

PREPORUKE ZA PRIMENU TUMORSKIH MARKERA KOD MONOKLONSKIH GAMAPATIJA

RECOMMENDATIONS FOR USE OF TUMOR MARKERS IN MONOCLONAL GAMMOPATHIES

Marijana Dajak

Institute of Medical Biochemistry, Clinical Center of Serbia, Belgrade

Summary: Monoclonal gammopathies constitute a group of disorders characterized by the clonal proliferation of plasma cells. The M protein is a tumor marker specific for monoclonal gammopathies because it reflects the clonal production of immunoglobulin. The monoclonal gammopathies include: multiple myeloma, *Waldenström* macroglobulinemia (WM), nonsecretory myeloma, smoldering multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), primary systemic amyloidosis and heavy-chain diseases. The diagnosis of multiple myeloma is based on detection of M protein in serum and/or urine, infiltration of plasma cells in the bone marrow, and lytic bone lesions on radiography of the skeleton. According to NACB (National Academy of Clinical Biochemistry) recommendations, the tumor markers for diagnosis, screening, identification of clonality, follow up of disease and prognostic evaluation in monoclonal gammopathies are: serum and/or urine protein electrophoresis, serum and/or urine immunofixation, serum and/or urine free light chains (FLC), serum viscosity and β_2 -microglobulin. Immunofixation is used to identify the clonality (type) of M protein observed on electrophoresis and when suspicion persists despite a normal protein electrophoretogram. It is particularly useful for the recognition and distinction of biclonal or triclinal gammopathies. The viscosity of serum should be measured if the patient has signs or symptoms of hyperviscosity syndrome. WM is the most common cause of hyperviscosity, but it can also occur in patients with large levels of monoclonal IgA or IgG. Serum FLC automated immunoassays are more sensitive for the detection of monoclonal light-chain myeloma, nonsecretory myeloma and AL amyloidosis than traditional electrophoretic and immunofixation methods. Furthermore, serum FLC ration is an independent risk factor for malignant progression in MGUS patients. The determination of serum FLC and serum electrophoresis as first-line tests for investigating possible B-cell disorders gains additional diagnostic information.

Keywords: monoclonal gammopathies, multiple myeloma, NACB (National Academy of Clinical Biochemistry) recommendations, immunotyping, free light chains, hyperviscosity, cryoglobulins

Kratak sadržaj: Monoklonske gamapatije čine grupu poremećaja koji se karakterišu klonskom proliferacijom plazma ćelija. M protein je tumorski marker specifičan za monoklonske gamapatije jer odražava klonsku produkciju imunoglobulina. Monoklonske gamapatije uključuju: multipli mijelom, *Waldenström*-ovu makroglobulinemiju (WM), nesekretorni mijelom, prikriveni (*smoldering*) multipli mijelom, monoklonsku gamapatiju od neodređenog značaja (MGUS, *Monoclonal gammopathy of undetermined significance*), primarnu sistemsku amiloidozu i bolest teških lanaca. Dijagnoza multiplog mijeloma je zasnovana na detekciji M proteina u serumu i/ili urinu, infiltraciji plazma ćelija u koštanoj srži i litičkim koštanim lezijama na radiografiji skeleta. Prema NACB (*National Academy of Clinical Biochemistry*) preporukama, tumorski markeri za dijagnozu, *screening*, identifikaciju klonaliteta, praćenje bolesti i prognostičku evaluaciju kod monoklonskih gamapatija su: elektroforeza proteina u serumu i/ili urinu, imunofiksacija u serumu i/ili urinu, slobodni laki lanci (SLL) u serumu i/ili urinu, viskoznost seruma i β_2 -mikroglobulin. Imunofiksacija se koristi za identifikaciju klonaliteta (tipa) M proteina primećenog na elektroforezi i kada postoji sumnja bez obzira na normalan proteinski elektroforetogram. Posebno je korisna za prepoznavanje i razlikovanje biklonskih ili triklonskih gamapatija. Viskoznost seruma trebalo bi određivati ako pacijent ima znake i simptome sindroma hiperviskoznosti. WM je najčešći uzrok hiperviskoznosti, ali se takođe može pojaviti i kod pacijenata sa velikim nivoima monoklonskog IgA ili IgG. Automatizovana imunoodređivanja SLL u serumu su osetljivija od tradicionalne elektroforetske metode i imunofiksacije za detekciju mijeloma monoklonskih lakih lanaca, nesekretornog mijeloma i AL amiloidoze. Osim toga, odnos SLL u serumu je nezavisan faktor rizika za nastanak maligne progresije kod pacijenata sa MGUS. Određivanje SLL u serumu i elektroforeze proteina seruma kao testova prve linije za razmatranje prisustva mogućih poremećaja B ćelija daje dodatnu dijagnostičku informaciju.

Ključne reči: monoklonske gamapatije, multipli mijelom, NACB (*National Academy of Clinical Biochemistry*) preporuke, imunotipizacija, slobodni laki lanci, hiperviskoznost, krioglobulini

Uvod

Monoklonske gamapatije (paraproteinemije, disproteinemije) su grupa poremećaja koja se karakteriše proliferacijom jednog ili više klonova diferenciranih B limfocita, pri čemu svaki od njih proizvodi imunološki homogeni imunoglobulin koji se obično naziva paraprotein ili monoklonski (M) protein. Imunoglobulinski molekul je sačinjen od dva identična teška i dva identična laka lanca. M protein u cirkulaciji se može sastojati od celog imunoglobulina, samo lakog lanca ili (ređe) samo teškog lanca. Postoji pet teških lanaca koji su označeni kao γ , α , μ , δ i ϵ i koji određuju klasu imunoglobulina (Ig) G, A, M, D ili E. IgG se može dalje podeliti u četiri podklase, a IgA u dve. Laki lanac može biti kapa ili lambda tipa. Svaki imunoglobulin sastoji se od jednog tipa teškog i jednog tipa lakog lanca koji su povezani disulfidnim mostom.

Monoklonske gamapatije obuhvataju brojne bolesti uključujući plazmocitom, monoklonsku gamapatiju od neodređenog značaja (MGUS, *Monoclonal gammopathy of undetermined significance*), multipli mijelom, *Waldenström*-ovu makroglobulinemiju (WM) i sistemsku AL amiloidozu (imunocitna amiloidoza gde amiloid potiče od lakih lanaca imunoglobulina). Pacijenti koji imaju paraprotein, a koji neispunjavaju dijagnostičke kriterijume za mijelom i kod kojih nije dokazana druga limfoproliferativna bolest su klasifikovani kao MGUS. Postoji bitna tendencija za transformaciju MGUS-a u mijelom, makroglobulinemiju ili AL-amiloidozu. *Waldenström*-ova makroglobulinemija je maligni limfom; karakteriše se povećanim nivoima monoklonskog IgM u serumu, prevelikom brojem limfoplazmocitoidnih ćelija u koštanoj srži i za razliku od multiplog mijeloma, učešćem visceralnih organa uključujući jetru i slezinu. U sistemskoj AL amiloidozi, mada je broj monoklonskih plazma ćelija obično nizak u koštanoj srži, protein koje one proizvode ima afinitet za formiranje naslaga (amiloid) u visceralnim organima kao što su srce, bubrezi i slezina i koje prouzrokuju organsku disfunkciju i ranu smrt (1). Klasifikacija monoklonskih gamapatija je prokazana u tabeli I (2).

Multipli mijelom je generalno bolest starijih i retko se javlja kod osoba mlađih od 40 godine. Postoji blaga sklonost za muški pol. Godišnja incidencija je 4,7/100 000 za muškarce i 3,2/100 000 za žene. Multipli mijelom je obuhvatao približno 1,1% novih slučajeva karcinoma i 10% do 15% svih hematoloških maligniteta u Americi (SAD) 2004. godine i bio je odgovoran za 2,0% smrti zbog karcinoma, što predstavlja najlošiji odnos broja smrtnih slučajeva prema novim slučajevima za bilo koji karcinom (3). Pokazano je da je medijana vremena preživljavanja približno 33 meseca (4).

Uzrok multiplog mijeloma je još uvek nepoznat. Potencijalni faktori rizika za razvoj mijeloma su jonizujuće zračenje i profesionalno izlaganje azbestu, benzenu, pesticidima, bojama ili razređivačima, mada rezultati istraživanja nisu dosledni (5). Najjači faktor udružen sa rizikom razvoja mijeloma je prisustvo MGUS-a.

Tabela I Klasifikacija monoklonskih gamapatija (1)

Maligne monoklonske gamapatije

- A) Multipli mijelom (IgG, IgA, IgD, IgE i slobodni laki lancii)
1. Prikriiveni multipli mijelom
 2. Leukemija plazma ćelija
 3. Nesekretorni mijelom
 4. Osteosklerotični mijelom (POEMS* sindrom)
 5. Plazmocitom
 - (a) Solitarni plazmocitom kostiju
 - (b) Ekstramedularni plazmocitom

Waldenström-ova makroglobulinemija Bolest teških lanaca (BTL)

- A) Gama-BTL
- B) Alfa-BTL
- C) Mi-BTL

Primarna amiloidoza

Monoklonske gamapatije od neodređenog značaja

- A) Benigna (IgG, IgA, IgD, IgM i retko slobodni laki lancii)
- B) Biklonska gamapatija
- C) Idiopatska *Bence Jones* proteinurija

* POEMS – *Polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy, and skin changes*

Multipli mijelom je maligni tumor plazma ćelija. Istraživanja imunoglobulinskih gena kod multiplog mijeloma su pokazala ekstenzivnu somatsku hipermutaciju i odsustvo intraklonske različitosti (6). Maligne plazma ćelije migriraju do koštane srži gde proliferišu u bliskoj kooperaciji sa pomoćnim ćelijama mikrookruženja koštane srži (7).

Multipli mijelom je prototip monoklonske diskrazije plazma ćelija. Podeljen je u dve podklase: indolentnu formu prikriivenog multiplog mijeloma (*SMM, Smoldering multiple myeloma*) i u simptomatsku sistemsku bolest, koja često uključuje završni stadijum oštećenja bubrega, kostiju i koštane srži. Indolentna bolest se karakteriše nedostatkom simptoma, bez ili sa nekoliko koštanih lezija i stabilnom koncentracijom M proteina (1).

Klinički nalazi kod monoklonskih gamapatija

Laboratorijski nalazi koji ukazuju na sumnju prisustva diskrazije plazma ćelija su povećanje sedimentacije eritrocita ili viskoznosti seruma, anemija (zbog supresije koštane srži), renalna insuficijencija sa blagim sedimentom urina (zbog toksičnog efekta monoklonskih lakih lanaca), teška proteinurija kod pacijenata preko 50 godina, *Bence Jones* proteinurija, hiperkalcemija (zbog degradacije kostiju), hipergamaglobulinemija i deficijencija imunoglobulina. Klinički simptomi koji ukazuju na moguće prisustvo monoklonske gamapatije su bol u leđima, slabost ili zamor (zbog anemije), osteopenija, osteolitičke lezije, spontane frakture i povratne infekcije uglavom gornjeg respiratornog trakta (zbog niskih nivoa serumskih imunoglobulina i nepotpunog humoralnog imunog odgovora). Bol u kostima (uglavnom u leđima) je najčešća pojava kod multiplog mije-

Tabela II Klinički simptomi i patološki nalazi kod multiplog mijeloma (7)

Klinički simptomi	Prevalancija (%)
Bol u kostima	55
Slabost, zamor	40
Osetljivost na infekcije	22
Anoreksija	20
Gastrointestinalni poremećaji	19
Gubitak težine	17
Promene na koži	10
Neurološki poremećaji	10
Groznica	10
Predispozicija za abnormalnu hemoragiju	10
Patološki nalazi	Prevalancija (%)
Sedimentacija > 30 mm/h	70
Sedimentacija > 90 mm/h	32
Bence Jones proteinurija	50
Eritrociti < $4 \times 10^{12}/L$	50
Hemoglobin < 120 g/L	46
Osteoliza	45
Ukupni proteini > 80 g/L	40
Kreatinin > 133 $\mu\text{mol}/L$	30
Trombociti < $50 \times 10^9/L$	8
Patološke frakture	18
Leukociti < $4 \times 10^9/L$	18
Leukociti > $10 \times 10^9/L$	12
Kalcijum < 2,25 mmol/L	17
Kalcijum > 2,75 mmol/L	16

loma i može biti prisutan čak i kod 90% pacijenata. Poremećaj u kostima nastaje kao rezultat bliske interakcije mijelomskih ćelija i osteoklasta, što ima za posledicu povećanu aktivnost osteoklasta i koštanoj resorpciju. Sve je više dokaza da je ova interakcija recipročna, odnosno mikrokruženje koštane srži stimuliše rast mijeloma. Osteoklasti, osteoblasti i ćelije strome su stimulirane da ekspresuju i sekretuju mijeloma stimulišuće citokine. Interleukin 6 (IL-6) je možda najvažniji faktor rasta. Stvara se u velikim količinama u koštanoj srži kod multiplog mijeloma od strane osteoklasta i ćelija strome i njegova sekrecija je regulisana IL-1- β koga stvaraju tumorske ćelije (6). Međutim, mnogi pacijenti su asimptomatični u prezentaciji bolesti, i upućeni su na medicinsku negu zbog blage anemije ili povećane vrednosti ukupnih proteina u rutinskim laboratorijskim nalazima. Prevalencija kliničkih simptoma i patoloških nalaza je prikazana u tabeli II (8).

Dijagnoza i tretman

Dijagnoza multiplog mijeloma se postavlja na osnovu nekoliko kriterijuma koji uključuju sledeće: monoklonski M protein u plazmi i/ili u urinu, infiltraciju plazma ćelija u koštanoj srži, prisustvo litičkih lezija pri radiografiji skeleta, anemiju i hiperkalcemiju. Dijagnoza se delimično zasniva proizvoljnim kriterijumima i često

zahteva posmatranje pacijenata izvesno vreme. M protein je tumorski marker za multipli mijelom. Jedinstven je među tumorskim markerima pošto nema njegove produkcije i ekspresije od strane drugih ćelija u bilo kom stadijumu razvoja. Međutim, M komponente su često prisutne i kod drugih monoklonskih proliferacija plazma ćelija, koje su u području od potencijalnih benignih stanja (MGUS) do malignih tumora (plazmocitomi, WM, bolest teških lanaca i AL amiloidoza) (Tabela I). Prema tome, dodatne dijagnostičke procedure su potrebne za diferencijaciju ovih poremećaja (9).

Distribucija M proteina po imunoglobulinskim klasama je otprilike sledeća: 73% su IgG, 14% su IgM, 11% su IgA i retko IgD ili IgE; 62% su kapa i 38% su lambda tipa. Postoji izvesna povezanost između izotipa i bolesti – IgM paraprotein je veoma redak kod mijeloma, ali je uobičajen kod limfoma (WM), a kod AL amiloidoze je lambda tip češći od kapa. Kod mijeloma sinteza lakih lanaca obično premašuje sintezu teških lanaca, a u oko 20% slučajeva kapacitet sinteze teških lanaca je izgubljen i samo se stvaraju laki lanci. Zbog njihove male molekulske mase (22 000 daltona), oni podležu renalnoj glomerularnoj filtraciji, tubularnoj reapsorciji i katabolizmu. Kada se premaši kapacitet tubularnih ćelija laki lanci se izlučuju u urinu (9).

Biopsija koštane srži se uzima iz sternuma ili ilijačne kosti i prisustvo bar 10% atipičnih plazma ćelija je opšte prihvaćeno kao dijagnostički kriterijum mijeloma. Atipična morfologija uključuje nuklearnu/citoplazmatsku asinhroniju, abnormalnosti nukleusa i različitost u veličini (10). Koristi se nekoliko *imaging* tehnika za ispitivanje koštanih lezija kod multiplog mijeloma i drugih monoklonskih gamopatija: radiografija, scintigrafija (npr. sa izotopom tehnecijuma), kompjuterizovana tomografija (CT) i magnetna rezonanca.

Za brojne proteine, citokine i faktore rasta, koji se mogu određivati u serumu, je pokazano da imaju prognostičku informaciju za mijelom. Ova grupa markera uključuje β_2 -mikroglobulin, C-reaktivni protein, interleukin-6, solubilni IL-6 receptor (sIL-6R), faktor rasta hepatocita (HGF), hijaluronan i vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF). Beta-2-mikroglobulin je konstantan deo molekula humanog MHC (*major histocompatibility complex*) klase I lokalizovanih na membrani svih nuklearnih ćelija. Njegova koncentracija je povećana kod renalne insuficijencije i takođe kod svih limfoproliferativnih bolesti zbog povećanog stvaranja. Kod mijeloma postoji visoka korelacija između nivoa β_2 -mikroglobulin u serumu i veličine tumora. Visoki nivoi u serumu su jak nezavisno nepoželjan prognostički faktor kod mijeloma (11).

Objavljeno je nekoliko sistema za utvrđivanje stadijuma multiplog mijeloma, međutim još uvek se upotrebljava *Durie/Salmon* sistem koji koristi nivo M proteina u serumu i urinu, veličinu koštane lezije, kao i koncentracije hemoglobina, kalcijuma i kreatinina za definisanje stadijuma (12). Novi internacionalni sistem za klasifikaciju stadijuma mijeloma zasniva se na koncentraciji β_2 -mikroglobulina i albumina (Tabela III) (13).

Tabela III Internacionalni sistem za klasifikaciju stadijuma multiplog mijeloma

Stadijum	β_2 -mikroglobulin, mg/L	Albumin, g/L
I	< 3,5	> 35
II	Niti stadijum I, niti stadijum III, što znači: a) β_2 -mikroglobulin je 3,5–5,5 mg/L, bez obzira na vrednost albumina ili b) albumin je < 35 g/L, β_2 -mikroglobulin < 3,5 mg/L	
III	> 5,5	> 35

Serijska određivanja M proteina u serumu i urinu se takođe koriste za praćenje odgovora na tretman i toka bolesti kod monoklonskih gamopatija. Smanjenje vrednosti M proteina u serumu do manje od 50% u odnosu na vrednost pre tretmana, a u urinu do manje od 0,2 g/24 sata je generalno prihvaćeno kao kriterijum za delimičan odgovor na terapiju. Kompletan odgovor zahteva nestanak merljivih vrednosti M proteina iz seruma ili urina i da koštana srž sadrži manje od 5% plazma ćelija. Kod pacijenata koji reaguju na terapiju, nivo M proteina teži da se stabilizuje bez obzira na dalji tretman, što ukazuje da je bolest došla do stabilne faze, koja se obično definiše kao promena nivoa paraproteina za manje od 10% u tri određivanja po mesečnim intervalima. Postizanje stabilne faze bolesti je poželjan prognostički znak i od većeg je značaja nego stepen odgovora (9).

Mada su nedavno uvedene nove terapije, multipli mijelom ostaje neizlečiv. Za tretman multiplog mijeloma i drugih monoklonskih gamopatija koristi se citotoksična terapija (melfalan, prednizon, interferon- α), necitotoksična terapija (imunomodulatorni lekovi – talidomid; inhibitori osteoklastne resorpcije – bisfosfonati), terapija za komplikacije bolesti (eritropoetin, plazmafereza, opioidni analgetici) i dr. (14). Autologna hematopoetska ćelijska transplatacija (HCT, *Hematopoietic cell transplantation*) je standardna terapija naročito kod mlađih pacijenata. Ciljevi terapije uključuju poboljšanje opšteg preživljavanja kao i kvaliteta života. Ispitivanja su pokazala da pacijenti kod kojih je primenjena hemoterapija sa visokim dozama zajedno sa HCT imaju produženo vreme preživljavanja od oko godinu dana i da je trend produžavanja vremena preživljavanju usmeren ka pacijentima sa visoko rizičnom bolešću (β_2 -mikroglobulin >8,0 mg/L) (14–16). Upotreba bisfosfonata i rekombinatnog eritropoetina potvrdila je da je korisna u smanjivanju skeletnih poremećaja kao i simptomatskih anemija kod ovih pacijenata.

Tumorski markeri kod monoklonskih gamopatija: NACB preporuke

Preporuke NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) i NACB (*National Academy of Clinical Biochemistry*) grupe eksperata za primenu tumorskih markera kod monoklonskih gamopatija su prikazane u tabeli IV.

Tabela IV Preporuke NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) i NACB (*National Academy of Clinical Biochemistry*) organizacija za primenu tumorskih markera kod monoklonskih gamopatija

Marker	Primene
Elektroforeza (EF) proteina seruma (EF na agaroznom gelu ili kapilarna EF)	Dijagnoza, <i>screening</i> , praćenje bolesti
Imunofiksacija proteina seruma	Dijagnoza i identifikacija tipa klona
Koncentracija imunoglobulina	Dijagnoza i praćenje bolesti
Slobodni laki lanci u serumu	Dijagnoza i praćenje nesekretornog mijeloma, MGUS* i amiloidoze
Viskoznost	Dijagnoza sindroma hiperviskoznosti
2-mikroglobulin	Prognostička evaluacija multiplog mijeloma (prognoza je loša ako je vrednost > 4,0 mg/L)
Elektroforeza proteina urina	Dijagnoza, <i>screening</i> , praćenje bolesti
Imunofiksacija proteina urina	Dijagnoza i identifikacija tipa klona
Slobodni laki lanci u urinu	Dijagnoza i praćenje nesekretornog mijeloma, MGUS* i amiloidoze

* MGUS – *Monoclonal gammopathy of undetermined significance*

Laboratorijska dijagnoza, *screening* i praćenje

Elektroforeza proteina

Elektroforezu proteina treba uvek uraditi kada god se sumnja na multipli mijelom, *Waldenström*-ovu makroglobulinemiju ili MGUS. Monoklonski protein migrira kao poseban entitet u električnom polju i dektuje se sa nespecifičnom proteinskom bojom kao intenzivnije obojena dodatna traka na uobičajenom izgledu elektroforeze proteina. Obično se prvo uradi elektroforeza serumskih proteina. Rezultat elektroforeze proteina urina je od posebnog značaja u slučaju prisustva mijeloma lakih lanaca, gde veći deo monoklonskog proteina nije prisutan u krvi. Elektroforezu proteina uvek treba raditi u kombinaciji sa imunotipizacijom da bi se odredio tip klona. Elektroforeza proteina je ne samo korisna za dijagnozu monoklonskih gamopatija, već za praćenje toka bolesti i odgovora na terapiju kod ovih pacijenata.

Koncentracija M proteina detektovanog elektroforezom je u direktnoj korelaciji s veličinom tumora, sem u retkim slučajevima nesekretornog mijeloma. M protein obično migrira u gama ili beta regionu normalnog elektroforetskog modela, ali se može pojaviti i u alfa-2 ili čak u alfa-1 regionu. Elektroforetsko razdvajanje se tipično izvodi na agaroznim gelovima ili na silikonskim kapilarama. Ova druga tehnika se odnosi na kapilarnu zonsku elektroforezu i ima rezoluciju uporedivu sa elektroforezom na agarozu gelu (17).

Imunotipizacija

Imunotipizacija (*immunotyping*) se koristi za identifikaciju tipa (klonaliteta) M proteina primećenog na elektroforezi i za dalje ispitivanje prisustva monoklonskih proteina kada postoji sumnja uprkos normalnom proteinskom elektroforetogramu. Takođe, *screening* za sistemsku AL amiloidozu zahteva primenu imunotipizacije seruma ili urina pošto u velikoj većini slučajeva količina M proteina je suviše mala da bi se detektovala elektroforetski. Klinički slučajevi koji uvek zahtevaju primenu imunotipizacije su: prisustvo drugačijih neobjašnjenih perifernih senzornih motornih neuropatija, nefrotski sindrom, srčana insuficijencija otporna na tretman, ortostatska hipotenzija, sindrom karpalnog kanala, malapsorpcija i snažan klinički dokaz koji nagoveštava primarnu amiloidozu (3). Druge indikacije za imunotipizaciju uključuju: otkrivanje M trake niskog intenziteta u elektroforezi, negativan rutinski elektroforetski rezultat kod pacijenata koji su prethodno lečeni od multiplog mijeloma ili makroglobulinemije i identifikacija i karakterizacija biklonskih (dva M proteina) ili triklonskih (tri M proteina) gamapatija (18, 19).

Imunotipizacija se određuje ili imunofiksacijom ili »imunooduzimanjem« (*immunosubtraction*). Kod prve tehnike, uzorak pacijenta je izložen elektroforezi na agaroznom gelu u najmanje pet posebnih linija. Posle elektroforetskog razdvajanja, svaka linija se prekriva sa antitelom specifičnim za različitu klasu teškog ili lakog lanca. Antitelo reaguje sa srodnim imunoglobulinskim domenima i formira veliki kompleks koji se fiksira u gelu. Drugi nevezani proteini se ispiraju sa gela, a samo fiksirani protein se vizualizuje posle nespecifičnog bojenja. Monoklonski protein se pojavljuje kao intenzivna traka prema pozadini poliklonskog imunoglobulina iste klase. Najniža koncentracija M proteina koja se može detektovati imunofiksacijom je u serumu oko 0,2 g/L, a u urinu je oko 0,04 g/L. U urinu je niža koncentracija koja se može detektovati zbog smanjenog pozadinskog bojenja nastalog zbog prisustva poliklonskog imunoglobulina iste klase koji komigrira sa monoklonskim proteinom. Ako imunotipizacijom u serumu ili urinu nisu detektovane anti-G, anti-M ili anti-A trake, potrebno je specifično ispitati i prisustvo IgD i IgE monoklonskih proteina.

»Imunooduzimanje« se razlikuje od imunofiksacije u tome što pre elektroforeze porcije uzoraka seruma

ili urina inkubiraju sa Sepharose™ česticama obložene sa anti-teški lanac ili anti-laki lanac antitelima. Svaka porcija se inkubira sa antitelom različite specifičnosti koje se vezuje za imunoglobuline koji sadrže odgovarajuće epitope i tako ih uklanja iz rastvora (odatle je i naziv »imunooduzimanje«). Proteini supernatanta svake porcije se zatim elektroforetski razdvajaju, obično na silikonskim kapilarama i denzitometričaju. Svaka porcija se poredi sa uzorkom pacijenta koji nije inkubiran sa Sepharose™ česticama. Imunotip M proteina odgovara onom antiserumu koji uklanja M proteinsku abnormalnost koja je primećena u uzorku koji nije inkubiran sa antiserumima. Ovaj postupak je automatizovan, što ga čini pogodnim za rutinsko izvođenje imunotipizacije M proteina (20).

Kvantifikacija imunoglobulina

Kvantifikacija IgG, IgA i IgM se rutinski izvodi nefelometrijskim ili turbidimetrijskim postupcima koji mere rasutu odnosno propuštenu svetlosti do koje dovodi makromolekularna mreža formirana iz reakcije imunoglobulinskih teških lanaca sa polivalentnim antiserumom teškog lanca specifične klase. Ovi postupci su potpuno automatizovani što ih čini pogodnim za primenu u serijskom praćenju progresije bolesti kod monoklonskih gamapatija i u praćenju sindroma hiper-viskoznosti. Takođe, određivanje imunoglobulina je klinički korisno u detekciji i praćenju poliklonskih hipogamaglobulinemija koje nastaju kao posledica funkcionalnog smanjenja normalne ćelijske produkcije imunoglobulina u koštanoj srži zbog prekomerne ekspanzije malignog klona (ili klonova). Nefelometrijsko ili turbidimetrijsko određivanje specifične klase imunoglobulina obezbeđuje tačniju procenu težine bolesti nego denzitometrijska kvantifikacija imunoglobulina u elektroforetogramu naročito kod pacijenata sa visokim nivoima (> 50 g/L) M proteina (21). Međutim, za razliku od elektroforeze, ovim postupcima se ne može prepoznati biklonska gamapatija kada dva različita klona pripadaju istom izotipu. IgM 7S monomeri, IgA polimeri i IgG agregati se svi tačno određuju ovim postupcima (21).

Radijalna imunodifuzija je drugačija tehnika koja se koristila u prošlosti za kvantifikaciju imunoglobulina. Ova metoda je teška za izvođenje, vremenski zavisna, manuelna, tehnički zahtevna i potencijalno nepouzdana jer relativne proporcije pentamernih i monomernih IgM i dimernih ili monomernih IgA utiču na kvantifikaciju. Zbog ovih ograničenja, radijalna imunodifuzija se više ne preporučuje za rutinsku kvantifikaciju imunoglobulina.

Automatske nefelometrijske i turbidimetrijske tehnike koje koriste odgovarajući antiserum mogu se primeniti i za određivanje kapa i lambda lakih lanaca i za praćenje neravnoteže u odnosu njihovih vrednosti koja nastaje zbog klonalne produkcije izotipa jednog ili drugog lakog lanca od strane malignih B ćelija. Ove

metode detektuju lake lance bez obzira da li su kompleksirani sa teškim lancima ili slobodni, osim ako se koristi antiserum specifičan za slobodne lake lance. Osim toga, laki lanci mogu poticati od monoklonskog ili poliklonskog imunoglobulina. Međutim, kod određivanja lakih lanaca može doći do toga da se ne dobije patološki rezultat jer je M protein prisutan u niskoj koncentraciji prema promenljivoj vrednosti normalnih poliklonskih imunoglobulina; koncentracija svakog izotipa kao i odnos kapa/lambda može ostati u okviru referentnog opsega. Uobičajeno, određivanje kapa i lambda lanaca se ređe primenjuje nego određivanje IgG, IgA i IgM u slučaju sumnje na monoklonsku gamapatiju i u rukovođenju utvrđivanja bolesti.

Međutim, nedavno je ponovo u interesu određivanje slobodnih lakih lanaca (SLL) u serumu. To je zbog dostupnosti specifičnih testova značajno poboljšane osetljivosti kojima se dobija jedan tačan odnos »slobodan kapa/slobodan lambda«, što zauzvrat obezbeđuje pouzdan numerički indeks klonaliteta (22). Ovaj napredak je značajno promenio način na koji se pacijenti sa tzv. nesekretornim mijelomom ili sa AL amiloidozom dijagnostikuju i posle toga rukovode za vreme terapije (23, 24). Takođe je pokazano kod MGUS da pacijenti sa abnormalnim odnosom SLL, imaju veći rizik od maligne progresije u poređenju od pacijenata sa normalnim odnosom SLL (25).

Ranije se smatralo da 3% pacijenata sa mijelomom, kod kojih nije dokazano prisustvo M proteina u serumu i urinu primenom imunofiksacije, imaju »nesekretornu« bolest. Pretpostavljalo se da je u većini ovih slučajeva paraprotein lokalizovan u citoplazmi mijelomskih ćelija i da se ne sekretuje (9). Sada je evidentno da većina ovih pacijenata ima niske, ali bez obzira na to, abnormalne koncentracije SLL u serumu. Jedna studija je pokazala da je kod 19 od 29 pacijenata sa nesekretornim mijelomom pronađeno da imaju patološki povećane vrednosti SLL u serumu uz patološke odnose slobodni kapa/slobodni lambda (12 pacijenata sa viškom kapa lanaca i 7 pacijenata sa viškom lambda lanaca) i da za je kod njih medijana za infiltraciju plazma ćelija u koštanoj srži 50% (opseg je od 6% do 90%) (23). Nivoi slobodnih lakih lanaca su varirali u zavisnosti od aktivnosti bolesti.

Prednost određivanja SLL u serumu je u tome što u urinu koncentracija filtriranih lakih lanaca zavisi od varijabilne reapsorpcije i razgradnje u tubularnim ćelijama proksimalnog nefrona. Odnos kapa/lambda u serumu bolje odražava relativnu brzinu produkcije i više je zavistan indikator klonaliteta. U toku hemoterapije pacijenata sa multiplim mijelomom lakih lanaca (26), analiza urina daje često normalne rezultate, dok rezultati određivanja u serumu ostaju patološki, što ukazuje na superiorniju osetljivost određivanja SLL u serumu za preostalu bolest u ovoj grupi pacijenata. Ispitivanje lakih lanaca u urinu je takođe otežano i u bolestima gde se velike količine poliklonskih lakih lanaca izlučuju urinom (npr. sistemski lupus eritematosus, renalna insufi-

cijencija, tubularna disfunkcija) i gde prisustvo monoklonskih lakih lanaca može biti neprimećeno. Međutim, ispitivanje lakih lanaca u urinu je osetljivije nego imunofiksacija u urinu i obezbeđuje kvantitativan rezultat (22). Nedavno je pokazano da određivanje SLL u serumu i elektroforeze proteina seruma kao testova prve linije za razmatranje prisustva mogućih poremećaja B ćelija daje dodatnu dijagnostičku informaciju i neće biti propuštena značajna patologija ako se analiza Bence Jones proteina zameni sa određivanjem SLL u serumu (27).

Kao i kod slučaja »nesekretornog« mijeloma, kod 5% do 10% pacijenata sa amiloidozom lakih lanaca imunofiksacijom se neće dokazati monoklonska gamapatija, mada pažljivim pregledom imunohistohemijski obojenog uzorka srži prisustvo klonalne bolesti se može utvrditi u većini slučajeva. Istraživanja su pokazala da kvantitativno određivanje odnosa SLL u serumu ima veću dijagnostičku osetljivost (91%) od pojedinačnog određivanja SLL u serumu (69%) i u urinu (83%) imunofiksacijom kod pacijenata sa AL amiloidozom. Primena imunofiksacije uz određivanje odnosa SLL daje osetljivost od 99% (24). Određivanje slobodnih lakih lanaca obezbeđuje direktnu meru prisustva amiloid prekurzornog proteina, što je najvažnije za tretman pacijenata sa sistemskom AL amiloidozom (28). Stabilno smanjenje vrednosti SLL od više od 50% u odnosu na bazalnu vrednost posle tretmana je udruženo sa produženim preživljavanjem kod sistemske AL amiloidoze (29).

Viskoznost seruma

Viskoznost seruma se određuje slično viskoznosti vode primenom jednog od nekoliko komercijalno dostupnih viskozimetara. Viskoznost se može meriti sa Ostwald-ovim viskozimetrom, ili još boljim, Wells-Brookfield-ovim viskozimetrom. Referentni interval za viskoznost seruma je od 1,4 do 1,8 centipoaza (cp). Simptomi hiperviskoznosti su retko klinički prepoznatljivi sve dok viskoznost ne dostigne vrednost od 3 cp.

Određivanje viskoznosti seruma je klinički indikovano kod pacijenata sa monoklonskom gamapatijom i simptomima oronazalnog krvarenja, zamagljenog vida, dilatacije retinalnih vena, retinalnih hemoragija u obliku plamena, neobjašnjive kongestivne srčane insuficijencije, ili sa neurološkim simptomima kao što su: glavobolje, vertigo, nistagmus, gluvoća, zujanje u ušima, ataksija, diplopija, parestezija, disorijentacija, stupor ili somnolencija. Viskozitet seruma bi trebalo odrediti kada koncentracija IgM dostigne vrednost od 30 g/L, IgA od 60 g/L, a IgG od 40 g/L.

Hiperviskoznost je ređe prisutna (10%) kod pacijenata sa visokim koncentracijama monoklonskog IgG, i to je uglavnom kod IgA i IgG3 mijeloma zbog povećane tendencije ovih imunoglobulina da formiraju polimere. Češće je prisutna (30–50%) kod pacijenata sa Waldenström-ovom makroglobulinemijom i udružena

je sa povećanim nivoom monoklonskog IgM. Veza između viskoznosti seruma i koncentracije IgM je nelinearna, pošto viskoznost zavisi od molekularnih karakteristika monoklonskog proteina i njegovog stepena agregacije.

Veličina viskoznosti je u slaboj korelaciji sa kliničkim simptomima: kod nekih pacijenata pojavljuju se simptomi pri vrednosti od 4 cp, a kod nekih tek kad viskoznost dostigne vrednost od 6 do 7 cp, ili čak višu. Ranije pojavljivanje simptoma je možda zbog istovremeno prisutne organo specifične bolesti mikrovaskulature, povećanog hematokrita ili poremećaja kardiološkog statusa (30).

Krioglobulini

Krioglobulini su imunoglobulini i komponente komplekta koji precipitiraju prilikom izlaganja serumu niskim temperaturama. Krioglobulini mogu biti prisutni kod *Waldenström*-e makroglobulinemije. Klasifikuju se kao tip I (monoklonski IgM, IgG, IgA ili ređe monoklonski laki lanci); tip II (mešoviti; dva ili više imunoglobulina od kojih je jedan monoklonski) i tip III (poliklonski, gde M-protein nije nađen). Kod krioglobulinemije tip II monoklonski IgM ima aktivnost antitela protiv imunoglobulina (aktivnost reumatoidnog faktora), što ima za posledicu brzo povećanje nivoa imunokompleksa. Glavne kliničke manifestacije mešovite krioglobulinemije su: purpura »osetljiva na dodir« (*palpable purpura*), artralgija, limfadenopatija, hepatosplenomegalija, periferna neuropatija i hipokomplementemija (najčešće je prisutno smanjenje nivoa C4).

Kod pacijenata kod kojih je krioglobulinemija značajan klinički problem, treba razmotriti primenu zamene plazme i novijih terapija kao što je Rituximab™. Posle flebotomije, uzorak krvi se mora održavati na 37 °C u toku transporta do laboratorije i pre koagulacije i centrifugiranja da bi se izbegao prevremeni gubitak krioglobulina među izdvojenim ćelijama. Serum se zatim stavlja u frižider ili ledeno kupatilo i pregleda posle 24 časa na prisustvo krioprecipitata. Ako nije primećen precipitat, uzorak se drži na 4 °C još dodatnih 6 dana i ponovo se pregleda na prisustvo krioprecipitata. Ako je prisutan, precipitat se ispere na 4 °C, rastvori u zagrejanom puferu i analizira imunoelektroforezom sa monospecifičnim antiserumima da bi se utvrdio tip imunoglobulina u precipitatu (31).

Zaključak

Veliki napredak je učinjen u dijagnozi i tretmanu monoklonskih gamopatija u toku poslednje decenije. Buduće perspektive koje uključuju primenu novih analiza kao što je određivanje slobodnih lakih lanaca u serumu, će pomoći u dijagnozi i ispitivanju MGUS, do sada nedijagnostikovanog entiteta, kao i u obezbeđivanju prognostičke informacije kod sistemske AL amiloidoze. Sa dolaskom ere terapijskih strategija i dijagnostika zasnovanih na molekularnom nivou, razumevanje monoklonskih gamopatija, njihova dijagnoza i tretman će dalje napredovati.

Zahvalnost. Rad je finansiran na osnovu Ugovora br. 145010B sa MNTR Srbije.

Literatura

1. Traynor AE, Noga SJ. NCCN: Multiple myeloma. Cancer Control, 2001; 8: 78–87.
2. Kyle RA. Classification and diagnosis of monoclonal gammopathies. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. Manual of clinical laboratory immunology, 3rd ed. Washington, DC: American Society of Microbiology, 1998; 152–67.
3. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. Br J Haematol 2003; 121: 749–57.
4. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. Mayo Clin Proc 2003; 78: 21–33.
5. Herrinton LJ, Weiss NS, Olshan AF. Epidemiology of myeloma. In: Malpas JS, Bergsagel DE, Kyle R, Anderson K, eds. Myeloma: biology and management. Oxford: Oxford University Press, 1998; 150–86.
6. Vescio RA, Cao J, Hong CH, Lee JC, Wu CH, Der Danielian M, et al. Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intraclonal diversity. J Immunol 1995; 155: 2487–97.
7. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. Blood 1998; 91: 3–21.
8. Bartl R, Hoechtlen-Vollmar W, Thomas L. Monoclonal immunoglobulins. In: Thomas L, eds. Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results. 1st ed, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, Germany, 1998; 742–58.
9. Turesson I. Monoclonal gammopathies. In: Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK, eds. Tumor markers: physiology, pathobiology, technology and clinical applications. AACCC Press, Washington, USA, 2002; 305–19.
10. Greipp PR, Leong T, Bennett JM, Gaillard JP, Klein B, Stewart JA, et al. Plasmablastic morphology – an independent prognostic factor with clinical and laboratory correlates: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Myeloma Trial E9486 report by ECOG Myeloma Laboratory Group. Blood 1998; 91: 2501–7.

11. Durie BG, Stock-Novak D, Salmon SE, Finley P, Eckord J, Crowley J, et al. Prognostic value of pretreatment serum β_2 microglobulin in myeloma: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 1990; 75: 823–30.
12. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975; 36: 842–54.
13. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3412–20.
14. Singhal S, Mehta J. Multiple myeloma. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 1322–30.
15. Bjorkstrand BB, Ljungman P, Svensson H, Hermans J, Alegre A, Apperley J, et al. Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a retrospective case-matched study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 1996; 88: 4711–8.
16. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003; 348: 1875–83.
17. Bossuyt X. Separation of serum proteins by automated capillary zone electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 762–72.
18. Grosbois B, Jego P, de Rosa H, Ruelland A, Lancien G, Gallou G, et al. Triclonal gammopathy and malignant immunoproliferative syndrome. *Rev Med Interne* 1997; 18: 470–3.
19. Kyle RA, Robinson RA, Katzmann JA. The clinical aspects of biclonal gammopathies: review of 57 cases. *Am J Med* 1981; 71: 999–1008.
20. Clark R, Katzmann JA, Kyle RA, Fleisher M, Landers JP. Differential diagnosis of gammopathies by capillary electrophoresis and immunosubtraction: analysis of serum samples problematic by agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1998; 19: 2479–84.
21. Katzmann JA, Clark R, Wiegert E, Anders E, Oda RP, Clark R, et al. Identification of monoclonal proteins in serum: a quantitative comparison of acetate, agarose gel, and capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1997; 18: 1775–80.
22. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT, et al. Highly sensitive automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001; 47: 673–80.
23. Drayson MT, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith HD, Bradwell AR. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory myeloma. *Blood* 2001; 97: 2900–2.
24. Katzmann JA, Abraham RS, Dispenzieri A, Lust J, Kyle RA. Diagnostic performance of quantitative κ and λ free light chain assays in clinical practice. *Clin Chem* 2005; 51: 878–81.
25. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, Melton LJ, Bradwell AR, Clark RJ, et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Blood* 2005; 106: 812–7.
26. Bradwell AR. Serum free light chain measurements move to center stage. *Clin Chem* 2005; 51: 805–7.
27. Hill PG, Forsyth JM, Rai B, Mayne S. Serum free light chains: an alternative to the urine Bence Jones proteins screening test for monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2006; 52: 1743–8.
28. Cohen AD, Zhou P, Xiao Q, Fleisher M, Kalakonda N, Akhurst T, et al. Systemic AL amyloidosis due to non-Hodgkin's lymphoma: an unusual clinicopathologic association. *Br J Haematol* 2004; 124: 309–14.
29. Lachmann HJ, Gallimore R, Gillmore JD, Carr-Smith HD, Bradwell AR, Pepys MB, et al. Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating free immunoglobulin light chains following chemotherapy. *Br J Haematol* 2003; 122: 78–84.
30. Mehta J, Singhal S. Hyperviscosity syndrome in plasma cell dyscrasias. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 467–71.
31. Ferri C, Zignego AL, Pileri SA. Cryoglobulins. *J Clin Pathol* 2002; 55: 4–13.

Rad primljen: 12. 01. 2007.

Prihvaćen za štampu: 16. 03. 2007.