

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA MONOKLONSKIH GAMAPATIJA

Laboratory Diagnosis Of Monoclonal Gammopathy

Jelena Vlašić Tanasković

Odjel za laboratorijsku djelatnost, Opća bolnica Pula, Pula

Summary: Monoclonal gammopathies are a group of disorders characterized by monoclonal proliferation of plasma cells. Tumor marker that is specific for a monoclonal gammopathy as reflected monoclonal immunoglobulin production is called the M-protein. Monoclonal gammopathies include: multiple myeloma, Waldenstrom macroglobulinemia (WM), nonsecretory myeloma, disguised (smoldering) multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS Monoclonal gammopathy of undetermined significance), primary systemic amyloidosis and heavy chain disease. The diagnosis of multiple myeloma is based on the detection of M protein in the serum and / or urine infiltration of plasma cells in the bone marrow and lytic bone lesions on skeletal radiography. Searching and confirmation of monoclonality are performed using electrophoresis of proteins in the serum and / or urine by immunofixation in the serum and / or urine, of free light chain (SLL) in serum and / or urine.

Keywords: monoclonal gammopathy, immunofixation, monoclonal protein

UVOD

Monoklonske gamapatije (MG) su skupina bolesti koje karakterizira monoklonska proliferacija plazma stanica, a nazivaju se još paraproteinemije i disproteinemije. Plazma stanice luče imunoglobuline, a bolest je karakterizirana nalazom imunološki i elektroforetski homogenog, monoklonskog imunoglobulina (cijele molekule ili samo lakih lanaca) u serumu i/ili mokraći. Takav protein nazivamo M-protein. Klinički simptomi monoklonskih gamapatija širokog uspektra i variraju od asimptomatskog, benignog i neprogresivnog stanja do simptomatskog, malignog i agresivnog multiplog mijeloma (MM). M-protein može se naći u serumu pacijenata bez kliničkih osobitosti (nerijetko kao slučajna nalaz), a osim toga postoje i brojne bolesti koje prati sinteza monoklonskog proteina kao što su B-kronična limfatična leukemija, maligni B- limfomi i sl. Stoga je upravo zbog raznolike kliničke slike i prisutne simptomatologije, racionalna, pravovremena i svrsishodna laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija neophodna za uspješno postavljanje dijagnoze i daljnje liječenje.

KLASIFIKACIJA MONOKLONSKIH GAMAPATIJA

Osnovne kriterije za klasifikaciju monoklonskih gamapatija postavila je 2003. godine International Myeloma Working Group¹ (IMWG) prema kojoj je različite entitete moguće ispravno klasificirati na osnovu tri pokazatelja:

1. citološki nalaz plazma stanica u biopsiji koštane srži (10%)
 2. prisutnost monoklonskog proteina u serumu i/ili mokraći
 3. disfunkcija organa vezana uz multipli mijelom
- a) koštane ozljede: litičke ozljede ili osteoporoza s kompresivnim frakturama,

b) anemija (hemoglobin < 100 g/l ili 20 g/l manje od referentnih vrijednosti),

c) zatajenje bubrega (kreatinin > 173 mmol/l),

d) povećana koncentracija kalcija u serumu.

Ovi pokazatelji omogućavaju postavljanje dijagnoze, ukazuju na proširenost tj. uznapređovalost bolesti i zajedno sa drugim laboratorijskim pretragama predstavljaju standardni okvir za dijagnozu, liječenje i praćenje pacijenata s MG.

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA MONOKLONALNIH GAMAPATIJA

ELEKTROFOREZA I IMUNOFIKSACIJA

Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija započinje testovima probiranja koji se koriste za dijagnozu i kojima se dodatno utvrđuje uznapređovalost (stadij) bolesti i eventualno procjenjuje prognoza bolesti tj. ishod odabranog liječenja. Prikaz testova koji se koriste u diferencijalnoj dijagnostici monoklonskih gamapatija nalazi se u Tablici 1.

Osnovni test je elektroforeza proteina seruma i 24-satne mokraće. Elektroforeza se danas uglavnom radi pomoću visokozolotnih tehnika razdvajanja: kapilarna elektroforeza i zonska elektroforeza u gelu agaroze gdje se proteini seruma pod djelovanjem električnog polja razdvajaju na uobičajenih 5 frakcija (albumini, α 1-, α 2-, β - i γ - globulini). Razdvajanje proteina u pojedine frakcije ovisi o veličini, vrsti i naboju proteina, pri čemu se imunoglobulini nalaze uglavnom u području γ , odnosno β - γ globulina. Vizualnim pregledom denzitometrijski očitano elferograma postavlja se sumnja na prisutnost M-proteina uočavanjem karakteristične vrpce, odnosno vrška (*spike, peak*) u području γ i β globulina (slika 1).

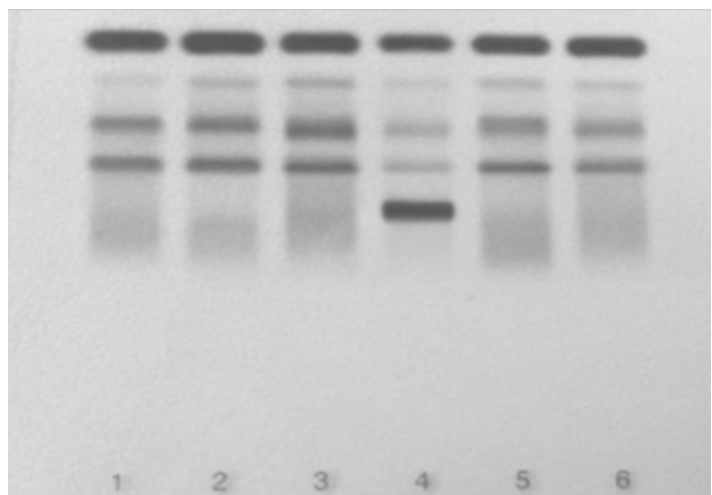
Tablica 1. Pregled postupaka koji se koriste u dijagnostici multiplog mijeloma

Testovi probiranja	Testovi za postavljanje dijagnoze	Testovi za procjenu veličine tumora i prognoze	Testovi za otkrivanje oštećenja organa	Testovi za posebne situacije
Krvna slika s diferencijalnom krvnom slikom, sedimentacija eritrocita	Pregled koštane srži citološki i histološki (aspirat koštane srži +/- biopsija)	Citogenetika i FISH stanica koštane srži	Kompletna krvna slika (anemija)	Imunohistokemija stanica koštane srži ili protočna citometrija - imunofenotipizacija radi utvrđivanja udjela zloćudnih plazma stanica
<u>Serum:</u> ureja, kreatinin, elektroliti, kalcij, albumin, urati, imunoglobulini, elektroforeza proteina <u>Mokraća:</u> elektroforeza i imunofiksacija (Bence-Jones protein)	Imunofiksacija proteina seruma	Kvantifikacija M-proteina u serumu i urinu, kalcij, albumin, beta2-mikroglobulin	Procjena funkcije bubrega (ureja kreatinin, klirens kreatinina), kalcij, albumin, LDH, CRP, imunoglobulini	Vitamin B12, folati
Rtg snimanje simptomatskih područja	Rtg snimanje svih kostiju (cijelog skeleta)	Rtg snimanje svih kostiju (cijelog skeleta)	Rtg snimanje svih kostiju (cijelog skeleta)	Magnetna rezonancija, CT ili FDG/PET radi utvrđivanja manjih oštećenja kostiju ili širenja tumora izvan koštane srži

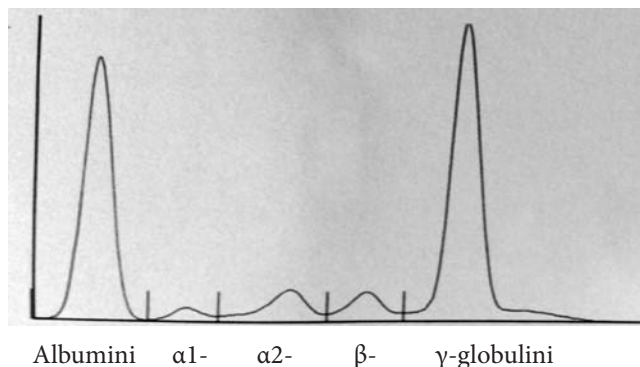
Slika 1:

- a) Elektroforeza proteina seruma u gelu agaroze.
Brojevima 1-6 označene su linije migracije za svaki od 6 ispitivanih seruma.
Linije 1-3, 5-6 : normalan nalaz;
Linija 4: monoklonska vrpca u području γ -globulina

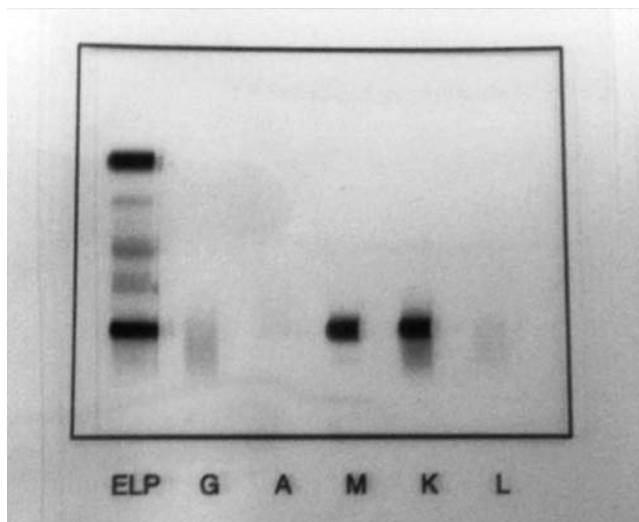
albumini →
 α 1-globulini →
 α 2-globulini →
 β -globulini →
 γ -globulini {



b) Densitometrijski prikaz elektroforeze proteina seruma (elferogram) za serum u liniji 4



Za potvrdu monoklonalnosti vrpce tj. definiranje razreda i tipa M-proteina koristi se tehnika imunofiksacije. Imunofiksacija je kombinacija elektroforeze na agarozu i imunoprecipitacije. Proteini se razdvoje elektroforetski, nakon čega se svaka linija migracije inkubira sa specifičnim protuserumima za teške (G, A, M) i lake (κ , λ) lance imunoglobulina, a rezultat izražava opisno (slika 2).



Slika 2:

Imunofiksacija proteina seruma (uzorak seruma iz linije 4 slike 1a)

Nalaz imunofiksacije: Nađen monoklonski IgM kapa tipa.

Bez obzira na rezultat elektroforeze, imunofiksaciju treba napraviti uvijek kada klinička slika upućuje na MM ili srodne bolesti zbog veće osjetljivosti same metode. Osim toga, uz jasnu kliničku sliku i/ili prisutnost vrpce u elektroforezi s negativnim nalazom imunofiksacije, treba postaviti sumnju na IgD monoklonsku gamapatiju i dodatno ispitati serum. Postupnik laboratorijskog ispitivanja za definiranje prisutnosti, te razreda i tipa M-proteina prikazan je na Slici 3.

Osobitu pažnju treba posvetiti monoklonskim gamapati-

jama kod kojih je M-protein sastavljen samo od lakih lanaca κ ili λ (tzv. MM lakih lanaca, mikroplazmocitom) kod kojih se u elektroforezi serumskih proteina najčešće ne uočava karakteristični vršak; često samo slika hipogamaglobulinemije (zbog supresije sinteze poliklonskih, "normalnih" imunoglobulina). U takvim je slučajevima neophodno učiniti elektroforezu i imunofiksaciju 24 h ugušćene mokraće radi utvrđivanja prisutnosti monoklonskih slobodnih lakih lanaca u mokraći (tzv. Bence-Jones protein, BJP) ili utvrditi prisutnost patološkog omjera slobodnih lakih lanaca kapa ili lambda u serumu. Postupnik laboratorijskog ispitivanja za definiranje prisutnosti, te razreda i tipa M-proteina prikazan je na slici 3.

Koncentraciju M proteina potrebno je pratiti densitometrijski (elektroforeza proteina), jer je osim kliničke slike, vrijednost M-proteina važan pokazatelj bolesti. Naime, monoklonsku gamapatiju neutvrđenog značaja (engl. *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*, MGUS) rijetko prati koncentracija M-proteina veća od 30 g/L te nema kliničkih znakova bolesti odnosno disfunkcije organa vezane uz MM. S druge strane, MM prati visoka koncentracija M proteina, a zloćudna preobrazba plazma stanica rezultira poticanjem razvoja osteoklasta uz razvoj hiperkalcemije, osteolitičkih lezija te osteopenije. Osim toga, supresija normalne hematopoeze rezultira anemijom, trombocitopenijom i imunodeficijencijom, a sistemski se učinak M-proteina najčešće očituje bubrežnim oštećenjem, hiperviskoznim sindromom, sekundarnom amiloidozom te poremećajem sustava koagulacije.

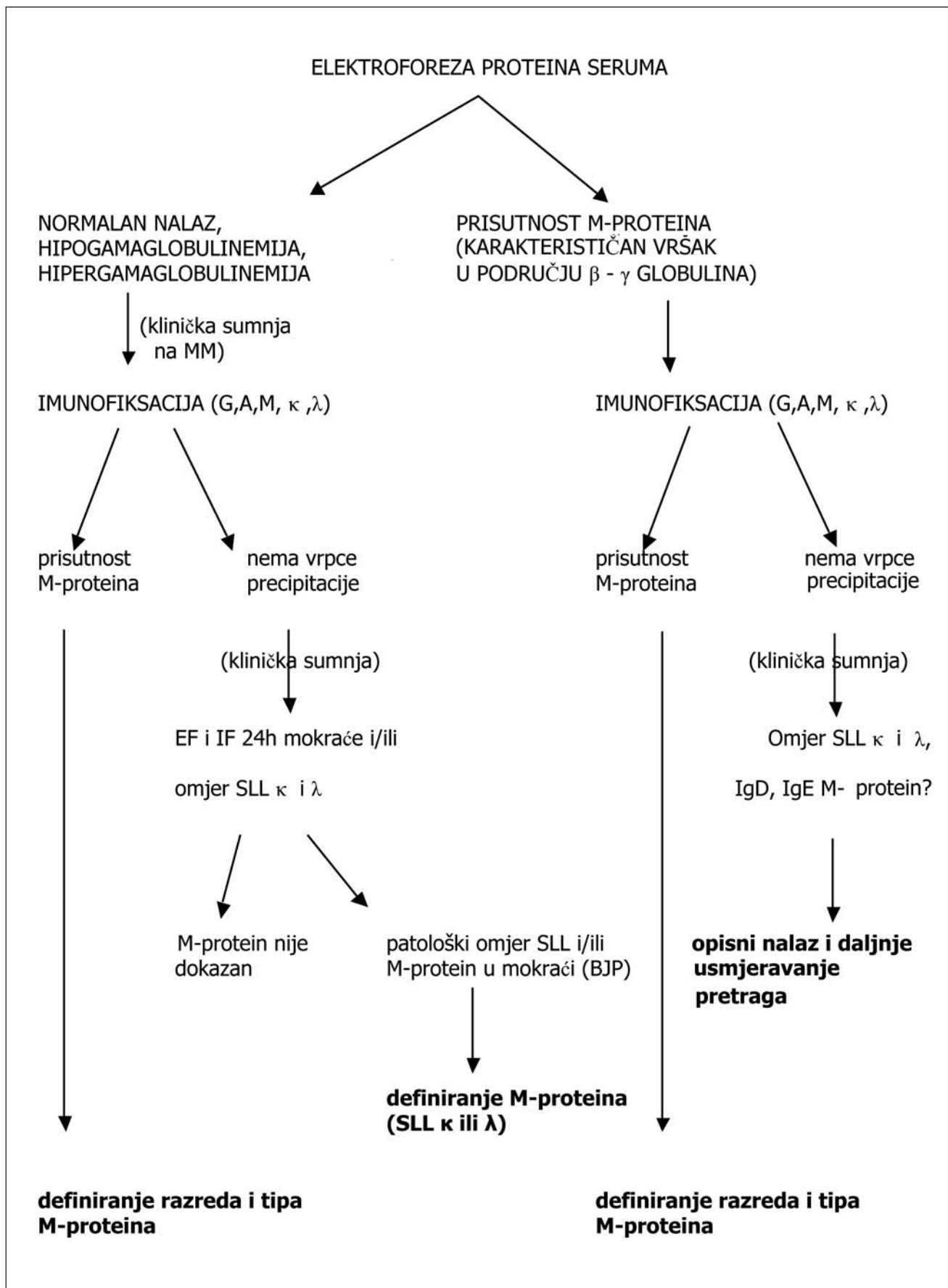
BIOKEMIJSKE PRETRAGE I SPECIFIČNI PROTEINI

Koncentracija svih imunoglobulina (monoklonskih i poliklonskih) određuje se nefelometrijski ili turbidimetrijski (kvantitativno) radi ukupne procjene stanja pacijenta. Iako densitometrija jedina uspješno razlučuje monoklonsku od poliklonske pozadine, kvantitativno određivanje svih imunoglobulina potrebno je osobito u slučajevima kada je M-protein male koncentracije i/ili migrira u područje beta globulina (npr. IgA, zbog nemogućnosti jasnog razdvajanja od drugih proteina i poliklonskih imunoglobulina).

Osim specifičnih i usmjerenih testova kojima se definira i određuje vrsta i koncentracija M-proteina, potrebno je provesti testove kojima se procjenjuje opće stanje pacijenta te zahvaćenost drugih organa i organskih sustava. U tu se svrhu određuje kompletna krvna slika s diferencijalnom krvnom slikom, kreatinin, kalcij, albumin, LDH, CRP te β 2-mikroglobulin. Dijagnoza se postavlja na osnovu dobivenih rezultata, a prema kriterijima IMWG.

Iako je biopsija koštane srži postupak indiciran u diferencijalnoj dijagnostici MM, kod pacijenata s kliničkim MGUS-om, koncentracijom M-proteina < 15g/l i bez oštećenja drugih organskih sustava, ona može biti odgođena. Kod takvih je pacijenata potrebno pratiti koncentraciju M-proteina i druge laboratorijske testove kojima se utvrđuje

Slika 3. Laboratorijski postupnik za definiranje razreda i tipa M-proteina



prisutnost poremećaja vezanih uz MM (hiperkalcemija, zatajenje bubrega, anemija i litičke lezije kostiju).

SLOBODNI LAKI LANCI

Slobodni laki lanci (SLL) kapa i lambda uobičajeno se nalaze u serumu u niskim koncentracijama. Stvaraju se u plazma stanicama gdje su potrebni za sintezu intaktnih imunoglobulina, a suvišak se izlučuje putem bubrega. Koncentracija slobodnih lakih lanaca u krvi rezultat je dinamike i međudnosa u njihovoj sintezi i mogućnosti izlučivanja putem bubrega. Povišene koncentracije SLL mogu biti rezultat maligne transformacije i proliferacije plazma stanica u MM, ali i kroničnog bubrežnog zatajenja (zbog smanjenog izlučivanja). Dok su kod kroničnog bubrežnog zatajenja i poliklonske proliferacije plazma stanica povišene koncentracije oba tipa lakih lanaca (kapa i lambda), u multiplom mijelomu normalan se omjer mijenja zbog povećane sinteze samo jednog tipa lanca. Stoga je biljeg monoklonske sinteze lakih lanaca patološki odnos kapa i lambda lakih lanaca: povišen kod monoklonske sinteze kapa lanca, odnosno snižen kod monoklonske sinteze lambda lakih lanaca.

Određivanje omjera kapa i lambda lakih lanaca u serumu znatno je povećalo dijagnostičku osjetljivost laboratorijskih metoda koje se koriste u početnom dijagnostičkom probiru na MM i u tom smislu prestaje potreba za uzorkom 24 h mokraće. Normalan nalaz elektroforeze i imunofiksacije serumskih proteina, uz normalan omjer kapa i lambda SLL isključuje potrebu za pretragama urina. S druge strane, ukoliko se dokaže proliferativna bolest plazma stanica, preporuke za određivanjem monoklonskih SLL u urinu metodom elektroforeze i imunofiksacije ostaju.

Prema preporukama IMWG određivanje SLL od velikog je prognostičkog značaja u gostovo svim proliferativnim bolestima plazma stanica. Osim toga, omogućuje kvantitativno praćenje pacijenata s oligosekretornim bolestima plazma stanica kao što su amiloidoza lakih lanaca, oligosekretorni MM i gotovo dvije trećine pacijenata do sada definiranih kao nesekretorni MM. Osim toga, normalizacija omjera SLL uključena je u kriterije za definiciju potpune remisije bolesti (engl. *stringent Complete response*, sCR).

PROGNOSTIČKI POKAZATELJI I SUSTAV STUPNJEVANJA

Niz kliničkih i laboratorijskih pokazatelja vezani su uz prognozu MM, a sustav Durie-Salmon koji je razvijen prije više od 30 godina još je uvijek koristan i praktičan za stupnjevanje tumorskog opterećenja. Pri tome su pacijenti svrstani u jedan od 3 stadija (stadij I – mala stanična masa, stadij III – velika stanična masa) prema vrijednostima i stupnju anemije, hiperkalcemije, vrijednosti M-proteina u serumu i urinu te leziji kostiju. Za dodatnu suklasifikaciju koristi se kreatinin kao pokazatelj bubrežne funkcije.

U novije vrijeme je predložen sustav stupnjevanja od

IMWG koji koristi kombinaciju serumskog albumina te beta 2-mikroglobulina. Stadiju I pripadaju pacijenti s vrijednostima beta 2-mikroglobulina < 3,5 mg/L i albumina > 35 g/L, a stadiju III pacijenti s beta 2-mikroglobulinom > 5,5 mg/L (slika 4).

Slika 4: Osnovni kriteriji internacionalnog sustava stupnjevanja

Stadij I	Beta 2-mikroglobulin < 3,5 mg/l Albumin > 35 g/L
Stadij II	Beta 2-mikroglobulin > 3,5 mg/l Albumin > 35 g/L ili Beta 2-mikroglobulin < 3,5 mg/l Albumin < 35 g/L
Stadij III	Beta 2-mikroglobulin > 3,5 mg/l Albumin < 35 g/L

PROCJENA ODGOVORA NA TERAPIJU

Multipli mijelom u većini bolesnika nije izlječiva bolest, stoga je cilj liječenja postići remisiju bolesti, održati je što duže te time zaustaviti ili usporiti njenu progresiju. Pristup liječenju velikim dijelom ovisi o općem stanju, komorbiditetu i dobi. Bez obzira na način liječenja, u tijeku i nakon odabranog načina liječenja provode se gotovo svi opisani laboratorijski testovi za procjenu odgovora na terapiju. Prema dobivenim rezultatima pacijenti se svrstavaju u subkategorije potpune remisije (*Complete Response*, CR i *stringent Complete Response*, sCR), vrlo dobrog parcijalnog odgovora (*Very Good Partial Response*, VGPR), parcijalnog odgovora (*Partial Response*, PR), stabilne bolesti (*Stable Disease*, SD) i progresivne bolesti (*Progressive Disease*, PD). Laboratorijski testovi ključni za ovu klasifikaciju su elektroforeza i imunofiksacija proteina seruma, vrijednosti M-proteina, te omjer kapa i lambda SLL u serumu i urinu.

ZAKLJUČAK

Poznavanje i ciljano korištenje pravih laboratorijskih testova, uz osnovanu kliničku sumnju, omogućuje gotovo nedvojbenu i pravovremenu dijagnozu pacijenata s multiplim mijelomom. Smjernice IMWG nastale kao rezultat iskustva kliničara, kliničkih studija i razvoja laboratorijskih testova u dijagnostici MM pridonijele su jednostavnijem prepoznavanju, klasifikaciji i praćenju pacijenata s MM.

Literatura

1. The International Myeloma Working Group. *Criteria for the Classification of Monoclonal Gammopathies, Multiple Myeloma and Related Disorders: A Report of the International Myeloma Working Group*. British Journal of Haematology 2003, 121: 749-757.
2. Haemato-oncology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology (BCSH) and UK Myeloma Forum. *Guidelines for the Diagnosis and Management of Multiple Myeloma 2013*. www.ukmf.org.uk/guidelines-page/bshukmf-guidelines/, prosinac 2014.
3. Damir Nemet, *Suvremena dijagnostika i liječenje multiplog mijeloma*, u: Danica Matišić (ur.), *Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija*, Medicinska naklada, Zagreb 2014.
4. Kyle RA, Rajkumar SV. *Criteria for Diagnosis, Staging, Risk Stratification and Response Assessment of Multiple Myeloma*. Leukemia 2009, 23(1): 3-9.
5. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek Rpalumbo A, et al. *International Myeloma Working Group Guidelines for Serum-Free Light Chain Analysis in Multiple Myeloma and Related Disorders*. Leukemia 2009, 23: 215-224.
6. Greip PR, San Miguel JF, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, et al. *International Staging System for Multiple myeloma*. J Clin Oncol 2005, 23: 3412-3420.
7. Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS, Blade J, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, et al. *International Uniforme Response Criteria for Multiple Myeloma*. Leukemia 2006, 20: 1467-1473.

Adresa za dopisivanje:

Jelena Vlašić-Tanasković, spec. med. biokem.,
Odjel za laboratorijsku dijagnostiku
Opća bolnica Pula, Zagrebačka 30, 52100 Pula
tel. 052/376-811,
e-mail: jelena.vlasictanaskovic@gmail.com