stimulaci antigenem (Hořejší, a další, 2002).

3.5. Plazmatické buňky (PC)

Plazmatické buňky slouží v systému imunokompetentních buněk k tvorbě a sekreci protilátek, vznikají diferenciací a jsou posledním vývojovým stupněm krevních buněk B řady. Délka života se pohybuje od několika dní až do několika týdnů, některé přetrvávají dlouhodobě. Při kontaktu B-ly s antigenem se tento aktivuje a přes stádium plazmablastu (má ještě schopnost se dělit) přechází do stádia plasmocyty (bez schopnosti proliferace).

PC jsou velké oválné buňky s excentricky uloženým jádrem. Obsahují velké množství bazofilní cytoplazmy. Mají značný poměr jádro/cytoplazma (2:1 až 1:1), loukoťovitě uspořádaný chromatin, v cytoplazmě je mnoho vrstev drsného endoplazmatického retikula (ER) kombinovaného s dobře vyvinutým Golgiho aparátem. ER a Golgiho aparát slouží k produkci a sekreci imunoglobulinů (Wols, 2005).



Obr. 2_Plazmatická buňka

vlevo: mikrofotografie PC (1000x); vpravo: elektronová mikrofotografie PC, v cytoplazmě je dobře patrné četné drsné ER

(<http://theadventuresofbecky.wordpress.com/2010/03/>)

Při vývoji plazmatických buněk z B-ly, se mění exprese povrchových CD znaků, některé buňka ztrácí, jiné získává. Při vyžívání přichází B-ly o znaky CD45, HLA DR a většinu B specifických markerů (CD20, CD22, CD79, sIg) a nově se vytváří CD38, PCA-1, PC-1, CD28, CD30, CD31, CD40, CD138, CD54. Nezralé plazmatické buňky si obvykle CD45 a CD19 ponechávají (Špička, 2005). Na povrchu plně diferenciovaných PC je exprimován poměrně malý počet antigenů hlavně CD19, CD38 a CD138 a nenesou některé znaky typické pro buňky B řady. Na povrchu již nemají molekuly MHC-II (HLA-II), nemohou tudíž přijímat signály od Th-ly. Povrchové antigeny se vyskytují jen v nepatrném množství. Pro plazmatické buňky jsou typické znaky CD38, CD78, receptor pro IL-6 a chybění znaku CD45. Dobrým markerem pro PC je znak CD27. Naivní B-ly jsou CD27 negativní, paměťové B-ly CD27 pozitivní a PC silně CD27 pozitivní. Na normálních i patologických buňkách je silně exprimován znak CD38. Hlavním markerem B-linie je CD19. U normálních PC je přítomen, u patologických PC většinou chybí. Jeho exprese se sleduje při rozpoznávání normálních a patologických PC. Hodnotí se spolu s CD56, který je typický pro patologické PC. U myelomů je častá různorodost povrchových znaků. Myelomové buňky často exprimují povrchové znaky typické pro jiné linie krevních buněk. To má základ v aberaci DNA u časně hematopoetické buňky. Následky pozměněné DNA se ale projevují až u zralejších stádií B-ly. PC lze za fyziologických podmínek zřídka najít v periferní krvi, v kostní dřeni tvoří 0,2 – 2,8 % bílých krvinek. (Špička, 2005)

3.5.1. Imunofenotypizace PC

Imunofenotypizace slouží k zjištění procentuálního nebo absolutního zastoupení určité subpopulace buněk pomocí detekce jejich charakteristických CD znaků. CD znaky jsou zviditelňovány pomocí specifických protilátek vázaných s fluorochromem. Ten po ozáření UV paprskem emituje záření, které je měřeno. Na základě přítomnosti či absence znaků a jejich kombinace se určí příslušnost k subpopulaci. Přítomnost CD znaků lze velmi snadno detekovat pomocí průtokové cytometrie. Měří se přímá fluorescence, fluorochromů vázaných na specifických protilátkách, které jsou namířeny proti jednotlivým znakům. S výhodou se užívá pro detekci myelomových buněk v periferní krvi (díky možnosti zhodnotit velké množství buněk).

Při hodnocení PC se pro jejich jednoznačnou identifikaci používají znaky CD38 a CD138. Znak CD38 není exprimován pouze na PC, ale specifické pro PC je, že exprimují znak CD38 ve vysoké denzitě. Znak CD138 je již specifickým markerem plazmatických buněk. Pro rozlišení normálních a patologických buněk se musí na buňkách hodnotit další povrchové znaky. Je známa řada markerů, které mají vztah k dalšímu vývoji onemocnění a odrážejí genetické abnormality patologických buněk. Mezi tyto znaky patří např. CD20, CD27, CD28, CD117 (Eckschlager, a další, 1999).

Pomocí stanovení cytoplazmatických lehkých řetězců κ a λ se hodnotí klonalita PC. Klonální plazmocyty exprimují jen jeden typ lehkých řetězců. Klonalita se posuzuje pomocí poměru κ/λ , kdy hodnoty 0,3 - 3 jsou u normálních buněk. Jedním z hlavních prognostických faktorů je labeling index. Je to procentuální zastoupení buněk v S-fázi buněčného cyklu. Vysoké hodnoty svědčí pro špatnou prognózu. K měření se užívá imunofluorescenční technika, kdy se fluorescenční barvivo (např. propidium jodid, bromodeoxyuridin) stechiometricky inkorporuje do DNA. Odečet se provádí buď pod fluorescenčním mikroskopem nebo pomocí průtokového cytometru (Špička, 2005).

Tab. 1_CD znaky vývojových stádií B-ly

	Kostní dřev				Periferie				
	Fáze nazávislá na Ag				Fáze závislá na Ag				
	Pro/pre-B-ly	Velký pre-B-ly	Velký pre-B-ly	Malý pre-B-ly II	Nezralý B-ly	Zralý B-ly	Aktivovaný B-ly	Plazmatická b.	
CD10	+	+	+	+	+	-	-	-	
CD19	+	+	+	+	+	+	+	+	
CD20	-	+	+	+	+	+	+	+	
CD34	+	-	-	-	-	-	-	-	
CD38	+	+	-	-	-	-	+	+	
CD40	-	-	-	+	+	+	+	-	
SL	+	+	-	-	-	-	-	-	
TdT	+	+	+	-	-	-	-	-	
μ_H	-	+	+	+	-	-	-	-	
Rag-1	+	?	?	+	+	-	-	-	

SL - náhradní lehký řetězec λ_5 (součást pre-B receptoru)

TdT – terminální dinukleotid transferáza

Rag – rekombináza

cytoplazmatický těžký řetězec

(Špička, 2005)

3.6. Průtokový cytometr

Mikroskopický odečet morfologických znaků se ukázal pro hodnocení leukemických buněk nedostatečný. Proto proběhly v 60. a 70. letech minulého století první pokusy o imunofenotypizaci, kdy se pomocí specifických antisér namířených proti povrchovým znakům lymfoidních buněk podařilo na základě tvorby rozet s ovčím erytrocyty (ery) odlišit B- a T-lymfocyty. V 70. letech se začaly k rozpoznávání imunofenotypových znaků standardně používat monoklonální protilátky (Mayer, a další, 2002). Zavedení průtokové cytometrie dále zpřesnilo a zrychlilo tuto diagnostickou metodu. První průtokový cytometr (FCM) byl sestaven v r. 1953 bratry Wallacem a Josephem Coulterovými. Tento cytometr počítal částice na základě změny impedance, způsobené průchodem měřených částic měřicí komorou.

Imunofenotypizace se dnes provádí prakticky výhradně metodou průtokové cytometrie. Imunofenotypizace slouží k charakterizaci buňky a umožňuje získání informací o povrchových nebo intracelulárních znacích na úrovni buňky (ale obecně i jiných částic: jader, chromozómů, apod.). V klinické praxi se pro detekci znaků využívají monoklonální protilátky proti povrchovým nebo intracelulárním antigenům, které jsou asociovány s typem buňky (např. s T-lymfocyty, B-lymfocyty, apod.), jejím vývojovým stadiem nebo klonem. Klasifikace těchto antigenů vychází z mezinárodní clusters of differentiation nomenklatury, která aktuálně zahrnuje přes 360 CD znaků.

Průtoková cytometrie nachází v medicíně široké uplatnění a je v současné době považována za standardní metodu analýzy částic. V hematologii pomáhá odhalit a klasifikovat maligní buňky, určit rozsah onemocnění, sledovat průběh léčby, diagnostikovat některé sekundární poruchy po chemoterapii, nebo určit kvalitu štěpu pro transplantaci. Navíc se podílí na diagnostice některých nemaligních hematologických chorob (Mayer, a další, 2002). V rámci klinické praxe je nejčastěji využívána při polychromatické imunofenotypizaci buněk periferní krve a buněk kostní dřeně, ale běžné jsou i další aplikace jako imunofenotypizace buněčných suspenzí izolovaných z jiných tělních tekutin (moč, likvor, výpotky), bronchoalveolárních laváží a také z orgánů a lymfatických tkání (např. při diagnostice lymfomů) či leukocytů infiltrujících solidní nádory.

3.6.1. Základní součásti průtokového cytometru

FCM se skládá ze tří základních komponent. Je to fluidní systém, optický systém a systém na zpracování dat.

Fluidní systém zprostředkovává přenos měřené buněčné suspenze, do měřicí komory. Sestává ze zásobníku vzorku, zásobníku nosné kapaliny a tlakové pumpy, pomocí které jsou kapaliny systémem hnány. Před vstupem do měřicí kyvety musí být buňky hydrodynamicky fokusovány. Aby mohla být měřena každá buňka zvlášť, musí tyto do měřicí komory přicházet postupně jedna za druhou. Toho je docíleno tím, že kolem úzké kapiláry, ze které je vypuzována měřená suspenze, proudí vysokou rychlostí nosná kapalina. Vzhledem k různým rychlostem a speciálnímu tvarování měřicí kyvety nedochází díky laminárnímu toku k vzájemnému promíchání obou kapalin a buňky jsou tak usměrněny do tenkého proudu, který je nasměrován do měřicí komory. Takto usměrněný tok vzorku prochází konstantní rychlostí jednotlivými měřicími světelnými paprsky. Po průchodu měřicí celou jsou buňky unášeny do odpadní nádoby (Pecka, 2010).

Optický systém zahrnuje zdroje světla a sběrné optické dráhy tvořené systémem čoček, kondenzorů, zrcadel a optických filtrů, kterými je světelné záření zdroje po interakci s měřenou buňkou přiváděno na optické detektory (fotodiody, fotonásobič), kterými je energie fotonů převedena na elektrické signály. Zdroj světla musí být schopen vyzařovat světlo o požadované vlnové délce. Jako zdroj světla se používá buď oblouková lampa (skleněná baňka obsahující plyn nebo aerosol o vysokém tlaku), nebo laser (helium-neonový, argonový, kryptonový, helium-kadmiový). Lasery emitují koherentní a monochromatický (o určité vlnové délce) paprsek světla.

Změna světelného signálu po interakci s měřenou buňkou je měřena pomocí série detektorů, před kterými je systém polopropustných zrcadel a filtrů, které propouštějí na daný detektor právě jemu příslušející signály (pro každou vlnovou délku je zvláštní detektor). Takto je změřeno až 100 000 buněk za sekundu. Detektorem přímo naproti zdroje světla je měřen přímý rozptyl světla (FSC), detektory umístěnými kolmo na směr šíření paprsku světla ze zdroje jsou měřeny boční rozptyl (SSC) a fluorescence. FSC odpovídá velikosti buňky, SSC vypovídá o vnitřní struktuře buňky a intenzita fluorescence jednotlivých buněk je v ideálním případě přímo úměrná množství navázané značené monoklonální protilátky.

Fluorescenční značky navázané na buňky jsou excitovány a poté emitují záření o delší vlnové délce. Tyto signály jsou snímány detektory. K excitaci se dnes téměř ve všech

případech využívá monochromatického záření laserů. Prakticky ke každému používanému laseru (nejčastěji 405, 488 a 633 nebo 635 nm) existuje celá skupina fluoroforů s dostatečně silnou absorpcí v dané oblasti spektra a rozdílnou emisní charakteristikou tak, aby byla jejich fluorescence odlišitelná pomocí soustavy optických filtrů uzpůsobených k odrazu a/nebo prostupu fotonů s definovanou vlnovou délkou (Šinkorová, a další, 2008). Fluorescence se hodnotí jak kvalitativně, buňka je pozitivní či negativní na přítomnost hledaného znaku, tak kvantitativně, kdy se sleduje množství exprimovaného znaku. Ze zjištěných rozdílů lze buňky rozčlenit do skupin, které označujeme jako populace, subpopulace, typy, subtypy, diferenciacní a aktivační stadia nebo malformace.

Počítačový software je poslední součástí analyzátoru. Zpracovává naměřené elektrické signály a převádí je do reprodukovatelné podoby (fyzikální hodnoty, histogramy, grafy). (Marinov, 2008), (Ormerod, 2000), (Mayer, a další, 2002)

3.6.2. Výstup z cytometru a gating

Výhodou průtokového cytometru je, že naměřená sada parametrů se vztahuje vždy ke každé jednotlivé buňce, z čehož vyplývají výhody při hodnocení exprese jednotlivých znaků. Data vycházející z FCM mohou být zakresleny do jedno-parametrového grafu jako histogram, nebo do dvoj- či troj-rozměrného grafu, kdy lze v jednom grafu pozorovat více parametrů najednou, např. expresi dvou povrchových znaků. Pomocí tzv. gatingu mohou být postupně vybrány a odděleny regiony s podobnými parametry a na těchto vybraných buňkách dále hodnoceny jiné znaky (Marinov, 2008).

3.6.3. Fluorescenční barviva

Pro průtokovou cytometrii může být použita široká škála fluoroforů. Ty jsou kovalentně navázány na monoklonální Ab, které specificky rozpoznávají určitý znak. Každý fluorofor má charakteristickou vlnovou délku excitačního světla a světla emitovaného. Kombinace použitých fluoroforů je odvislá na parametrech optického systému analyzátoru. Na trhu je k dispozici nepřeberné množství protilátek značených různými fluorofory, což umožňuje multiparametrové měření 2 a více povrchových znaků najednou. Dnes se běžně provádí čtyřbarevné imunofenotypizace leukocytů.

K nejpoužívanějším fluorescenčním značkám patří např. fykoerytrin (PE), fluorescein isothiokyanát (FITC), peridinin-chlorofyl (PerCP), cyanin (Cy-3, Cy-5), alofykocyanin (APC).

Zvláštními značkami jsou tandemové konjugáty. Jedná se o dva fluorochromy v přesném vzájemném poměru navázané na jednu protilátku, kdy jeden fluorochrom je excitován zdrojem a poté emituje záření, kterým je excitován druhý fluorochrom z tohoto páru.

(Marinov, 2008), (http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/fluorescent_dyes.pdf)

3.7. Monoklonální gamapatie

Monoklonální gamapatie (MG) je charakterizována jako stav s přítomností patologické bílkoviny v séru a v moči. Z klinického hlediska lze mezi MG zařadit všechny choroby, u kterých je přítomen monoklonální imunoglobulin (M-Ig). Jsou to např. mnohočetný myelom (MM), Waldenströмова makroglobulinémie (WM), amyloidóza, monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS), apod. Vedle termínu monoklonální imunoglobulin se můžeme v literatuře setkat také s označením paraprotein, M-protein. M-Ig se vyskytuje většinou v gramových množstvích a je produktem jednoho klonu plazmatických buněk.

U pacientů je M-Ig v séru detekován pomocí elektroforézy s vysokým rozlišením, většinou na agarózovém gelu. Oproti běžné elektroforéze (ELFO) se bílkoviny dělí do více frakcí. Detekce M-Ig je poté potvrzena pomocí imunofixace. Dříve se používala ke stanovení imunoelektroforéza. Tato metoda je ale časově náročná a má malou citlivost. Ke kvantitativnímu stanovení se dnes používá denzitometrie elektroforeogramu nebo turbidimetrie či nefelometrie po navázání specifických protilátek proti M-Ig. Stanovení volných lehkých řetězců kappa a lambda v séru se provádí pomocí „Free light chain assay“. Normální hodnoty lehkého řetězce kappa jsou 3,30-19,4 mg/l a řetězce lambda 5,7-26,3 mg/l a jejich vzájemný poměr 0,26-1,65. Stanovení je zatíženo interferencí s jinými sérovými proteiny (např. volný hemoglobin, myoglobin, fibrinogen, transferin a další). Výsledek testu je také ovlivněn způsobem odběru. Např. nadměrné zatažení paže zvyšuje relativní množství bílkovin přestupem plazmy do intersticiálního prostoru, nebo může být množství celkových bílkovin sníženo naředěním infuzními roztoky. Protilátky používané při nefelo- a turbidi-metrii mohou reagovat i s polyklonálními protilátkami stejné třídy a stanovované monoklonální protilátky mohou mít také různou antigenní strukturu. Stanovení M-Ig v moči je zatíženo mnohem větším množstvím nepřesností a záleží na mnoha faktorech. Používá se reakce s chemickými činidly (biuretovo činidlo, Coomasie blue, pyrogalová červěň). Pro vyloučení MG je třeba provést vyšetření moderními zobrazovacími metodami (magnetická rezonance - MR, pozitronová emisní tomografie - PET) (Špička, 2005).

Tvorba M-Ig, i když krátkodobě, se může vyskytovat i u jiných onemocnění. U autoimunitních (revmatoidní artritida, systémový lupus, polymyozitida), neurologických (periferní neuropatie), hematologických (*polycytemia vera*, myelofibróza, chronická myeloidní leukémie, akutní myeloidní leukémie), kožních (*lichen ruber planus*,

diseminované xantomy, *urticaria pigmentosa*, chronické aktivní hepatitidy, jaterní cirhózy, infekce HIV a u pacientů s transplantací ledvin nebo jater (Špička, 2005).

3.7.1. Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) a doutnající mnohočetný myelom (SMM)

Jsou to velmi podobná asymptomatická premaligní onemocnění, která jsou charakteristická maligní transformací a proliferací monoklonálních plazmatických buněk v kostní dřeni, nejsou však ještě přítomny poškození jiných orgánů. Při těchto onemocněních jsou v kostní dřeni a periferní krvi přítomny patologické plasmatické buňky. V séru může být přítomno zvýšené množství monoklonálních protilátek (paraprotein). U těchto onemocnění existuje riziko přechodu do stádia mnohočetného myelomu.

Pro stanovení MGUS a SMM je charakteristická přítomnost paraproteinu bez přítomnosti příznaků typických pro plazmocytom, makroglobulinemii nebo amyloidózu.

Tab. 2_Kritéria pro stanovení MGUS a SMM

Kritéria pro diagnostiku MGUS
<ul style="list-style-type: none"> -sérový paraprotein <30 g/l -paraprotein v moči pod 1 g za 24 h -v kostní dřeni méně jak 10 % plazmatických buněk -není přítomna anémie -kalcium, hemoglobin a kreatinin jsou normální, -nejsou nalezeny lytické kostní léze nebo poškození ledvin -orgány bez známek amyloidózy, bez depozit lehkých řetězců nebo jiného poškození vlivem monoklonálních imunoglobulinů
Kritéria pro diagnostiku SMM
<ul style="list-style-type: none"> -sérový paraprotein \geq 30 g/l -v kostní dřeni přes 10 % plazmatických buněk -bez známek anémie -kalcium normální -bez lytických kostních lézí -bez poškození ledvin

Toto rozdělení je z důvodu signifikantně rozdílného rizika přechodu do MM. U MGUS 1 % ročně, u SMM 10 – 20 % ročně. (Adam, a další, 2008)

Výskyt MG roste s věkem, nad 50 let 1 %, nad 70 let, 3%, nad 80 let 50 %. (Adam, a další, 1999). Příčina vzniku MGUS a SMM není jasná. Téměř u 50 % pacientů s MGUS je přítomna translokace v genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgH) v lokusu 14q32. Častými párovými lokusy translokace jsou 11q13 (cyclin D1 gen), 4p16.3 (FGFR-3 a MMSET), 6p21 (cyclin D3 gen), 16q23 (c-maf) a 20q11 (mafB) (Rajkumar, 2005). Zdá se, že tyto translokace jsou zodpovědné za iniciaci a udržení klonální proliferace plazmatických buněk. Delece 13 chromozomu, která je charakteristická pro MM je přítomna u více než 50 % pacientů s MGUS. Patogeneze u zbývajících případů bez přítomnosti této translokace není jasná. Detekce aberací probíhá pomocí metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace).

Tab. 3_Méně časté varianty MGUS

Varianty MGUS
-Typ IgD – s přítomností Ig třídy D
-typ IgE - s přítomností Ig třídy E
-biklonální typ - přítomny dva různé monoklonální imunoglobuliny, ty mohou být buď produktem dvou klonů PC, nebo jeden klon PC produkuje dva typy imunoglobulinů
-typ s Bence-Jonesovou proteinurií - dochází k vylučování lehkých řetězců močí

MGUS je vždy diagnostikován *per exclusionem*, tj. vyloučením všech ostatních možných B-lymfoproliferativních onemocnění (MM, solitární plazmocytom, a další). Při rozlišení benigního MGUS a MM se stanovuje labeling index, který udává počet cirkulujících monoklonálních plazmatických buněk, a ukazatele kostního metabolismu (osteokalcin). U pacientů s MGUS je nutná pravidelná kontrola, nutná kvůli včasnému zachycení transformace do MM). Sleduje se, zda je koncentrace M-Ig stabilní. Přechod z benigního stádia do maligního onemocnění může být nenápadný pozvolný s pomalým zhoršováním příznaků, ale k přechodu může dojít i skokově s náhlým vzestupem závažnosti, kdy se z ničeho nic objevují obtíže, které bývají podnětem k návštěvě lékaře.

Podle běžně stanovovaných parametrů, jako jsou koncentrace Hb, koncentrace M-Ig, procentuální zastoupení plazmocytů ve dřeni, množství lehkých řetězců v moči, pokles množství fyziologických Ig, koncentrace albuminu, nelze odhadnout prognózu daného pacienta. Při hodnocení rizika se užívá hlavně množství a typ M proteinu a

detekce sérových lehkých řetězců. Pravděpodobnost zvrhnutí je odvislá na typu Ig. Při výskytu monoklonálních IgM je vyšší riziko než u IgA a než u IgG. Pravděpodobnost zhoršení se stupňuje s rostoucím množstvím monoklonálního Ig.

Spolu s MGUS se často vyskytují jiné doprovodné nemoci. Lymfoproliferativní choroby, neurologické choroby, kožní onemocnění, imunosuprese, změněná protilátková aktivita, revmatické nemoci, poškození oka M-Ig. (Adam, a další, 2001)

3.7.2. Mnohočetný myelom

Název mnohočetný myelom (MM) vychází z historického označení této choroby, kdy byly nalezeny v kostech postižených osob četná nádorová ložiska, která ovšem nebyla metastázami jiného nádoru. Termín je vytvořen podle názvosloví pro nádory, kdy se k názvu tkáně, ze které nádor vychází, přidá koncovka -om, tedy myelom. A pro popsání četných kostních ložisek se před toto slovo přidá ještě adjektivum mnohočetný (*multiple*). V konečné podobě tedy *multiple myeloma*.

MM je relativně časté zhoubné onemocnění, při kterém dochází k maligní transformaci B-lymfocytů, jejich klonální proliferaci, hromadění a následné tvorbě monoklonálního imunoglobulinu (molekuly patologického imunoglobulinu mají stejné fyzikální, chemické a imunologické vlastnosti), který je příčinou dalších příznaků a poškození organismu. Nemoc se nejčastěji projevuje osteolýzou, poškozením ledvin a útlumem krvetvorby. Postihuje převážně starší osoby, hlavně muže. Maligní mutace B-ly nastává ve folikulu lymfatické tkáně. Normální plazmatické buňky produkující imunoglobulin přežívají asi dva dny, poté podléhají apoptóze. Maligní plazmatické buňky si zachovávají schopnost proliferace a nehynou tak záhy jako normální buňky. Vyžívání maligních buněk probíhá v kostní dřeni, kde jsou pro toto příznivé podmínky.

Nejčastějším příznakem u MM je bolest kostí, hlavně v oblasti páteře a žeber. Bolest je vázána na tělesnou aktivitu, může docházet ke spontánním frakturám. Dále je přítomna malátnost, hubnutí, anémie. Při hyperviskózním syndromu se objevuje bolest hlavy, poruchy vidění. Dalšími příznaky mohou být deprese, letargie, slabost, zácpa z důsledku hyperkalcémie, snížení B- posléze T-buněčné imunity. Někteří nemocní jsou ovšem z počátku zcela bez obtíží.

Tab. 4_Příznaky MM a jejich příčiny

Příznaky způsobené cytokiny myelomových buněk (TNF α , interleukin 6, interleukin 1- β , OAF – osteoclasts activating factor)
<ul style="list-style-type: none"> -bolesti kostí – na základě osteolýzy, aktivitu osteoklastů zvyšují hlavně macrophage inflammatory protein-1-α (MIG-1-α) a snížená hladina osteoprotegerinu -metabolické poruchy – častá je hypercalcémie a hyperurikémie -infekce z důvodu imunoprese – porucha B-buněčné později i T-buněčné imunity, s postupem rozvoje nemoci ubývá množství fyziologických Ig -anémie, trombocytopenie a leukopenie – způsobené nejen útlakem krvetvorné tkáně, ale i řadou cytokinů -teplota, hubnutí, noční pocení
Příznaky způsobené monoklonálními Ig
<ul style="list-style-type: none"> -bolest končetin - z důvodu poškození senzitivních vláken -myelomová nefropatie – poškození ledviny monoklonálními lehkými řetězci, atrofie až degenerace ledvinových tubulů. Lehké řetězce jsou filtrovány do primární moči, jejich zpětná resorpce tubuly tyto poškozuje, je-li přítomno velké množství lehkých řetězců, mohou precipitovat s Tammovým-Horsfalovým proteinem a dávat tak vznik odlitkovým válcům -poruchy hemostázy – lehké řetězce adherují na povrch destiček a zamezují tak jejich normální funkci, monoklonální Ig mohou také inhibovat koagulační kaskádu -hyperviskozita – způsobená M-Ig, může vést k poruše koagulačních mechanismů
Příznaky způsobené útlakem normální krvetvorby
<ul style="list-style-type: none"> -anémie, poruchy srážlivosti krve, oslabená imunita, a další příznaky vycházející z chybění fyziologických krevních buněk
Příznaky z nejasné příčiny
<ul style="list-style-type: none"> -zvýšená kapilární propustnost -kardiální příznaky (ICHS, srdeční selhání) -pleurální výpotek

MM tvoří 1 % všech nádorových onemocnění, přes 10 % hematologických malignit. V poslední době je sledován trojnásobný nárůst incidence. MM je častější u mužů, více je postižena černošská populace, 9,6 na 100 000 (oproti 2-4 na 100 000 u bělochů). Incidence roste s věkem, nad 60 let prudce stoupá. Mortalita je 5 (3 u žen) na 100 000. Pětileté přežití činí 20-30 %. Medián věku při stanovení je 66 let (Adam, a další, 1999).

Nejvýznamnějšími diagnostickými nálezy pro MM jsou bolest kostí, osteolytická ložiska na rentgenových (RTG) snímcích, výrazně zvýšený počet plazmatických buněk a přítomnost monoklonálního imunoglobulinu. Typická je bolest páteře nebo jiných kostí trvající déle než 4 týdny, která se s postupujícím časem zhoršuje a může vést k fraktuře. Dalšími příznaky mohou být proteinurie, renální selhání, časté infekce, vysoká sedimentace (>100 mm/h), anémie a pancytopenie.

V kostní dřeni se nachází atypické plazmocyty (více jak 10 %) často vícejaderné s jemnou strukturou chromatinu a zřetelnými nukleoly. Dříve se provádělo vyšetření z aspirace kostní dřene. Při odběru kostní dřene aspirací často dochází k naředění vzorku periferní krví. Přesnější je stanovení z trepanobiopsie pomocí imunohistochemického barvení. K diagnóze je dále třeba kvalitativní a kvantitativní stanovení paraproteinu v séru a v moči, pomocí imunoelektroforézy, imunofixace a denzitometrie elektroforetického výsledku jak v séru, tak v moči. Množství v krvi se udává v g/l, v moči se udává v g/24 h (výsledek se násobí celodenní diurézou). Bence-Jonesova bílkovina v moči se stanovuje pomocí činidla. Z dalších sérových parametrů se stanovuje kalcium, kyselina močová a β_2 mikroglobulin. Pro MM svědčí anémie, zvýšená koncentrace kreatininu, hyperkalcémie.

U mnohočetného myelomu lze plazmocyty identifikovat metodou průtokové cytometrie na základě fenotypu CD38^{hi} CD45⁻ CD54⁺ CD56⁺ CD138⁺ cIg^{hi} a restrikcí lehkých, eventuálně i těžkých řetězců. U většiny nemocných lze buňky tohoto fenotypu identifikovat v periferní krvi, zpravidla reprezentující pouze malý zlomek leukocytů. Pokud cirkulující plazmocyty tvoří větší populaci, lze hovořit o plazmocytární leukemii. (Mayer, a další, 2002)

Pro určení stádia nemoci se užívají Durieho a Salmonova kritéria

Tab. 5_ Durieho a Salmonova kritéria

Velká kritéria	Malá kritéria
1)plazmocytom (histologie tkáně)	a)v kostní dřeni 10 – 30 % plazmocytů
2)počet plazmocytů v kostní dřeni >30 %	b)koncentrace M-Ig nižší než v bodě 3
3)sérové koncentrace M-Ig: M-IgG >35 g/l M-IgA >20 g/l nebo množství lehkých řetězců v moči za 24 hodin > 1 g	c)přítomna osteolytická ložiska d)snížení ostatních fyziologických Ig IgM < 0,5 g/l IgA < 1,0 g/l IgG < 6,0 g/l

Pro diagnózu MM je třeba jedno malé a jedno velké kritérium, anebo je-li a+b a dále c nebo d (Adam, a další, 2001)

Stádia onemocnění MM podle Durieho a Salmona, dělení je důležité pro volbu léčebné strategie.

Tab. 6_ Stádia onemocnění MM podle Durieho a Salmona (Klener, 2003)

Typ	Charakteristika
Stádium I	nemocní s hemoglobinem nad 100 g/l, plazmatické kalcium a RTG nález na skeletu jsou normální, prokáže se relativně nízká koncentrace paraproteinu (IgG méně než 50 g/l, IgA méně než 30 g/l, M protein v moči méně než 4 g/24 h)
Stádium II	stanoví se u nemocných s laboratorními nálezy horšími, než jsou stanoveny pro stádium I a lepšími než jsou stanoveny pro stádium III
Stádium III	je charakterizováno sníženou hodnotou hemoglobinu (pod 85 g/l), zvýšenou koncentrací kalcia v séru (více než 2,75 mmol/l), RTG skeletu prokáže kostní postižení. Hodnoty paraproteinu jsou vysoké (IgG více než 70 g/l, IgA více než 50 g/l, M protein v moči více než 12 g/24 h)
Subklasifikace	A: normální funkce ledvin (Krea do 2 mg/ml; do 176 μmol/l) B: snížená funkce ledvin (Krea > 2 mg/ml; > 176 μmol/l)

Vedle klasické MM jsou diagnostikovány i onemocnění velmi podobná MM, ale příznaky a laboratorní nález nenasvědčují této diagnóze. Bývají často objeveny až v pokročilejším stádiu. Mezi tyto méně časté formy myelomu patří např. **solitární kostní plazmocytom**, který je charakterizován izolovaným ložiskem v kostní dřeni a je u něj velká pravděpodobnost přechodu v MM.

U **multifokálního myelomu bez difúzní infiltrace dřene** jsou v kostní dřeni přítomna vícečetná osteolytická ložiska, kost ovšem není postižena difúzní osteoporózou. Punkci kostní dřene pro vyšetření je třeba provádět cíleně přímo z nádorového ložiska. **Difúzní infiltrace kostní dřene** se naproti tomu projevuje difúzní osteoporózou, osteolytická centra zpravidla nejsou přítomny.

Plazmoblastický sarkom tvoří velká, ale málo početná osteolytická ložiska, která prorůstají do okolních měkkých tkání.

MM bez osteolytických projevů nemá na RTG snímcích patrná osteolytická ložiska ani osteoporózu. U pacientů převládají ostatní příznaky MM (imunosuprese, anémie a poškození ledvin lehkými řetězci).

Při diagnóze je třeba odlišit MM od MGUS, primární amyloidózy a jiných lymfoproliferativních chorob s přítomností monoklonálního imunoglobulinu. Dále existují stavy velmi podobné MM, ale uplatňuje se u nich jiná strategie léčení.

Doutnající myelom je myelom, který zůstává dlouhou dobu stabilní a nevyžaduje léčbu

Indolentní MM je podobný doutnajícímu myelomu, může u něj být mírná anémie nebo osteolytická ložiska.

Solitární plazmocytom se podle toho kde vznikají nádorová ložiska, dělí na plazmocytomy měkkých tkání nebo uzlin a kostní plazmocytomy.

U **extraoseálního plazmocytomu** se ložiska nádorových buněk tvoří primárně v měkkých tkáních, rostou pomalu a nemají tendenci přecházet v MM. Působí lokálně expanzivně a dobře reagují na léčbu ozářením.

Nesekreční MM nevytváří M-Ig. Pokud ano tak jen malé množství.

Osteosklerotický myelom (POEMS syndrom) je kombinací MM, polyneuropatie a endokrinních poruch. Označení POEMS syndrom vychází z charakteristických příznaků (Polyneuropatie, Organomegalie, Endokrinopatie, Monoklonální gamapatie a Skin changes - kožní změny). Vyznačuje se multiorgánovými poruchami (Adam, a další, 2001).

Další stavy podobně MM jsou ještě např. **IgD myelom, IgE myelom IgM myelom a Schnitzlerův syndrom**. Tato onemocnění se však vyskytují velmi vzácně.

U MM se aplikuje jednak léčba pomocí klasické chemoterapie, nebo vysokodávkové chemoterapie s následnou autologní transplantací kostní dřeně, jednak léčba doprovázejících potíží. Chemoterapie dává pacientům medián přežití 3 až 4 roky, u pacientů mladších 60 let je to ještě o něco více. U léčených se vyšetřují prognostické faktory, např. labeling index (charakterizuje proliferační aktivitu myelomových buněk), β -2-makroglobulin, C-reaktivní protein (CRP). Dobrou známkou je také vymizení monoklonálního imunoglobulinu (Adam, a další, 2008).

Při sledování léčebné odpovědi se měří hladina monoklonálního imunoglobulinu v séru a vylučování lehkých řetězců močí, pokles plazmatických buněk v kostní dřeni. Na RTG snímcích se poté hodnotí, zdali nedošlo k progresi osteolytických ložisek. Podle těchto kritérií se rozlišuje, zda došlo ke kompletní, parciální, minimální, nebo žádné léčebné odpovědi.

U pacientů, kteří prošli léčbou a došlo u nich k remisi onemocnění, má význam sledování zbytkové (reziduální) nemoci (důležité pro stanovení prognózy pacienta). V těle často zůstává malé množství maligních buněk, které mohou být příčinou relapsu. Zde nejsou běžné stanovovací metody dostatečně senzitivní, proto se používají citlivější metody jako průtoková cytometrie a polymerázová řetězová reakce (PCR). U průtokové cytometrie se stanovuje imunofenotyp plazmatických buněk, přítomnost či chybění povrchových markerů z řady CD molekul. U detekce maligních plazmatických buněk se standardně užívá stanovení CD38, CD56 a CD45. U detekce zbytkového nádorového onemocnění pomocí metody PCR se využívá amplifikace DNA sekvencí typických pro maligní plazmatické buňky (Adam, a další, 2008).

3.7.3. Waldenströмова makroglobulinemie

Waldenströмова makroglobulinemie (WM) je B-lymfoproliferativní onemocnění, spojené s maligní proliferací plazmatických buněk a přítomnými nádorovými ložisky v kostní dřeni. B-ly u WM neexprimují znak CD5, což je důležitý parametr při diferenciální diagnostice B-lymfoproliferativních stavů.

WM je onemocnění vyššího věku, podobá se částečně plazmocyтому, částečně chronické lymfatické leukémii. Je vzácnější než MM (incidence u žen 0,17 na 100 000 obyvatel a u mužů 0,34 na 100 000 obyvatel) (Špička, 2005). Dochází při ní k mutaci B-

ly, proliferace a diferenciacie se zastaví na úrovni lymfoplazmocytární buňky produkující M-IgM, který je příčinou dalších obtíží. K příznakům patří únava, krvácení z nosu a sliznic, časté infekce, hyperviskozita krve, která může být zodpovědná za zhoršení zraku, později se může projevit ataxie, diplopie, závratě, nystagmus, nebo zmatenost, chronická bolest hlavy, selhávání srdce a dušnost. Mezi další příznaky patří anémie, která se projevuje bledostí, může se objevit hepatomegalie, splenomegalie, zvětšení uzlin, či změny na očním pozadí.

Dále se může WM projevovat koagulačními poruchami, kdy M-IgM může agregovat trombocyty a následně narušit jejich funkci. IgM může také působit jako inhibitor koagulační kaskády. Molekuly IgM mohou infiltrovat ledvinné kapiláry a způsobovat změny, podobné glomerulonefritidě. IgM se mohou ukládat ve stěně trávicí trubice, v ledvinné tkáni kde jsou příčinou amyloidózy, v mozkových tepnách, které tím poškozují a zvyšují jejich permeabilitu a tím porušují hematoencefalickou bariéru. M-Ig mohou mít také charakter kryoglobulinu, který způsobuje Raynaldův sy, artralgie, purpuru a poškozuje ledviny. Asi 10 % makroglobulinu tvoří chladové protilátky (kryoglobulin), který se stává při nízkých teplotách nerozpustný, tzn. při teplotě nižší než 37°C (tělesná teplota) precipituje a může být příčinou různých obtíží.

Laboratorně se u WM prokazuje anémie (z nedostatečné tvorby, zkráceného přežívání ery, z nedostatku železa), extrémně vysoká sedimentace ery, trombocytopenie (pod $50 \cdot 10^9 \cdot l^{-1}$). Dále se stanovuje, M-IgM, Bence-Jonesova bílkovina. V kostní dřeni jsou zmnoženy lymfocyty a lymfoplazmocyty.

Tab. 7_Kritéria stanovení WM (Adam, a další, 1999)

Kritéria pro diagnostiku WM
<ul style="list-style-type: none"> -koncentrace IgM > 10g/l -v kostní dřeni > 30 % maligních plazmatických buněk -Imunofenotypisace – přítomnost pan-B znaků, CD19, CD20, CD22, CD24 a lehkého řetězce kappa nebo lambda. Na monoklonálních ly bývá CD5 nebo CD10, CD11b a CD9.

V léčbě se uplatňuje plazmaferéza, klasická chemoterapie, kortikosteroidy, adenosinová analoga (fludarabin a 2-chlordeoxyadenosin).

3.7.4. Primární AL-amyloidóza

Jako amyloidóza se označuje skupina onemocnění, při kterých se do extracelulárních prostor ukládají nerozpustné fibrilární proteiny. Tyto proteiny mohou být různého původu, ale pro všechny je společné to, že jsou lineární, nerozvětvené a v β -konformaci. Amyloidová masa u AL-amyloidózy je tvořena fragmenty lehkých řetězců imunoglobulinů (AL – amyloid light chain). Ukládání AL-amyloidu často doprovází MM, WM, ale i jiná onemocnění. Vyskytuje-li se AL-amyloidóza a chybí nálezy nasvědčující některé maligní lymfoproliferaci, hovoříme o primární systémové AL-amyloidóze.

Podstatou primární systémové amyloidózy je maligní transformace B-ly, u něhož dochází k diferenciaci v plazmatické buňky, které produkují amyloidogenní lehké řetězce. Tento klon nemusí být maligní, množství lehkých řetězců se u pacienta nezvyšuje, zhoršující se příznaky jsou důsledkem zvětšování depozit amyloidu. Amyloid je tvořen převážně variabilními částmi lehkých řetězců, z čehož vyplývá složitost detekce pomocí specifických diagnostických protilátek.

Potíže pacienta se odvíjejí od toho, ve kterém orgánu se amyloid nejvíce ukládá. Histologické vyšetření s barvením na amyloid, prokáže tento v malém množství ve všech orgánech. Přítomnost amyloidu se prokazuje pomocí barvení Konžskou červení a/nebo imunohistochemickými barveními. V moči postiženého nacházíme lehké řetězce, převážně lambda, někdy je nelze detekovat. V séru jsou dominantní lambda řetězce nebo celé molekuly Ig, většinou IgG.

(Špička, 2005)

Tab. 8_ Příznaky primární AL-amyloidózy podle místa uložení amyloidu

Místo uložení	Příznaky
Ledviny	proteinurie, edémy, hypoalbuminemie, hypercholesterolemie, kreatinin a urea může být v normálu, otoky, pleurální výpotek, ascites, anasarka
Srdce	dysrytmie, snížení minutového objemu srdce, časem vede k selhání (typicky pravostrannému)
Nervové dráhy	neuropatie s demyelinizací nervových vláken, parestézie dolních končetin, syndrom karpálního tunelu, posturální hypotenze, impotence, poruchy střevní motility, svalová slabost
Játra	hepatomegalie, tuhá konzistence jater, zvýšená aktivita ALP, anorexie, úbytek na váze.
Cévní stěny	purpura, tvorba hematomů po neadekvátním podnětu.
GIT	makroglosie (problémy s mluvením, dýcháním), infiltrace distálnějších částí GIT jsou velmi časté, nezpůsobují však závažnější problémy (poruchy pasáže, malabsorpce, krvácení).
Dýchací trakt	většinou bez příznaků, může být příčinou dušnosti.

(Adam, a další, 2001)

4 Materiál a metodika

4.1. Soubor pacientů a vstupní materiál

Vzorky použité pro tuto práci byly v roce 2011 analyzovány v laboratoři Ústavu klinické imunologie a alergologie Fakultní Nemocnice Hradec Králové pomocí průtokové cytometrie. Jako materiál byly použity vzorky periferní krve (PK) a kostní dřeně (KD) osob s podezřením na onemocnění MM/MGUS. Klonalita jejich plazmatických buněk byla potvrzena stanovením exprese intracelulárních lehkých řetězců kappa a lambda. Jako kontrolní vzorky byla použita PK nebo KD pacientů se zvýšenou přítomností plazmatických buněk, ale bez podezření na hematologické onemocnění plazmatických buněk. Polyklonalita jejich PC byla potvrzena stanovením exprese intracelulárních lehkých řetězců kappa lambda.

V 82 vzorcích byl stanoven celkový počet PC, jejich klonalita a exprese jednotlivých znaků. Pacienti, u kterých se nepodařilo jednoznačně prokázat monoklonalitu resp. polyklonalitu PC byli z našeho souboru vyloučeni (13 vzorků). V našem konečném souboru pacientů bylo 34 žen a 35 mužů. Medián věku pacientů s klonálními PC byl 68 let (rozmezí 44-92). Medián věku pacientů s polyklonálními PC byl 64 let (rozmezí 40-79). Vzorky PK a KD byly odebrány do vakuové odběrové soupravy s heparinem (BD Vacutainer, LH 68 I.U.) a zpracovány nejpozději do 24 hodin od náběru.

Výsledky imunofenotypizace PC výše uvedených vzorků jsou shrnuty v Tab. 11.

Vybavení a reagentie pro průtokovou cytometrii

Monoklonální protilátky:

CD38-FITC (Beckman Coulter, USA)

CD138-PE (Beckman Coulter, USA)

CD19-ECD ((Beckman Coulter, USA)

CD56-PC5 (Beckman Coulter, USA)

CD20-ECD (Beckman Coulter, USA)

CD27-PC5 (Beckman Coulter, USA)

CD45-ECD (Beckman Coulter, USA)

CD19-PC5 (Beckman Coulter, USA)

CD38-PC5 (Beckman Coulter, USA)

IgG1-FITC (Beckman Coulter, USA)

IgG1-PE (Beckman Coulter, USA)

IgG1-ECD (Beckman Coulter, USA)

IgG1-PC5 (Beckman Coulter, USA)

Kappa-FITC (eBioscience, USA)

Lambda-PE (eBioscience, USA)

Lyzační roztok: odstranění červených krvinek ze vzorku, které by interferovaly při měření

OptiLyse C (Beckman Coulter, USE)

Permeabilizační a fixační činidlo: zfixování a „proděravění“ cytoplazmatické membrány pro umožnění vniknutí monoklonálních protilátek dovnitř buňky.

IntraPrep Permeabilization reagent (Beckman Coulter, USA)

Průtokový cytometr:

Coulter EPICS XL (Beckman Coulter, USA)

Analyzační software:

Flow Jo (Tree Star, Inc., USA)

PBS (Phosphate Buffered Saline)

4.2. Stanovení exprese povrchových znaků

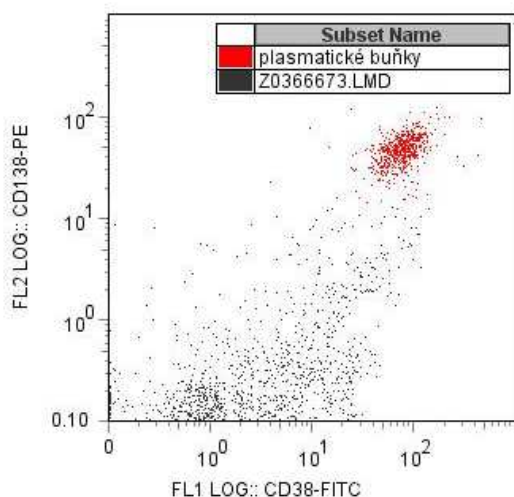
U každého vzorku periferní krve a kostní dřeně bylo ve třech zkumavkách provedeno stanovení exprese povrchových znaků CD38, CD138, CD19, CD56, CD45, CD20, CD27, a v jedné zkumavce byly změřeny jejich izotypové (negativní) kontroly.

Tab. 9_Kombinace protilátek v jednotlivých zkumavkách

Kombinace protilátek proti povrchovým znakům
1. zkumavka: CD38 (FITC), CD138 (PE), CD19 (ECD), CD56 (PC5)
2. zkumavka: CD38 (FITC), CD138 (PE), CD19 (ECD), CD45 (PC5)
3. zkumavka: CD38 (FITC), CD138 (PE), CD20 (ECD), CD27 (PC5)
4. zkumavka: IgG1 (FITC), IgG1 (PE), IgG1 (ECD), IgG1 (PC5)

V každé zkumavce bylo inkubováno (15 minut, 18-25°C) 5 µl příslušných monoklonálních protilátek (viz Tab. 9) s 25 µl periferní krve nebo kostní dřeně (1×10^6 buněk/ml). Červené krvinky byly zlyzovány během inkubace s lyzačním roztokem (10 minut, 18-25°C). Následně byly vzorky promyty (přidání 2 ml PBS, centrifugace 1100 ot./min., slití a přidání 0,5ml PBS). Vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru nejpozději do 30 minut po přípravě.

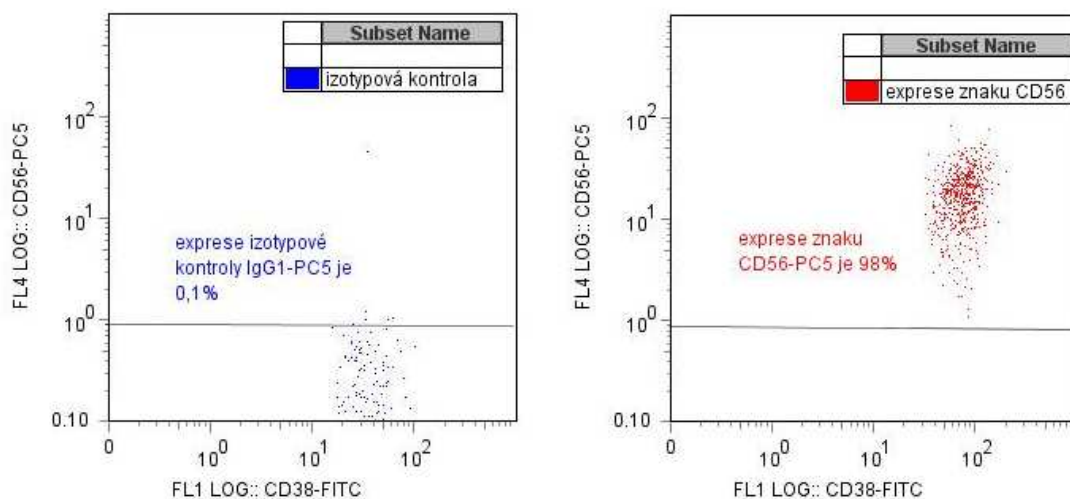
Počet plazmatických buněk byl stanoven pomocí pozitivitu znaků CD138 a CD38^{high}.



Obr. 3_Rozpoznání PC mezi zbylými leukocyty

Stanovení počtu PC na základě znaků CD138 a CD38^{high}. Na obrázku je znázorněn vzorek KD s 9% PC (PC jsou označeny červeně).

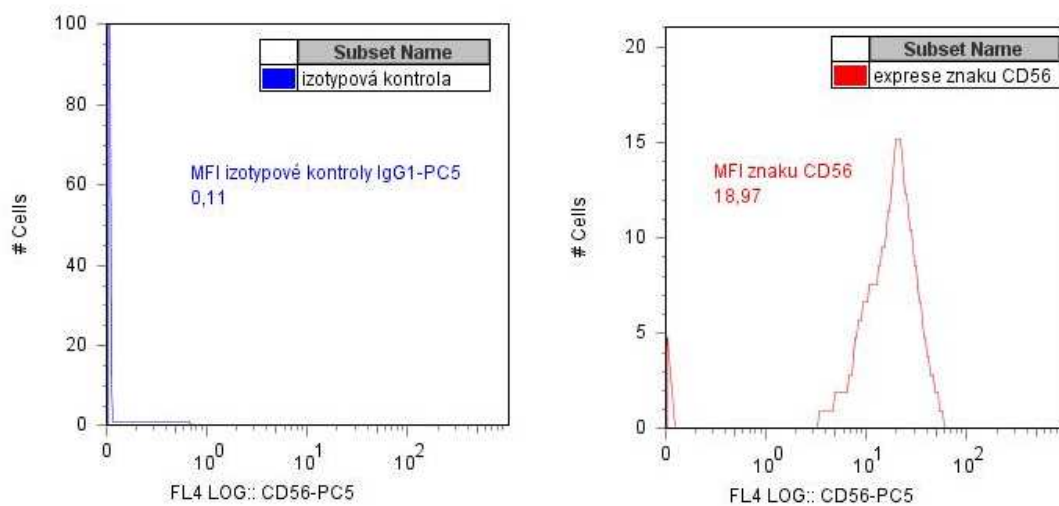
Hodnota exprese znaků CD19, CD56, CD20, CD27, CD45 byla analyzována z oblasti CD38/CD138 dvojitě pozitivních buněk, do které bylo nasbíráno alespoň 200 buněk. Při hodnocení pomocí procentuálního vyjádření byla podle izotypové kontroly nastavena hranice positivity tak, aby nebylo více než 1 % PC pozitivních. Na Obr. 4 je zobrazen příklad stanovení hranice positivity pro znak CD56-PC.



Obr. 4_ Stanovení hranice positivity pro znak CD56

V levé části obrázku je zobrazena exprese izotypové kontroly IgG1-PC5 na PC (modré tečky). Podle izotypové kontroly se nastavuje hranice positivity tak, aby nebylo více jak 1 % PC pozitivních. V pravé části obrázku je zobrazena exprese znaku CD56 na PC (červené tečky).

Při hodnocení pomocí střední hodnoty intenzity fluorescence (MFI, mean fluorescence intensity) byla konečná hodnota MFI jednotlivých znaků určena jako podíl naměřené MFI vzorku a MFI izotypové kontroly. Na Obr. 5 je zobrazen příklad hodnocení MFI pro znak CD56.



Obr. 5_Hodnocení MFI pro znak CD56

V levé části obrázku je zobrazeno MFI izotypové kontroly IgG1-PC5 na PC (modře). V pravé části obrázku je zobrazeno MFI znaku CD56 na PC (červeně). Výsledná hodnota MFI CD56 se získá poměrem MFI CD56 a MFI IgG1 ($18,97/0,11=172,5$)

4.3. Stanovení exprese cytoplazmatických znaků

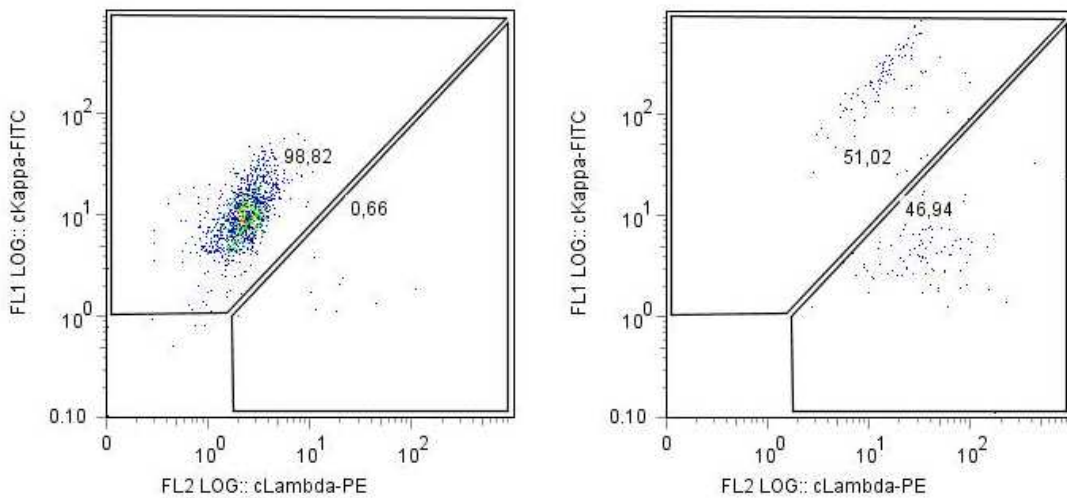
V každém vzorku periferní krve a kostní dřeně byla prokázána klonalita resp. polyklonalita plazmatických buněk pomocí stanovení exprese intracelulárních lehkých řetězců kappa a lambda. Každý vzorek PK nebo KD byl před intracelulárním značením 2x promyt 5 ml PBS (centrifugace 1100 ot./min.)

Tab. 10_ Kombinace protilátek ve zkumavce

Kombinace protilátek proti cytoplazmatickým znakům
kappa (FITC), lambda (PE), CD38 (PC5)

V každé zkumavce bylo inkubováno (15 minut, 18-25°C) 5 µl povrchové monoklonální protilátky CD38 s 25 µl periferní krve nebo kostní dřeně (1×10^6 buněk/ml). Následně byly buňky fixovány 15 minutovou inkubací (18-25°C) s činidlem 1 (reagent 1, IntraPrep). Po promytí (přidání 2 ml PBS, centrifugace 1100 ot./min.) byly buňky permeabilizovány inkubací (5 minut, 18-25°C) s činidlem 2 (reagent 2, IntraPrep). Následně byly označeny intracelulární lehké řetězce pomocí 2 µl monoklonálních protilátek kappa (FITC) a lambda (PE). Po proběhlé inkubaci (15 minut, 18-25°C, tma) a promytí buněk byly vzorky nejpozději do 30 minut analyzovány na průtokovém cytometru.

Plazmatické buňky byly určeny na základě CD38^{high} positivity. Plazmatické buňky jsou považovány za polyklonální pokud poměr kappa pozitivních buněk/lambda pozitivních buněk je v rozmezí 0,3-3 (viz Obr. 6).



Obr. 6_Stanovení klonality PC

Na levé straně obrázku jsou znázorněny klonální PC, které exprimují jen intracelulární lehký řetězec kappa. Na pravé straně obrázku jsou znázorněny polyklonální PC, které exprimují intracelulární řetězec kappa i lambda.

Statistické hodnocení výsledků bylo provedeno pomocí programu MedCalc od firmy MedCalc Software. Nejdříve bylo pomocí Kolmogorovova-Smirnovova testu zjištěno, zda jsou hodnoty u daného parametru normálně Gaussovsky rozloženy. Naměřená data, která byla normálně Gaussovsky rozložena, byla statisticky zpracována pomocí t-testu pro dva nezávislé výběry, data bez normálního rozložení byla hodnocena pomocí dvouvýběrového Wilcoxonova testu. U obou s 5% hladinou významnosti.

5 Výsledky

Celkově byl stanoven počet PC, jejich klonalita a exprese jednotlivých znaků v 82 vzorcích. Klonalita plazmatických buněk byla prokázána v 47 vzorcích PK/KD (dále jen P-PC, patologické PC). Ve 22 vzorcích PK/KD byla prokázána přítomnost polyklonálních plazmatických buněk (dále jen N-PC, normální PC). U 13 pacientů se nepodařilo jednoznačně prokázat monoklonalitu resp. polyklonalitu PC a proto byly jejich vzorky z našeho souboru vyloučeny. Medián počtu plazmatických buněk ve skupině vzorku s N-PC byl 0,53 (0,07-4,41) a medián počtu PC ve skupině vzorků s P-PC byl 5,15 (0,02-69,96).

Tab. 11_Charakteristika pacientů

	Pohl.	Normální PC		Patologické PC		Hodnota P
Medián věku	M	64	63,5	68	73	0,2405
	Ž		72		67,5	
Počet vzorků	M	22	14	47	21	
	Ž		8		26	

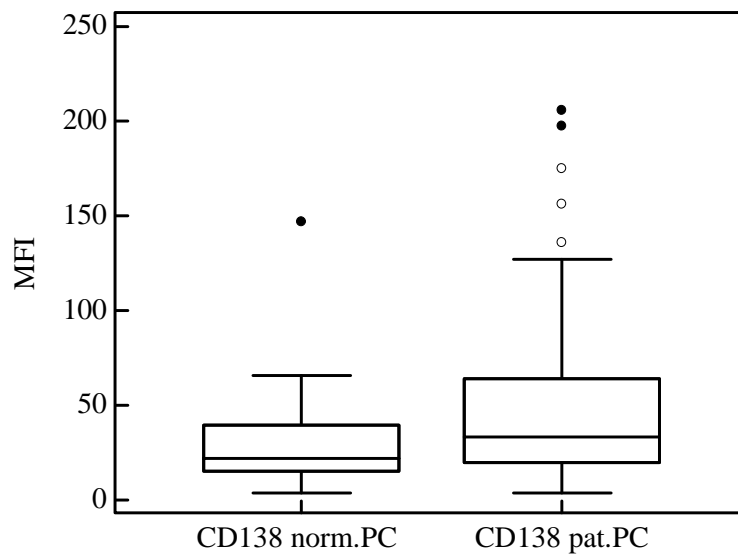
Tab. 12_Souhrnná tabulka výsledků imunofenotypizace

		Normální PC		Patologické PC		
	Metoda hodnocení	Počet vzorků	Medián	Pocet vzorků	Medián	P
CD138	MFI	22	21,95	47	33,54	0,0432
CD38	MFI	22	212,96	47	114,00	<0,0001
CD19	MFI	21	144,92	45	5,50	<0,0001
	procenta	21	78,32	45	3,76	0,0001
CD56	MFI	21	4,92	46	134,72	<0,0001
	procenta	21	5,42	46	90,73	0,0001
CD45	MFI	21	61,92	45	14,17	0,0001
	procenta	21	88,24	45	20,67	<0,0001
CD20	MFI	20	1,59	46	1,71	0,5028
	procenta	20	1,89	46	1,79	0,5768
CD27	MFI	20	99,24	46	13,99	<0,0001
	procenta	20	74,77	46	18,02	<0,0001

5.1. Porovnání exprese jednotlivých hodnocených znaků na normálních a patologických PC

5.1.1. Exprese znaku CD138 hodnocená metodou MFI

Znak CD138 je exprimován na všech PC, jak ve skupině pacientů s N-PC, tak ve skupině pacientů s P-PC. V expresi na N-PC a P-PC je však statisticky významný rozdíl ($P = 0,0432$). Míra exprese CD138 hodnocená metodou MFI je na P-PC (medián = 33,54, $n = 47$) větší než na N-PC (medián = 21,95, $n = 22$).

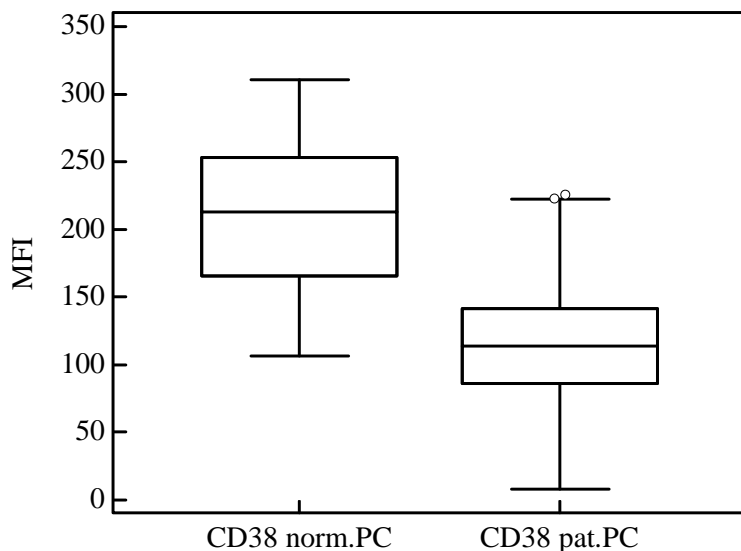


Obr. 7_Porovnání MFI znaku CD138 u normálních a patologických PC

Porovnání bylo provedeno pomocí dvouvýběrového Wilcoxonova testu. Na 5% hladině významnosti vychází hodnota $P = 0,0432$. V expresi znaku CD138 u normálních a patologických PC je statisticky významný rozdíl.

5.1.2. Exprese znaku CD38 hodnocená metodou MFI

Znak CD38 je exprimován na všech PC, jak ve skupině pacientů s N-PC, tak ve skupině pacientů s P-PC. V expresi na N-PC a P-PC je statisticky významný rozdíl ($P < 0,0001$). Míra exprese CD38 hodnocená metodou MFI je na N-PC (medián = 212,96, $n = 22$) větší než na P-PC (medián = 114,00, $n = 47$). Oproti znaku CD138 je míra exprese výrazně větší.

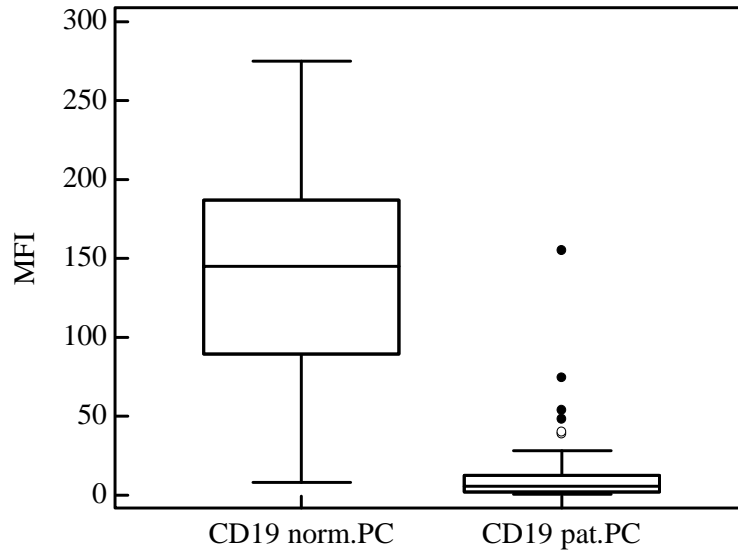


Obr. 8_Porovnání MFI znaku CD38 u normálních a patologických PC

Porovnání bylo provedeno pomocí t-testu pro nepárová data. Na 5% hladině významnosti vychází hodnota $P < 0,0001$. V expresi znaku CD38 u normálních a patologických PC je statisticky významný rozdíl.

5.1.3. Expresí znaku CD19 hodnocená metodou MFI

Míra exprese znaku CD19 hodnocená pomocí MFI je znatelně vyšší ve skupině pacientů s N-PC. V expresi CD19 na N-PC (medián = 144,92, n = 21) a P-PC (medián = 5,50, n = 45) je statisticky významný rozdíl ($P < 0,0001$).

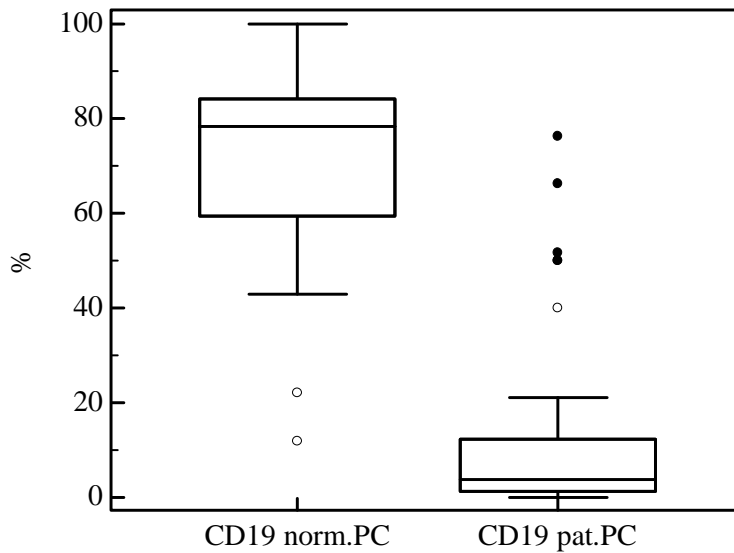


Obr. 9_Porovnání MFI znaku CD19 u normálních a patologických PC

Porovnání bylo provedeno pomocí dvouvýběrového Wilcoxonova testu. Na 5% hladině významnosti vychází hodnota $P < 0,0001$. V expresi znaku CD19 u normálních a patologických PC je statisticky významný rozdíl.

5.1.4. Exprese znaku CD19 hodnocená procentuální metodou

Velká část N-PC (medián = 78,32 %, n = 21) je CD19 pozitivních. Mezi P-PC vykazuje pozitivitu jen malé procento buněk (medián = 3,76 %, n = 45). V expresi znaku CD19 hodnocené procentuální metodou je mezi N-PC a P-PC statisticky významný rozdíl (P = 0,001).

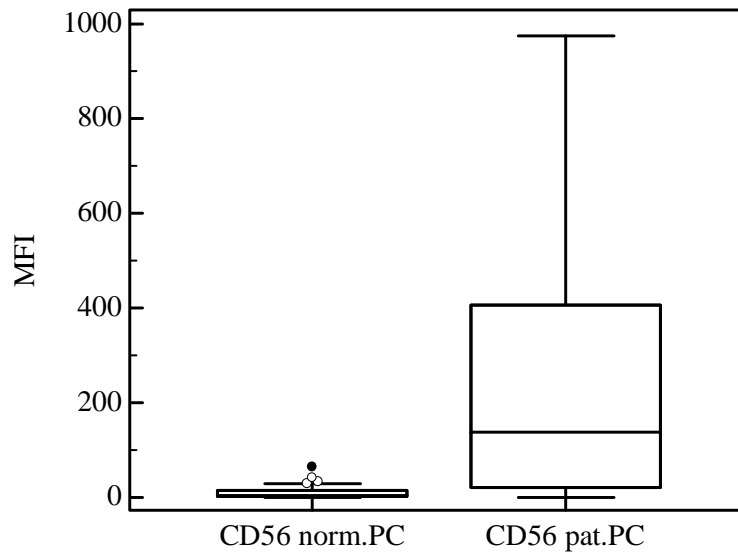


Obr. 10_Porovnání procentuálního zastoupení normálních a patologických PC s expresí CD19

Porovnání bylo provedeno pomocí dvouvýběrového Wilcoxonova testu. Na 5% hladině významnosti vychází hodnota $P = 0,0001$. V expresi znaku CD19 u normálních a patologických PC je statisticky významný rozdíl.

5.1.5. Expresí znaku CD56 hodnocená metodou MFI

N-PC vykazují velmi slabou míru exprese Znaku CD56 (medián = 4,92, n = 21). Na P-PC je znak CD56 exprimován s větší intenzitou (medián = 134,72, n = 46). V míře exprese znaku CD56 na PC u skupiny pacientů s N-PC a u pacientů s P-PC je při hodnocení metodou MFI statisticky významný rozdíl ($P < 0,0001$).

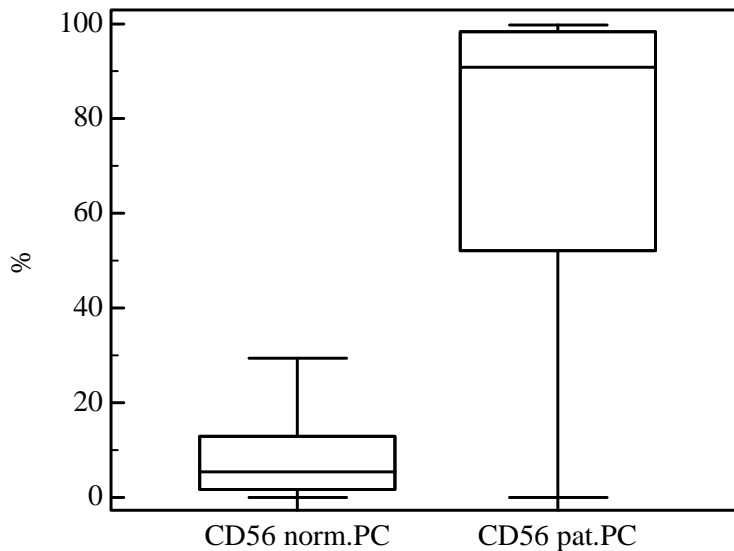


Obr. 11_Porovnání MFI znaku CD56 u normálních a patologických PC

Porovnání bylo provedeno pomocí t-testu pro nepárová data. Na 5% hladině významnosti vychází hodnota $P < 0,0001$. V expresi znaku CD56 u normálních a patologických PC je statisticky významný rozdíl.

5.1.6. Expresí znaku CD56 hodnocená procentuální metodou

Jen malé procento N-PC má exprimován znak CD56 (medián = 5,42 %, n = 21). Většina P-PC je CD56 pozitivní (medián = 90,73 %, n = 46). V expresi znaku CD56 hodnocené procentuální metodou je mezi N-PC a P-PC statisticky významný rozdíl (P = 0,001).

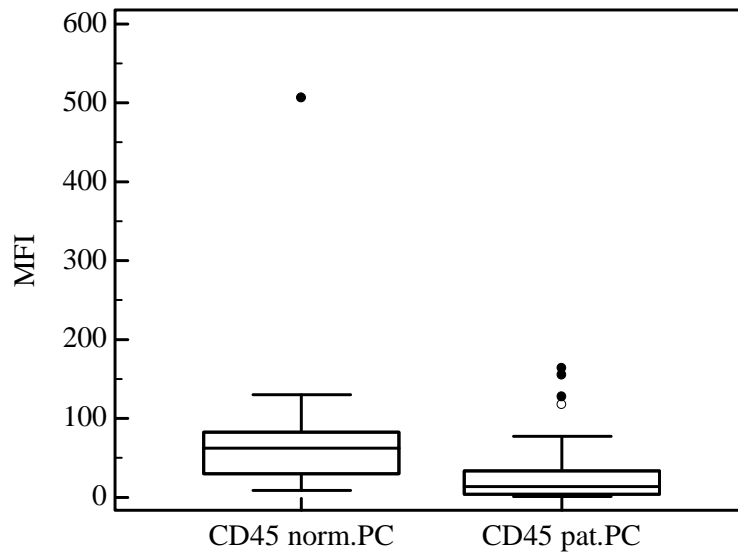


Obr. 12_Porovnání procentuálního zastoupení normálních a patologických PC s expresí CD56

Porovnání bylo provedeno pomocí dvouvýběrového Wilcoxonova testu. Na 5% hladině významnosti vychází hodnota P = 0,0001. V expresi znaku CD56 u normálních a patologických PC je statisticky významný rozdíl.

5.1.7. Exprese znaku CD45 hodnocená metodou MFI

N-PC vykazují větší míru exprese znaku CD45 než P-PC. V míře exprese znaku CD45 na PC u skupiny pacientů s N-PC (medián = 61,92, n = 21) a u skupiny pacientů s P-PC (medián = 14,17, n = 45) hodnocené pomocí metody MFI je statisticky významný rozdíl (P = 0,0001).

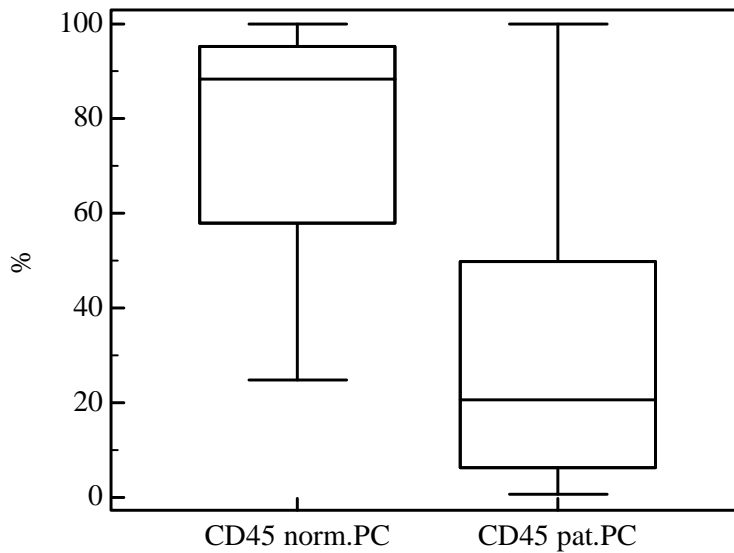


Obr. 13_Porovnání MFI znaku CD45 u normálních a patologických PC

Porovnání bylo provedeno pomocí dvouvýběrového Wilcoxonova testu. Na 5% hladině významnosti vychází hodnota P = 0,0001. V expresi znaku CD45 u normálních a patologických PC je statisticky významný rozdíl.

5.1.8. Exprese znaku CD45 hodnocená procentuální metodou

Ve skupině pacientů s N-PC je znak CD45 exprimován na větší části PC než ve skupině pacientů s P-PC. V procentuálním zastoupení CD45 pozitivních PC u pacientů s N-PC (88,24 %, n = 21) a pacientů s P-PC (20,67 %, n = 45) je statisticky významný rozdíl ($P < 0,0001$).

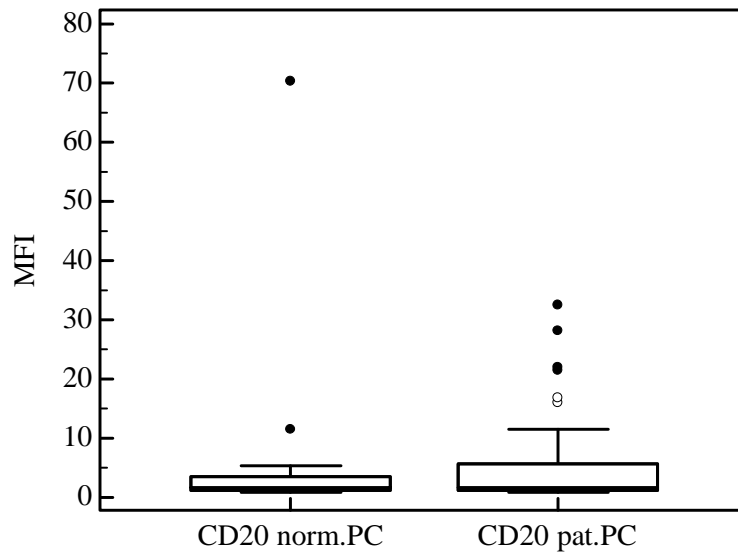


Obr. 14_Porovnání procentuálního zastoupení normálních a patologických PC s expresí CD45

Porovnání bylo provedeno pomocí t-testu pro nepárová data. Na 5% hladině významnosti vychází hodnota $P < 0,0001$. V expresi znaku CD45 u normálních a patologických PC je statisticky významný rozdíl.

5.1.9. Expresí znaku CD20 hodnocená metodou MFI

Míra exprese znaku na N-PC (medián = 1,59, n = 20) a na P-PC (medián = 1,71, n = 46) je velmi podobná. V míře exprese znaku CD20 na PC ve skupině pacientů s N-PC a ve skupině s P-PC hodnocené metodou MFI není statisticky významný rozdíl (P = 0,5028).

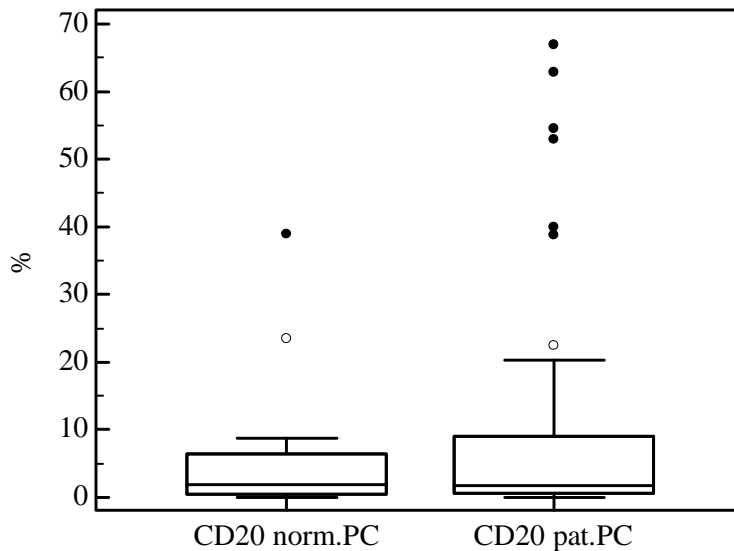


Obr. 15_Porovnání MFI znaku CD20 u normálních a patologických PC

Porovnání bylo provedeno pomocí dvouvýběrového Wilcoxonova testu. Na 5% hladině významnosti vychází hodnota P = 0,5028. V expresi znaku CD20 u normálních a patologických PC není statisticky významný rozdíl.

5.1.10. Exprese znaku CD20 hodnocená procentuální metodou

Jen velmi malé procento PC je jak ve skupině pacientů s N-PC (medián = 1,89 %, n = 20), tak ve skupině pacientů s P-PC (medián = 1,79 %, n = 46) CD20 pozitivních. V procentuálním zastoupení CD20 pozitivních PC není mezi oběma skupinami statisticky významný rozdíl (P = 0,5768).

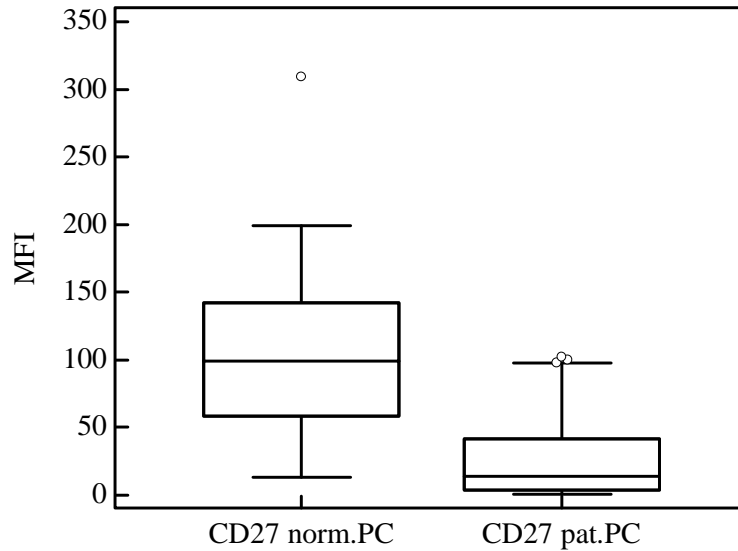


Obr. 16_Porovnání procentuálního zastoupení normálních a patologických PC s expresí CD20

Porovnání bylo provedeno pomocí dvouvýběrového Wilcoxonova testu. Na 5% hladině významnosti vychází hodnota P = 0,5768. V expresi znaku CD20 u normálních a patologických PC není statisticky významný rozdíl.

5.1.11. Expresí znaku CD27 hodnocená metodou MFI

Míra exprese znaku CD27 je vyšší ve skupině pacientů s N-PC. V míře exprese CD27 na N-PC (medián = 99,24, n = 20) a P-PC (medián = 13,99, n = 46) hodnocené metodou MFI je statisticky významný rozdíl ($P < 0,0001$).

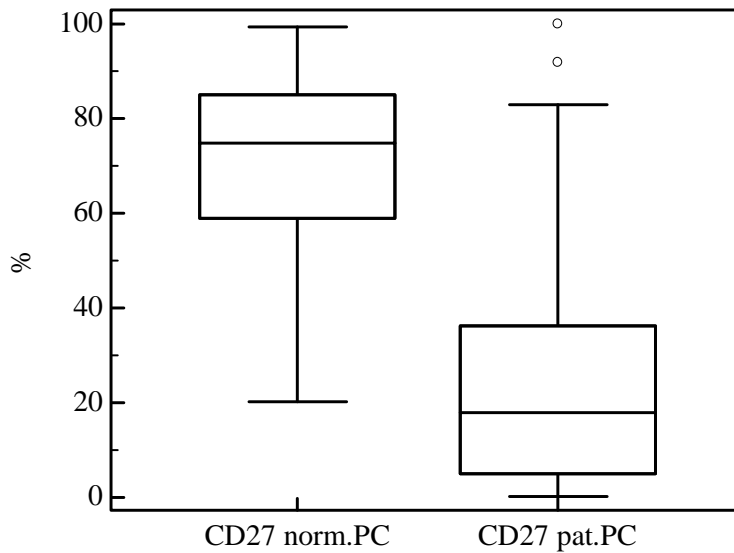


Obr. 17_Porovnání MFI znaku CD27 u normálních a patologických PC

Porovnání bylo provedeno pomocí t-testu pro nepárová data. Na 5% hladině významnosti vychází hodnota $P < 0,0001$. V expresi znaku CD27 u normálních a patologických PC je statisticky významný rozdíl.

5.1.12. Expresí znaku CD27 hodnocená procentuální metodou

Velká část N-PC (medián = 74,77 %, n = 20) je CD27 pozitivních. Mezi P-PC vykazuje pozitivitu jen menší část buněk (medián = 18,02 %, n = 46). V expresi znaku CD27 hodnocené pomocí procentuální metody je mezi N-PC a P-PC statisticky významný rozdíl (P = 0,001).



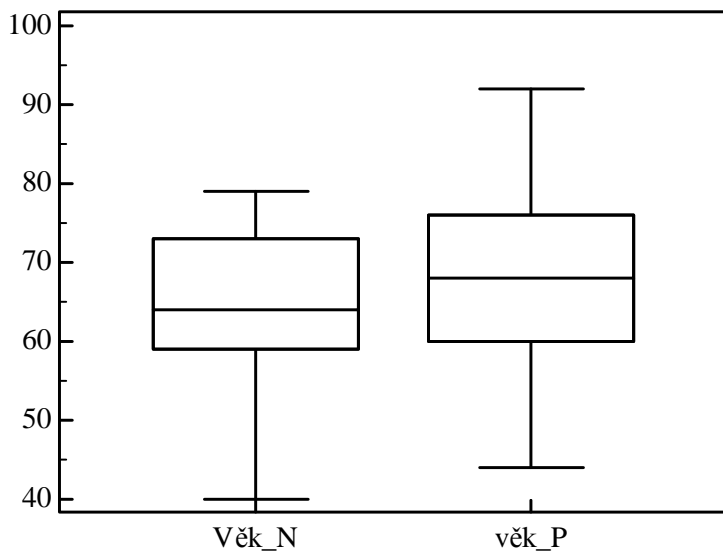
Obr. 18_Porovnání procentuálního zastoupení normálních a patologických PC s expresí CD27

Porovnání bylo provedeno pomocí t-testu pro nepárová data. Na 5% hladině významnosti vychází hodnota $P < 0,0001$. V expresi znaku CD27 u normálních a patologických PC je statisticky významný rozdíl.

5.2. Zhodnocení věku pacientů

Pravděpodobnost výskytu MM a MGUS se zvyšuje s věkem. Proto je pro naše hodnocení žádoucí, aby obě hodnocené skupiny pacientů byly ve stejném věkovém rozmezí.

Medián věku pacientů s N-PC je 64 let ($n = 22$). Medián věku skupiny pacientů s P-PC je 68 let ($n = 47$). Mezi věkovým rozmezím pacientů ze skupiny s N-PC a pacientů ze skupiny s P-PC není statisticky významný rozdíl ($P = 0,2405$).



Obr. 19_Porovnání věkové skladby pacientů s normálními a patologickými PC
Porovnání bylo provedeno pomocí t-testu pro nepárová data. Na 5% hladině významnosti vychází hodnota $P = 0,2405$. Mezi dvěma hodnocenými skupinami není statisticky významný věkový rozdíl.

5.3. Procentuální zastoupení pacientů podle exprese CD znaků

Na základě hodnot procentuálního zastoupení PC vykazujících expresi daného CD znaku, které byly získány procentuální metodou, byli pacienti rozděleni do následujících tří skupin (procento PC s expresí znaku ≥ 40 – pozitivní, procento PC s expresí znaku v intervalu 5–20 – slabě pozitivní, procento PC s expresí znaku ≤ 5 – negativní). Následně bylo vypočteno procentuální zastoupení pacientů v jednotlivých vytvořených skupinách.

Tab. 13_Procentuální zastoupení pacientů podle exprese hodnocených znaků

Znak	Pozitivita	N-PC	P-PC
CD19	Pozitivní	90,48 %	13,33 %
	Slabě pozitivní	4,76 %	8,89 %
	Negativní	4,76 %	77,78 %
CD56	Pozitivní	0,00 %	76,60 %
	Slabě pozitivní	20,00 %	4,26 %
	Negativní	80,00 %	19,15 %
CD45	Pozitivní	90,48 %	31,11 %
	Slabě pozitivní	9,52 %	33,33 %
	Negativní	0,00 %	35,56 %
CD20	Pozitivní	0,00 %	10,87 %
	Slabě pozitivní	10,00 %	10,87 %
	Negativní	90,00 %	78,26 %
CD27	Pozitivní	90,00 %	21,74 %
	Slabě pozitivní	10,00 %	36,96 %
	Negativní	0,00 %	41,30 %

6 Diskuse

Na PC byly sledovány povrchové znaky CD38, CD138, CD19, CD56, CD45, CD20 a CD27 a cytoplazmatické lehké řetězce κ a λ . N-PC jsou různorodé a exprimují mimo cytoplazmatických imunoglobulinů např. antigeny CD9, CD10, CD13, CD19, CD20, CD33, CD38. Myelomové buňky mohou exprimovat mimo CD38, nejtypičtější marker PC, i další markery jako jsou např. CD9, CD10, CD13, CD19, CD20, CD33 a CD56. Podle přítomnosti těchto markerů může být stanovena prognóza onemocnění (Ruiz-Argüelles, a další, 1994). Studie Valdase, a dalších se zabývá sledováním fenotypu PC. Porovnává fenotyp PC u pacientů s monoklonální gamapatií (MM a/nebo MGUS) ve vztahu k fenotypu PC u pacientů se zmnoženými PC, ale bez přítomnosti maligního onemocnění PC nebo ve vztahu k fenotypu PC u zdravých dárců. PC byly identifikovány jako normální, pokud měly fenotyp CD138+, CD38+, CD19+, CD56-, vykazovaly variabilní expresi znaku CD45 a byl zjištěn normální κ/λ poměr, nebo jako aberantní při fenotypu CD138+, CD38+, CD19-, CD56+ nebo CD56-, s variabilní expresí CD45 a abnormálním κ/λ (Valdas, a další, 2011). V jiné studii byla k rozlišení mezi myelomovými a normálními PC navržena kombinace znaků CD19, CD56, CD20, CD45, CD28, CD33 a CD117 (Mateo, a další, 2008).

V této práci byla nejprve na základě poměru exprese cytoplazmatických znaků určena malignita popř. normalita PC, vzorky pacientů byly rozděleny na dvě skupiny a to na skupinu pacientů s P-PC a skupinu pacientů s N-PC. Dále byla sledována exprese námi navržených znaků s úkolem zjistit, zda exprese jednotlivých znaků koreluje s malignitou popřípadě normalitou PC.

CD138

Aplikace monoklonálních protilátek proti znakům CD38 a CD138 umožňuje přesnou identifikaci PC v kostní dřeni a periferní krvi. PC mohou být určeny jako CD38 a CD138 pozitivní (Sezer, a další, 2001), (Rawstron, a další, 1997). Znak CD138 je typický pro PC a není exprimován na jiných hematopoetických buňkách (Bataille, a další, 2006), (Kovářová, a další, 2008). Všechny PC (normální i maligní) exprimují CD38 a CD138 (Bataille, a další, 2006). Znak CD138 je přítomen u 100 % případů s MM (Ocqueteau, a další, 1998). Míra exprese znaku CD138 na P-PC je statisticky významně vyšší než míra exprese tohoto znaku na N-PC (Bataille, a další, 2006), (Kovářová, a další, 2008), (Kobayashi, a další, 2006). Na P-PC byla námi zjištěna

statisticky významně vyšší míra exprese ($P = 0,0432$) znaku CD138, než míra exprese tohoto znaku na N-PC.

CD38

CD38 byl pozitivní u všech pac s MM (Ocqueteau, a další, 1998). CD38 byl exprimován na všech PC u pacientů s MGUS, s MM i u pacientů s reaktivní kostní dřeví. (Zandecki, a další, 1995). Znak CD38 je exprimován na všech PC. Oproti znaku CD138 je však míra exprese výrazně vyšší. P-PC vykazují nižší expresi znaku CD38 než N-PC, což umožňuje odlišit normální PC od patologických pomocí znaku CD38 (Lin, a další, 2004), (Kovařova, a další, 2009), (Kobayashi, a další, 2006). Myelomové PC exprimují významně vyšší stupeň CD38 a CD56 než buňky normální. (Rawstron, a další, 1997). V expresi tohoto znaku na N-PC a P-PC byl námi zjištěn statisticky významný rozdíl ($P < 0,0001$). To je v souladu s předchozími studiemi.

CD19

Nejčastěji hodnocené antigeny pro detekci patologických a normálních PC presentované v literatuře a účastníky odborných seminářů zahrnují CD19, CD56, CD20, CD117, CD28, CD33, CD27, CD81, CD31, CD39, CD40, CD44, CyclinD1 (Rawstron, a další, 2006). Myelomové PC je možné rozlišit od jejich normálních protějšků pomocí rozdílné exprese CD19 (Rawstron, a další, 1997). U normálních PC je znak CD19 přítomen, u patologických PC většinou chybí (Bataille, a další, 2006), (Kovářová, a další, 2008), (Kovařova, a další, 2009). N-PC typicky vykazují fenotyp CD19+, CD56-, zatímco P-PC CD19-, CD56+; CD19-CD56- nebo CD19+, CD56+ (Sezer, a další, 2001). Další studie prokázala, že fenotyp CD19+, CD56- je pouze u normálních PC, u pacientů s MG nebyly nalezeny žádné PC s CD38++, CD19+, CD56- fenotypem (Harada, a další, 1993). Jak se ukázalo myelomové PC kompletně ztrácí pan-B buněčný znak CD19 u většiny pacientů (93 %) (Mateo, a další, 2005). Chybění znaku CD19 bylo sledováno u téměř všech pacientů s MM (97,5%, $n = 362$) (Bataille, a další, 2006). Expresí CD19 byla nalezena u 4 % případů s MM (Mateo, a další, 2008). Pacienti s MM vykazovali v kontrastu k míře exprese znaku CD138 pro znak CD19 velmi slabou pozitivitu. CD19 bylo exprimováno na 76 % (rozmezí 66 - 92%) N-PC (Ocqueteau, a další, 1998). V naší skupině pacientů s P-PC bylo CD19 pozitivních přibližně 13 % pacientů, slabě pozitivních asi 9 % případů, rozdíl může být způsoben tím, že v naší skupině jsou zahrnuti i pacienti s MGUS. U N-PC byl znak CD19

exprimován na 78 % všech PC (v rozmezí 60 – 83 %). Byl prokázán statisticky významný rozdíl v expresi znaku CD19 na N-PC a P-PC a to jak metodou MFI, tak procentuální metodou ($P < 0,0001$; $P = 0,0001$).

CD56

V porovnání s normálními PC, myelomové buňky mají zvětšenou expresi markeru CD56, který je typický pro NK-buňky, u 78 % PC (Bataille, a další, 2006). 78 % pacientů s MM mělo pro znak CD56 pozitivních více než 50 % PC (Van Camp, a další, 1990) U 67 % pacientů s MM byla zjištěna silná pozitivita pro znak CD56 (Ocqueteau, a další, 1998). Jiná studie také ukazuje, že myelomové PC exprimují významně vyšší stupeň CD56 než buňky normální (Rawstron, a další, 1997). Znak CD56 byl použit Pellat-Deceunynckem a dalšími k rozlišení normálních a patologických buněk. Jejich studie naznačuje, že i N-PC exprimují CD56. Bylo potvrzeno, že u 10 z 11 zdravých dárců je přítomna malá subpopulace CD56 pozitivních buněk. Dále byla porovnána procentuální zastoupení CD56 pozitivních buněk a míra exprese CD56 na N-PC a P-PC. U maligních buněk je významně zvýšené procentuální zastoupení CD56 pozitivních buněk a míra exprese tohoto znaku u populace PC. Míra exprese se významně zvyšuje během maligního procesu. (Normální oproti maligním buňkám $P < 0,01$), (Pellat-Deceunynck, a další, 1995). Také u našich P-PC je zvýšené procentuální zastoupení CD56 pozitivních PC, medián činí 91 % všech PC. U skupiny s N-PC bylo sledováno malé procento CD56 pozitivních PC (5,5 %). Znak CD56 je ve větší míře exprimován asi u 77 % pacientů ze skupiny s P-PC. N-PC vykazují pro tento znak nízkou míru exprese a P-PC vykazují silnou míru exprese. V expresi CD56 mezi N-PC a P-PC byl prokázán statisticky významný rozdíl metodou MFI ($P < 0,0001$) i metodou procentuální ($P = 0,0001$).

CD45

P-PC vykazují pro znak CD45 slabou až negativní intenzitu. Během diferenciac PC klesá exprese CD45 (Sezer, a další, 2001). Exprese CD45 odráží stupeň vyžralosti a proliferační aktivity PC. Znak CD45 je exprimován na povrchu nezralých a proliferujících PC (Lin, a další, 2004), (Bataille, a další, 2006). Myelomové PC exprimují významně nižší stupeň CD45 než buňky normální. (Rawstron, a další, 1997). Mateo a další sledovali čtyři různé obrazy pro expresi znaku CD45. V 73 % případů byl znak negativní, u 10 % homogenní slabě pozitivní (tyto dva obrazy jsou sledovány u

pacientů s P-PC), u 9 % homogenní jasně pozitivní a u 8 % byla heterogenní exprese (tyto dva obrazy jsou typické pro normální PC (Mateo, a další, 2005). U pacientů s MM byla zjištěna exprese znaku CD45 u 27 % případů. (Mateo, a další, 2008). Normální i maligní PC kostní dřeně obsahují malou podskupinu proliferujících buněk, které jsou silně pozitivní pro CD45. Celkově je exprese CD45 u N i P-PC heterogenní (Robillard, a další, 2005). V porovnání s normálními PC, myelomové buňky vykazují většinou slabou nebo negativní expresi CD45 (Bataille, a další, 2006). U N-PC je znak CD45 silně exprimován (Lin, a další, 2004), (Bataille, a další, 2006). Nicméně stejně jako u normální kostní dřeně, i myelomové buňky jsou mix malého množství CD45 silně pozitivních a velké části CD45 negativních až slabě pozitivních PC (Bataille, a další, 2006), (Sezer, a další, 2001). U nepatologických PC je CD45 silně exprimován u všech uzlinových, cirkulujících nebo reaktivních PC (Bataille, a další, 2006). N-PC byly pozitivní pro znak CD45 (Ocqueteau, a další, 1998). Podobné výsledky vyplývají i z naší práce. P-PC mají malou míru intenzity fluorescence ve znaku CD45. 31 % pacientů ze skupiny s P-PC vykazují silnou pozitivitu pro znak CD 45. U N-PC je exprimován ve vyšší míře. U N-PC je znak CD45 exprimován v průměru na 88 % všech PC. P-PC exprimují statisticky významně méně markeru CD45. Tato menší exprese byla zjištěna jak metodou MFI, tak metodou procentuální ($P = 0,0001$; $P < 0,0001$).

CD20

Myelomové buňky u malé části pacientů si ponechávají markery B-buněk, např. CD19 nebo CD20, ale nikdy ne oba zároveň. Mnoho CD19 a CD20 pozitivních myelomových buněk exprimuje zároveň i CD27. Expresí CD20 je mnohem častější než exprese CD19. Asi 14 % pacientů exprimuje znak CD20. (Bataille, a další, 2006). N-PC znak CD20 neexprimují, P-PC vykazují asynchronní expresi (Paiva, a další, 2010). 18% z 66 pacientů s MM mělo více než 1/3 PC s expresí CD20 a 5 pacientů exprimovalo znak C20 na 100 % buněk. (Robillard, a další, 2003). Znak CD20 vykazuje u pacientů s MM velmi slabou pozitivitu (23 %) (Ocqueteau, a další, 1998). Normální i myelomové buňky nevykazují v porovnání s expresí znaku CD3 (který byl v této studii použit jako negativní kontrola) expresi znaku CD20 (Rawstron, a další, 1997). Znak CD20 by přítomen u 17 % pacientů s P-PC (Mateo, a další, 2005). PC 20 % pacientů s MGUS a 16 % pacientů s MM byly pozitivní ve znaku CD20 (Zandecki, a další, 1995). Expresí CD20 byla nízká u pacientů s reaktivně kostní dřeně, pouze 1-25 % PC

se barvilo pozitivně. (Zandecki, a další, 1995). Celkově byla u naší skupiny pacientů s P-PC pozitivita pro znak CD20 stanovena v asi 11 % případů. V naší skupině pacientů s P-PC byl znak CD20 pouze u 4 pacientů (8,5 %) exprimován na více než 50 % všech PC. U zbytku bylo procentuální zastoupení CD20 pozitivních PC ještě menší. U skupiny s N-PC bylo pro znak CD20 pozitivních 0,5 – 6 % všech PC. Oproti Robillardovi a dalším je to velký rozdíl ve výsledcích. U obou našich skupin pacientů byla zjištěna velmi slabá míra exprese znaku CD20 a ani metodou MFI, ani metodou procentuální nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v expresi znaku CD20 ($P = 0,5028$; $P = 0,5768$).

CD27

Chybění znaku CD27 je časté u MM (Bataille, a další, 2006). Studie sledující genetickou expresi normálních PC a myelomových PC určily CD27 jako nejvýznamnější genetickou ztrátu u myelomových buněk, nicméně polovina MM si ponechává CD27 (51%, n=146) a exprese tohoto znaku je spojena s lepší prognózou (Bataille, a další, 2006). Znak CD27 je na N-PC silně exprimován, P-PC vykazují pro znak CD27 slabou až negativní expresi (Bataille, a další, 2006), (Paiva, a další, 2010). U naší skupiny pacientů s N-PC je výrazně vyšší exprese znaku CD27, přibližně 59 % pacientů ze skupiny s P-PC vykazuje pozitivitu (zde se jedná o procento pacientů slabě i silně pozitivních pro znak CD27). Míra exprese znaku CD27 je statisticky významně vyšší u skupiny s N-PC při použití metody MFI i při použití procentuální metody ($P < 0,0001$; $P < 0,0001$).

Vzorky

Ve studii Robillarda a dalších bylo zahrnuto 49 pacientů s MM. Vzorky kostní dřene a periferní krve od zdravých dárců nebo od pacientů s reaktivní plasmocytózou byly použity k porovnání rozdílů ve fenotypu PC (Robillard, a další, 2005). Terstappen a další získali výsledky změřením vzorů z PK a KD pacientů s MM nebo MGUS. U pacientů s těmito onemocněními je zvýšený počet PC. Jako referenční vzorky byly použity vzorky zdravých dobrovolných dárců. Normální počet PC v KD je menší než 0,25 % (Terstappen, a další, 2009), normální hodnota PC v PK se pohybuje v rozmezí 0,01 - 0,1 % (Paul, 2008). U našich vzorků je ve skupině pacientů s P-PC počet PC ve vzorcích z KD v rozmezí 0,02 - 69,96 % (medián = 3,87 %). Až na dvě výjimky je

počet PC minimálně dvakrát větší, než je normální rozmezí. Ve vzorcích PK ze skupiny pacientů s P-PC je také zvýšené procento PC (medián = 28,63 %).

Kappa a lambda

Hodnocení exprese cytoplazmatických lehkých řetězců κ a λ a jejich vzájemného poměru pomocí průtokové cytometrie je důležité ke zjištění klonality PC (Rawstron, a další, 2006). Sezer, a další určili PC jako monoklonální, pokud byl poměr κ/λ v rozmezí 0,5 - 5 (Sezer, a další, 2001). Ve výsledcích Ocqueteau a dalších byly u monoklonálních PC v 58 % případů exprimovány lehké řetězce κ , ve zbývajících 44 % případů lehké řetězce λ (Ocqueteau, a další, 1998). U všech vzorků ze skupiny pacientů s P-PC byla potvrzena monoklonalita PC pomocí poměru exprese intracelulárních lehkých řetězců κ a λ . U našich vzorků s P-PC bylo v 80,5 % exprimovány lehké řetězce κ , v 19,5 % lehké řetězce λ . Oproti studii Ocqueteau a dalších je v naší práci převaha případů s monoklonálními PC exprimujícími řetězce kappa.

Plazmatické buňky

Střední množství N-PC identifikované pomocí průtokové cytometrie bylo 0.25 ± 0.09 % a střední procentuální zastoupení PC u pacientů s MM bylo 1.76 ± 1.2 % (Ocqueteau, a další, 1998). Vzorky s N-PC, které byly v této práci použity k porovnání, byly získány od pacientů, kteří měli zvýšené množství PC, ale nebylo u nich diagnostikováno hematologické onemocnění PC. U těchto vzorků byla na základě poměru κ/λ potvrzena polyklonalita. Ve vzorcích s N-PC z KD (medián = 0,5 %) i PK (medián = 4,41 %) bylo naměřeno zvýšené procento PC. Zvýšené množství polyklonálních PC v PK a KD se vyskytuje u některých zánětlivých stavů, u chronických infekcí, autoimunitních onemocnění a u hypersenzitivních stavů (Kojima, a další, 2007), (Li, a další, 2006).

7 Závěry

Na základě exprese znaků typických pro plazmatické buňky (CD138 a CD38) byly tyto odděleny od ostatních leukocytů a bylo stanoveno jejich relativní zastoupení ve vzorcích. Jak ve skupině pacientů s patologickými plazmatickými buňkami (P-PC), tak ve skupině s normálními buňkami (N-PC) bylo zjištěno zvýšené množství plazmatických buněk. Za pomoci změření exprese cytoplazmatických lehkých řetězců kappa a lambda a následného výpočtu poměru κ/λ byla u skupiny pacientů s N-PC potvrzena polyklonalita (poměr κ/λ byl ve fyziologickém rozmezí 0,3–3), u skupiny pacientů s P-PC byla potvrzena monoklonalita (poměr κ/λ mimo rozmezí 0,3–3). V expresi povrchových znaků CD138, CD38, CD19, CD56, CD45 a CD27 byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi P-PC a N-PC. V expresi znaku CD20 nebyl tento rozdíl zjištěn. P-PC u pacientů s prokázaným mnohočetným myelomem (MM) nebo monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) vykazují oproti PC ze skupině pacientů s N-PC zvýšenou expresi znaků CD138 a CD56 a sníženou expresi znaků CD38, CD19, CD45 a CD27.

Ačkoliv se mnoho studií zabývá sledováním a porovnáváním povrchových CD znaků na normálních a patologicky změněných PC a výsledky potvrzují rozdíly v expresi některých znaků mezi normálními a patologickými PC, podává metoda sledování cytoplazmatických lehkých řetězců κ a λ při hodnocení klonality PC stále mnohem přesnější výsledky. Tato metoda je však jak časově, tak finančně náročná, a proto zde existuje snaha nahradit ji levnější a snadnější metodou hodnocení povrchových CD znaků. Hodnocení povrchových znaků se mimo jiné ukazuje jako přínosné pro zjištění prognózy pacientů, kdy byla např. u některých konkrétních fenotypů PC sledována lepší odezva na léčbu, nebo delší průměrná doba přežití pacientů, nebo u pacientů s MGUS menší pravděpodobnost zvrhnutí tohoto onemocnění v závažnější MM. Studie citované v této práci se však zabývají imunofenotypy PC jen u malých skupin pacientů. Velkým přínosem by tedy byla studie, která by se soustředila na sledování imunofenotypu PC a jeho souvislostí s onemocněním monoklonální gamapatií ve větším a dlouhodobějším měřítku.

8 Seznam zkratek

Ab	protilátka (antibody)
Ag	antigen
AMK	aminokyselina
APC	alofykocyanin
APC	antigen prezentující buňka (antigen presenting cell)
BCR	B-buněčný receptor (B-cell receptor)
B-ly	B-lymfocyt
CD	diferenciační skupina (cluster of differentiation)
CRP	C-reaktivní protein
Cy	cyanin
DNA	deoxyrybonukleová kyselina
ELFO	elektroforéza
ER	endoplazmatické retikulum
ery	erytrocyty
FCM	průtokový cytometr (flow cytometry)
FDC	folikulární dendritická buňka (follicular dendritic cell)
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FITC	fluoresceinisothiokyanát
FSC	přímý rozptyl (forward scatter)
HLA	antigen lidských leukocytů (human leukocyte antigen)
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
leu	leukocyty
LPS	lipopolyysacharid
MG	monoklonální gamapatie
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MIG	makrofágový zánětlivý protein (macrophage inflammatory globulin)
M-Ig	monoklonální imunoglobulin
MM	mnohočetný myelom
MR	magnetická rezonance

NK	nukleová kyselina
PC	plazmatická buňka (plasma cell)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PE	fykoerytrin
PerCP	peridinin-chlorofyl
PET	pozitronová emisní tomografie
RTG	rentgen
SMM	doutnající mnohočetný myelom (smoldering multiple myeloma)
SSC	boční rozptyl (side scatter)
Th-ly	T-helper lymfocyt
T-ly	T-lymfocyt
WM	Waldenströmova makroglobulinemie

9 Literatura

Abcam. Fluorescence guide. *Abcam*. [Online] Abcam. [Citace: 27. 3 2012.] <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11755>.

Adam, Z. a Vorlíček, J. *Hematologie II*. Praha : Grada, 2001. 678 s. ISBN 80-247-0116-2.

Adam, Z., a další. *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. Brno: Masarykova univerzita, 1999. 370 s. ISBN 80-210-2034-2.

Adam, Z., Krejčí, M. a Vorlíček, J. *Hematologie, přehled maligních hematologických nemocí*. Praha : Grada, 2008. 390 s. ISBN 978-80-247-2502-4.

Bataille, R., a další. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Hematologica*. Sep 2006, 91(9), s. 1234-1240.

Eckschlager, T. a Bartůňková, J. *Průtoková cytometrie v klinické praxi*. Praha : Grada, 1999. 160 s. ISBN 80-7169-279-4.

Harada, H., a další. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood*. May 1993, 81(10), s. 2658-2663.

Hořejší, V. a Bartůňková, J. *Základy imunologie*. Praha : Triton, 2002. 260 s. ISBN 80-7254-215-X.

Jackson, N., a další. An analysis of myeloma plasma cell phenotype using antibodies defined at the IIIrd international workshop on human leukocyte differentiation antigens. *Clin Exp Immunol*. June 1988, 72(3), s. 351-356.

Klener, P. *Hematologie*. Praha : Galén, 2003. 115 s. ISBN 80-246-0672-0.

Kobayash, S., a další. Four-color flow cytometric analysis of myeloma plasma cell. *Am J Clin Pathol*. Dec 2006, 126(6), s. 908-915.

Kojima, M., a další. Bone marrow plasmacytosis in idiopathic plasmatic lymphadenopathy with polyclonal hyperimmunoglobulinemia. *Pathol Res Pract*. Sep 2007, 203(11), s. 789-794.

Kovařova, L, a další. Phenotype of plasma cell in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Neoplasma*. 2009, 56(6), s. 526-532.

Kovářová, L, a další. Rozlišení nádorových klonálních a fyziologických polyklonálních plazmatických buněk pomocí flowcytometrie. *Klinická onkologie*. 2008, 21(Supplement), s. 254-257.

- Li, L., a další.** Polyclonal plasma cell proliferation with marked hypergammaglobulinemia and multiple autoantibodies. *Ann Clin Lab Sci.* Autumn 2006, 36(4), s. 479-484.
- Lin, P., a další.** Flow Cytometric Immunophenotypic Analysis of 306 Cases of Multiple myeloma. *Am J Clin Pathol.* Apr 2004, 121(4), s. 482-488.
- Lloyd, D.** *Flow cytometry in microbiology.* London : Springer-Verlag, 1993. 188 s. ISBN 3-540-19796-6.
- Lochmanová, A.** *Základy imunologie.* Ostrava : Ostravská univerzita, 2006. 136 s. ISBN 80-7368-153-6.
- Marinov, I.** *Průtoková cytometrie v klinické hematologii.* Praha : Triton, 2008. 148 s. ISBN 978-80-7387-143-7.
- Mateo, G., a další.** Genetic Abnormalities and Patterns of Antigenic Expression in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res.* May 2005, 11, s. 3661-3667.
- Mateo, G., a další.** Prognostic Value of Immunophenotyping in Multiple Myeloma. *JCO.* June 2008, 26(16), s. 2737-2744.
- Mayer, J. a Starý, J.** *Leukémie.* Praha : Grada, 2002. 357 s. ISBN 80-7169-991-8.
- Ocqueteau, M., a další.** Immunophenotypic Characterization of Plasma Cells from Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance patients. *Am J Pathol.* June 1998, 152(6), s. 1655-1665.
- Ormerod, M.G.** *Flow cytometry, third Edition.* Oxford : Oxford University Press, 2000. 276 s. ISBN 100-19-963824-1.
- Paiva, B., a další.** Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom.* Jul 2010, 78(4), s. 239-252.
- Paul, W. E.** *Fundamental immunology.* Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2008. 1603 s. ISBN 978-0781765190.
- Peceliunas, V., a další.** Circulating plasma cells predict the outcome of relapsed or refractory multiple myeloma (RR MM). *Leuk lymphoma.* Apr 2011, 53(4), s. 641-647.
- Pecka, M.** *Praktická hematologie.* Český Těšín : Infiniti art, 2010. 343 s. ISBN 978-80-903871-9-5.
- Pellat-Deceunynck, C., a další.** Adhesion Molecules on Human Myeloma Cells: Significant Adhesion Molecules on Human Myeloma Cells: Significant Spreading, and Immortalization. *Cancer Res.* Aug 1995, 55(16), s. 1647-1653.

Rajkumar, S.V. MGUS and Smoldering Multiple Myeloma: Update on Pathogenesis, Natural History, and Management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005, s. 340-345.

Rawstron, A.C., a další. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol*. Apr 1997, 97(1), s. 46-55.

Rawstron, A.C., a další. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. Mar 2006, 93(3), s. 431-438.

Robillard, N., a další. CD20 is associated with a small mature plasma cell morphology and t(11;14) in multiple myeloma. *Blood*. Aug 2003, 102(3), s. 1070-1071.

Robillard, N., a další. Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood*. Jun 2005, 105(12), s. 4845-4848.

Ruiz-Argüelles, G.J. a San Miguel, J.F. Cell surface markers in multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. Jul 1994, 69(7), s. 684-690.

San Miguel, J.F., a další. Immunophenotype and DNA cell content in multiple myeloma. *Baillieres Clin Haematol*. Dec 1995, 8(4), s. 735-759.

San Miguel, J.F., a další. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood*. Mar 2002, 99(5), s. 1853-1856.

Sandacká, V., a další. MGUS 2010 – výzkumný projekt zaměřený na identifi kaci. *Klin Biochem Metab*. 2009, 17(38), s. 75-77.

Sezer, O., a další. Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica*. Aug 2001, 86(8), s. 837-843.

Šinkorová, Z. a Zárybnická, L. Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda. *Vojenské zdravotnické listy*. 2008, 77(3), s. 98-103.

Špička, I. *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. Praha : Galén, 2005. 128 s. ISBN 80-7262-330-3.

Šterzl, I. *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékaře*. Praha : Karolinum, 2005. 207 s. ISBN 80-246-0972-X.

Terstappen, L., a další. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood*. Nov 2009, 114(9), s. 1739-1747.

Terstappen, L.W., a další. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood*. Nov 1990, 76(9), s. 1739-47.

Van Camp, B., a další. Plasma Cells in Multiple Myeloma Express a Natural Killer Cell-Associated Antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood*. Jul 1990, 76(2), s. 377-382.

Wols, H.A.M. Plasma cells. *Encyclopedia of lifesciences*. John Wiley & Sons, Ltd., 2005. s.1-8.

Zandecki, M., a další. CD19 and immunophenotype of bone marrow plasma cells in monoclonal gammopathy of. *J Clin Pathol*. June 1995, 48(6), s. 548-552.