Otkrivanje rezidualne bolesti u bolesnika s multiplim mijelomom

Batinić, Josip

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:622509

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







Središnja medicinska knjižnica

Batinić, Josip (2015) ***Otkrivanje rezidualne bolesti u bolesnika s multiplim mijelomom [Detection of residual disease in multiple myeloma patients].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/2232

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SADRŽAJ:

1 **UVOD** 1
1.1. Definicija bolesti 1
1.2. Epidemiologija 1
1.3. Etiologija 1
1.4. Patogeneza 3
1.5. Klinička slika 5
1.6. Klasifikacija bolesti 6
1.7. Dijagnostika i praćenje multiplog mijeloma 8
1.8. Dijagnostički kriteriji 13
1.9. Prognostički čimbenici 15
1.10. Liječenje multiplog mijeloma 16
1.10.1. Liječenje bolesnika koji su kandidati za transplantaciju autolognih matičnih stanica 17
1.10.2. Liječenje bolesnika koji nisu kandidati za transplantaciju autolognih matičnih stanica 19
1.10.3. Liječenje bolesnika s relapsom, refraktornom bolesti ili bolesti u progresiji 20
1.10.4. Terapija održavanja 20
1.10.5 Potporna terapija 22
1.11. Procjena odgovora na liječenje 24
1.12. Značenje dubine odgovora 25

2 **ZNAČENJE ODREĐIVANJA MONOKLONSKOG PROTEINA** 27
2.1. Slobodni laki lanci 28
2.2. Monoklonski imunoglobulini – monoklonski izotipovi teškog/lakog lanca (Ig'κ ili Ig'λ) 30
2.3. Imunofenotipizacija koštane srži 33

3 **HIPOTEZE** 35

4 **CILJEVI ISTRAŽIVANJA** 36

5 **ISPITANICI I METODE** 37
5.1. Ispitanici i plan rada 37
5.2. Metode 37
5.2.1. Plan rada 37
5.2.2. Definicija stanja multiplog mijeloma 38
5.2.3. Mjerenje koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu 38
5.2.4. Kvantifikacija monoklonskih izotipova teškog/lakog lanaca imunoglobulina 39
5.2.5. Standardni laboratorijski testovi 40

5.2.5.1. Elektroforeza i imunofiksacija protiena u serumu 40
5.2.5.2. Mjerenje koncentracije ukupnih imunoglobulina 41
5.2.5.3. Ostali laboratorijski pokazatelji 41
5.3. Imunofenotipizacija stanica koštane srži protočnom citometrijom 42
5.3.1. Metode uzorkovanja stanica koštane srži 42
5.3.2. Postupak imunofenotipizacije 42
5.4. Statistička analiza podataka 43

6 **REZULTATI** 44
6.1. Karakteristike promatrane populacije 44
6.1.2. Monoklonski izotipovi u ispitanika s IgG tipom mijeloma 45
6.1.3. Monoklonski izotipovi u ispitanika s IgA tipom mijeloma 48
6.1.4. Rezultati analize cijele grupe bolesnika 51
6.1.5. Utjecaj vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i Ig´κ/Ig´λ omjera na ukupno preživljenje bolesnika 52
6.1.6. Utjecaj vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i Ig´κ/Ig´λ omjera na dužinu vremena do progresije bolesti 54
6.1.7. Ostali čimbenici koji utječu na ukupno preživljenje i dužinu vremena do progresije bolesti 57
6.1.8. Određivanje monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i Ig´κ/Ig´λ omjera u ispitanika s negativnom imunofiksacijom (bolesnici u kompletnoj remisiji) 60
6.1.9. Kvantitativno određivanje monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca imunoglobulina Ig´κ/Ig´λ omjera i multiparametarska imunofenotipizacija 61
6.1.10. Multivarijatna analiza za cijelu grupu ispitanika 63
6.2. Ne-monoklonski izotip teškog/lakog lanca imunoglobulina, pokazatelji bolesti i ishod mijeloma 64

7 **RASPRAVA** 66
7.1. Dosadašnje spoznaje 66
7.2. Osjetljivost metode za kvantifikaciju monoklonskih izotipova teškog/lakog lanaca u serumu i Ig´κ/Ig´λ omjera u detekciji monoklonskog proteina 68
7.3. Osjetljivost metode za kvantifikaciju monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca u serumu i Ig´κ/Ig´λ omjera u procjeni stanja kompletne remisije 71
7.4. Odnos omjera Ig´κ/Ig´λ izotipova imunoglobulina i omjera κ/λ slobodnih lakih lanaca u serumu 73
7.5. Odnos vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca u serumu i Ig´κ/Ig´λ omjera i postotka infiltracije koštane srži plazma stanicama 75

7.6. Utjecaj vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca u serumu i Ig´κ/Ig´λ omjera na ishod liječenja bolesnika 78
7.6.1. Utjecaj ostalih čimbenika na ishod bolesnika 80
7.7. Odnos vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca u serumu i Ig´κ/Ig´λ omjera s prognostičkim čimbenicima (vrijednosti serumskog albumina i beta-2-mikroglobulina)..... 81
7.8. Abnormalna vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera kao nezavisni prognostički čimbenik – multivarijatna analiza 83
7.9. Značenje supresije ne-monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca imunoglobulina 84

8 **ZAKLJUČCI** 87

9 **SAŽETAK** 88

10 **SAŽETAK NA ENGLESKOM** 89

11 **LITERATURA** 90

12 **ŽIVOTOPIS** 101

POPIS KRATICA:

bFGF (eng. basic fibroblast growth factor) – fibroblastni čimbenik rasta

CAM-DR (eng. cell adhesion-mediated drug resistance) – otpornost na lijekove posredovana vezanjem na stanicu

CD (eng. cluster of differentiation) – stanični biljeg diferencijacije

CR (eng. complete response) – kompletna remisija (KR)

CRP (eng. C-reactive protein) – C reaktivni protein

CT – kompjuterizirana tomografija

CTD – kemoterapijski protokol (Ciklofosfamid/Talidomid/Deksametazon)

DKK1 (eng. Dickkopf-related protein 1) – Dickkopf srodan protein 1

DT-PACE – kemoterapijski protokol (Deksametazon/Talidomid/Platina/Adriamicin/ Ciklofosfamid/Etopozid)

ECOG (eng. Eastern Cooperative Oncology Group) – naziv radne skupine

EDHAP – kemoterapijski protokol (Etopizid/Deksametazon/Cisplatina/Ara-C).

EFS (eng- event free survival) – preživljenje bez događaja

FcRn (eng. neonatal Fc receptor) – neonatalni receptor za Fc kraj molekule imunoglobnulina

FISH (eng. fluorescent in-situ hybridisation) – fluorescentna in-situ hibiridizacija

GEP (eng. gene expression profiling) – postupak analize ekspresije gena

GSK-3β (eng. glycogen synthase kinase 3β) – kinasa 3 β glikogen sintaze

HGF (eng. hepatocyte growth factor) – hepatocitni čimbenik rasta

HLA (eng. human leukocyte antigen) – humani leukocitni antigeni

ICAM-1 (eng. intercellular adhesion molecule 1) – molekula unutarstanične adhezije

IgA - imunoglobulin teškog lanca razreda A

IgAκ, IgAλ – izotipovi imunoglobulina teškog lanca razreda A i kappa (κ) ili lambda (λ) tipa lakog lanca

IgD - imunoglobulin teškog lanca razreda D

IGF (eng. insulin-like growth factor 1) – inzulinu sličan čimbenik rasta 1

IgG - imunoglobulin teškog lanca razreda G

IgGκ, IgGλ – izotipovi imunoglobulina teškog lanca razreda G i kappa (κ) ili lambda (λ) tipa lakog lanca

IgM - imunoglobulin teškog lanca razreda M

IgMκ, IgMλ – izotipovi imunoglobulina teškog lanca razreda M i kappa (κ) ili lambda (λ) tipa lakog lanca

IL – interleukin

IMWG (eng. International Myeloma Working Group) – međunarodn radna skupina za mijelom

ISS (eng. International staging system) – međunarodna klasifikacija za stupnjeve bolesti

JAK/STAT3 (eng. Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3) – Janus kinaza/prenositelj signala i aktivator transkripcije

kDa – kiloDalton; mjerna jedinica

LDH – enzim laktat dehidrogenaza

LFA-1 (eng. leukocyte function-associated antigen 1) – antigen pridružen funkciji leukocita

MEK/ERK, Ras/Raf (eng. mitogen-activated protein kinase/extracellular signal–regulated kinase) – protein-kinaza aktivirana mitogenom/kinaza regulirana izvanstaničnim signalom

MGUS (eng. monoclonal gammopathy of undetermined significance) – monoklonalna gamapatija neutvrđenog značenja

MIP-1α (eng. macrophage inflammatory protein 1α) – makrofagni upalni protein 1α

MP – kemoterapijski protokol (Melfalan/Prednizon)

MPR – kemoterapijski protokol (Melfalan/Prednozon/Revlimid(lenalidomid)

MPT – kemoterapijski protokol (Melfalan/Prednizon/Talidomid)

MR – magnetska rezonancija

MR (eng. minimal response) – minimalni odgovor

mTOR (eng. mammalian target of rapamycin) – meta za rapamicin

MYC; NRAS/KRAS; RB1 - protonkogeni

NF-κB (eng. nuclear factor κB) – nuklearni (jezgrin) čimbenik kapa B

novodg. – novodijagnosticirana bolest

OPG – osteoprotegerin

OS (eng. overall survival) – ukupno preživljenje

PCR (eng. polymerase chain reaction) – lančana reakcija polimeraze

PD (eng. progressive disease) – progresivna bolest

PET-CT – pozitron emisijska tomografija udružena s kompjuteriziranom tomografijom

PFS (eng. progression free survival) – preživljenje bez progresije bolesti

PI3K (eng. phosphatidylinositol 3-kinase) – fosfatidil-inozitol 3 kinaza

PKC (eng. protein kinase C) – protein kinaza C

PR (eng. partial response) – parcijalna remisija

PTHrP (eng. paratyreoid hormon related protein) - protein srodan paratireoidnom hormonu

RANK (eng. receptor activator of NF-κB) – receptor za aktivaciju NF-κB

RANKL - RANK ligand

sCR (eng. stringent complete response) – striktna kompletna remsija (sKR)

SD (eng. stabile disease) – stabilna bolest

SDF-1α (eng. SC-derived factor 1α) – čimbenik 1α porijeklom iz stromalnih stanica

t(11;14), t(14;16), t(4;14) – translokacije kromosoma (npr. 11. na 14. i sl.)

TGF-β (eng. transforming growth factor β) – transformirajući čimbenik rasta β

TNF-α (eng. tumor necrosis factor α) – čimbenik tumorske nekroze α

TTP (eng. time to progression) – vrijeme do progresije

VAD – kemoterapijski protokol (Vinkristin/Adriamicin/Deksametazon)

VCAM-1 (eng. vascular cell–adhesion molecule 1) – adhezijska molekula na stanicama vaskularnog endotela

VEGF (eng. vascular endothelial growth factor) – čimbenik rasta vaskularnog endotela

VGPR (od eng. very good partial remission) – vrlo dobra parcijalna remisija

VLA-4 (eng. very late antigen 4) – kasni antigen 4

VMP – kemoterapijski protokol (Velcade(bortezomib)/Melfalan/Prednizon)

1. **UVOD**

1.1. Definicija bolesti

Multipli mijelom je zloćudna novotvorina krvotvornog sustava svrstavana u skupinu zloćudnih novotvorina zrelih B limfocita prema podjeli Svjetske zdravstvene organizacije (SZO). Multipli mijelom je karakteriziran nekontroliranom monoklonskom proliferacijom plazma stanica u koštanoj srži. Budući da zloćudne plazma stanice uglavnom zadržavaju sposobnost sinteze i izlučivanja imunoglobulina, jedno od glavnih obilježja bolesti je nalaz monoklonskog proteina (cijele molekule imunoglobulina i/ili samo lakih lanaca) u serumu i/ili urinu. Kako stvara monoklonski protein mijelom je jedan od najvažnijih uzroka monoklonskih gamapatija (tablica 1)[1], bolesti s proliferacijom jednog klona plazma stanica koje stvaraju imunološki homogeni protein poznat kao paraprotein ili monoklonski protein (M – protein, pri čemu M znači monoklonski). Ovisno o stadiju bolesti uz monoklonski protein, bolest obilježavaju različit stupanj koštanih, osteolitičkih promjena, anemija, hiperkalcemija, bubrežno oštećenje, hiperviskozni sindrom, poremećaj zgrušavanja krvi.

1.2. Epidemiologija

Incidencija multiplog mijeloma iznosi 4,2 do 4,8 na 100 000 stanovnika godišnje.[2] Učestalost bolesti raste s dobi, medijan dobi pri dijagnozi je 68 godina[3], a nešto je veća učestalost u muškaraca te u pripadnika crne rase. To je nakon ne–Hodgkinovih limfoma druga najčešća zloćudna novotvorina krvotvornog sustava i čini 8 do 10% svih hematoloških zloćudnih novotvorina, odnosno oko 1% svih malignih novotvorina.[4]

1.3. Etiologija

Etiologija bolesti još uvijek je nepoznata, moguće da postoji genska predispozicija. Kao mogući okolišni/vanjski uzroci navode se utjecaj radioaktivnog zračenja, kronična antigena stimulacija virusima te višegodišnja izloženost pesticidima i sredstvima za čišćenje.[5,6]

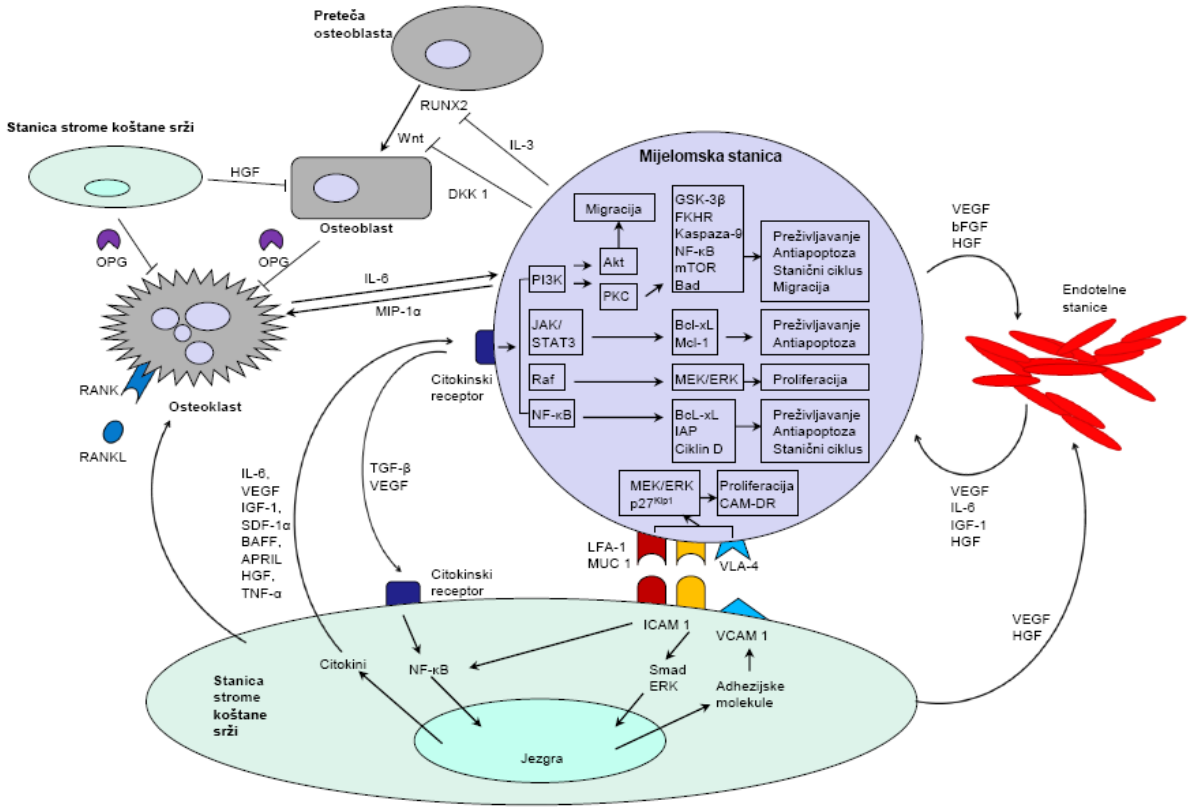
Tablica 1. Stanja udružena s prisutnošću monoklonalne gamapatije.[1]

Poremećaji plazma stanica
Monoklonalna gamapatija neutvrđena značenja (MGUS)
Biklonalna gamapatija neutvrđena značenja
Idiopatska Benca-Jones proteinurija
Sindrom POEMS (polineuropatija, organomegalija, endokrinopatija, monoklonski protein, kožne promjene); Osteosclerotični mijeloma
Castelmanova bolest
AL amiloidoza (lakih lanaca); bolesti odlaganja lakih i teških lanaca
Solitarni plazmocitom
Multipli mijelom; šuljajući (*smoldering*) multipli mijelom
B stanične limfoproliferativne bolesti
Ne-Hodgkinov limfom
Kronična limfocita leukemija
Limfoplazmocitoidni limfom (Waldenströmova makroglobulinemija)
Post-transplantacijske monoklonalne gamapatije
Bolest teških lanaca
Bolesti vezivnog tkiva
Sustavni eritemski lupus
Reumatoidni artritis
Sjögrenov sindrom
Sklerodermija
Psorijatični artritis
(Polimijalgija reumatika)
Infekcije*
Hepatitis C
HIV infekcija/AIDS
Dermatološki poremećaji
Sklerodermija, Lichen
Difuzna ksantomatoza
Urtikarija i IgM (Schnitzlerov sindrom)
Subkornealna pustulozna dermatoza
Nekrobiotski ksantogranulom
Pioderma gangrenozum
Različita stanja*
Stečena von Willenbrandova bolest
Stečeni manjak inhibitora C1 esteraze (angioedem)
Eozinofilni fasciitis
Krioglobulinemija
Mijelodisplastični sindrom
Kronična mijeloična leukemija
Senzomotorna neuropatija sudružena s MGUS
Kapilarni "*leak*" sindrom
Bolest hladnih protutijela
*neka od navedenih stanja mogu biti udružena s podležećim limfoproliferativnim poremećajem

1.4. Patogeneza

Smatra se da u patogenezi multiplog mijeloma postoje dvije faze. Prva faza je pojava monoklonskih plazma stanica do koje dolazi zbog antigenskog podražaja plazmablasta (moguće infekcija ili općenito upala), limfocita B koji su prošli kroz proces diferencijacije u germinativnom centru limfnog čvora i kod kojih je preuredba gena za imunoglobuline završena te su migrirali u koštanu srž gdje završavaju diferencijaciju u dugoživuće plazma stanice. Antigenski podražaj dovodi do proliferacije stanica, u tijeku koje mogu nastati genske promjene, najčešće translokacija na kromosomu 14, na lokusu za teški lanac imunoglobulina kao što su t(11;14), t(14;16), t(4;14), (u oko 50% do čak 75% slučajeva)[3] ili delecija kromosoma 13 (također u oko 50% slučajeva), što dovodi do nastanka ograničenog broja klonskih stanica.[7] Obzirom da u ovoj fazi nastanka bolesti, bolesnici još nemaju nikakvih simptoma ili znakova oštećenja organa, klinički se ovo stanje naziva monoklonskom gamapatijom neutvrđenog značenja (eng. *MGUS - monoclonal gammopathy of undetermined significance*). MGUS se smatra premalignim stanjem jer ti bolesnici imaju rizik od 1% godišnje za progresiju u multipli mijelom. Slijedeća faza u nastanku multiplog mijeloma je stjecanje dodatnih genetskih promjena, često disregulacija onkogena (*MYC, NRAS, KRAS, RB1*).[3,8] Prema nekim istraživanjima ključnu ulogu u patogenezi bolesti imaju mutacije NRAS i KRAS onkogena koje dovode do aktivacije signalnog puta posredovanog protein-kinazom aktivirane mitogenom (*MAPK – eng. mitogen-activated protein kinase*).[9] Opaženo je da se te mutacije mogu dokazati u 40% do 55% bolesnika s multiplim mijelomom i samo 5% bolesnika s MGUS-om što upućuje na važnost MAPK signalnog puta u progresiji MGUS-a u multipli mijelom.[10] U daljnjem razvoju bolesti od iznimne važnosti je sinergistička interakcija između klonalnih plazma stanica i mikrookoliša koštane srži. Mikrookoliš čine stanice (stanice strome koštane srži osteoblasti, osteoklasti, fibroblasti, endotelne stanice) i vanstanični matriks (fibronektin, kolagen, laminin, osteopontin). U interakciji mikrookoliša i tumorskih stanica sudjeluju brojni citokini, interleukini i faktori rasta, djelujući parakrino i autokrino na stanice mijeloma. Jedan od najvažnijih čimbenika u procesu adhezije je molekula CD138 (syndecan 1), transmembranski proteoglikan kojim se tumorske stanice vežu za kolagen tipa 1 vanstaničnog matriksa inducirajući tako aktivaciju metaloproteinaza te resorpciju kosti što omogućuje lakšu invaziju.[10] Ključno mjesto u procesima rasta i preživljavanja tumorskih stanica imaju interleukin 6 (IL-6) koji ima snažan stimulacijski i antiapoptotički učinak na mijelomske stanice i čimbenik rasta vaskularnog endotela (eng.

VEGF - vascular endothelial growth factor) koji potiče neovaskularizaciju tj. angiogenezu.[10,11] Uz IL-6 i VEGF važnu ulogu u patogenetskim mehanizmima imaju i interleukin 1ß, protein srodan paratireoidnom hormonu (*PTHrP*), RANK ligand koji poticanjem aktivnosti osteoklasta i inhibicijom diferencijacije osteoblasta dovode do osteolitičkih lezija. Navedeni i drugi važni patogenetski mehanizmi prikazani su na slici 1.[10]



Slika 1. Utjecaj mikrookoliša koštane srži na razvoj multiplog mijeloma. Međudjelovanje mijelomskih stanica i stanica mikrookoliša:_stanice strome, endotelnih stanica, osteoblasta, osteoklasta i njihov učinak na neoangiogenezu i koštanu bolest. Kratice čimbenika rasta su navedene prema engleskim nazivima: *bFGF - basic fibroblast growth factor; CAM-DR – cell adhesion-mediated drug resistance; DKK1 - Dickkopf-related protein 1; GSK-3β - glycogen synthase kinase 3β; HGF – hepatocyte growth factor; ICAM-1 - intercellular adhesion molecule 1; IGF1 - insulin-like growth factor 1; IL - interleukin; JAK/STAT3 – Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3; LFA-1 - leukocyte function-associated antigen 1; MEK/ERK, Ras/Raf - mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal–regulated kinase; MIP-1α - macrophage inflammatory protein 1α; mTOR - mammalian target of rapamycin; NF-κB - nuclear factor κB; OPG - osteoprotegerin; PI3K - phosphatidylinositol 3-kinase; PKC - protein kinase C; RANK - receptor activator of NF-κB; RANKL - RANK ligand; SDF-1α - SC-derived factor 1α; TGF-β - transforming growth factor β; TNF-α - tumor necrosis factor α; VCAM-1 - vascular cell–adhesion molecule 1; VEGF - vascular endothelial growth factor; VLA-4 - very late antigen 4*. Za prijevod vidi popis kratica. Preuzeto i adaptirano iz Anderson KC, Carrasco RD. Pathogenesis of Myeloma. Annu. Rev, Pathol. Mech. Dis. 2011. 6:249-74

1.5. Klinička slika

Klinička slika je u početku nespecifična, najčešći simptomi su osjećaj slabosti (82%), bol u kostima (58%), umor (32%), gubitak tjelesne težine (24%). Rjeđe se javljaju simptomi poput pojačane sklonosti krvarenju po koži i sluznicama (13%), hiperviskoznost, recidivirajuće infekcije (13%), različit stupanj bubrežnog oštećenja (20%). Često se u kliničkoj praksi koristiti akronim CRAB (od eng. *C - calcium, R - renal, A - anemia, B - bone*) za opis najčešćih laboratorijskih i/ili kliničkih manifestacija: hipeklacemija, bubrežno oštećenje, anemija i koštane lezije koje definiraju simptomatski mijelom.

Simptomi su posljedica djelovanja samih tumorskih stanica tj. infiltracije koštane srži koja dovodi do supresije normalne hematopoeze. Posljedica toga su pojava anemije, najčešće normocitne i normokromne što se manifestira općom slabosti i umorom, i trombocitopenije tj. sklonosti krvarenju. Kao posljedica prevelike proizvodnje monoklonskog imunoglobulina dolazi do pareze normalnih imunoglobulina odnosno imunodeficijencije zbog čega je izražena sklonost infekcijama različitim vrstama bakterija, napose inkapsuliranim sojevima (rekurirajuće infekcije). Zbog osteolitičkih koštanih promjena, bolesnici se često žale na koštane boli, a nerijetko se već kod postavljanja dijagnoze utvrde patološke frakture. Rjeđe, bol nastaje zbog ekstramedularnog rasta tumorske mase i pritiska na korijene spinalnih živaca ili na samu kralježničku moždinu; u potonjem slučaju često posotoje i neurološki ispadi. Karakterističan je nalaz rentgenske snimke lubanje s brojnim osteolitičkim lezijama različitih veličina. Hiperkalcemija se manifestira umorom, konstipacijom, mučninom te moguće konfuzijom, a pridonosi i nastanku bubrežnog oštećenja. Do bubrežnog oštećenja dolazi primarno zbog proteinurije lakih lanaca imunoglobulina, poznatih i kao Bence Jones protein. Oko 20% bolesnika se prezentira određenim stupnjem bubrežnog oštećenja kao vodećim simptomom. Laki lanci se filtriraju u glomerulu te reapsorbiraju i kataboliziraju u proksimalnim tubulima. Proksimalni tubuli imaju velik kapacitet reapsorpcije laki lanaca, do 30 grama dnevno, ali kada se taj kapacitet zasiti, kao što je slučaj kod nekontrolirane produkcije lakih lanaca u mijelomskim stanicama, dolazi do nakupljanja lakih lanaca u tubulima, precipitacije s Tamm-Horsfallovim proteinima i stvaranja cilindara s posljedičnom atrofijom i degeneracijom tubula (tzv. mijelomski bubreg). O samim lakim lancima i njihovom metabolizmu više je opisano u narednim poglavljima. Sindrom hiperviskoznosti nije čest, a najčešće se javlja kod bolesnika čiji tumor producira velike količine imunoglobulina A. Može se manifestirati epistaksom, krvarenjem iz usne šupljine, purpurom,

poremećajem vida, glavoboljom, dispnejom. Zbog prisutnosti monoklonskog proteina i interakcije s proteinima plazme može doći i do poremećaja u sustavu faktora zgrušavanja krvi, što u kombinaciji s trombocitopenijom dovodi do veće sklonosti krvarenju.

Od ostalih poremećaja koji se mogu javiti u sklopu multiplog mijeloma treba spomenuti pridruženu amiloidozu koja nastaje zbog nakupljanja lakih lanaca imunoglobulina u različitim tkivima, najčešće bubregu - amiloidoza bubrega, ali i srcu, jeziku te drugim organima.

1.6. Klasifikacija bolesti

Danas se najčešće koriste dvije klasifikacije za svrstavanje bolesnika u rizične skupine tj. u prognostički povoljnije i prognostički nepovoljnije grupe. Starija klasifikacija je klasifikacija po Durie-Salmonu kojom se može procjeniti veličina tumorske mase i uznapredovalost bolesti:[12]

a) stadij I (mala tumorska masa, svi kriteriji moraju biti zadovoljeni):
   hemoglobin >100 g/L,
   normalan ili tek blago povišen kalcij u serumu,
   normalan nalaz rtg skeleta ili solitarni plazmocitom,
   niska proizvodnja M-komponente: IgG <50 g/L, IgA <30 g/L;
   M-komponenta lakih lanaca u urinu elektroforezom < 4g/24h;
b) stadij II (intermedijarna stanična masa): ne zadovoljava kriterije ni za stadij I niti za stadij III;
c) stadij III (velika tumorska masa, jedan ili više od kriterija moraju biti zadovoljeni):
   hemoglobin <85 g/L,
   kalcij u serumu značajno povišen,
   uznapredovale litičke lezije kostiju,
   visoka proizvodnja M-komponente: IgG >70 g/L, IgA >50 g/L;
   M-komponenta lakih lanaca u urinu elektroforezom >12g/24h;

subklasifikacija: A – normalna ili blago oštećena bubrežna funkcija, kreatinin < 170 μmol/L; B – jače oštećenje bubrežene funkcije, kreatinin > 170 μmol/L).

Novija, prognostička klasifikacija je ISS (*International Staging System*) klasifikacija:[13]

a) stadij I: ß2-mikroglobulin <3,5 g/mL, serumski albumin >35g/L;
b) stadij II: ß2-mikroglobulin <3,5 g/mL, serumski albumin <35 g/L
   ili ß2-mikroglobulin 3,5–5,5 g/mL;
c) stadij III: ß2-mikroglobulin >5,5 g/mL.

Iako su obje klasifikacije opće prihvaćene, niti jedna od njih samostalno ne zadovoljava u potpunosti mogućnost procjene rizika. Nedostatak Durie-Salmonove klasifikacije je što je jedan od ključnih kriterija, nalaz radiološke obrade skeleta, neobjektivan jer ovisi o iskustvu radiologa što dovodi u pitanje reproducibilnost nalaza i mogućnost usporedbe bolesnika. Upravo iz tog razloga osmišljena je ISS klasifikacija koja, iako je lakše izvediva i objektivnija, također ima nedostatke. Za razliku od starije Durie-Salmonove klasifikacije koja je i dijagnostička i procjenjuje uznapredovalost bolesti, za noviju ISS klasifikaciju dijagnoza multiplog mijeloma već mora biti potvrđena, a ona također ne uzima u obzir bubrežno oštećenje itd. Stoga se danas, u nedostatku uniformne klasifikacije, preporučuje korištenje obje klasifikacije zajedno gdje svaka opisuje stanje bolesnika na drugi način. Usporedba klasifikacija je prikazana u tablici 2. Jedan od razloga nepostojanja jedinstvene, sveobuhvatne klasifikacije je sigurno pojava novih dijagnostičkih testova; u prvom redu određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu i urinu, određivanje koncentracije teških lanaca imunoglobulina; spoznaja o novom i/ili većem značenju standardnih testova kao što su imunofenotipizacija i citogenetske analize (napose delecije kromosma 13 i 17; translokacije 4;11, 4;14, 14;16); te svakako i pojava novih, „pametnih“ lijekova kojima se poništava prognostičko značenje pojedinih pokazatelja.[14,15] Treba napomenuti još i nesekretorni oblik bolesti koji je karkateriziran infiltracijom koštane srži malignim stanicama, ali bez produkcije monoklonskog proteina te ekstramedularni plazmocitom karkateriziran nalazom ekstramedularnog tumora građenog od klonskih plazma stanica također bez produkcije ili s vrlo malom produkcijom monoklonskog proteina te bez infiltracije koštane srži.

Tablica 2. Usporedba Durie-Salmonove klasifikacije i ISS klasifikacije[13]

Durie-Salmonova klasifikacija			ISS klasifikacija		
stadij	% bolesnika	medijan preživljenja (mjeseci)	stadij	% bolesnika	medijan preživljenja (mjeseci)
IA	7,5	62	I	28	62
IB	0,5	22			
IIA	22	58	II	33	44
IIB	4	34			
IIIA	49	45	III	39	29
IIIB	17	24			

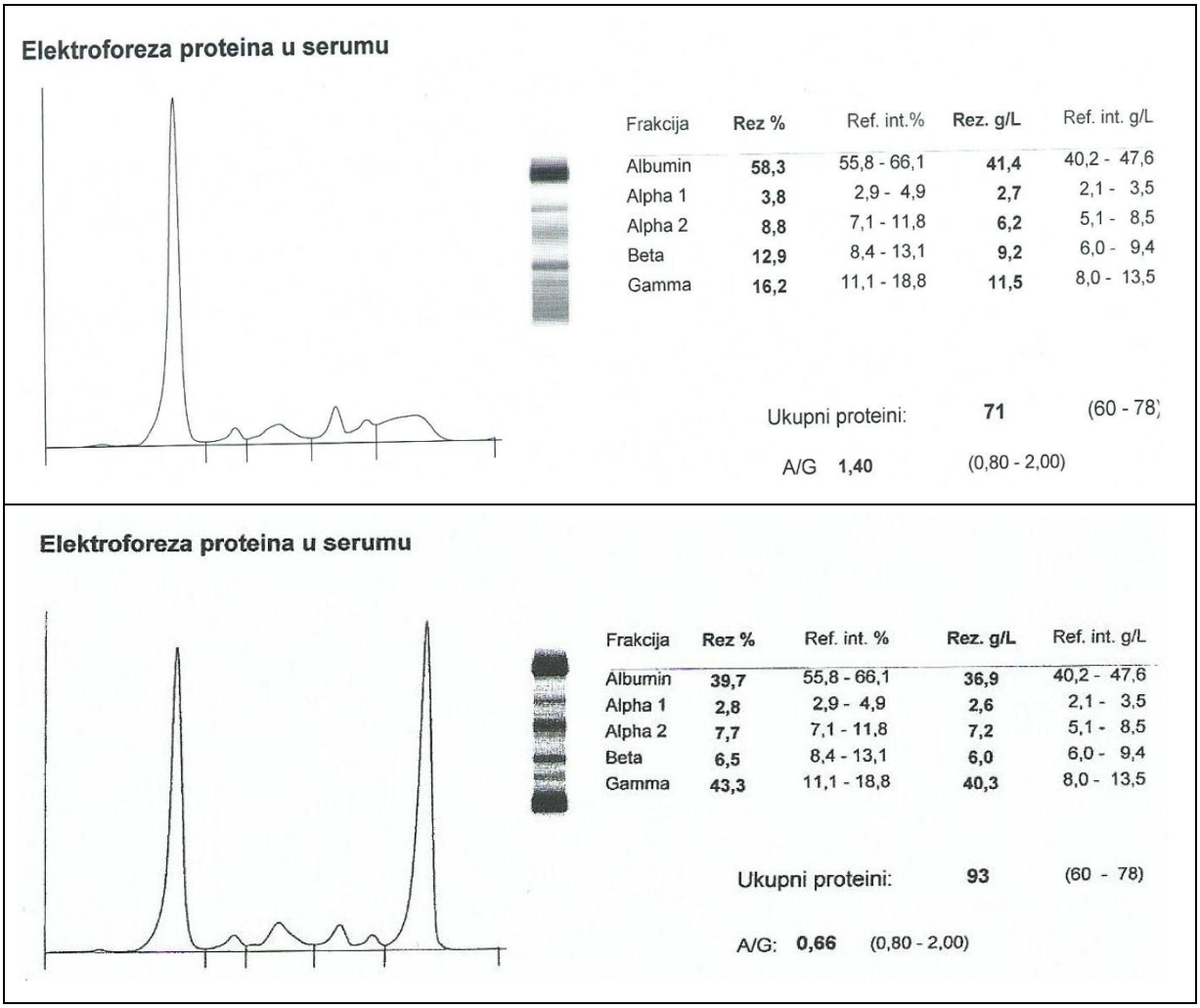
1.7. Dijagnostika i praćenje multiplog mijeloma

U dijagnostici i praćenju bolesnika s multiplim mijelomom, osim uobičajnih nalaza kompletne i diferencijalne krvne slike i općih biokemijskih pretraga, koriste se dobro definirane biokemijske metode (na uzorcima seruma i urina), imunopatohistološke metode (na uzorcima bioptata kosti i punktata koštane srži) te radiološka obrada kostiju.

Od biokemijskih analiza, u standardnu obradu za multipli mijelom, ubrajaju se: elektroforeza serumskih proteina, kvantitativno određivanje imunoglobulina (IgG, IgA, IgM, IgD), imunofiksacija proteina seruma i urina, određivanje proteinurije tj. Bence-Jones proteina u 24-satnom urinu, kvantitativno određivanje slobodnih lakih lanaca u serumu i urinu i njihovog omjera (kappa/lambda omjer), te određivanje koncentracije beta-2-mikroglobulina u serumu. Elektroforeza serumskih proteina (slika 2) služi i kao test probira jer daje uvid u sastav svih proteina u serumu, a krivulja elektroforeze može biti karkateristična za monoklonske gamapatije. Najčešće se nalazi šiljak u gama frakciji elektroforetske krivulje, iako se npr. kod monoklonskog imunoglobulina A, taj šiljak može pomaknuti i u beta frakciju krivulje. Elektroforezom serumskih proteina se također dobiva uvid u koncentraciju albumina za kojeg se pokazalo da ima prognostičku važnost u bolesnika s multiplim mijelomom. Smatra se da je snižena razina serumskog albumina posljedica djelovanja IL-6, kojeg produciraju tumorske stanice, na stanice jetre zbog čega dolazi do smanjenja sinteze albumina.[13] Neki autori

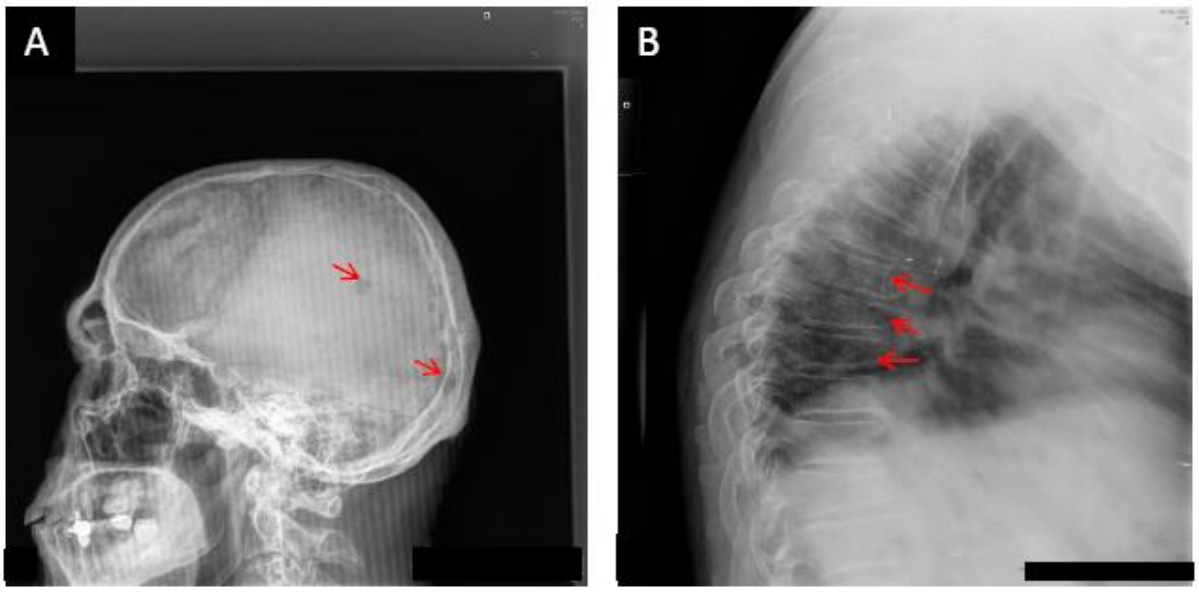
nagađaju da je snižena razina albumina odraz brzog tumorskog rasta čime objašnjavaju činjenicu da albumin ima prognostičko značenje te da razina albumina odražava nutritivni status bolesnika.[16] Imunofiksacija seruma (i/ili urina) se smatra zlatnim standardom za dokaz monoklonskog imunoglobulina zbog velike osjetljivosti i specifičnosti iako je samo kvalitativna metoda. Kvantitativno određivanje imunoglobulina (IgA, IgG, IgM, rjeđe IgD) daje uvid u veličinu monoklonskog proteina, a donekle i u stupanj imunosupresije ne-mijelomskih imunoglobulina. Određivanje koncentracije imunoglobulina također je dobar pokazatelj odgovora na terapiju, ali ova metoda ima dosta neodstataka (vrijednost može varirati ovisno o volumenu plazme, vrijednosti hematokrita i sl., vidi poglavlje 2) zbog čega u nekim slučajevima nije dovoljno precizna. Kvantitativno određivanje slobodnih lakih lanaca u serumu i urinu i njihovog omjera je komplementarana metoda elektroforezi serumskih proteina i imunofiksaciji. Naime, u oko 25% bolesnika monoklonski protein se ne može dokazati elektroforezom serumskih protiena te se ranije smatralo da boluju od nesekretornog ili oligosekretornog oblika bolesti. Uvođenjem kvantitativnog određivanja slobodnih lakih lanaca u serumu i urinu u laboratorijsku analizu dokazano je da većina bolesnika; prema nekim autorima i 2/3 bolesnika, za koje se smatralo da imaju nesekretorni oblik bolesti zapravo imaju oblik mijeloma kod kojeg se izlučuju samo laki lanci imunoglobulina tzv. mijelom lakih lanaca.[17] Zato se preporučuje da se ova metoda koristi i kao metoda probira jer u kombinaciji s elektroforezom i imunofiksacijom serumskih proteina imaju veću osjetljivost.[18] Osim u dijagnostici, kvantifikacija slobodnih lakih lanaca u serumu i urinu se pokazala i kao vrijedan alat za praćenje odgovora na terapiju. To se u prvom redu odnosi na bolesnike s mijelomom koji luči samo lake lance te na druge monoklonske gamapatije kao što je amiloidoza. U bolesnika kod kojih bolest luči cjelovitu molekulu imunoglobulina, kvantifikacija slobodnih lakih lanaca u serumu služi za definiciju stroge kompletne remisije (vidi tablicu 4). Također je dokazana prognostička vrijednost kvantitativnog određivanja lakih lanaca u bolesnika s multiplim mijelomom, MGUS-om, pa čak i šuljajućim mijelomom i solitarnim plazmocitomom.[17,19] Jedan od važnijih parametara u dijagnostici multiplog mijeloma je i koncentracija beta-2-mikroglobulina. Beta-2-mikroglobulin je zapravo laki lanac proteinskog kompleksa tj. molekula tkivnog raspoznavanja razreda I (HLA – eng. *human leukocyte antigen*). Vjeruje se da on odražava ukupnu tumorsku masu, a brojnim studijama dokazana je njegova prognostička važnost.[13,20] Zbog toga je, uz albumin, uvršten i u noviju ISS klasifikaciju bolesti (vidi poglavlje 1.6.).

Biokemijskim analizama dobiva se uvid u aktivnost bolesti (veličina M komponente) i indirektno u veličinu tumorske mase. Dokazan je proporcionalan odnos između veličine M komponente i veličine tumorske mase.[14] Za direktni dokaz veličine tumorske mase tj. broja monoklonskih plazma stanica koriste se morfološke i imunopatohistološke metode u koje se ubrajaju: citološka analiza punktata koštane srži, histostološka i imunohistokemijska analiza bioptata kosti i imunofenotipizacija koštane srži protočnom citometrijom. Uz navedene matode sve veću važnost dobivaju i citogenetska i molekularna analiza koštane srži (florescentna in situ hibridizacija – FISH), obzirom na sve veći broj dokaza da određene promjene u kariotipu (delecija kromosoma 13, translokacije 4;14 i 14;16 i drugo) imaju prognostičko značenje (vidi poglavlje 1.8.).

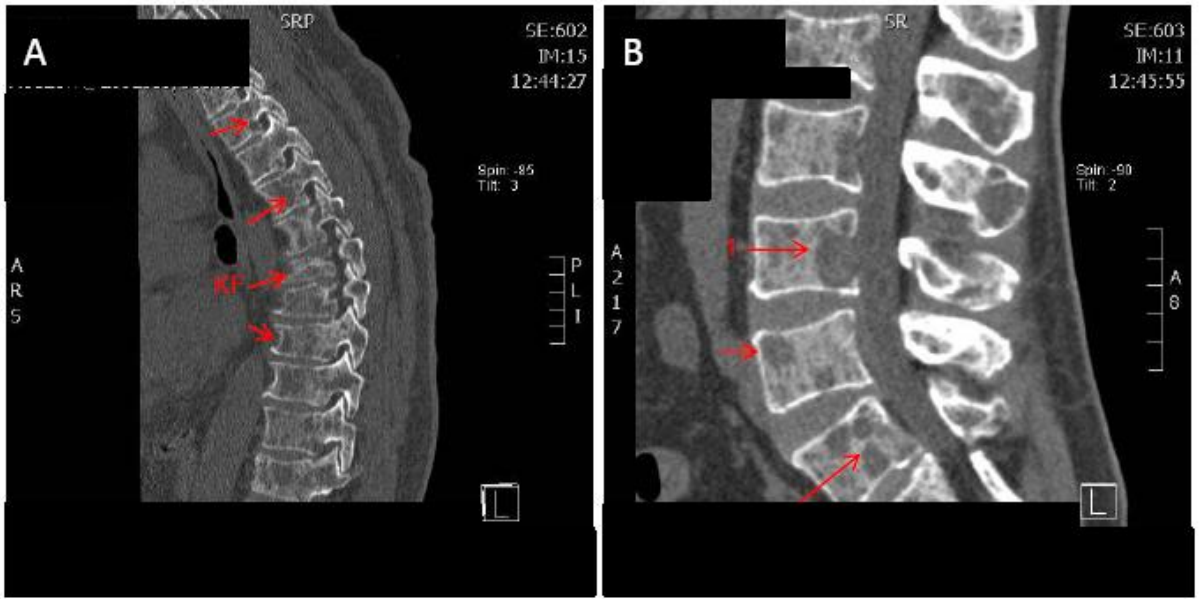


Slika 2. Primjeri izgleda elektroforetskih krivulja: gornja slika prikazuje izgled normalne krivulje elektroforeze serumskih proteina uz relativne i apsolutne vrijednosti pojedinih proteinskih frakcija. Donja slika prikazuje karakterističan izgled krivulje u bolesnika s multiplim mijelomom: vidi se visoki šiljak u gamma frakciji uz povećanu relativnu i apsolutnu vrijednost proteina gamma frakcije. (s ljubaznošću prof.dr.sc. Danice Matišić)

Nezaobilazan dio dijagnostičke obrade je i radiološka obrada skeleta, odnosno kvantifikacija koštanih osteolitičkih lezija i/ili patoloških fraktura. U tu svrhu još uvijek se zlatnim standardnom smatraju klasične rentgenske snimke cijelog skeleta (anteroposteriorna i lateralna snimka lubanje, posteroanteriorna snimka prsnog koša, anteroposteriorne i lateralne snimke cervikalne, torakalne, lumbalne kralježnice, anteroposteriorna snimka zdjelice, nadlaktične i natkoljenične kosti) uz dodatne ciljane snimke simptomatskih područja (slika 3). Klasična radiološka obrada je obavezna kod postavljanja dijagnoze zbog određivanja stadija bolesti te ponovno kod relapsa/progresije bolesti. Magnetska rezonancija (MR) je komplementarna metoda klasičnim radiološkim snimkama te se preporuča kod bolesnika u kojih je nalaz klasičnih snimaka normalan tj. bez osteolitičkih promjena. Magnetska rezonanca je metoda izbora kod bolesnika sa solitarnim plazmocitomom te kod sumnje na pritisak kralježničke moždine.[21] Kompjuterizirana tomografija (CT) (slika 4) se koristi uglavnom za razjašnjavanje dubioznih nalaza klasičnih snimaka ili kao zamjena kada MR nije moguće učiniti te za praćenje i reevaluaciju bolesnika s ekstramedularnim (mekotkivnim) tumorskim masama. Za pozitron-emisijsku tomografiju u kombinaciji s kompjuteriziranom tomografijom (PET-CT) za sada nema dokaza ili preporuka za primjenu u svakodnevnoj praksi; korisiti se samo u odabranim slučajevima radi razjašnjena ili dopune navedenih radioloških metoda. Klasična scintigrafija skeleta radioaktivnim tehnecijem nije korisna u dokazivanju i praćenju koštanih promjena u bolesnika s multiplim mijelomom jer ima manju osjetljivost čak i od konvencionalne radiološke snimke. Razlog tome je što je nakupljanje tehnecija ovisno o osteoblastičnoj aktivnosti, a u multiplom mijelomu dominantna je osteoklastična aktivnost uz inhibiciju osteoblasta. Novija scintigrafska metoda je upotreba ^{99m}Tc-sestamibija (tehnecijem obilježen heksakis-2-metoskiizobutilisonitril) koji se nakuplja i u samim mijelomskim stanicama, ima visoku osjetljivost i specifičnost te se pokazao i kao prognostički čimbenik za grupu bolesnika stadija II prema ISS klasifikaciji.[21,22] Međutim, kao i za PET-CT za sada nema dokaza i preporuka za rutinsku primjenu scintigrafije ^{99m}Tc-sestamibijem.[21]



Slika 3. Klasični rentgenogrami kostiju glave A) i torakalne kralježnice B). Na slici A strelicama su označene osteolitičke lezije kostiju lubanje, a na slici B strelicama su označeni kolabirani kralješci torakalnog dijela kralježnice.



Slika 4. Snimke torakalne A) i lumblane B) kralježnice pomoću kompjuterizirane tomografije (CT). Na slici A) vide se brojna osteolitička žarišta u trupovima kralješaka (strelice) i kompresivna fraktura jednog kralješka (KF). Na slici B) vide se multipla osteolitička žarišta uz prodor tumorske mase iz jedne od lezija u spinalni kanal (označeno s 1).

1.8. Dijagnostički kriteriji

Dijagnoza simptomatskog multiplog mijeloma postavlja se ako su zadovoljeni slijedeći kriteriji (prema *International Myeloma Working Group* smjernicama[14]):

1) monoklonske plazma stanice u koštanoj srži ≥ 10% i/ili prisutnost biopsijom dokazanog plazmocitoma.
2) monoklonski protein u serumu i/ili urinu, odnosno kod nesekretornog mijeloma udio plazma stanica u koštanoj mora biti ≥ 30%.
3) organsko oštećenje vezano uz mijelom (1 ili više):
   (C) hiperkalcemija
   (R) renalana insuficijencija (kreatinin > 170 umol/L)
   (A) anemija (Hb < 100 g/L ili 20g/L < normale)
   (B) koštane lezije (litičke lezije ili osteoporoza s patološkim frakturama)

Iz navedenih kriterija, vidljivo je da je za dijagnozu simptomatske bolesti uz prisutnost monoklonskog proteina i povećanog broja plazma stanica u koštanoj srži, potrebno prisustvo oštećenja barem jednog organa. Ukoliko nema oštećenja organa, već su zadovoljena samo prva dva kriterija, govorimo o asimptomatskom (šuljajućem ili indolentnom) multiplom mijeloma, stadija IA prema Durie-Salmon klasifikacija koji ne zahtjeva aktivno liječenje ili o premalignom stadiju bolesti - monoklonalnoj gamapatiji neutvrđenog značenja - MGUS. Kriteriji za razlikovanje pojednih entiteta navedeni su u tablici 3.[14,18]

Tablica 3. Dijagnostički kriteriji za MGUS, asimptomatski i simptomatski multipli mijelom.

MGUS	Asimptomatski (šuljajući ili indolentni) - stadij IA po Durie Salmon klasifikaciji	Simptomatski mijelom
• monoklonski protein u serumu < 30 g/L • plazma stanice u koštanoj srži < 10% i niska razina infiltracije u bioptatu koštane srži • nepostojanje oštećenja organa uzrokovano mijelomom ili simptoma • nepostojanje dokaza o drugoj B-staničnoj proliferativnoj bolesti ili amiloidozi lakih lanaca ili oštećenja tkiva lakim lancima, teškim lancima ili imunoglobulinima	• monoklonski protein u serumu ≥ 30 g/L • plazma stanice u koštanoj srži i/ili biopsiji tkiva > 10% • nepostojanje oštećenja organa uzrokovanog mijelomom (uključivo koštane lezije) ili simptoma	• monoklonski protien u serumu i/ili urinu • plazma stanice (klonalne) u koštanoj srži ili multipli mijelom potvrđen biopsijom • svako oštećenje organa ili simptom uzrokovano mijelomom (vidi gore).

1.9. Prognostički čimbenici

Prognostički čimbenici mogu se podijeliti u tri grupe: svojstva samih bolesnika (opće stanje bolesnika procjenjeno ECOG ili Kranofsky klasifikacijom, dob, bubrežna funkcija), veličina tumorske mase (definirana Durie Salmon i/ili ISS klasifikacijom) i karkateristike tj. biologija bolesti (promjene u kariotipu - delecije, translokacije, hiper/hipoploidija; proliferacijski indeks plazma stanica, ekspresija gena).[23] Sve je više dokaza da upravo čimbenici iz posljednje skupine imaju najveći utjecaj na prognozu i ishod liječenja. U prvom redu se to odnosi na nalaze klasične citogenetike - kariogram i FISH (od eng. *flourescent in-situ hibridization*) kojima detektiramo prisutnost hiper ili hipoploidije, translokacije i/ili delecije kromosma. Najvažnije, ujedno i najčešće, promjene su one koje uključuju promjene na kromosmu 14, na lokusu za teški lanac imunoglobulina. Za neke od tih kromosomskih promjena, kao što su translokacije 14;16, 14;20, dokazano je da su povezane s kraćim preživljenjem bolesnika, dok za neke druge, npr. translokacija 11;14, nema dokaza da utječu na preživljenje bolesnika. Osim translokacija koje zahvaćaju kromosom 14, u bolesnika s multiplim mijelomom se često mogu dokazati i delecije kromosoma. Najvažnije su delecije kromosoma 13 i 17.[24,25,26,27]Ovisno o prisutnosti kromosomskih promjena i njihovom utjecaju na preživljenje, bolesnike svrstavamo u tri grupe: standardnog, intermedijarnog (srednjeg) i visokog rizika. U kliničkoj praksi to znači da u bolesnika visokog rizika odmah treba primijeniti agresivniju terapiju i/ili veći broj ciklusa nego u bolesnika srednjeg ili standardnog rizika (tzv. terapija prilagođena riziku). Tako na primjer znamo da se negativni prognostički učinak translokacije 4;14, a prema nekim autorima i delecije 13, koji su prije bili loš prognostički pokazatelj, mogu nadvladati primjenom inhibitora proteasoma pa oni danas više ne spadaju u visoko rizičnu skupinu.[28] Pregled najvažnijih čimbenika iz ove skupine i njihov utjecaj na preživljenje prikazan je u tablici 4.[23] U novije vijeme sve se više govori o nalazima analize ekpsresije gena GEP (od eng. *gene expression profiling*) koja bi mogla biti jedan od novih čimbenika rizika, ali se ova metoda za sada korisiti samo u okviru studija i eksperimentalnih modela.

Tablica 4. Genski čimbenici rizika, njihova incidencija i medijan preživljenja.[23]

	VISOKI RIZIK	**INTERMEDIJARNI RIZIK**	**STANDARDNI RIZIK**
ČIMBENIK	FISH: del 17p t(14;16) t(14;20)	FISH: t(4;14) citogenetika: del 13 hipodiploidija	FISH: t(11;14) t(6;14) ostale promjene
INCIDENCIJA	20%	20%	60%
MEDIJAN UKUPNOG PREŽIVLJENA	3 godine	4-5 godina	8-10 godina

1.10. Liječenje multiplog mijeloma

Liječenje multiplog mijeloma velikim dijelom ovisi o stanju samog bolesnika tj. o njegovom općem stanju, komorbiditetu i dobi te o stadiju u kojem se bolest nalazi. Već je spomenuto da MGUS i šuljajući mijelom tj. mijelom stadija IA prema Durie Salmon klasifikaciji ne zahtjevaju specifičnu citostatsku terapiju već samo praćenje zbog rizika od progresije. U onih bolesnika u kojih je potrebno provoditi specifično liječenje, terapijski pristup se može podijeliti u dva pravca, ovisno o karkateristikama samih bolesnika. Jedan pravac uključuje bolesnike koji su kandidati za liječenje transplantacijom autolognih matičnih stanica tj. bolesnike mlađe od 65 godina, dobrog općeg stanja i sa zadovoljavajućom funkcijom svih organskih sustava. U njih se terapijski pristup sastoji od uvodnoga liječenja kojim se nastoji smanjiti tumorska masa, a potom primjene visokih doze melfalana i transplantacije autolognih hematopoetskih matičnih stanica. U nekih bolesnika, ovisno o odgovoru, provode se i dvije uzastopne transplantacije tzv. tandem transplantacija. Drugi pravac liječenja namijenjen je bolesnicima koji nisu kandidati za liječenje transplantacijom autolognih matičnih stanica, točnije onim bolesnicima kod kojih se ne može provesti intenzivna kemoterapija visokim dozama melfalana zbog prevelike toksičnosti i velikog rizika komplikacija. U ovu grupu ubrajamo starije bolesnike (> 65 godina) i one s ozbiljnijim

komorbiditetima i/ili oštećenom funkcijom organskih sustava. U ovih bolesnika liječenje se provodi konvencionalnom kemoterapijom različitog intenziteta. Ipak, treba napomenuti da neke karkateristike bolesnika, u prvom redu dob > 65 god i bubrežno oštećenje, nisu apsolutna kontraindikacija za liječenje transplantacijom autolognih matičnih stanica.

1.10.1. Liječenje bolesnika koji su kandidati za transplantaciju autolognih matičnih stanica

U Hrvatskoj je do sada standardni pristup u liječenju ove grupe bolesnika bio uvodna ili indukcijska terapija VAD protokolom (vinkristin, adriamicin, deksametazon). Obično se primjenjuju ciklusi svaka četri tjedna, ukupno 3 do 4 ciklusa nakon kojih se radi reevaluacija i procjenjuje odgovor na terapiju te donosi odluka o nastavku liječenja transplantacijom autolognih matičnih stanica.[29] Iako se ovim protkolom postiže relativno dobar odgovor na terapiju i postotak remisije, VAD se danas smatra zastarjelim načinom liječenja, osobito u kontekstu novih antimijelomskih lijekova: inhibitora proteasoma (bortezomib) i imunomodulatornih lijekova (talidomid, lenalidomid) i njihovih kombinacija. U posljednjih nekoliko godina mnogobrojne studije koje su uspoređivale VAD ili monoterapiju deksametazonom i protokole s nekim od novijih lijekova, potvrdile su superiornost novih lijekova i u postotku postizanja odgovora i u postotku postizanja kompletnih remisija, a time i u produženju preživljenja bez progresije (eng. PFS - *progression free survival*) i ukupnog preživljenja (eng. OS - *overall survival*).[30,31,32,33,34,35] Neke od studija su dokazale i pozitivan učinak bortezomiba na poboljšanje prognoze bolesnika (i PFS i OS) koji su imali t(4;14) koja se smatrala negativnim prognostičkim čimbenikom.[28] Zahvaljujući terapiji bortezomibom, sada bolesnike s ovom translokacijom ubrajamo u intermedijarni rizik. Zbog navedenog sve novije smjernice za liječenje multiplog mijeloma u prvoj liniji, dakle u indukciji, preporučuju primjenu protokola koji sadržavaju bortezomib u kombinaciji s klasičnim antimijelomskim lijekovima (npr. bortezomib / deksametazon, bortezomib / ciklofosfamid / deksametazon, bortezomib / doksorubicin / deksametazon) ili protokole s kombinacijom dvaju novijih lijekova - inhibitor proteasoma i imunomodulatorni lijek (npr. bortezomib/talidomid/deksametazon, bortezomib/lenalidomid/deksametazon).[36] Neki centri daju prednost lenalidomidu, kao monoterapiji ili češće u kombinaciji s deksametazonom, u inicijalnoj terapiji jer se pokazalo da se tim protokolima postiže visok postotak odgovora te visok postotak ukupnog preživljenja; u studiji predvođenoj Rajkumarom postignut je postotak

odgovora 70 do 81% uz trogodišnje ukupno preživljenje od 75%, a 80% bolesnika koji su transplantirani bili su živi i nakon 5 godina.[37] Od ostalih citostatika i njihovih kombinacija u indukcijskom liječenju multiplog mijeloma rjeđe se koriste i cis-platina, etopozid, adriamicin, liposomalni doksorubicin. Svakako treba još spomenuti i novije generacije inhibitora proteasoma kao što je carfilzomib i novije imunomodulatorne agense kao što je pomalidomid koji još nemaju primjenu u rutinskoj praski već samo u okviru studijskih ispitivanja.

Kao što je rečeno na početku, u Hrvatskoj je i dalje VAD protokol standard za inicijalno liječenje prije transplantacije autolognih matičnih stanica ili protokoli s talidomidom (npr. CTD protokol: ciklofosfamid, talidomid, deksametazon), dok je bortezomib od nedavno registriran za liječenje bolesnika i u drugoj liniji liječenja (do tada je bio samo u trećoj liniji). Talidomid je dostupan i primjenjuje se najčešće u drugoj ili višim linijama liječenja, odnosno u prvoj liniji liječenja za bolesnike koji nisu kandidati za liječenje transplantacijom matičnih stanica. Lenalidomid se u Hrvatskoj primjenjuje tek sporadično, u iznimnim slučajevima, kada nastupi relaps/progresija bolesti unatoč prethodno provedenoj terapiji bortezomibom i talidomidom.

Nakon provedenog uvodnog liječenja i postizanja odgovora na terapiju (barem parcijalnog odgovora, vidi poglavlje o procjeni odgovora na terapiju), u ove grupe bolesnika provodi se prikupljanje autolognih matičnih stanica za transplantaciju. Sam postupak prikupljanja uključuje primjenu citostatske terapije, najčešće su to visoke doze ciklofosfamida, te stimulaciju koštane srži faktorima rasta. Najčešće se primjenjuje faktor rasta granulocita filgrastim. Istovremeno s primjenom filgrastima, prati se oporavak koštane srži prema broju leukocita u perifernoj krvi. Kada broj leukocita poraste iznad $1{,}0x10^9/L$ određuje se broj matinčnih stanica (CD34 pozitivnih stanica) u perifernoj krvi metodom protočne citometrije. U slučaju da je porast matičnih stanica u perifernoj krvi zadovoljavajuć započinje se s postupkom leukafereze. Postupak se provodi staničnim separatorom, a cilj je skupiti dovoljan broj matičnih stanica za dvije transplantacije. To je potrebno u slučaju kada se planira provesti tandem transplantacija tj. dvije transplantacije u razmaku od najviše 6 mjeseci. Sam postupak liječenja transplantacijom se sastoji od primjene visokih doza melfalana (200 mg/m^2) i potom reinfuzije odmrznutih autolognih matičnih stanica. Randomizirane studije su pokazale da liječenje transplantacijom autolognih matičnih stanica ima malu smrtnost povezanu sa samim postupkom liječenja, ima prihvatljivu toksičnost, a može se provoditi čak i ambulantno, što smanjuje i troškove te poboljšava i PFS i OS.[38,39,40,41] Pojavom novih lijekova (inhibitora proteasoma i imunomodulatora) kojima se već uvodnim

liječenjem postiže veći broj i bolji odgovor na terapiju nego konvencionalnim protokolima, liječenje transplantacijom postaje komplementarna metoda. Za sada još nema randomiziranih studija koje bi potvrdile bolji učinak novih lijekova u odnosu na transplantaciju pa ovakav način liječenja i dalje ostaje standard za ovu skupinu bolesnika, osobito za one koji imaju primarno refraktornu ili progresivnu bolest.[23,36] Osim transplantacije autolognih matičnih stanica, u liječenju multiplog mijeloma može se primijeniti i transplantacija alogeničnih matičnih stanica. Ovakav pristup se za sada koristi samo u mlađih bolesnika s refraktornom ili progresivnom bolesti koji imaju srodnog HLA identičnog darivatelja i u okviru kliničkih studija.[36]

1.10.2. Liječenje bolesnika koji nisu kandidati za transplantaciju autolognih matičnih stanica

U ove grupe bolesnika može se primjenjivati velik broj protokola kao i kod prethodne grupe. Razlika je što se kod ove grupe bolesnika češće koriste protokoli koji uključuju i alkilirajući agens melfalan koji kompromitira prikupljanje matičnih stanica te se stoga ne korisiti za liječenje bolesnika koji su kandidati za transplantaciju. I u svijetu i u Hrvatskoj najčešće korišteni protokol za liječenje bolesnika koji nisu kandidati za transplantaciju je melfalan + prednizon (MP protokol). Kao i kod bolesnika koji su kandidati za liječenje transplantacijom, i u ove grupe bolesnika se mogu primjenjivati noviji antimijelomski lijekovi, inhibitori proteasoma i imunomodulatorni lijekova. Danas se najčešće MP protokol kombinira s talidomidom (MPT). Više studija je dokazalo korist od kombiniranja talidomida i/ili bortezomiba s klasičnim protokolima i u pogledu produženja ukupnog preživljenja i u pogledu produženja preživljenja bez progresije bolesti.[42,43,44,45,46] Liječnje se provodi primjenom ciklusa svakih 4 do 6 tjedna, ovisno o pojavi i težini nuspojava, kao što su mijelosupresija, periferna neuropatija i sl., kroz godinu dana. Uz najčešće korišteni MPT (melfalan / prednizon / talidomid) protokol koriste se još i kombinacije melfalan / prednizon / bortezomib (VMP), melfalan / prednozon / lenalidomid (MPR) ili kombinacije s deksametazonom kao što su bortezomib / deksametazon i lenalidomid / deksametazon u malim dozama, talidomid / deksametazon.[36]

1.10.3. Liječenje bolesnika s relapsom, refraktornom bolesti ili bolesti u progresiji

Za liječenje bolesnika u relapsu ili progresiji bolesti, bez obzira jesu li transplantirani ili nisu kandidati za tranplantaciju, može se primjeniti isti protokol kao i u početnoj terapiji pod uvjetom da su relaps ili progresija nastupili nakon 6 ili više mjeseci od završetka liječenja. Ipak, najčešće se primjenjuju lijekovi i/ili protokoli različiti od onih upotrebljenih u indukciji, dakle lijekovi s drugačijim mehanizmima djelovanja. Na raspolaganju su brojni protokoli: bortezomib u monoterapiji; bortezomib i deksametazon; bortezomib, lenalidomid i deksametazon; ciklofosfamid, bortezomib i deksametazon i dr.[36] Isti protokoli se mogu primjenjivati i u bolesnika s refraktornom bolesti tj. onih u kojih prvim izborom lijekova nije postignut zadovoljavajući odgovor. Sve je više dokaza iz randomiziranih studija o učinkovitosti novijih generacija lijekova kao što su inhibitor proteasoma druge generacije carfilzomib ili novi imunomodulatorni lijek pomalidomid koji također sve više ulaze u kliničku upotrebu za liječenje progresivne i/ili refraktorne bolesti.[47,48] U Hrvatskoj se za liječenje refraktorne bolesti ili bolesti u relapsu ili progresiji također najčešće koristi bortezomib, u monoterapiji ili u kombinaciji s drugim antimijelomskim lijekovima, napose zato što je za tu indikaciju i odobren (druga i treća linija terapije). Od ostalih lijekova treba još spomenuti talidomid i ciklofosfamid koji se najčešće kombinira s talidomidom i deksametazonom (CTD protokol) ili bortezomibom i deksametazonom (CyBorDex protokol). Rjeđe upotrebljavane kombinacije lijekova su protokoli poput DT-PACE (deksametazon, talidomid, platina, adriamicin, ciklofosfamid i etoposide) ili EDHAP (etopizid, deksametazon, cisplatina, Ara-C). Lenalidomid se u Hrvatskoj primjenjuje tek sporadično upravo u ove grupe bolesnika. Primjenjuje se sam ili češće u kombinaciji s deksametazonom.

1.10.4. Terapija održavanja

Terapija održavanja nakon uvodnog liječenja, bez obzira radi li se o oblesnicima liječenim transplantacijom autolognih matičnih stanica ili o starijim bolesnicima koji nisu kandidati za transplantacijsko liječenje, jedno je od najdiskutabilnijih područja u liječenju multiplog mijeloma. Za sada ne postoje jedinstvene smjernice niti za odabir pojednih lijekova ili protokola, niti za procjenu bolesnika u kojih terapija održavanja mora biti provođena tj. onih u kojih ne mora. I ovdje postoje dva koncepta. Prvi je konsolidacijska terapija koja se

sastoji od nekoliko kratkih ciklusa kemoterapije, a cilj joj je produbiti razinu odgovora (parcijalna remisija, kompletna remisija) postignutu indukcijskim liječenjem. Drugi koncept je dugotrajna terapija održavanja kojoj je cilj produžiti trajanje odgovora odnsono spriječiti progresiju bolesti.[49] Prije su se kao terapija održavanja najčešće koristili Interferon alfa i deksametazon, ali se pojavom učinkovitijih lijekova koji se koriste danas izgubili na važnosti. Danas se u terapiji održavanja najčešće koristi talidomid. Više studija i njihovih meta-analiza su potvrdile korist primjene talidomida i kao konsolidacijske terapije nakon transplantacije, odnosno poboljšanja odgovora i kao terapije održavanja, odnosno produženja preživljenja bez progresije bolesti.[50,51,52,53] Talidomid se primjenjuje u dozama od 50 do 100mg dnevno kroz najviše godinu dana; dužina trajanja terapije je najčešće ograničena kumulativnom neurotoksičnosti.[49,52] Iste preporuke se mogu primijeniti i na grupu starijih bolesnika koji nisu kandidati za transplantacijsko liječenje. Jedina grupa u koje nije preporučljivo primjenjivati terapiju održavanja talidomidom je grupa bolesnika koji prema FISH analizi imaju bolest visokog rizika. Pokazalo se da ta grupa bolesnika uz terapiju talidomidom ima lošiji ishod od kontrolne skupine (MRC Myeloma IX studija).[54] Drugi lijek koji se sve više koristi u terapiji održavanja je lenalidomid za kojeg se također dokazala korist u produženju preživljenja bez progresije bolesti[55,56], a neke studije i u ukupnom preživljenju bolesti.[55] Preporuke za doziranje i način primjene su jednake i u mlađih bolesnika i u onih starijih: doze su 5 do 15 mg dnevno kontinuirano ili u ciklusima od 21 dan s tjedan dana pauze između ciklusa. Jedna od glavnih prepreka u terapiji lenalidomid bi mogla biti veća incidencija sekundarnih primarnih tumora zabilježena u svim studijama.[36] Slično kao i talidomid, niti lenalidomid nije poboljšao ishod bolesnika s bolesti visokog rizika definiranog prema FISH analizi. Treći lijek koji se navodi u smjernicama o terapiji održavanja je bortezomib. Međutim, nedostatak ovih preporuka je što se temelje na rezultatima studija koje su pokazale korist od primjene bortezomiba u terapiji održavanja u bolesnika koji su i u uvodnom liječenje primali bortezomib.[57,58,59] Korist za bolesnike koji u uvodnom liječenju nisu primali inhibitor proteasoma tek treba biti ispitana.

1.10.5 Potporna terapija

Obzirom da sama bolest ima neke specifičnosti, a pojedine terapije imaju velik ili povećan rizik od nastanka dobro poznatih i definiranih komplikacija, u liječenju multiplog mijeloma vrlo je važna primjena potpornih mjera liječenja.

To se u prvom redu odnosi na koštanu bolest. Gotovo 70% bolesnika s multiplim mijelomom ima koštane promjene različitog stupnja, a oko 30% patološke, kompresivne frakture kralježaka. Zbog toga se kao standard u liječenju multiplog mijeloma smatra primjena bisfosfonata (najčešće pamidronat ili zolendronična kiselina). Osim ove konzervativne terapije koštane bolesti koja se provodi u svih bolesnika, u jednog djela bolesnika potrebna je i kirurška intervencija, osobito u onih s kompresivnim frakturama kralježaka. U tu svrhu najčešće se izvode postupci vertebroplastike ili kifoplastike. Za sada ne postoje jedinstvne smjernice za ovaj oblik liječenja koštane bolesti u ovih bolesnika, a možda najsveobuhvatnije preporuke je dala *International Myeloma Working Group* (IMWG).[60] Prema IMWG konsenzusu indikacije za kirurško liječenje su: jaka bol, definirana kao bol veća od stupnja 7 na analogno vizulanoj skali za bol, uz kolaps jednog ili više kralježaka, jaka bol uz destrukciju kosti (osteoliza/osteopenija) s visokim rizikom kolapsa jednog ili više kralježaka te odsutnost jake boli tj. bol manja od stupnja 7 uz značajan gubitak visine i/ili stabilnosti kralježnice. Konsenzus preporuča da se u jednom aktu intervenira na najviše 3-4 kralješka zbog rizika od plućnih komplikacija.

Vidljivo je da se liječenje koštanih promjena često preklapa s liječenjem boli koja je jedan od vodećih simptoma i bitnih čimbenika koji utječu na kvalitetu života. Zato u potpornoj terapiji važno mjesto zauzima i konzervativna antidolorozna terapija koja se temelji na primjeni opioidnih analgetika obzirom da je uz primjenu nesteroidnih analgetika povezan veći rizik nastanka ili pogoršanja bubrežnog oštećenja. Također, jedna od antidolorozinih mjera može biti i radioterapija, osobito kada postoji tumorska masa koja komprimira živce ili kralježničnu moždinu.

Od komplikacija vezanih uz specifičnu terapiju, a koje zahtjevaju primjenu potporne terapije treba izdvojiti rizik duboke venske tromboze uz liječenje talidomidom, lenalidomidom osobito u kombinaciji s kortikosteroidima. Zbog toga se kod ovih protokola preporuča primjena antikoagulantne terapije. Ovisno o ostalim rizičnim čimbenicima za duboku vensku trombozu, kao što su dob, spol, drugi komorbiditeti, imobilizacija i sl., kao profilaksa trombotskih incidenata se mogu primjenivati acetilsalicilna kiselina, kumarinski

preparati te rjeđe heparin niske molekularne mase. U slučaju nastanka duboke venske tromboze terapija se ne razlikuje od one kod tromboza uzrokovanih drugim bolestima i/ili stanjima; najčešće je to dugotrajna terapija preparatima kumarina (varfarin).

Jedan od ključnih elemenata potporne terapije je i prevencija i liječenje infekcija. Sama bolest uzrokuje određeni stupanj imunodeficijencije, a primjenom različitih kemoterapijskih protokola rizik infekcije se još povećava. Većina smjernica preporuča profilaksu cijepljenjem protiv inkapsuliranih uzročnika (pneumokok) i virusnih bolesti (gripa), medikamentoznu profilasku protiv atipičnih uzročnika kao što je Pneumocystis te profilasku gljivičnih infekcija, osobito u kontekstu visoko dozne terapije kod liječenja transplantacijom.[36] U slučaju po život opasnih infekcija preporuča se primjena intravenskih gamaglobulina. Nadalje, kod primjene bortezomiba uočen je veći rizik od razvoja herpes zostera, pa se danas preporuča uz protokole koji sadrže inhibitor proteasoma primjena antivirusne terapije (aciklovira).[61]

1.11. Procjena odgovora na liječenje

Za procjenu odgovora na liječenje koristi se kriteriji odgovora prema *International Myeloma Working Group:*[62]

Tablica 5. Kriteriji procjene odgovora na liječenje – prema International Myeloma Working Group.

ODGOVOR	KRITERIJI
sKR - striktna kompletna remisija (eng. sCR)	kriteriji za KR uz normalan omjer slobodnih lakih lanaca i odsutnost klonalnih plazma stanica u nalazu imunohistokemije ili imunoflorescencije
KR - kompletna remisija (eng. CR)	negativna imunofiksacija seruma i/ili urina; nestanak svih mekotkivnih tumora - plazmocitoma; < 5% plazma stanica u koštanoj srži
VGPR - vrlo dobra parcijalna remisija (od eng. very good partial response)	monoklonski protein u serumu i/ili urinu detektibilan imunofiksacijom, ali ne elektroforezom ili 90% ili veće smanjenje monoklonskog proteina u serumu uz monoklonski protein u urinu < 100 mg/24h
PR - parcijalana remisija (eng. PR)	• ≥ 50% smanjenje monoklonskog proteina u serumu i smanjenje monoklonskog proteina u urinu ≥ 90% ili < 200mg/24h • ukoliko je monoklonski protein u serumu i/ili urinu nemjerljiv, smanjenje ≥ 50% u razlici između monoklonskog tipa i nemonoklonskog tipa lakog lanaca • ukoliko je monoklonski protein u serumu i/ili urinu nemjerljiv, a isto tako i slobodni laki lanci u serumu, smanjenje ≥ 50% plazma stanica u koštanoj srži, pod uvjetom da ih je na početku bilo > 30% • ukoliko se radi o ekstramedularnom plazmocitomu, uz navedene kriterije, ≥ 50% smanjenjne u veličini ekstramedularnog plazmocitoma
SD - stabilna bolest (eng. stable disease)	ne zadovoljava kriterije za niti jedan odgovor - KR, VGPR, PR niti za progresivnu bolest
Progresivna bolest	jedno ili više od slijedećg mora biti zadovoljeno: • povećanje od 25% ili više od početne vrijednosti monoklonskog proteina u serumu (u apsolutnim vrijednostima povećanje ≥ 0.5 g/dL) • povećanje od 25% ili više od početne vrijednosti monoklonskog proteina u urinu (u apsolutnim vrijednostima povećanje ≥ 200 mg/24h) • ukoliko je monoklonski protein u serumu i/ili urinu nemjerljiv, ≥ 25% povećanje u razlici između

	monoklonskog tipa i nemonoklonskog tipa lakog lanaca (u apsolutnim vrijednostima povećanje > 10mg/dL) • nastanak novih koštanih lezija ili ekstramedularnih plazmocitoma i/ili povećanje postojećih koštanih lezija ili ekstramedularnih plazmocitoma • nastanak hiperkalcemije (> 2.65 mmol/L) koja se može pripisati samo poremećaju plazma stanica
Klinički relaps	Klinički relaps zahtjeva jedno ili više od navedenog: • izravni dokaz povećanja bolesti i/ili disfunkcije organa (CRAB) • nastanak novih ekstramedularnih plazmocitoma ili koštanih lezija • definitivno povećanje postojećih ekstramedularnih plazmocitoma ili koštanih lezija (definitivno povećanje se definira kao 50% (najmanje 1cm) povećanje tumora (mjeri se serijski zbroj umnožaka poprečnih promjera mjerljivih tumora) • hiperkalcemija (Ca > 2.65 mmol/L) • smanjenje hemoglobina ≥ 20 g/L • porast serumskog kreatinina ≥ 177 μmol/L
Relaps iz KR	jedno ili više od navedenog: • ponovna pojava monoklonskog proteina u imunofiksaciji ili elektroforezi • povećanje plazma stanica ≥ 5% u koštanoj srži • pojava bilo kojeg znaka progresije (novi plazmocitom, litička koštana lezija, hiperkalcemija...)

1.12. Značenje dubine odgovora

U novije vrijeme sve je više dokaza da je postizanje kompletne remisije povezano s dužim preživljenjem bez progresije bolesti, a prema nekim studijama i s boljim ukupnim preživljenjem bolesnika. Zato je postizanje kompletne remisije, ali i njezino održavanje postalo jedan od glavnih ciljeva u liječenju bolesnika s multiplim mijelomom.

Međutim, postavlja se pitanje je li sadašnja definicija kompletne remisije temeljena na serološkim i citološkim analizama dovoljno osjetljiva. Problem definicije kompletne remisije proizlazi iz nekoliko činjenica. Prvo, serološke metode imaju svoje nedostatke. Imunofiksacija serumskih proteina je samo kvalitativna vrijednost, dok značenje vrijednosti koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu i njihovog omjera, koji se koriste za definiciju

stroge kompletne remisije, još nije u potpunosti razjašnjeno, barem kad je u pitanju tip bolesti koji producira cjelovitu molekulu imunoglobulina. Također, postoje teorije da uz klon stanica koje proizvode monoklonski protein, uvijek postoji i subpopulacija nesekretornih stanica, moguće i matičnih mijelomskih stanica, koje nije moguće pratiti serološkim metodama. Drugo, citološke analize često mogu podcijeniti postotak rezidualnih plazma stanica zbog biologije samog tumora; rast u nakupinama; dilucije s perifernom krvi prilikom uzorkovanja i sl., a također ne mogu se razlikovati maligne od normalnih plazma stanica. Treće, poznato je da promjene kariotipa također imaju prognostičko značenje, ali za sada nisu uključene u kriterije za procjenu odgovora. Jedan od mogućih razloga za to je što je nalaz kariotipa informativan u samo 30% bolesnika s multiplim mijelomom.

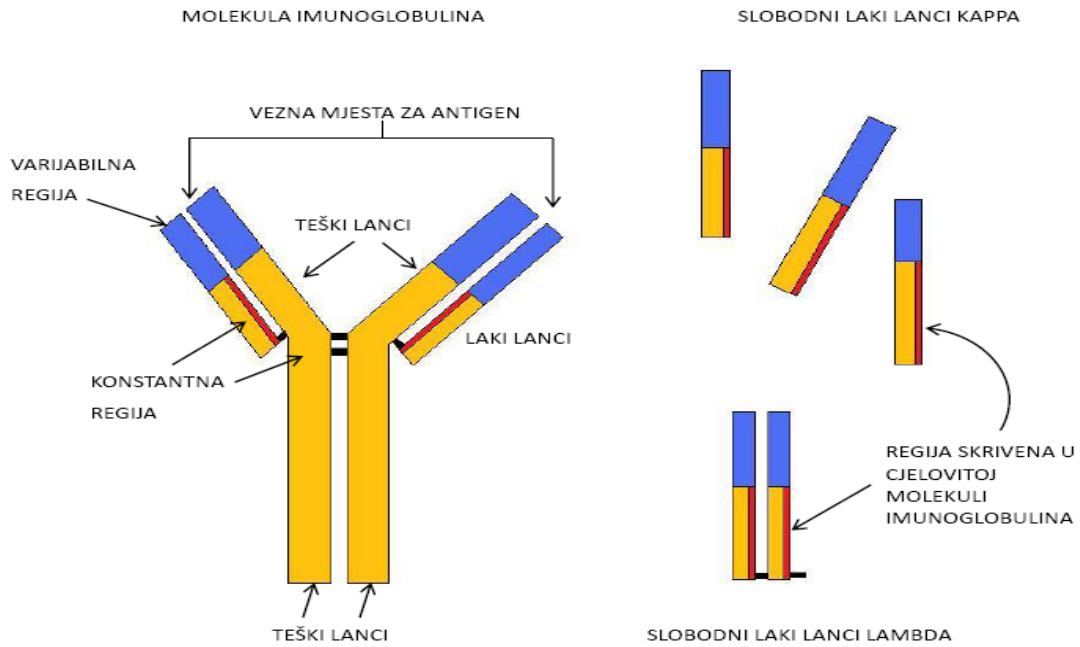
Zato se pokušavaju naći nove metode koje bi poboljšale detekciju rezidulane bolesti i tako preciznije definirale stanje remisije. Najviše se u tom smislu proučavaju metode molekularne analize, imunofenotipizacija stanica koštane srži protočnom citometrijom te metode slikovnog prikaza. Metode molekularne analize; u novije vrijeme i GEP analize (od eng. *gene expression profiling*), smatraju se najosjetljivijima u detekciji minimalne rezidualne bolesti, ali njihov velik nedostatak je da su vrlo skupe i zahtjevne te se za sada provode samo eksperimentalno u nekoliko centara.[63] Od metoda slikovnog prikaza, u središtu zanimanja je magnetska rezonancija. Neki autori smatraju da bi magnetska rezonancija mogla detektirati populaciju onih nesekretornih mijelomskih stanica u koštanoj srži koje serološkim testovima ostaju neprepoznate.[63] Imunofenotipizacija stanica koštane srži je komplementarna metoda citološkoj analizi koštane srži. Njezina velika prednost je što omogućuje razlikovanje malignih od nemalignih plazma stanica, a prema nekim studijama postizanje imunofenotipske remisije je također neovisni prognostički čimbenik.[64]

Poznato je da je postotak postizanja kompletnih remisija relativno mali (5 do 15%) kada se primjenjuje samo konvencionalna kemoterapija te da se liječenjem transplantacijom matičnih stanica i/ili dodatkom novih lijekova kao što imunomodulatorni lijekovi i inhibitori proteasoma, taj postotak može povećati, ali i dalje ne prelazi 50%.[63] Ta činjenica ima i veliko kliničko značenje i otvara niz kliničkih pitanja: treba li u bolesnika koji su postigli kompletnu remisiju nastaviti terapiju, koju, kako dugo i sl. Upravo zato se javila potreba za preciznijim definiranjem stanja kompletne remisije.

U tom smislu doprinos preciznijoj definiciji stanja kompletne remisije imala bi i osjetljivija metoda detekcije monoklonskog protiena u serumu, a takav potencijal ima metoda kvantifikacije monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca imunoglobulina.

2 ZNAČENJE ODREĐIVANJA MONOKLONSKOG PROTEINA

Ključno mjesto u dijagnostici i praćenju bolesnika s multiplim mijelomom ima detekcija i kvantifikacija monoklonskog proteina te kvantifikacija tumorskih stanica u koštanoj srži. Već u uvodnom dijelu spomenuto je da mijelomske stanice ne moraju nužno producirati cijele molekule imunoglobulina već mogu proizvoditi samo lake lance (tablica 1). Zato, da bi se lakše razumijele metode detekcije i mjerenja monoklonskih proteina potrebno je poznavati osnovnu strukturu molekule imunoglobulina i krakteristike njezinih sastavnica. Molekula imunoglobulina je građena od dva identična teška lanca i dva laka lanca (slika 5), ukupne molekulske mase oko 150 kDa. Ovisno o tipu teških lanaca razlikujemo 5 razreda ili izotipova imunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG i IgM. Također, razlikujemo dva razreda ili izotipa lakih lanaca, kappa i lambda, a u jednoj molekuli imunoglobulina uvijek su prisutni laki lanci istog razreda. U nastavku su detaljnije opisane novije metode detekcije i mjerenja monoklonskog proteina; kvantifikacija slobodnih lakih lanaca i kvantifikacija mnoklonskog izotipa imunoglobulina (monoklonskog vezanog para teškog i lakog lanca); kao i multiparametarska imunofenotipizacija kao metoda kvantifikacije tumorskih stanica.



Slika 5. Građa molekule imunoglobulina. Kappa laki lanci se u slobodnom obliku nalaze kao monomeri, dok se lambda laki lanci vežu u dimere. Regija na lakim lancima označena crvenom bojom je mjesto na koje se veže ovčje protutijelo u testu za kvantifikaciju slobodnih lakih lanaca.

2.1. Slobodni laki lanci

Jedan od novijih dijagnostičkih testova koji je u središtu zanimanja je određivanje slobodnih lakih lanaca imunoglobulina i njihovog omjera (kappa/lambda omjer) u serumu i urinu.[65] Kao što je već rečeno, razlikujemo dva razreda lakih lanaca, kappa i lambda, a u jednoj molekuli imunoglobulina uvijek su prisutni laki lanci istog razreda. Normalno se proizvodi oko 40% više lakih lanaca nego teških lanaca, što osigurava pravilnu proizvodnju cijelovite molekule imunoglobulina. Također normalno se proizvodi oko dva puta više kappa lakih lanaca od lambda lakih lanaca. Zbog činjenice da ih se stvara 40% više od teških lanaca, nalazimo ih i kao slobodne lake lance u serumu i urinu. U slobodnom, nevezanom, obliku kappa laki lanci se nalaze kao monomeri, dok se lambda tip lakih lanaca veže u dimere. Koncentracija slobodnih lakih lanaca u serumu i urinu ovisi o produkciji u plazma stanicama i bubrežnom klirensu. Radi se o proteinima male molekulske mase, oko 25 kDa kappa laki lanci, odnosno 50 kDa dimeri lambda lakih lanaca, koji se filtriraju u glomerulirama nefrona i konačno metaboliziraju u proksimalnim tubulima. Bubreg ima veliki kapacitet metabolizma proteina male molekulske težine, do 60 kDa, čak do 30 grama dnevno, a procjenjuje se da je u zdravog pojedinca dnevna produkcija lakih lanaca svega oko 500 miligrama. Stoga slobodni laki lanci imaju vrlo kratak poluvijek života: kappa tip 2-4 sata, a lambda tip 3-6 sati. Iz ovoga proizlazi da će koncentracija slobodnih lakih lanaca u serumu i urinu biti povećana kada postoji prevelika produkcija, kao u slučaju monoklonskih gamapatija, i/ili smanjen klirens u bubregu.[66]

Prije nekoliko godina osmišljen je test za kvantitativno određivanje slobodnih lakih lanca u serumu i urinu. Test se temelji na imunološkoj reakciji ovčjih protutijela i područja na lakim lancima koje je u cjelovitoj molekuli imunoglobulina sakriveno vezom s teškim lancem, što ovoj metodi daje visoku osjetljivost i specifičnost[66] (slika 5). Stavljanjem koncentracija različitih tipova slobodnih lakih lanaca u omjer (kappa/lambda omjer), učinkovitost testa se povećava jer omogućuje razlikovanje grupa entiteta tj. uzorka koji dovode do povećanja koncentracije slobodnih lakih lanaca. Naime, ukoliko se radi o povećanju koncentracije slobodnih lakih lanaca uzrokovanom bubrežnom bolešću ili poliklonskom sintezom, kao npr. kod kroničnih infekcija, omjer kappa i lambda lakih lanca će biti nepromjenjen, točnije postojat će povećanje koncentracije i kappa i lambda lakih lanaca. Nasuprot tome, ukoliko je uzrok porasta koncentracije lakih lanaca tumorska sekrecija, omjer lakih lanaca će biti abnormalan. Tumorska sinteza je monoklonska pa do povećanja

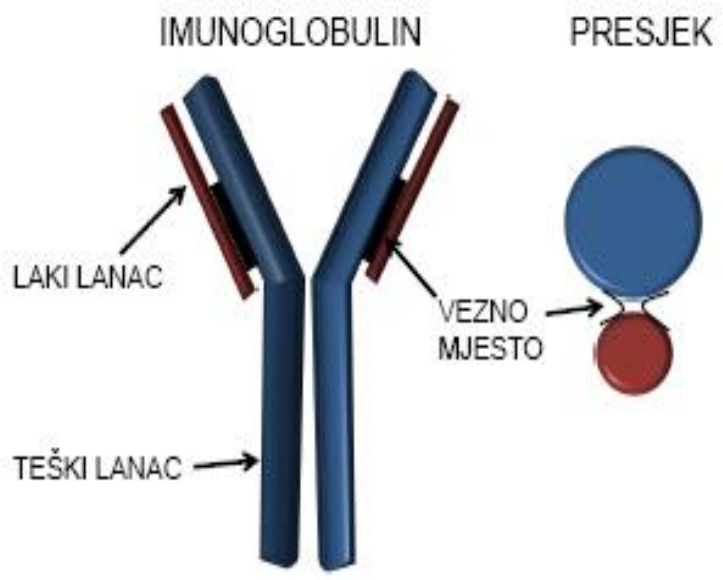
koncentracije ukupnih lakih lanaca dolazi zbog povećane sinteze jednog od izotipova, a često i supresije sinteze onog drugog izotipa. Zato je ovaj test, određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu i urinu, označio velik napredak u dijagnostici monoklonskih gamapatija. Najzornije se to vidi na primjeru tzv. mijeloma lakih lanaca tj. oblika bolesti u kojem tumorske stanice proizvode i secerniraju samo lake lance, a ne i cijele molekule imunoglobulina. Bolesnici s takvim oblikom bolesti, a procjenjuje se da ih je oko 30% od ukupnog broja bolesnika s mijelomom, su često bili neprepoznati ili krivo kategorizirani kao nesekretorni oblik bolesti jer se niti elektroforetskim metodama niti imunofiksacijom serumskih protiena nije mogao dokazati monoklonski protein. Obzirom na kratak poluvijek života slobodnih lakih lanaca u serumu od samo 2-6 sati metoda se pokazala i kao dobro sredstvo praćenja odgovora na terapiju, a prema nekim autorima i pokazatelj ranog relapsa.[67,68] U posljednje vrijeme sve je više radova koji upućuju na prognostičku važnost koncentracije slobodnih lakih lanaca i/ili njihovog omjera, a nedavno su normalizacija koncentracije lakih lanaca u serumu i njihovog omjera uvedeni kao jedan od kriterija za postizanje stroge kompletne remisije.[17,19] Međutim, prognostička vrijednost određivanja lakih lanaca odnosi se u prvom redu na mijelom lakih lanaca (kod kojeg M komponentu čine samo laki lanci) i amiloidozu, dok je u mijeloma koji izlučuje cjelovitu molekulu imunoglobulina, prognostička vrijednost lakih lanaca i dalje upitna.[69] Naime, normalizacija koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu i/ili njihovog omjera u bolesnika s mijelomom koji proizvodi cjelovitu molekulu imunoglobulina, ne znači nužno negativizaciju nalaza imunofiksacije tj. postizanje kompletne remisije, kao što niti negativna imunofiksacija ne znači nužno normalizaciju koncentracije lakih lanaca u serumu i/ili njihovog omjera. Ova potonja pojava može imati dvojako objašnjenje. Prvo je da se radi o pojavi subklona maligne plazma stanice koji producira samo lake lance (u anglo-saksonskoj literaturi se taj fenomen označava kao "*light chain escape*").[70] Drugo objašnjenje je da je abnormalni omjer slobodnih lakih lanaca u serumu odraz oligoklonalnosti tj. oporavka humoralne imunosti.[71] Iz navedenog je razumljivo da je uloga i prognostička vrijednost određivanja slobodnih lakih lanaca u bolesnika s multiplim mijelomom koji proizvodi cijelu molekulu imunoglobulina nejasna i nedovoljno definirana te zahtijeva daljnja ispitivanja.

2.2. Monoklonski imunoglobulini – monoklonski izotipovi teškog/lakog lanca (Ig'κ ili Ig'λ)

Većina bolesnika s multiplim mijelomom ima cijelu molekulu imunoglobulina kao monoklonski protein te za dijagnozu i procjenu odgovora na terapiju u tih bolesnika zlatni standard su elektroforeza serumskih proteina za dokaz prisutnosti M komponente, određivanje koncnetracije ukupnih imunoglobulina IgA, IgG, IgM i imunofiksacija za dokaz monoklonalnosti. Međutim, navedene metode imaju nedostataka. Jedan od najvažnijih nedostataka određivanje ukupnih imunoglobulina standardnom metodom, kada su u pitanju monoklonske gamapatije, je taj što se ne dobiva podatak koliko je ta vrijednost rezultat produkcije monoklonskog proteina, a koliko supresije normalnih imunoglobulina. To proizalzi iz činjenice da je poluvijek života imunoglobulina, za razliku od slobodnih lakih lanaca, vrlo dug od nekoliko dana do nekoliko tjedana. To se posebice odnosi na imunoglobuline izotipa G koji ima poluvijek života čak do 21 dan, što je i klinički vrlo važno jer većina bolesnika (do 70%)[72] boluje upravo od IgG tipa multiplog mijeloma. Za imunoglobuline izotipova A i M poluvijek života iznosi 5 do 6 dana. Imunoglobulini G imaju tako dug poluvijek života zbog specifičnog metabolizma. Uz albumine ovaj tip imunoglobulina se veže na tzv. Brambellove ili neonatalne receptore (uobičajno označene kao FcRn) koji ih štite od degradacije u stanicama i omogućuju recikliranje imunoglobulina.[66] Jasno je da ukupna količina imunoglobulina G određena standardnom metodom stoga nije odraz isključivo tumorske produkcije već i procesa recikliranja, što onemogućuje točnu procjenu stanja bolesti. To se posebice odnosi kod nižih koncentracija monoklonskog imunoglobulina G kada se pravu procjenu stanja bolesti i/ili odgovora na terapiju dobiva tek nakon nekoliko tjedana od provedene terapije. Nasuprot tome kod visokih koncentracija monoklonskog imuniglobulina G, na početku terapije dolazi do brzog pada njegove vrijednosti, ali istovremeno zbog zasićenja FcRn receptora monoklonskim IgG dolazi do veće degradacije nemonoklonskog para, npr. ako je monoklonski IgG kappa, dolazi od veće degradacije IgG lambda. Drugim rječima, normalizacija vrijednosti ukupnog imunoglobulina G nije odraz samo smanjenja tumorske mase već i supresije poliklonske komponente. Od ostalih nedostataka treba još naglasiti da vrijednost ukupnih imunoglobulina određena standardnom metodom može značajno varirati obzirom na promjene u hematokritu i volumenu krvi. Nedostatak imunofiksacije seruma je taj što ima samo kvalitativnu vrijednost.

Poboljšanje detekcije i mjerenja monoklonskog imunoglobulina moglo bi se postići određivanjem specifičnog monoklonskog izotipa imunoglobulina npr. IgG kappa, a upravo

takvu metodu je osmislila tvrtka "The Binding Site" (Velika Britanija). Nova metoda određivanja imunoglobulina (komercijalnog imena *Hevylite*) omogućeuje kvantifikaciju vrijednosti pojedinih izotipova imunoglobulina, ne samo prema izotipu teškog lanca već i prema izotipu vezanog lakog lanca, dakle omogućuje zasebno mjerenje npr. IgG kappa i IgG lambda. Na temelju svega već navedenog, metoda bi trebala omogućiti preciznije mjerenje baš monoklonskog imunoglobulina tj monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca te otkloniti nedostatke sadašnjih testova. Metoda je u svojoj osnovi identična metodi za određivanje slobodnih lakih lanaca i temelji se na reakciji specifičnog protutijela koje se veže na spojno mjesto teškog i lakog lanca u molekuli imunoglobulina (slika 6).



Slika 6. Građa molekule imunoglobulina. Vezno mjesto teškog i lakog lanca (obojano crnom) je ciljno mjesto vezanja specifičnog ovčjeg protutijela *Hevylite* testa.

Test se sastoji od dva protutijela za svaki razred imunoglobulina (IgG, IgA, IgM) ovisno o razredu lakih lanaca: protutijelo koje se veže za spoj teškog lanca i kappa lakog lanca i protutijelo koje se veže na spoj teškog lanca i lambda lakog lanca (IgGκ, IgGλ, IgAκ, IgAλ, IgMκ, IgMλ). Na taj način moguće je kvantitativno mjerenje koncentracije i monoklonskog izotipa teškog/lakog lanaca imunoglobulina i nemonoklonskog izotipa imunoglobulina, dakle par teškog i lakog lanca koji se nalazi u monoklonskom imunoglobulinu. Klonalnost tako izmjerenih imunoglobulina se određuje stavljanjem u omjer

izotipova istog razreda teškog lanca tako da je izotip vezan s kappa lakim lancem brojnik, a izotip vezan s lambda lakim lancem nazivnik (IgGκ/IgGλ; IgAκ/IgAλ; IgMκ/IgMλ).[73] Velik omjer će biti u slučaju velikog brojnika što znači da se izotip imunoglobulina s kappa lakim lancima proizvodi u suvišku i da je on monoklonalni. Nasuprot tome, ako je omjer mali, manji od nule, znači da je nazivnik velik tj. da se izotip imunoglobulina s lambda lakim lancima proizvodi u suvišku i da je on monoklonalan. Refrentne vrijednosti pojedinih izotipova i njihovih omjera navedene su u tablici 7 (str. 39). Prema prvim rezultatima, ova nova metoda kvantificiranja imunoglobulina u serumu ima veću osjetljivost od standardne metode mjerenja koncentracije imunoglobulina. To se osobito odnosi na bolesnike u kojih je jedini znak bolesti pozitivna imunofkisacija proteina u serumu jer se može procijeniti točna količina tumorske produkcije imunoglobulina iako je ona u tih bolesnika vrlo mala. Nadalje, nova metoda omogućuje i bolje praćenje učinka terapije jer daje uvid u dinamiku samo monoklonskog izotipa, a iz istog razloga pogodna je i za detekciju relapsa i/ili rezidualne bolesti.[74,75,76,77,78] I omjer monoklonskog i nemonoklonskog izotipa imunoglobulina (Ig'κ/Ig'λ) također ima prednosti. Stavljanjem vrijednosti u omjer kompenzira se utjecaj promjene volumena plazme i/ili hematokrita, kao i utjecaj metabolizma preko FcRn receptora jer te promjene jedanko utječu i na monoklonski i na nemonoklonske imunoglobulin. Na kraju, nova metoda daje i točan uvid u stupanj supresije nemonoklonskog izotipa imunoglobulina. Procjena supresije ne-monoklonskog izotipa je važna jer nije samo posljedica opisanog metabolizma imunoglobulina već i inhibicije normalnih, poliklonskih plazma stanica. Zato se smatra da je dubina supresije ne-monoklonskog izotipa odraz infiltracije koštane srži klonskim stanicama, a njegova vrijednost bi mogla biti također pokazatelj rezidualne bolesti.[79]

2.3. Imunofenotipizacija koštane srži

U sklopu praćenja bolesnika s multiplim mijelomom i procjene stanja bolesti važno pitanje je i procjena stanja remisije tj. minimalne rezidualne bolesti jer je stanje remisije točnije njezina dubina jedan od važnjih ciljeva u liječenju. Jedan od kriterija za procjenu stanja kompletne remisije je citomorfološki kriterij prisutnosti manje od 5% plazma stanica u koštanoj srži, prema Međunarodnoj radnoj skupini za mijelom (*International Myeloma Working Group*). Prema novijim studijama prisutnost manje od 5% plazma stanica u koštanoj srži je povezano i s boljim ukupnim preživljenjem. Mislilo se da će određivanje slobodnih lakih lanaca, kao indirektni pokazatelj tumorske mase, moći zamjeniti citološke metode analize koštane srži, ali nije nađena dovoljno jaka korelacija između slobodnih lakih lanca i stanja kompletne remisije, pa tako niti između lakih lanaca i postotka plazma stanica u koštanoj srži.[80] Stoga su metode morfološke analize koštane srži i dalje nezaobilazni dio dijagnostike, praćenja i procjene stanja bolesti, a sve je više dokaza o važnosti razlikovanja malignih i nemalignih plazma stanica tj. detekciji minimalne rezidualne bolesti.

U tom smislu najosjetljivijom metodom za razlikovanje klonskih od normalnih plazma stanica pokazala se multiparametarska imunofenotipizacija protočnom citometrijom.[81] Imunofenotipizacija je metoda razlikovanja vrsta stanica koja se temelji na reakciji specifičnih protutijela na različite stanične biljege tzv. CD biljege (skraćenica od eng. *cluster of differentiation*). Protutijela su visoko specifična i vežu samo na točno određene stanične biljege, a obilježena su fluorescentnim bojama. Postupak obilježavanja stanica specifičnim protutijelima sastoji se od inkubacije uzorka koštane srži s reagensom, ispiranja uzorka od suviška reagensa pri čemu stanice koje nose ispitivani biljeg ostaju obilježene protutijelom. Uzorak se potom propušta kroz protočni citometar gdje se fluorescentna boja na protutijelu pobuđuje laserima određenih valnih duljina. Intenzitet fluorescencije se izražava kao postotak obilježenih stanica. Korištenjem više protutijela tj. određivanjem više biljega na stanicama moguće je detektirati i kvantificirati točno određenu populaciju stanica.

Kada je multipli mijelom u pitanju, kao biljezi za probir plazma stanica od ostalih stanica koštane srži koriste se protutijela na CD138 (syndecan 1) i CD38, biljezi koji su univerzalni svim plazma stanicama. Dakle, pomoću ova dva biljega može se odrediti ukupan postotak plazma stanica u koštanoj srži bez uvida u omjer malignih i nemalignih plazma stanica. Razlikovanje malignih od nemalignih plazma stanica moguće je obilježavanjem dodatnih biljega, ali se nameće pitanje kojih. Za sada ne postoji jedinstveni panel biljega koji

bi nedvosmisleno i u svih bolesnika detektirao maligne plazma stanica; mijelomske stanice mogu i imaju različit fenotip kod različitih bolesnika. Prema smjernicama *European Myeloma Network* analiza protočnom citometrijom mora obavezno uključivati biljege CD138 i CD38 radi izdvajanja ukupne populacije plazma stanica te biljege CD19 i CD56 radi detekcije aberantnih plazma stanica, a poželjno je odrediti i biljege CD45, CD117, CD28, CD20 i CD27.[82] Zanimljivo je da su neke studije, osim što su dokazale prognostičko značenje postotka malignih plazma stanica tj. kraće ukupno preživljenje bolesnika s većim postotkom malignih plazma stanica, pokazale kako postotak normalnih plazma stanica kod postavljanja dijagnoze također ima prognostičko značenje. Pokazalo se da bolesnici s inicijalno većim postotkom normalnih plazma stanica imaju duže ukupno preživljenje[83] što bi u budućnosti moglo značiti i drugačiji terapijski pristup za tu grupu bolesnika.

Zato smo odlučili i u našem istraživanju pokušati definirati stupanj infiltracije koštane srži multiparametarskom imunofenotipizacijom. Određivali smo šest staničnih biljega: CD38, CD138, CD45, CD117, CD56, CD19. Biljezi CD138 i CD38 su korišteni za primarni probir kao što je opisano u tekstu. Ostali biljezi su odabrani radi daljnje selekcije aberantnih plazma stanica. Biljeg CD45 je jako izražen na normalnim i reaktivnim plazma stanicama, dok je na malignim odsutan, a prema nekim autorima odsutnost CD45 biljega ima i loše prognostičko značenje.[84] Za razliku od biljega CD45, biljeg CD56 je često i jako izražen na aberantnim plazma stanicama (čak u 94% bolesnika), dok ga normalne rijetko izražavaju. Taj biljeg je zapravo adhezijska molekula, a primijećeno je da bolesnici s CD56 negativnim mijelomskim stanicima češće imaju ekstramedularnu bolest.[84] Biljeg CD19, točnije izostanak njegove ekspresije na plazma stanicama smatra se znakom malignosti, u čak 97% bolesnika ovaj biljeg je negativan na malignim plazma stanicama.[84] Točna uloga CD19 još nije poznata. Niti za biljeg CD117 još nije poznata točna uloga, ali je uočeno da je njegova ekspresija povezana s boljim ishodom (povezuje se s indolentnim oblikom bolesti).[84]

Namjera ovog istraživanja je ispitati vrijednost metode kvantificiranja monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca imunoglobulina u serumu u procjeni stanja bolesti te utvrditi odnose tog novog testa sa standardnim serološkim testovima i postotkom infiltracije koštane srži plazma stanicama određenog citološki i imunofenotipizacijom.

Kao što je opisano u prethodnim poglavljima, standardne metode kojima se služimo za detekciju i mjerenje monoklonskog imunoglobulina imaju dosta nedostatka (utjecaj promjene volumena plazme i hematokrita, utjecaj različitog metabolizma pojednih razreda imunoglobulina, komigracija s drugim serumskim proteinima u elektroforetskom gelu i dr.)

zbog čega nisu uvijek pouzdana mjera tumorske aktivnosti i/ili veličine tj. ne koreliraju uvijek točno s kliničkim stanjem. Poboljšanje detekcije i mjerenja monoklonskog imunoglobulina podrazumjeva otklanjanje spomenutih nedostatka, a upravo takav potencijal ima nova određivanja imunoglobulina komercijalnog imena *Hevylite*. Metoda omogućeuje kvantifikaciju vrijednosti pojedinih izotipova imunoglobulina, ne samo prema izotipu teškog lanca već i prema izotipu vezanog lakog lanca, dakle omogućuje zasebno mjerenje npr. IgG kappa i IgG lambda. Drugim riječima, metoda omogućuje točnu kvantifikaciju monoklonskog izotipa imunoglobulina, ali i ne-monoklonskog para imunoglobulina istog razreda teškog lanca. Kvanitifkacija ne-monoklonskog para nije ništa manje važna jer stavljanjem u omjer monoklonskog i ne-monoklonskog izotipa (najčešće Ig'κ izotip kao brojnik, a Ig'λ izotip kao nazivnik) nadvladava se učinak promjena volumena plazme i/ili hematokrita i metabolizma na vrijednosti monoklonskog imunoglobulina, obzirom da navedeni fenomeni jednako utječu i na monoklonski i na ne-monoklonski imunoglobulin. Na temelju navedenog, nova metoda bi trebala omogućiti preciznije mjerenje monoklonskog imunoglobulina i bolji uvid u kliničko stanje bolesti (akitvnost i veličinu tumorske mase).

Naš cilj je utvrditi kliničku korist ovog novog testa u dijagnostici i praćenju bolesnika samog za sebe i u korelaciji s ostalim testovima, te ga uvesti u rutinsku kliničku i laboratorijsku praksu.

3 **HIPOTEZE**

Kvantifikacijom monoklonskih izotipova teškog/lakog lanaca imunoglobulina u serumu i određivanjem omjera monoklonskih i nemonoklonskih izotipova imaju dijagnostičko i prognostičko značenje u bolesnika s multiplim mijelomom.

Nalazima kvantitatifikacija monoklonskih izotipova teškog/lakog lanaca imunoglobulina u serumu, koncentracije slobodnih lakih lanaca imunoglobulina u serumu i nalazom multiparametrijske imunofenotipizacije može se točnije definirati stanje remsije, odnosno veličina rezidualne bolesti tijekom liječenja multiplog mijeloma.

4 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Utvrditi vrijednost testa za kvantifikaciju izotipova teških/lakih lanaca imunoglobulina u serumu i njihovog omjera (IgGκ/IgGλ; IgAκ/IgAλ; IgMκ/IgMλ) u dijagnostici i praćenju bolesnika s multiplim mijelomom.
2. Odrediti razinu izotipova teških/lakih lanaca imunoglobulina IgG i IgA u serumu bolesnika s multiplim mijelomom.
3. Ispitati povezanost kvantitativnog određivanja izotipova teških/lakih lanaca imunoglobulina IgG i IgA u serumu i omjera s imunofiksacijom u serumu, koncentracijom slobodnih lakih lanca u serumu i imunofenotipizacijom stanica koštane srži protočnim citometrom.
4. Utvrditi ulogu testa za kvantifikaciju izotipova teških/lakih lanaca imunoglobulina u serumu u definiranju stanja bolesti.
5. Utvrditi utjecaj monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca IgG i IgA i njihovih omjera Ig'κ/Ig'λ na ukupno preživljenje i vrijeme do progresije multiplog mijeloma.
6. Utvrditi odnos testa za kvantifikaciju izotipova teških/lakih lanaca imunoglobulina u serumu i njihovog omjera sa stupnjem imunosupresije.
7. Odrediti prognostičku vrijednost kvantitativnog određivanja izotipova teškog/lakog lanca IgG i IgA i njihovih omjera Ig'κ/Ig'λ.

5 **ISPITANICI I METODE**

5.1. Ispitanici

Istraživanje je provedenou bolesnika s multiplim mijelomom liječenih u Zavodu za hematologiju KBC-a Zagreb u razdoblju od siječnja 2011. do listopada 2013. godine. Značajke ispitanika prikazuje tablica 9. U ispitivanje su uključeni bolesnici s multiplim mijelomom u raznim fazama bolesti: kompletnoj remisiji, parcijalnoj remisiji, progresiji/relapsu i stabilnoj bolesti prema kriterijima Međunarodne radne skupine za mijelom, odnosno bolesnici s različitom veličinom tumorske mase.[62] Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine: (i) ispitanici s monoklonskim IgG, i (ii) ispitanici s monoklonskim IgA. Ispitivanje je provedeno i za cijelu skupinu.

5.2. Metode

5.2.1. Plan rada

U svih ispitanika učinjena je slijedeća obrada:

- reevaluacija bolesti: osnovni biokemijski i hematološki parametri, pretrage vezane za određivanje monoklonskog proteina: (i) elektroforeza serumskih proteina, (ii) određivanje monoklonskog imunoglobulina imunofiksacijom proteina u serumu, (iii) kvantitativno određivanje slobodnih lakih lanaca kappa i lambda u serumu, (iv) koncentracija ukupnih imunoglobulina, (v) citološka analiza koštane srži, (vi) imunofenotipizacija protočnim citometrom (multiparametarska imunofenotipizacija je učinjena u 24 bolesnika)
- kvantifikacija monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca imunoglobulina razreda IgA, IgG, njihovog omjera (provedena je u točki reevaluacije bolesti).
- Reevalkuacija bolesti učinjena je u jednoj točki praćenja.

5.2.2. Definicija stanja multiplog mijeloma

Stanje multiplog mijeloma u ispitanika određeno je temeljem kriterija Međunarodne radne skupine za mijelom (*International Myeloma Working Group)*[62] i to: novootkriveni mijelom, kompletna remisija, vrlo dobra parcijalna remisija, parcijalna remisija, relaps mijeloma, progresija mijeloma, stabilna bolest..

5.2.3. Mjerenje koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu

Metoda mjerenja koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu temelji se na reakciji ovčjih protutijela koja se specifično vežu za slobodne lake lance u serumu, na epitope koji su skriveni kada je laki lanac vezan u molekuli imunoglobulina. Koncentracija slobodnih lakih lanaca u serumu se određuje nefelometrijskom tehnikom.[73,86] Tehnika se izvodi u tekućem mediju. Dodatkom otopine protutijela u otopinu koja sadrži antigen nastaje zamućenje zbog nastanka kompleksa protutijelo-antigen. Nakon inkubacije mjeri se rasap svjetla pod kutem od 13°. Standardna krivulja rasapa svjetlosti dobije se mjerenjem poznatih koncnetracija antigena. Koriste se reagensi *Freelite*^{TM} *Human Kappa* i *Freelite® Human Lambda* prema uputama proizvođača (The Binding Site, UK) za nefelometar *Behring Nephelometer Analyzer II (Siemens)*.

Kao referentne vrijednosti korištene su vrijednosti navedene u uputama proizvođača dobivene mjerenjem koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu i njihovog omjera u zdravih odraslih osoba; vrijednosti su navedene u tablici 6.

Table 6. Referentne vrijednosti koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu i njihovog omjera (kappa/lambda omjer).

TIP LAKOG LANCA	MEDIJAN (mg/L)	RASPON (mg/L)
Kappa	7,30	3,30 – 19,40
Lambda	12,40	5,71 – 26,30
Omjer kappa/lambda	0,60	0,26 – 1,65

5.2.4. Kvantifikacija monoklonskih izotipova teškog/lakog lanaca imunoglobulina

Komercijalno su dostupni reagensi za razrede imunoglobulina IgG, IgA i IgM. Za svaki razred imunoglobulina postoje 2 reagensa ovisno o tipu lakog lanca u molekuli imunoglobulina (IgGκ, IgGλ, IgAκ, IgAλ, IgMκ, IgMλ).

Metode kvantitativnog određivanja monoklonskih izotipova teških/lakih lanaca imunoglobulina u serumu također se temelji na reakciji ovčjih protutijela koja se specifično vežu za spojno mjesto teškog i lakog lanca u cijelovitoj molekuli imunoglobulina. Koncentracija izotipova teških/lakih lanaca se određuje nefelometrijskom tehnikom kako je opisano gore. Koristi se reagens *Hevylite*® prema uputama proizvođača (The Binding Site, UK) za nefelometar *Behring Nephelometer Analyzer II (Siemens).*

Kao referentne vrijednosti za kvantitativno određivanje monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca imunoglobulina i njihovih ne-monoklonskih parova (IgGκ, IgGλ, IgAκ, IgAλ, IgMκ, IgMλ) te njihovog omjera (IgGκ/IgGλ; IgAκ/IgAλ; IgMκ/IgMλ) korištene su refrentne vrijednosti navedene od samog proizvođača (tablica 7).[66]

Tablica 7. Referntne vrijednosti izotipova teškog/lakog lanca imunoglobulina i njihovih omjera.

IMUNOGLOBULIN (g/L)	RASPON
IgGκ	4,03 – 9,78
IgGλ	1,97 – 5,71
IgGκ/IgGλ	0,98 – 2,75
IgAκ	0,48 – 2,82
IgAλ	0,36 – 1,98
IgAκ/IgAλ	0,80 – 2,04
IgMκ	0,28 – 1,82
IgMλ	0,16 – 0,94
IgMκ/IgMλ	0,96 – 2,30

5.2.5. Standardni laboratorijski testovi

5.2.5.1. Elektroforeza i imunofiksacija protiena u serumu

Elektroforeza i imunofiksacija proteina u serumu su učinjeni na *Hydrasis* aparatu prema uputama proizvođača, koristeći *Sebia* gelove *Hydragel 15* i *30* protein za elektroforezu odnsono *Hydragel 2* i *4* za imunofiksaciju.[87]

Postupak elektroforeze:

- 10µL uzorka ručno se aplicira na pločicu za uzorke
- kroz 5 minuta dopusti se da uzorak difundira u gel
- u aparatu se automatizirano provode: aplikacija reagensa, elektroforeza (pH 8,6, 20W, 20ºC kroz 7 minuta) i sušenje (65ºC kroz 10 minuta)
- gel se potom ručno premjesti u komoru za bojanje
- automatizirano se provode: bojanje (kroz 4 minute amido crnom bojom), uklanjanje viška boje (3 ispiranja, prvo kroz 3 min, potom kroz 2 min te kroz 1 min) i sušenje (75ºC kroz 8 minuta)
- gel se skenira *Hyrys* denzitometrom

Postupak imunofiksacije:

- uzorak se nanosi na gel, obično na 6 pozicija
- postupak elektroforeze (20W, 20ºC kroz 9 minuta) se provodi automatizirano
- na pozicije uzoraka na gelu se potom dodaju otopina za fiksaciju i specifični antiserum; gel se ostavlja 5 minuta kako bi došlo do fiksacije i imunoprecipitacije
- slijedi automatizirani postupak bojanja (kroz 4 minuta violet blue bojom), uklanjanja viška boje (3 ispiranja, prvo kroz 3 min, potom kroz 2 min te kroz 6 min) i sušenja (75ºC kroz 8 minuta)
- očitavanje uzoraka (detekcija monoklonske vrpce) vrši se vizualno inspekcijom obojenih gelova

5.2.5.2. Mjerenje koncentracije ukupnih imunoglobulina

Mjerenje koncentracije ukupnih imunoglobulina je provedeno metodom imunoturbidimetrije automatiziranim postupkom na uređaju *Cobas 6000cee Roche Diagnostics*, koristeći reagense *Tina-quant Gen.2.* Postupak je proveden prema uputama proizvođača.

Kao referentne vrijednosti za koncentracije ukupnih imunoglobulina korištene su refrentne vrijednosti navedene od samog proizvođača (tablica 8).

Table 8. Referentne vrijednosti koncentracije ukupnih imunoglobulina u serumu.

RAZRED IMUNOGLOBULINA	RASPON (g/L)
IgG	7,0 – 16,0
IgA	0,7 – 4,0
IgM	0,4 – 2,3

5.2.5.3. Ostali laboratorijski pokazatelji.

U svakog ispitianika načinjeni su slijedeći laboratorijski pokazatelji, kompletna krvna slika, broj trombocita, beta-2-mikroglobulin C-reaktivni protein (CRP), kalcij, fosfor, Laktad dehidrogenaza (LD). Njihovo određivanje provedeno je prema specifikacijama u priručniku KBC-a Zagreb „Katalog dijagnostičkih laboratorijskih pretraga – priručnik“ (2009).[85]

5.3. Imunofenotipizacija stanica koštane srži protočnom citometrijom

5.3.1. Metode uzorkovanja stanica koštane srži

Postoje dvije metode uzimanja koštane srži: punkcijom prsne kosti i biopsijom koštane srži. Kod prve metode postupak se sastoji od uboda iglom u prsnu kost nakon primjene lokalne anestezije te uzimanja uzorka stanica koštane srži isisavanjem pomoću štrcaljke (aspirat koštane srži). Ovom metodom može se dobiti uzorak za citološku (morfološku) analizu koštane srži, imunofenotipizaciju protočnom citometrijom, citogenetsku analizu i analizu FISH (fluorescentna in situ hibridizacija) te molekularnu analizu (PCR – lančana reakcija polimerazom). Druga metoda je dobivanje uzorka koštane srži prilikom izvođenja biopsije kosti. Postupak se izvodi biopsijskom iglom kojom se dobiva uzorak spužvastog dijela kosti, najčešće iz zdjelične kosti (greben zdjelične kosti – crista illiaca posterior). Ovim postupkom dobije se uzorak koštane srži isisavanjem stanica koštane srži štrcaljkom kroz biopsijsku iglu kao i kod prethodne metode (aspirat) i uzorak spužvastog dijela kosti (bioptat) za histološke i imunohistološke analize.

5.3.2. Postupak imunofenotipizacije

Uzorci aspirata koštane srži, dobiveni gore opisanim metodama, najprije su podvrgnuti liziranju eritrocita s pomoću 0,15 M hipotonične otopine amonijeva klorida (NH_4Cl, pH 7,3) tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja lizata kroz 3 minute na 2200 okretaja u minuti (o/m), nadtalog se odlije, a stanični talog resuspendira u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*). Brojnost i vijabilnost stanica u suspenziji odredi se brojanjem stanica u Burker-Turkovoj komorici nakon dodatka 0,4% Tripanskog modrila u omjeru 5:1. Brojnost stanica u suspenziji podesi se otopinom PBS na 10^7/mL, nakon čega se 100 μL stanične suspenzije (10^6 stanica) koristi za obilježavanje monoklonskim protutijelima. U istraživanju je primjenjena metoda 6-strukog obilježavanja stanica s pomoću sljedećih monoklonskih protutijela: CD19-FITC (BD Biosciences), CD117-PE (DAKO), CD138-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences), CD56-PE-Cy7 (Pharmingen-BD Biosciences), CD38-APC (BD Biosciences) i CD45-APC-Cy7 (Pharmingen-BD Biosciences). Ukratko, u epruvetu se najprije odpipetira odgovarajući

volumen monoklonskih protutijela prema preporuci proizvođača (raspon od 2,5 μL do 10 μL, ukupni dodani volume 33 μL) nakon čega se doda 100 μL stanične suspenzije s 10^6 stanica. Suspenzija se inkubira kroz 10 minuta u mraku na sobnoj temperaturi, nakon čega se suvišak protutijela ispere otopinom PBS, te se potom centrifugira na sobnoj temperaturi kroz 5 minuta na 2200 o/m. Nakon drugog ispiranja, stanice se resuspendiraju u 0,5 mL otopine PBS i čuvaju na +4^{o}C do propuštanja na protočnom citometru.

Za imunofenotipsku analizu protočnom citometrijom korišten je digitalni protočni razvrstač stanica FACSAria™ (BD Biosciences) opskrbljen s tri lasera i računalnim programom FACSDiva™. U svakom je pokusu propušteno minimalno 1x10^5 stanica. Podaci su analizirani u programu FACSDiva™ prema smjernicama navedenim u ref. (Paiva B. et al. *Blood 2008;112:4017-23.*; i Paiva B. et al. Blood. *2009;114:4369-72.*). Pri tome su biljezi CD38 i CD138 korišteni u svrhu identifikacije plazma-stanica u uzorcima, a biljezi CD45, CD56, CD117 i CD19 korišteni su za razlikovanje normalnih od aberantnih/neoplastičnih plazma-stanica. Rezultat je izražen u postotku aberantnih plazma-stanica na sve stanice koštane srži.

5.4. Statistička analiza podataka

Prikupljeni podaci statistički su obrađeni upotrebom R statističkog programa (R Development Core Team, 2006. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org.) i prikazani su opisnom statistikom, grafički i tabelarno Za usporedbu kvalitativnih obilježja koristio se χ^2 test, a za neparametrijske varijable Mann-Whitney test. Za izračun kumulativne stope ukupnog preživljenja i kumulativne stope vremena do progresije bolesti korištena je Kaplan-Meierova analiza. Vrijeme do progresije bolesti definirano je kao vrijeme proteklo od datuma uzimanja uzorka za analizu do datuma kada je potvrđen relaps ili progresija bolesti. Ukupno preživljenje definirano je kao vrijeme proteklo od datuma uzimanja uzorka do datuma smrti.

Omjer rizika i prognostička vrijednost omjera teških lanaca određeni su multivariatnom Coxovom regresijskom analizom.

6. **REZULTATI**

6.1. Karakteristike promatrane populacije

Od 99 ispitanika , njih 25 bilo je u kompletnoj remisiji, 33 u vrlo dobroj parcijalnoj remisiji, 10 u parcijalnoj remisiji, 10 sa stabilnom bolesti, 7 u progresiji bolesti, 5 u relapsu bolesti, 1 bolesnik s minimalnim odgovorom te 8 novodijagnosticiranih bolesnika. U tijeku praćenja sedamnaest bolesnika je umrlo, a samo jedan bolesnik je izgubljen u praćenju.. Također sedamnaest bolesnika je ušlo u relaps ili progresiju bolesti tijekom praćenja.

Opće karakteristike ispitanika prikazuje tablica 9.

Tablica 9. Opće karakteristike ispitivane populacije.

	SVI	BOLESNICI S IgG MIJELOMOM	BOLESNICI S IgA MIJELOMOM
Broj ispitanika	99	74	25
Medijan dobi – godine (raspon)	62 (39-84)	61 (39-84)	62 (45-84)
Spol (muški/ženski)	44/55	33/41	11/14
Monoklonski Ig - standardna metoda (g/L) -medijan i raspon	11,47 (1,05-54,32)	11,74 (2,85-54,32)	4,82 (1,05-35,49)
Omjer slobodnih lakih lanaca u seumu – medijan i raspon	1,13 (0,01-2220,0)	1,31 (0,01-2220,0)	0,78 (0,02-25,8)
β-2-mikroglobulin (mg/L) – medijan i raspon	2,4 (1,3-11,15)	2,4 (1,3-11,15)	2,4 (1,71-9,78)
Albumin (g/L) – medijan i raspon	41,6 (16,8-69)	41,9 (25,9-69)	39,4 (16,8-44,9)
Hemoglobin (g/L) – medijan i raspon	124 (86 – 179)	123 (86 – 149)	126 (101 – 179)
Trombociti ($x10^9$/L) – medijan i raspon	186 (43 – 567)	190 (43 – 567)	186 (99 – 378)
CRP (mg/L) – medijan i raspon	2,6 (0,2 - 82,6)	2,45 (0,2 – 23)	2,9 (0,3 – 82,6)
Kreatinin (µmol/L) – medijan i raspon	90 (47 – 256)	90 (47 – 192)	93 (51 – 256)
Serumski kalcij (mmol/L) – medijan i raspon	2,34 (1,82 – 2,86)	2,32 (1,89 – 2,79)	2,42 (1,82 – 2,86)
LDH (U/L) – medijan i raspon	182 (79 – 862)	191 (79 – 862)	154 (113 – 264)
% plazma stanica – medijan i raspon	6,5 (0 – 95)	6 (0 – 70)	8 (0 – 95)
ISS stadij I / II / III	59 / 36 / 4	41 / 31 / 2	18 / 5/ 2

Durie-Salmon stadij I / II / III	5 / 8 / 86	3 / 5 / 66	2 / 3 / 20
CR / VGPR + PR SD / MR PD / relaps novodg.	25 / 43 10 / 1 7 / 5 8	16 / 36 5 / 1 4 / 5 7	9 / 7 5 / 0 3 / 0 1
Medijan praćenja u mjesecima (raspon)	6,5 (1 – 34)	9,7 (0,5 – 34,4)	5,1 (0 – 29)
Medijan ukupnog preživljenja (mjeseci)	31,7	31,7	20,0
Ig – imunoglobulini; CRP – C reaktivni protein; LDH – laktatdehidrogenaza; % plazma stanica – postotak plazma stanica; CR – kompletna remisija; VGPR – vrlo dobra parcijalna remisija; PR – parcijalna remisija; SD – stabilna bolest; MR – minimalni odgovor; PD – progresivna bolest; novodg. – novodijagnosticirana bolest.			

6.1.2. Monoklonski izotipovi u ispitanika s IgG tipom mijeloma

U ovoj grupi bilo je 74 bolesnika, 54 koji su imali IgG kappa monoklonski protein te 20 koji su imali IgG lambda monoklonski protein. Medijan vrijednosti monoklonskog IgG kappa proteina je bio 9,54 g/L s rasponom od 2,00 do 60,4 g/L, a medijan omjera IgGκ/IgGλ je iznosio 6,13 uz raspon od 1,00 do 419. Medijan vrijednosti monoklonskog IgG lambda proteina je bio 7,06 g/L s rasponom od 1,65 do 28,1 g/L, a medijan omjera IgGκ/IgGλ je iznosio 0,66 uz raspon od 0,02 do 13,8 (tablica 10).

Tablica 10. Vrijednosti medijana i raspona monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i IgGκ/IgGλ omjera u ispitanika s IgG tipom mijeloma.

TIP MONOKLONSKOG IZOTIPA TEŠKOG/LAKOG LANCA	MEDIJAN I RASPON (g/L)	OMJER IgGκ/IgGλ - medijan i raspon
IgG kappa	9,54 (2,0 – 60,4)	6,13 (1,0 – 419)
IgG lambda	7,06 (1,65 – 28,1)	0,66 (0,02 – 13,8)

Od 74 bolesnika, 51 bolesnik je imao normalne vrijednosti imunoglobulina G određivanog standardnom metodom, ali je određivanjem monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca imunoglobulina u toj skupini detektirano 1 bolesnika s vrijednostima monoklonskog izotipa većim od odgovarajućih referentnih vrijednosti. Nadalje, u grupi bolesnika koji su imali uredne vrijednosti i imunoglobulina određene standardnom metodom i uredene vrijednosti monoklonskog izotipa, detektirano je 15 bolesnika s abnormalnom vrijednosti IgGκ/IgGλ omjera (tablica 11). Svi bolesnici kojim su standradnom metodom nađene vrijednosti imunoglobulina G većom od referentnih vrijednosti imali su i vrijednosti

monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca veće od referentnog raspona za odgovarajuće izotipove te posljedično i abnormalne vrijednosti IgGκ/IgGλ omjera.

Tablica 11. Osjetljivost metode kvantifikacije monoklonskih izotipova IgG teškog/lakog lanca i omjera IgGκ/IgGλ u detekciji monoklonskog proteina. Ig - imunoglobulin.

Izotip	Broj bolesnika	Standardna metoda: Ig u granicama normale	Monoklonski izotip > normale	Standardna metoda Ig i monoklonski izotip normalni – omjer Ig´κ/Ig´λ abnormalan
IgGκ	54	36	8/36	13
IgGλ	20	15	7/15	2

Vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i IgGκ i IgGλ veće od vrijednosti njihovih mediana korelirali su s postotkom plazma stanica u koštanoj srži ($p < 0,0001$), vrijednostima beta-2-mikroglobulina ($p = 0,01$), abnormalnim omjerom slobodnih lakih lanaca u serumu ($p < 0,0001$) i vrijednosti serumskog kalcija ($p = 0,004$).

Abnormalna vrijednost omjera IgGκ/IgGλ, manja ili veća od referentnih vrijednosti, korelirala je također s postotkom infiltracije koštane srži plazma stanicama ($p = 0,0037$), vrijednosti hemoglobina ($p = 0,019$); abnormalnim omjerom slobodnih lakih lanaca u serumu ($p < 0,0001$) i vrijednostima serumskog kalcija ($p = 0,03$). Korelacija s vrijednostima beta-2-mikroglobulinom se približila statističkoj značajnosti ($p = 0,06$) kao i korealcija s apsolutnim vrijednostima slobodnih lakih lanaca u serumu ($p = 0,06$).

Vrijednosti medijana monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i IgGκ/IgGλ omjera su još korelirane s vrijednostima: albumina, trombocita, C-reaktivnog proteina, serumskog kreatinina, laktat dehidrogenaze te stadijima bolesti po Durie Salmon klasifikacji i ISS kalsifikacija, ali nije nađena statistički značajana povezanost s navedenim pokazateljima.

Također je pokušano utvrditi povezanost povišenih vrijednosti monoklonskih izotipova (vrijednosti iznad medijana) te abnormalnog IgGκ/IgGλ omjera s vrijednostima hemoglobina manjim od 100 g/L, trombocitima manjim od $150x10^9$/L, beta-2-mikroglobulinom višim od 3,5 mg/L, albuminima nižim od 35 g/L, vrijednostima CRP većim od 10 mg/L, vrijednostima LDH višim od normale (> 240 U/L) te hiperkalcemijom (Ca > 2,5 mmol/L); navedenim analizama nije nađena statistički značajna korelacija.

Rezultati svih korelacija prikazani su u tablicama 12 i 13.

Tablica 12. Rezultati korelacija s vrijednostima monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca većim od odgovarajućih medijana za grupu bolesnika s IgG tipom mijeloma.

	USPOREĐIVANA VARIJABLA	p VRIJEDNOST
vrijednosti IgGκ i IgGλ > medijana	Albumin	0,19
	albumin < 35g/L	0,17
	beta-2-mikroglobulin	**0,01**
	beta-2-mikroglobulin > 3,5mg/L	0,25
	% plazma stanice	**< 0,0001**
	omjer slobodnih lakih lanaca u serumu – apsolutna vrijednost	0,75
	omjer slobodnih lakih lanaca u serumu – abnormalna vrijednost	**< 0,0001**
	stadij prema ISS	0,23
	stadij prema Durie-Salmon	0,28
	Hemoglobin	0,38
	Hemoglobin < 100g/L	0,14
	Trombociti	0,97
	Trombociti < $150x10^9$/L	0,50
	LDH	0,60
	LDH > 240 U/L	0,38
	Kreatinin	0,43
	serumski kalcij	**0,04**
	serumski kalcij > 2,5 mmol/L	0,72
	CRP	0,24
	CRP > 10 mg/L	0,22

Tablica 13. Rezultati korelacija s vrijednostima IgGκ/IgGλ omjera većim ili manjim od referentnih vrijednosti.

	USPOREĐIVANA VARIJABLA	p VRIJEDNOST
IgGκ/IgGλ omjer	Albumin	0,085
	albumin < 35g/L	0,71
	beta-2-mikroglobulin	**0,06**
	beta-2-mikroglobulin > 3,5mg/L	0,33
	% plazma stanice	**0,0037**
	omjer slobodnih lakih lanaca u serumu – apsolutna vrijednost	**0,06**
	omjer slobodnih lakih lanaca u serumu – abnormalna vrijednost	**< 0,0001**
	stadij prema ISS	0,16
	stadij prema Durie-Salmon	0,75
	Hemoglobin	**0,019**
	Hemoglobin < 100g/L	0,17
	Trombociti	0,73
	Trombociti < $150x10^9$/L	0,73
	LDH	0,15
	LDH > 240 U/L	0,85
	Kreatinin	**0,06**
	serumski kalcij	**0,03**
	serumski kalcij > 2,5 mmol/L	0,21
	CRP	0,46
	CRP > 10 mg/L	0,56

6.1.3. Monoklonski izotipovi u ispitanika s IgA tipom mijeloma

U ovoj grupi bilo je 25 bolesnika, 14 koji su imali IgA kappa monoklonski protein te 11 koji su imali IgA lambda monoklonski protein. Medijan vrijednosti monoklonskog IgA kappa proteina je bio 4,57 g/L s rasponom od 0,73 do 18,8 g/L, a medijan omjera IgAκ/IgAλ je iznosio 8,53 uz raspon od 0,69 do 730,0. Medijan vrijednosti monoklonskog IgA lambda proteina je bio 4,01 g/L s rasponom od 0,65 do 22,7 g/L, a medijan omjera IgAκ/IgAλ je iznosio 0,19 uz raspon od 0,04 do 1,26 (tablica 11).

Tablica 14. Vrijednosti medijana i raspona monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i IgAκ/IgAλ omjera za grupu bolesnika s IgA tipom mijeloma

TIP MONOKLONSKOG IZOTIPA TEŠKOG/LAKOG LANCA	MEDIJAN I RASPON (g/L)	OMJER IgAκ/IgAλ - medijan i raspon
IgA kappa	4,57 (0,73 – 18,8)	8,53 (0,69 – 730)
IgA lambda	4,01 (0,65 – 22,7)	0,19 (0,04 – 1,26)

Od 25 bolesnika, 10 bolesnika je imalo normalne vrijednosti imunoglobulina A određivanog standardnom metodom, ali je određivanjem monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca u toj skupini detektirano 3 bolesnika s vrijednostima monoklonskog izotipa većim od odgovarajućih referentnih vrijednosti. Svih 3 bolesnika je imalo i abnormalne vrijednosti IgAκ/IgAλ omjera. Uz navedena 3 bolesnika u jednog bolesnika je detektirana abnormalna vrijednost IgAκ/IgAλ omjera, iako su i vrijednosti imunoglobulina određene standradnom metodom i vrijednosti monoklonskog izotipa bile u granicama normale (tablica 15). Svi bolesnici kojim su standradnom metodom nađene vrijednosti imunoglobulina A veće od referentnih vrijednosti imali su i vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca veće od referentnog raspona za odgovarajuće izotipove.

Tablica 15. Osjetljivost metode kvantifikacije monoklonskih izotipova IgA teškog/lakog lanca i omjera IgAκ/IgAλ u detekciji monoklonskog proteina. Ig - imunoglobulin.

Izotip	Broj bolesnika	Standardna metoda: Ig u granicama normale	Monoklonski izotip > normale	Standardna metoda Ig i monoklonski izotip normalni – omjer Ig´κ/Ig´λ abnormalan
IgAκ	14	6	2/6	1
IgAλ	11	4	1/4	0

Vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i IgAκ i IgAλ veće od vrijednosti njihovih medijana korelirale su s postotkom plazma stanica u koštanoj srži (p = 0,0097), abnormalnom vrijednosti omjera slobodnih lakih lanaca u serumu (p = 0,027) dok korelacija s vrijednostima ostalih čimbenika nije pokazala statističku značajnost (korelacije s vrijednostima albumina i povišenim serumskim kalcijem su bili na razini značajnosti od 0,07).

Abnormalna vrijednost omjera IgAκ/IgAλ, manja ili veća od referentnih vrijednosti, statistički je bila značajno povezana s abnormalnim vrijednostima omjera slobodnih lakih lanaca u serumu (p = 0,01), a statistička povezanost s postotkom plazma stanica je bila na razini p = 0,064. Analizom povezanosti povišenih vrijednosti monoklonskog IgA izotipa (vrijednosti iznad medijana) te abnormalnog IgAκ/IgAλ omjera s vrijednostima hemoglobina manjim od 100 g/L, trombocitima manjim od $150x10^9$/L, beta-2-mikroglobulinom višim od 3,5 mg/L, albuminima nižim od 35 g/L, vrijednostima CRP većim od 10 mg/L, vrijednostima LDH višim od normale (> 240 U/L) te hiperkalcemijom (Ca > 2,5 mmol/L) nije nađena statistički značajna korelacija.

Razultati svih korelacija prikazani su u tablicama 16 i 17.

Tablica 16. Rezultati korelacija s vrijednostima monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca većim od odgovarajućih medijana za grupu bolesnika s IgA tipom mijeloma.

	USPOREĐIVANA VARIJABLA	p VRIJEDNOST
vrijednosti IgAκ i IgAλ > medijana	**albumin**	**0,07**
	albumin < 35g/L	0,22
	beta-2-mikroglobulin	0,27
	beta-2-mikroglobulin > 3,5mg/L	0,12
	% plazma stanice	**0,0097**
	omjer slobodnih lakih lanaca u serumu – apsolutna vrijednost	0,76
	omjer slobodnih lakih lanaca u serumu – abnormalna vrijednost	**0,027**
	stadij prema ISS	0,92
	stadij prema Durie-Salmon	0,28
	Hemoglobin	0,38
	Hemoglobin < 100g/L	*
	Trombociti	0,97
	Trombociti < $150x10^9$/L	0,43
	LDH	0,59
	LDH > 240 U/L	0,30
	kreatinin	0,90
	serumski kalcij	0,62
	serumski kalcij > 2,5 mmol/L	**0,07**
	CRP	0,59
	CRP > 10 mg/L	0,59

Tablica 17. Rezultati korelacija s vrijednostima IgAκ/IgAλ omjera većim ili manjim od referentnih vrijednosti.

	USPOREĐIVANA VARIJABLA	p VRIJEDNOST
IgAκ/IgAλ omjer	albumin	0,30
	albumin < 35g/L	0,81
	beta-2-mikroglobulin	0,20
	beta-2-mikroglobulin > 3,5mg/L	0,31
	% plazma stanice	**0,064**
	omjer slobodnih lakih lanaca u serumu – apsolutna vrijednost	0,93
	omjer slobodnih lakih lanaca u serumu – abnormalna vrijednost	**0,01**
	stadij prema ISS	0,74
	stadij prema Durie-Salmon	0,22
	Hemoglobin	0,70
	Hemoglobin < 100g/L	*
	Trombociti	0,97
	Trombociti < $150x10^9$/L	0,86
	LDH	0,55
	LDH > 240 U/L	0,52
	kreatinin	0,45
	serumski kalcij	0,67
	serumski kalcij > 2,5 mmol/L	0,25
	CRP	0,96
	CRP > 10 mg/L	0,94

6.1.4. Rezultati analize cijele grupe bolesnika

U analizi rezultata svih ispitanika dobivena je statistički značajna korelacija između vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca većim od odgovarajućeg medijana i postotka plazma stanica u koštanoj srži ($p < 0,0001$), vrijednosti albumina ($p = 0,05$) i abnormalne vrijednosti omjera slobodnih lakih lanaca u serumu ($p < 0,0001$). Abnormalna vrijednost omjera (IgGκ/IgGλ odnosno IgAκ/IgAλ), manja ili veća od referentnih vrijednosti, korelirala je također s postotkom infiltracije koštane srži plazma stanicama ($p = 0,0004$), s vrijednostima hemoglobina ($p = 0,05$), s vrijednostima albumina ($p = 0,046$) te s abnormalnom vrijednosti omjera slobodnih lakih lanaca u serumu ($p = 0,0001$). Korelacije s vrijednostima ostalih čimbenika nisu bile statistički značajne, kao niti povezanost povišenih vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca (vrijednosti iznad medijana) te abnormalnog omjera s vrijednostima hemoglobina manjim od 100 g/L, trombocitima manjim od $150x10^9$/L, beta-2-mikroglobulinom višim od 3,5 mg/L, albuminima nižim od 35 g/L, vrijednostima CRP većim od 10 mg/L, vrijednostima LDH višim od normale (> 240 U/L) te hiperkalcemijom (Ca > 2,5 mmol/L). Rezultati svih korelacija za cijelu grupu bolesnika prikazani su u tablicama 14 i 15.

Tablica 18. Rezultati korelacija s vrijednostima monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca većim od odgovarajućih medijana za cijelu grupu ispitanika.

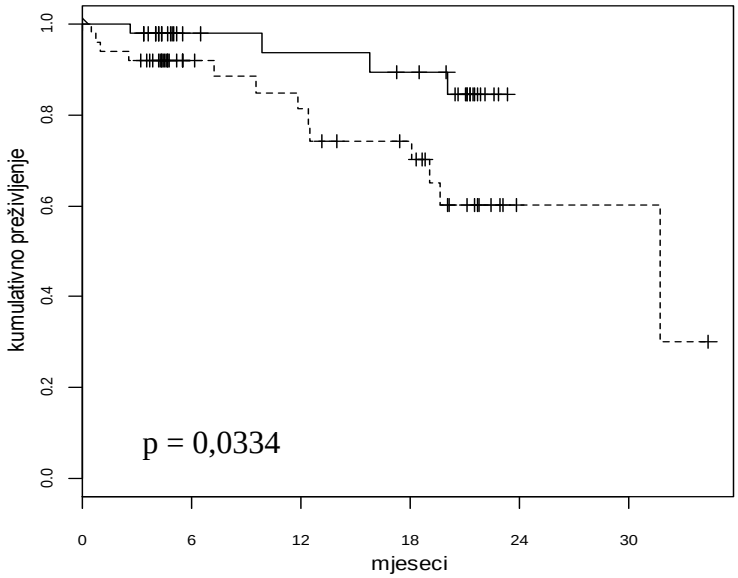
	USPOREĐIVANA VARIJABLA	p VRIJEDNOST
vrijednosti IgGκ, IgGλ, IgAκ, IgAλ > medijana	**albumin**	**0,05**
	albumin < 35g/L	0,63
	beta-2-mikroglobulin	**0,07**
	beta-2-mikroglobulin > 3,5mg/L	0,63
	% plazma stanice	**< 0,0001**
	omjer slobodnih lakih lanaca u serumu – apsolutna vrijednost	0,15
	omjer slobodnih lakih lanaca u serumu – abnormalna vrijednost	**< 0,0001**
	stadij prema ISS	0,39
	stadij prema Durie-Salmon	0,82
	Hemoglobin	0,11
	Hemoglobin < 100g/L	0,17
	Trombociti	0,99
	Trombociti < $150x10^9$/L	0,79
	LDH	0,5
	LDH > 240 U/L	0,25
	kreatinin	0,53
	serumski kalcij	0,12
	serumski kalcij > 2,5 mmol/L	0,85
	CRP	0,25
	CRP > 10 mg/L	0,55

Tablica 19. Rezultati korelacija s vrijednostima IgGκ/IgGλ i IgAκ/IgAλ omjera većim ili manjim od referentnih vrijednosti.

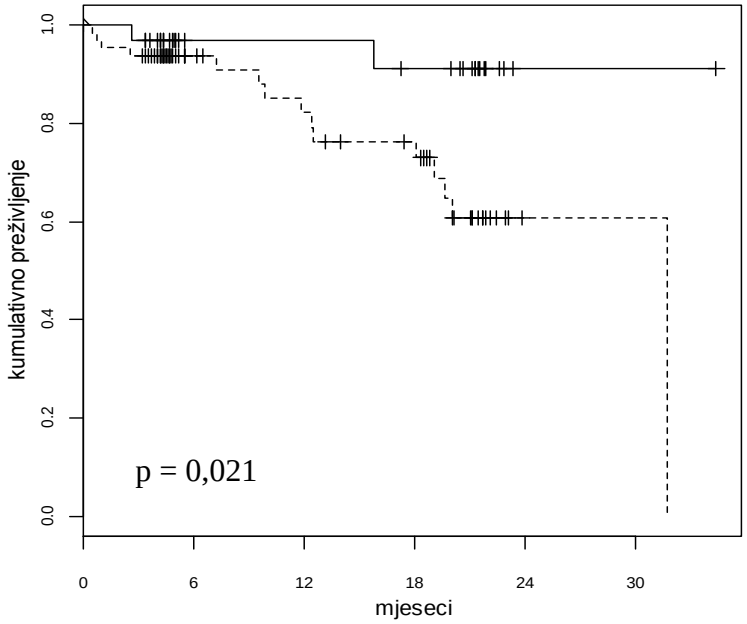
	USPOREĐIVANA VARIJABLA	p VRIJEDNOST
IgGκ/IgGλ, IgAκ/IgAλ omjeri	**albumin**	**0,046**
	albumin < 35g/L	0,63
	beta-2-mikroglobulin	0,28
	beta-2-mikroglobulin > 3,5mg/L	0,9
	% plazma stanice	**0,0004**
	omjer slobodnih lakih lanaca u serumu – apsolutna vrijednost	0,10
	omjer slobodnih lakih lanaca u serumu – abnormalna vrijednost	**0,0001**
	stadij prema ISS	0,49
	stadij prema Durie-Salmon	0,29
	Hemoglobin	**0,05**
	Hemoglobin < 100g/L	0,21
	Trombociti	0,79
	Trombociti < $150x10^9$/L	0,86
	LDH	0,31
	LDH > 240 U/L	0,36
	kreatinin	0,21
	serumski kalcij	0,10
	serumski kalcij > 2,5 mmol/L	0,9
	CRP	0,61
	CRP > 10 mg/L	0,65

6.1.5. Utjecaj vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i Ig´κ/Ig´λ omjera na ukupno preživljenje bolesnika

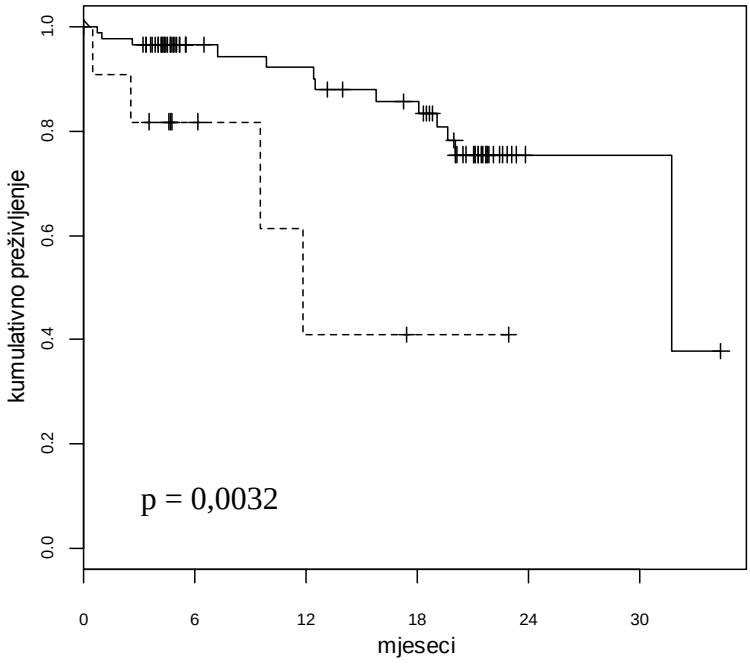
Medijan ukupnog preživljenja ispitanika iznosi 31,7 mjeseci. Ispitanici s vrijednostima višim od medijana za pojedni mnonoklonski izotip imaju značajno kraće ukupno preživljenje; p = 0,00334 (slika 7). Ispitanici s promijenjenim vrijednostima omjera (IgGκ/IgGλ; IgAκ/IgAλ) te posebice s izrazito povećanim vrijednostima omjera (< 0,02 ili > 40), pokazuju značajno kraće ukupno preživljenje u usporedbi s ispitanicima s omjerom unutar referentnih vrijednosti p = 0,021 (slika 8), odnosno u onih u kojih je izmjeren izrazito nizak (< 0,02) ili izrazito visok (> 40) omjer; p = 0,0032 (slika 9).



Slika 7. Ukupno preživljenje u odnosu na apsolutnu vrijednost monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca. Bolesnici s vrijednosti većom od medijana za određeni izotip imaju kraće ukupno preživljenje (isprekidana linija); medijan iznosi 31,7 mjeseci, nasuprot bolesnicima s vrijednostima monoklonskog izotipa manjim od medijana (puna linija) u kojih medijan preživljenja nije dosegnut.



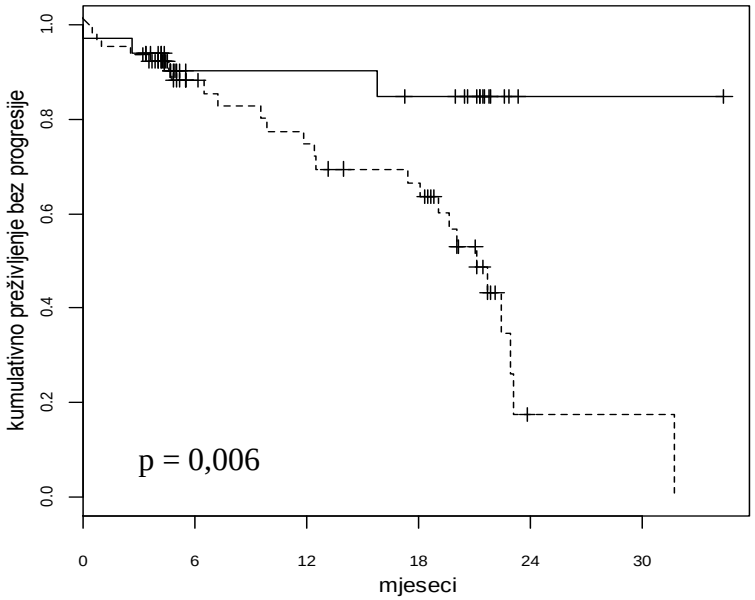
Slika 8. Ukupno preživljenje bolesnika u odnosu na vrijednost lg´κ/lg´λ omjera. Bolesnici s abnormalnom vrijednosti omjera (manjim ili većim od referentnih vrijednosti) imaju kraće ukupno preživljenje (isprekidana linija); medijan preživljenja iznosi 31,7 mjeseci, nasuprot bolesnicima s vrijednostima lg´κ/lg´λ omjera u normali (puna linija) u kojih medijan preživljenja nije dosegnut.



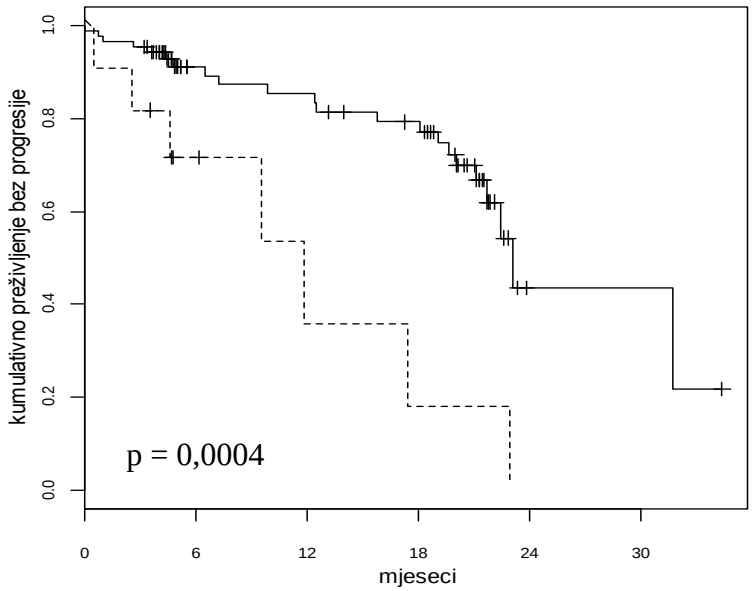
Slika 9. Ukupno preživljenje bolesnika u odnosu na ekstremne vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera. Bolesnici s ekstremno abnormalnim vrijednostima omjera (< 0,02 ili > 40) imaju kraće ukupno preživljenje (isprekidana linija); medijan preživljenja za ovu skupinu bolesnika iznosi 11,8 mjeseci, nasuprot bolesnicima s manje ekstremnim, ali abnormalnim vrijednostima Ig´κ/Ig´λ omjera (puna linija) čiji medijan preživljenja iznosi 31,7 mjeseci.

6.1.6. Utjecaj vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i Ig´κ/Ig´λ omjera na dužinu vremena do progresije bolesti

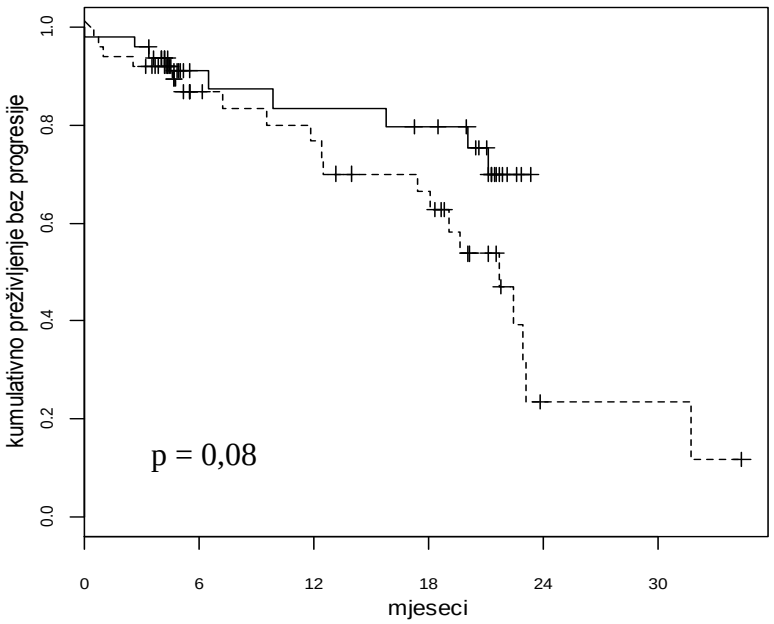
Dužina vremena bez progresije bolesti je značajno kraća u bolesnika s promjenjenim omjerom, manjim ili većim od referentnih vrijednosti; p = 0,006 (slika 10), odnosno u onih u kojih je izmjeren izrazito nizak (< 0,02) ili izrazito visok (> 40) omjer; p = 0,0004 (slika 11). Vrijednosti monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca ne pokazuju statistički značajnu razliku u dužini vremena do progresije bolesti na razini p = 0,05 između bolesnika s vrijednostima većim od medijana. Međutim, prisutan je trend kraćeg preživljenja bez progresije. (slika 12).



Slika 10. Vrijeme do progresije bolesti u odnosu na vrijednost lg´κ/lg´λ omjera. Bolesnici s abnormalnom vrijednosti omjera (manjim ili većim od referentnih vrijednosti) imaju kraće vrijeme do progresije bolesti (isprekidana linija; medijan 21,1 mjesec) u odnosu na bolesnike s vrijednostima lg´κ/lg´λ omjera u granicama normale (puna linija, medijan nije dosegnut).



Slika 11. Vrijeme do progresije bolesti u odnosu na ekstremne vrijednosti lg´κ/lg´λ omjera. Bolesnici s ekstremno abnormalnim vrijednostima omjera (< 0,02 ili > 40) imaju kraće vrijeme do progresije bolesti (isprekidana linija, medijan 11,8 mjeseci) u odnosu na bolesnike s manje ekstremnim, ali abnormalnim vrijednostima lg´κ/lg´λ omjera (puna linija, medijan 23,1 mjesec).

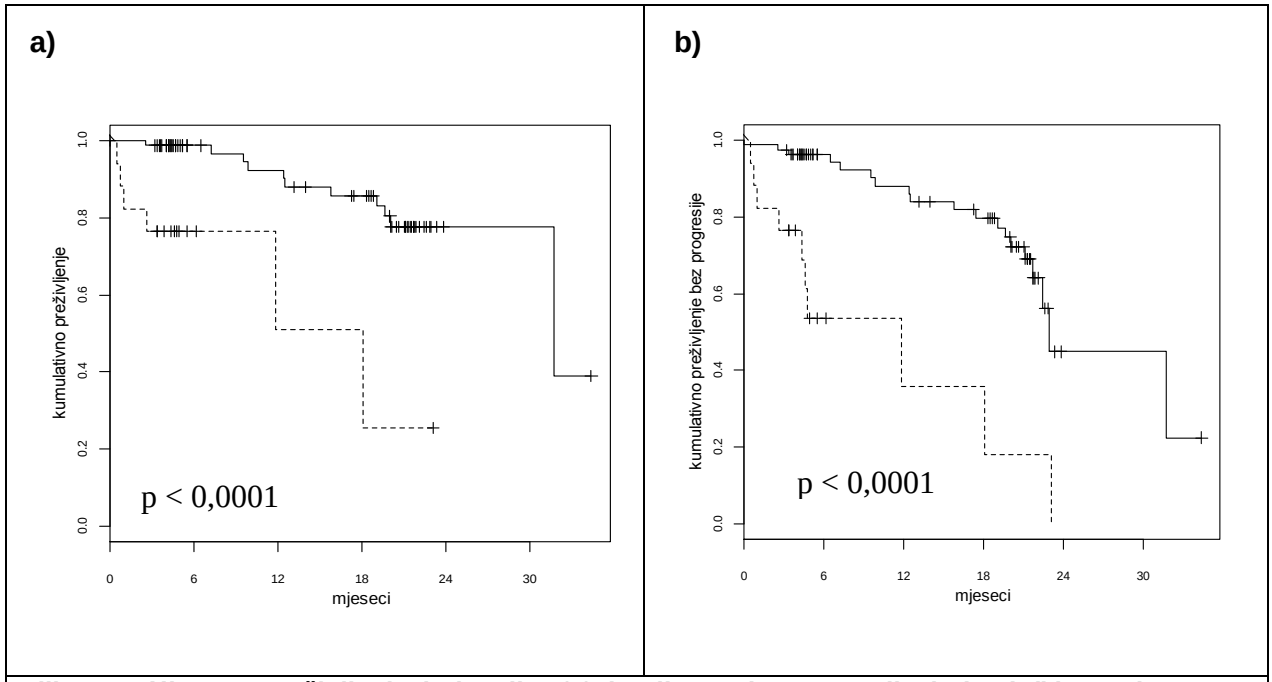


Slika 12. Vrijeme do progresije bolesti u odnosu na apsolutnu vrijednost monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca. Bolesnici s vrijednosti većom od medijana za određeni izotip imaju tendenciju kraćeg vremena do progresije bolesti (isprekidana linija, medijan 21,7 mjeseci) u odnosu na bolesnike s vrijednostima manjim od medijana za određeni izotip (puna linija, medijan nije dosegnut). Nije dosegnuta statistička značajnost na razini p = 0,05.

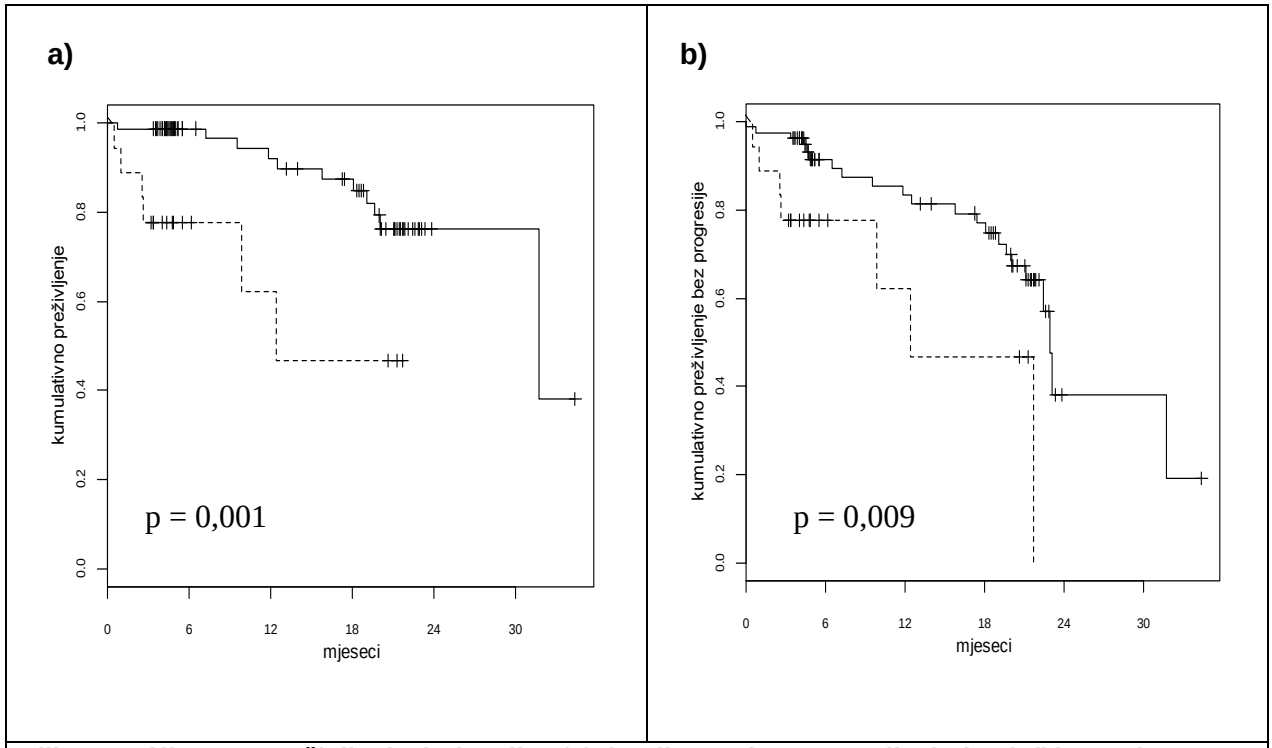
6.1.7. Ostali čimbenici koji utječu na ukupno preživljenje i dužinu vremena do progresije bolesti

Značajni utjecaj na ukupno preživljenje i dužinu vremena do progresije bolesti pokazuju razine serumskog albumina, beta-2-mikroglobulina, stadij bolesti prema ISS klasifikaciji i prema Durie Salmon klasifikaciji te vrijednost omjera slobodnih lakih lanaca u serumu.

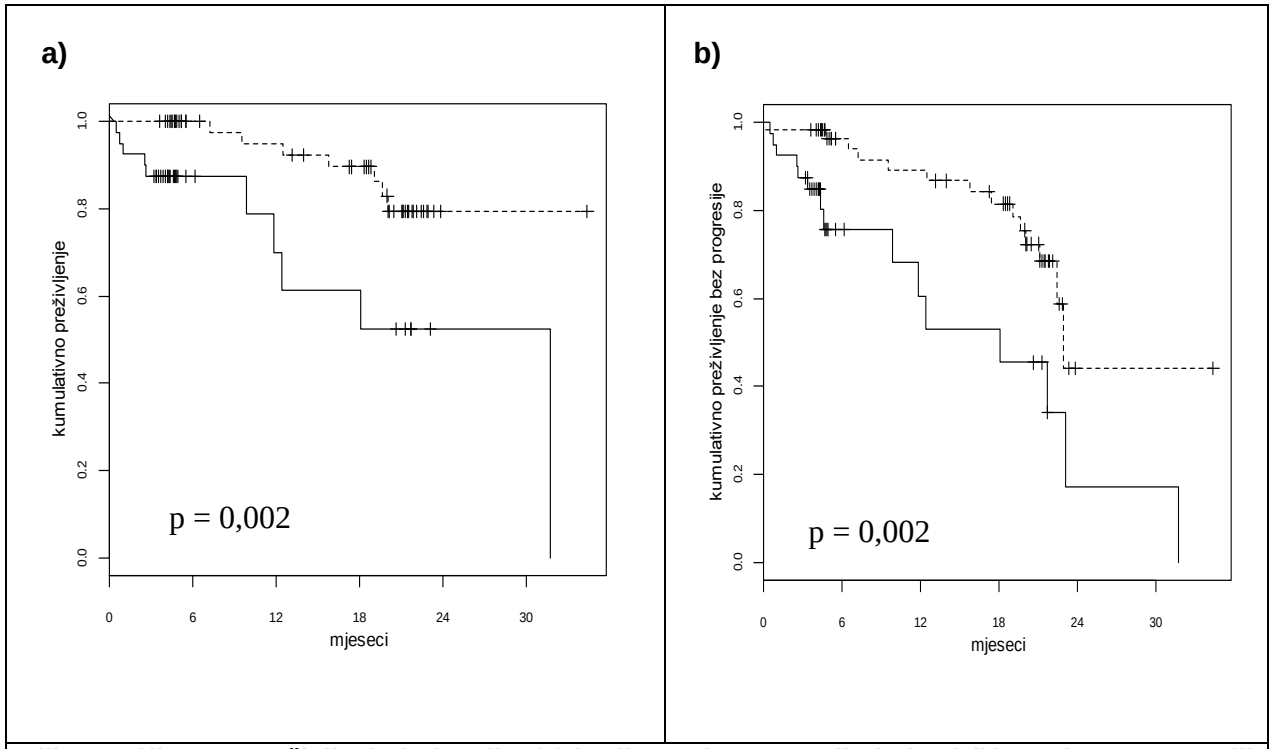
Ispitanici s manjim vrijednostima albumina imaju kraće ukupno preživljenje; $p < 0,0001$; i kraće vrijeme do progresije bolesti, $p < 0,0001$ (slika 13). Ispitanici s većim vrijednostima beta-2-mikroglobulina imaju kraće ukupno preživljenje; $p = 0,001$; i kraće vrijeme do progresije bolesti, $p = 0,009$ (slika 14). Ispitanici u stadiju bolesti II i III prema ISS klasifikaciji imaju kraće ukupno preživljenje; $p = 0,002$ i kraće vrijeme do progresije bolesti, $p = 0,002$, u usporedbi s ispitanicima u stadiju I (slika 15). Stadij bolesti prema Durie-Salmon klasifikaciji nije imao statistički značajan utjecaj na ukupno preživljenje; $p = 0,61$; ali je imao značajan utjecaj na dužinu vremena do progresije bolesti; $p = 0,01$ (slika 16). Bolesnici s promjenom omjera slobodnih lakih lanaca u serumu imali su kraće ukupno preživljenje i kraće vrijeme do progresije bolesti ($p = 0,022$) u odnosu na bolesnike s normalnim omjerom slobodnih lakih lanaca (slika 17).



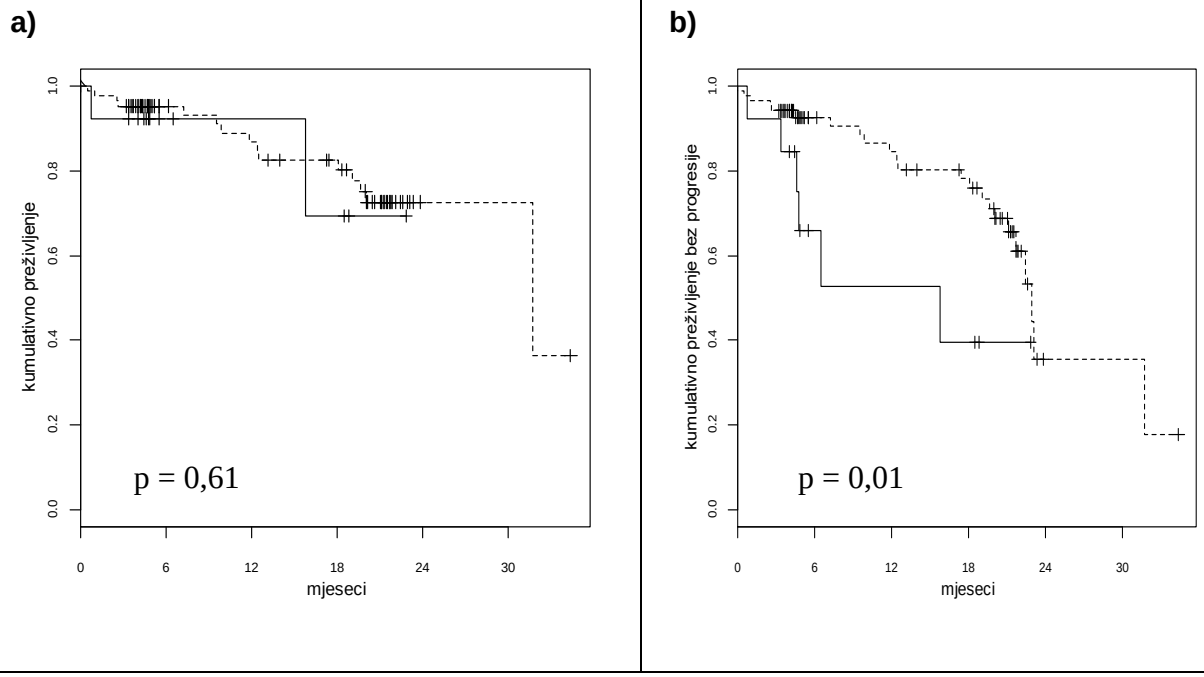
Slika 13. Ukupno preživljenje bolesnika (a) i vrijeme do progresije bolesti (b) u odnosu na vrijednost serumskog albumina. Bolesnici s manjim vrijednostima albumina imaju kraće ukupno preživljenje i kraću dužinu vremena do progresije bolesti (isprekidana linija).



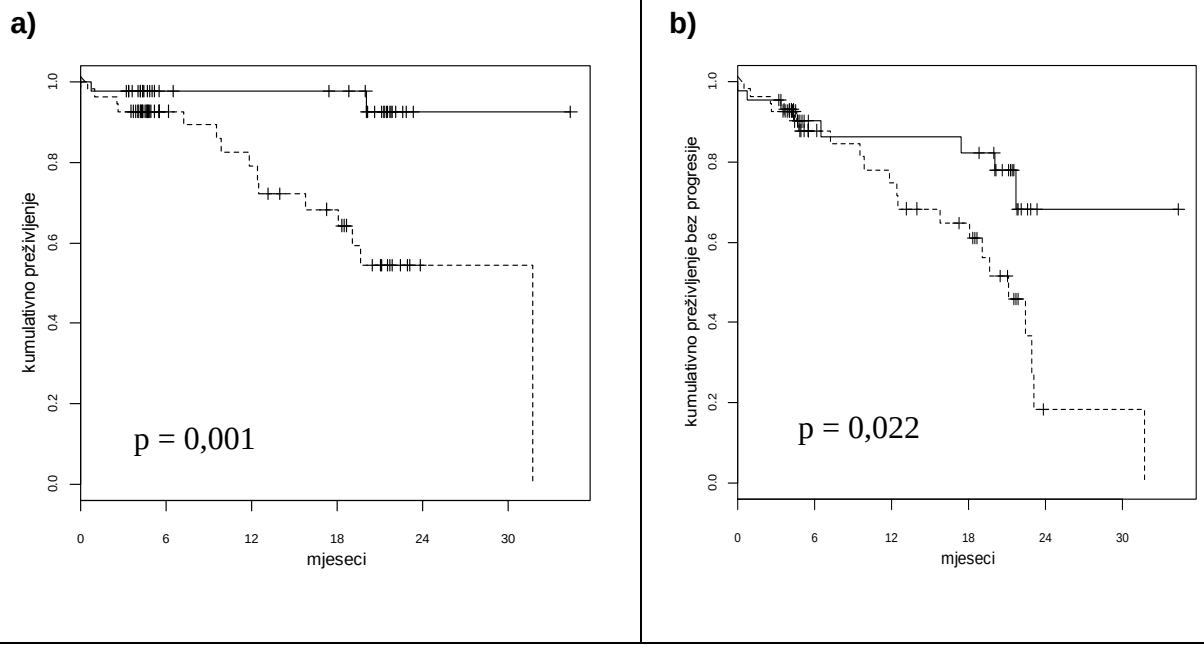
Slika 14. Ukupno preživljenje bolesnika (a) i vrijeme do progresije bolesti (b) u odnosu na vrijednost beta-2-mikroglobulina. Bolesnici s većim vrijednostima beta-2-mikroglobulina imaju kraće ukupno preživljenje i kraću dužinu vremena do progresije bolesti (isprekidana linija).



Slika 15. Ukupno preživljenje bolesnika (a) i vrijeme do progresije bolesti (b) u odnosu na stadij bolesti prema ISS klasifikaciji. Bolesnici s višim stadijem bolesti (II i III) imaju kraće ukupno preživljenje i kraću dužinu vremena progresije bolesti (puna linija).



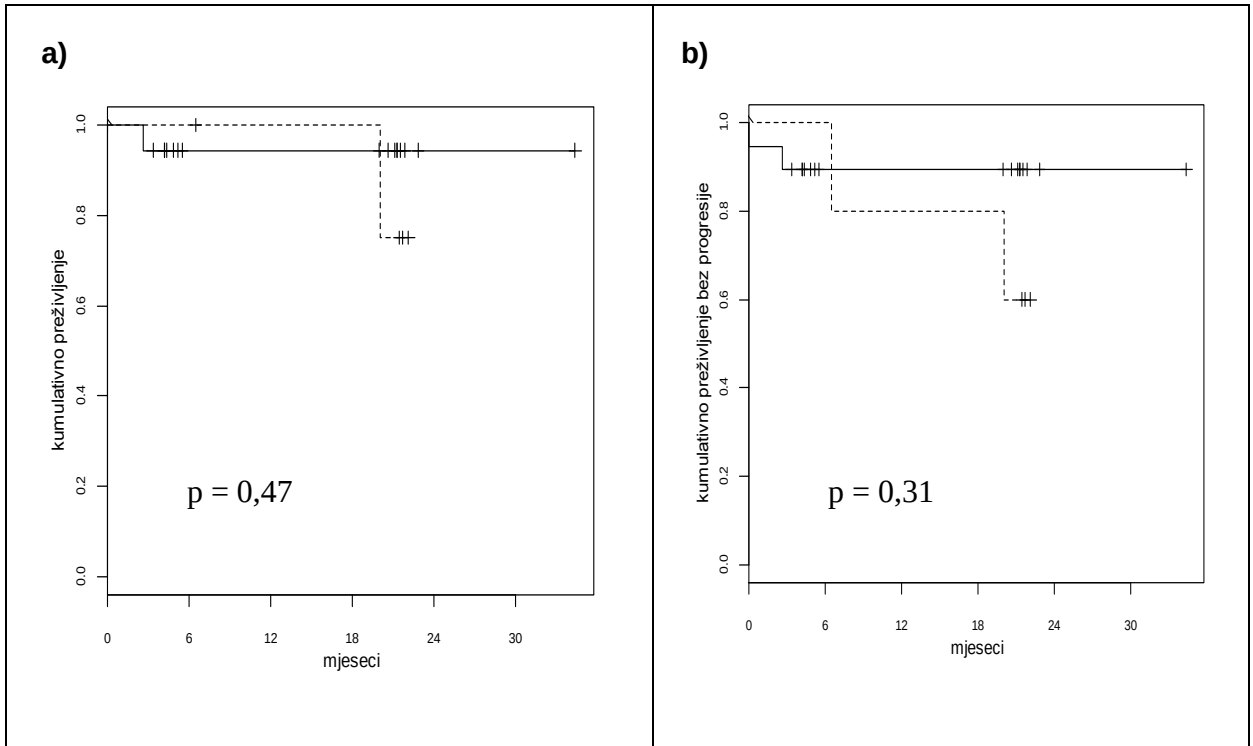
Slika 16. Ukupno preživljenje bolesnika (a) i vrijeme do progresije bolesti (b) u odnosu na stadij bolesti prema Durie-Salmon klasifikaciji. Bolesnici s višim stadijem bolesti (II i III) imaju kraću dužinu vremena do progresije bolesti (slika b - puna linija).



Slika 17. Ukupno preživljenje bolesnika (a) i vrijeme do progresije bolesti (b) u odnosu na vrijednost omjera slobodnih lakih lanaca u serumu. Bolesnici s abnormalnom vrijednosti omjera slobodnih lakih lanaca u serumu imaju kraće ukupno preživljenje i kraću dužinu vremena do progresije bolesti (isprekidana linija).

6.1.8. Određivanje monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i Ig´κ/Ig´λ omjera u ispitanika s negativnom imunofiksacijom (bolesnici u kompletnoj remisiji)

Od ukupnog broja ispitanika, u njih 23 utvrđena je negativna imunofiksacija (kompletna remisija) Kvantitativnim određivanjem monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca imunoglobulina u dva bolesnika dokazana vrijednost veća od referentnog raspona tj. vrijednost veća od medijana za pojedine izotipove. Mjerenjem Ig´κ/Ig´λ omjera, u 5 bolesnika je dokazan abnormalan omjer tj. vrijednost omjera manja ili veća od referentnog raspona. Od navedenih 5 bolesnika s promjenjenim omjerom, dvoje je ušlo u relaps bolesti za vrijeme praćenja. Analizom utjecaja abnormalne vrijednosti omjera u ovoj skupini na ukupno preživljenje te dužinu vremena do progresije bolesti nije nađen značajan utjecaj na ukupno preživljenje (p=0.47) i na vrijeme do progresije bolesti (p=0,31)(slika 18).



Slika 18. Ukupno preživljenje (a) i vrijeme do progresije bolesti (b) bolesnika u kompletnoj remisiji (negativna imunofiksacija) u odnosu na vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera. Bolesnici s abnormalnom vrijednosti omjera tj. omjerom manjim ili većim od referetnog raspona prikazani su isprekidanom linijom – statistički nema značajne razlike između grupa bolesnika.

6.1.9. Kvantitativno određivanje monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca imunoglobulina, Ig´κ/Ig´λ omjera i multiparametarska imunofenotipizacija

U 24 ispitanika IgG skupine i 3 ispitanika IgA skupine učinjena je analiza koštane srži multiparametraskom imunofenotipizacijom na protočnom citometru. Karakteristike ove skupine bolesnika i vrijednosti analiziranih parametara prikazani su u tablici 20.

Tablica 20. Karakteristike grupe bolesnika u kojih je učinjena analiza koštane srži multiparamteraskom imunofenotipizacijom.

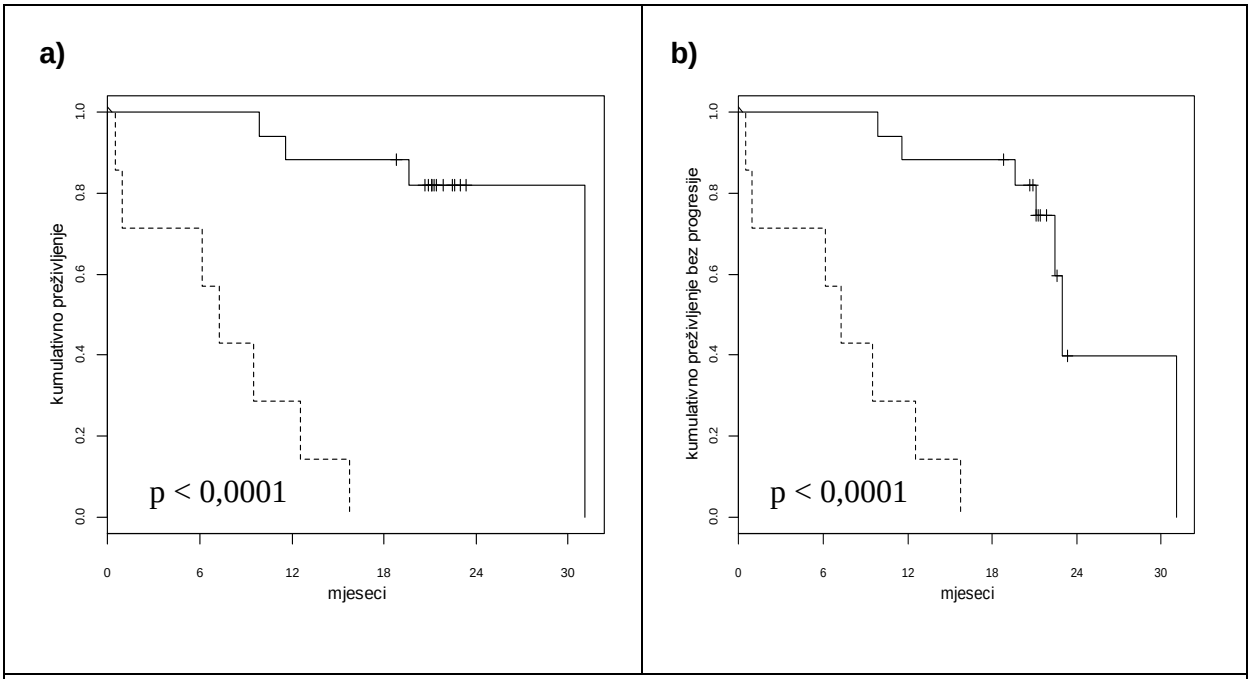
IZOTIP	**STATUS**	**% PS (citološki)**	**% patoloških PS (imunofeno.)**	**IF**	**Omjer slobodnih lakih lanaca**	**Monoklonski izotip teškog/lakog lanca u odnosu na medijan**	Ig´κ/Ig´λ **omjer**
IgGλ	novodg.	24	24,78	poz.	abnormalan	viši	abnormalan
IgGλ	VGPR	1	0,01	poz.	normalan	niži	normalan
IgGλ	PR	6	0,02	poz.	abnormalan	viši	abnormalan
IgGκ	PD	20	6,56	poz.	abnormalan	viši	abnormalan
IgGλ	PR	13	6,31	poz.	abnormalan	viši	abnormalan
IgAκ	VGPR	5	0,13	poz.	abnormalan	niži	abnormalan
IgGκ	VGPR	6	0,26	poz.	abnormalan	viši	abnormalan
IgGκ	SD	15	4,18	poz.	abnormalan	niži	normalan
IgGκ	VGPR	10	0,01	poz.	normalan	niži	normalan
IgGκ	CR	2	0,10	neg.	normalan	niži	normalan
IgGκ	MR	35	0,85	poz.	abnormalan	niži	abnormalan
IgGκ	relaps	6	0,26	poz.	abnormalan	niži	abnormalan
IgGλ	CR	2	0,12	neg.	normalan	niži	normalan
IgGλ	VGPR	2	0,13	poz.	normalan	viši	abnormalan
IgGλ	CR	5	0,00	neg.	normalan	niži	normalan
IgAλ	PD	40	16,82	poz.	abnormalan	viši	abnormalan
IgGκ	VGPR	1	0,00	poz.	abnormalan	niži	abnormalan
IgGλ	PD	50	37,82	poz.	abnormalan	viši	abnormalan
IgGκ	SD	12	0,80	poz.	abnormalan	viši	abnormalan
IgGλ	PD	25	29,81	poz.	abnormalan	viši	abnormalan
IgAκ	SD	7	0,23	poz.	abnormalan	viši	abnormalan
IgGκ	VGPR	2	0,03	poz.	normalan	niži	normalan
IgGκ	VGPR	11	0,02	poz.	normalan	viši	abnormalan
IgGκ	PD	0	0,02	poz.	abnormalan	viši	abnormalan

IgG ili IgA κ – imunoglobulin razreda G ili A kappa lakog lanca; IgG ili IgA λ – imunoglobulin razreda G ili A lambda lakog lanca; MM – multipli mijelom; novodg. – novodijagnosticirana bolest; VGPR – vrlo dobra parcijalna remisija (od eng. very good partial remission); PR – parcijalna remisija; PD – progresivna bolest (eng. progressive disease); SD – stabilna bolest (eng. stabile disease); CR – kompletna remisija (eng. complete response); MR – minimalni odgovor (eng. minimal response); % PS – postotak plazma stanica; imunofeno. – imunofenotipizacija; IF – imunofiksacija seruma; poz. – pozitivna; neg. – negativna.

Utvrđena je pozitivna korelacija između vrijednosti monoklonskog izotipa koje su veće od vrijednosti medijana za pojedini teški lanac i postotka patoloških plazma stanica (p = 0,047), te pozitivna korelacija abnormalnog omjera slobodnih lakih lanca u serumu s postotkom patoloških plazma stanica (p = 0,026). Ne postoji značajna korelacija postotka patoloških plazma stanica i Ig´κ/Ig´λ omjera (p = 0,30). Korelacija nije pokazana ,između postotka patoloških plazma stanica i visokih vrijednosti beta-2-mikroglobulina odnosno s niskim vrijednostima albumina (tablica 21). Očekivano, bolesnici s većim postotkom patoloških plazma stanica u koštanoj srži (više od 0,1%) imali su i kraće ukupno preživljenje i kraću dužinu vremena do progresije bolesti; p < 0,0001 za oba (slika 19).

Table 21. Korelacije postotka patoloških plazma stanica određenih multiparametarskom imunofenotipizacijom s pokazateljima aktivnosti bolesti u serumu.

	Uspoređivana varijabla	**p vrijednost**
% patoloških plazma stanica	vrijednosti IgGκ, IgGλ, IgAκ, IgAλ > medijana	0,047
	abnormalna vrijednost omjera slobodnih lakih lanaca u serumu	0,026
	abnormalna vrijednost IgGκ/IgGλ, IgAκ/IgAλ omjera	0,30
	beta-2-mikroglobulin > 3,5 mg/L	0,31
	vrijednost albumina < 35 g/L	0,08



Slika 19. Ukupno preživljenje (a) i vrijeme do progresije bolesti (b) bolesnika u odnosu na postotak patoloških plazma stanica u koštanoj srži. Bolesnici s postotkom patoloških plazma stanica > 0,1% imaju očekivano kraće ukupno preživljenje, kao kraće vrijeme do progresije bolesti (isprekidana linija).

6.1.10. Multivarijatna analiza za cijelu grupu ispitanika

U multivarijatnoj analizi pokazatelja preživljenja bez progresije bolesti korelirani su čimbenici koji su univarijatnom analizom bili statistički značajno povezani, a to su abnormalan Ig´κ/Ig´λ omjer, vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca veće od medijana, abnormalan omjer slobodnih lakih lanaca u serumu, vrijednosti beta-2-mikroglobulin veće od 3,5 mg/L, vrijednosti albumina manje od 35 g/L. Rezultati su prikazani u tablici 22.

Tablica 22. Multivarijatna analiza prognostičkih čimbenika za preživljenje bez progresije bolesti.

RIZIČNI ČIMBENIK	RELATIVNI RIZIK	95% INTERVAL POUZDANOSTI	"p" VRIJEDNOST
albumin < 35 g/L	**4,25**	**1,66 – 10,88**	**0,003**
β-2-mikroglobulin > 3,5 mg/L	**2,94**	**1,13 – 7,68**	**0,03**
abnormalan IgGκ/IgGλ; IgAκ/IgAλ omjer	**3,55**	**0,96 – 13,20**	**0,05**
vrijednost monoklonskog izotipa > medijana	0,73	0,29 – 1,97	0,54
abnormalan omjer slobodnih lakih lanaca	1,24	0,45 – 3,45	0,67

Značajni neovisni rizični pokazatelji za preživljenje bez progresije mijeloma su poremećeni omjer IgGk/IgGlamba, odnosno omjer IgAk/IgAlambda, te razina albumina < 35 g/L i razina beta-2-mikroglobulina > 3,5 mg/L.

6.2. Ne-monoklonski izotip teškog/lakog lanca imunoglobulina, pokazatelji bolesti i ishod mijeloma

U svih ispitanika određena je i vrijednost ne-monoklonskog para imunoglobulina. Vrijednosti medijana i rasponi prema izotipovima prikazani su u tablici 23.

Tablica 23. Prikaz vrijednosti medijana i raspona ne-monoklonskog izotipa imunoglobulina.

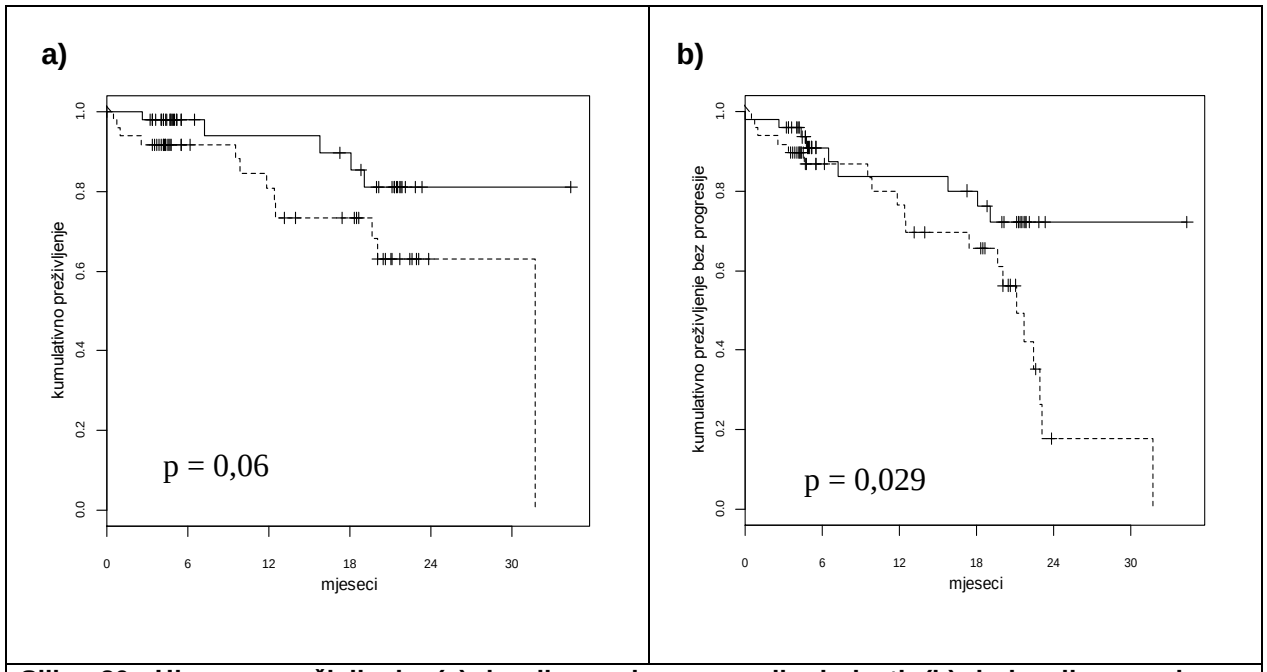
IZOTIP	MEDIJAN (g/L)	RASPON
IgGκ	1,30	0,11 – 7,31
IgGλ	3,46	0,33 – 8,06
IgAκ	0,68	0,02 – 1,52
IgAλ	0,65	0,07 – 4,28

Utvrđeno je da su vrijednosti ne-monoklonskog para manje od odgovarajućeg medijana povezane s pokazateljima veličine infiltracije koštane srži; postotkom plazma stanica ($p = 0,006$) te vrijednostima hemoglobina manjim od 100 g/L ($p = 0,0036$) te s abnormalnim omjerom slobodnih lakih lanaca u serumu ($p < 0,0001$) i vrijednostima serumskog kalcija ($p = 0,01$). Granična korelacija sa statističkom značajnosti na razini 0,07 utvrđena je s vrijednostima albumina i hemoglobina (tablica 24.).

Ispitanici sa sniženim vrijednostima ne-monoklonskog para izotipova imaju statistički značajno kraće vrijeme do progresije bolesti ($p = 0,029$). Ukupno preživljenje nije doseglo statističku značjanost na razini $p \leq 0,05$ ($p = 0,06$) iako se može reći da postoji trend kraćeg preživljenja (slika 20).

Tablica 24. Rezultati korelacija s vrijednostima ne-monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca manjim od odgovarajućih medijana za cijelu grupu ispitanika.

	USPOREĐIVANA VARIJABLA	p VRIJEDNOST
ne-monoklonski izotip Ig´κ ili Ig´λ < medijana	**albumin**	**0,07**
	albumin < 35g/L	0,39
	beta-2-mikroglobulin	0,52
	beta-2-mikroglobulin > 3,5mg/L	0,96
	% plazma stanice	**0,006**
	omjer slobodnih lakih lanaca u serumu – apsolutna vrijednost	0,16
	omjer slobodnih lakih lanaca u serumu – abnormalna vrijednost	**< 0,0001**
	stadij prema ISS	0,18
	stadij prema Durie-Salmon	0,69
	Hemoglobin	**0,07**
	Hemoglobin < 100gL	**0,036**
	Trombociti	0,15
	Trombociti < $150x10^9$/L	0,62
	LDH	0,40
	LDH > 240 U/L	0,93
	kreatinin	0,22
	serumski kalcij	**0,01**
	serumski kalcij > 2,5 mmol/L	0,93
	CRP	0,93



Slika 20. Ukupno preživljenje (a) i vrijeme do progresije bolesti (b) bolesnika u odnosu prisutnost supresije ne-monoklonskog para izotipova teškog/lakog lanca imunoglobulina (vrijednosti manje od granica normale). Bolesnici sa supresijom ne-monoklonskog para izotipova imaju kraće vrijeme do progresije (b; isprekidana linija), medijan iznosi 21,1 mjesec, u odnosu na bolesnika bez supresije (b; puna linija), medijan nije dosegnut. Razlika u ukupnom preživljenju nije dosegla statističku značajnost na razini p ≤ 0,05, ali može se reći da postoji taj trend.

7 **RASPRAVA**

7.1. Dosadašnje spoznaje

Strategije i metode dijagnosticiranja, liječenja i praćenja bolesnika s multiplim mijelomom dobro su definirane, ali još uvijek postoje brojne nedoumice i kontroverze o značenju pojedinih laboratorijskih nalaza, a posebice o njihovom međusobnom odnosu i važnosti u procjeni stanja bolesti.

Procjena stanja bolesti u određenom trenutku, a osobito definicija kompletne remisije i definicija minimalne rezidualne bolesti su u središtu zanimanja. Razlog tome je dokazana povezanost dužine preživljenja bez progresije bolesti i ukupnog preživljenja bolesnika s postizanjem kompletne remisije. Prema sadašnjim smjernicama kompletna remisija je definirana negativnom imunofiksacijom i nalazom manje od 5% plazma stanica u koštanoj srži. Drugim riječima, stanje kompletne remisije je zapravo procjena minimalne rezidualne bolesti, one koje sadašnjim metodama ne možemo do kraja precizno detektirati. Uz nove antimijelomske lijekove i liječenje transplantacijom matičnih stanica broj bolesnika u kojih se postiže kompletna remisija znatno se povećao, a time se poboljšao nijhov ishod. Ipak većina tih bolesnika uđe u relaps bolesti; uzimajući u obzir različita klinička istraživanja može se reći da je za bolesnike liječene samo konvencionalnom kemoterapijom medijan preživljenja bez događaja (EFS – eng. event free survival) od 15 do 33 mjeseca, a za bolesnike liječene transplantacijom autolognih matičnih stanica medijan EFS je 24 do 42 mjeseca.[88] Zbog toga i zbog određenih nesavršenosti samih metoda procjene stanja bolesti (vidi poglavlje 1.12.) javila se potreba za preciznijom definicijom kompletne remisije odnosno procjene postojanja i količine rezidualne bolesti.

U tom se smislu određeno poboljšanje u definiciji kompletne remisije postiglo uvođenjem kvantitativnog mjerenja slobodnih lakih lanaca u serumu i/ili urinu i njihovih omjera. Definicija kompletne remsije nije se mijenjala, već je dodana nova kategorija – striktna kompletna remisija koja je uz dotadašnje kriterije kompletne remisije morala zadovoljiti i kriterij normalizacije omjera κ/λ lakih lanaca u serumu. Vrijednost omjera slobodnih lakih lanaca je uvrštena kao jedan od kriterija jer se pokazalo da su koncentracija slobodnih lakih lanaca i njihov omjer pokazatelji ranog relapsa i neovisni prognostički čimbenik. Kapoor i suradnici[89] su na velikom broju bolesnika (445 bolesnika) koji su liječeni transplantacijom matičnih stanica pokazali da striktna kompletna remisija vjerojatno

predstavlja dublji odgovor tj. manju rezidualnu bolest u usporedbi s kompletnom remisijom. Uspoređivali su bolesnike koji su postigli striktnu kompletnu remisiju (sCR) i one koji su postigli kompletnu remisiju (CR) nakon transplantacije matičnih stanica i utvrdili statistički značajnu razliku u vremenu do progresije (TTP – eng. time to progression) i u ukupnom preživljenju (OS – eng. overal survival). Tako su bolesnici koji su postigli sCR imali medijan TTP od 50 mjeseci, za razliku od bolesnika u CR čiji medijan TTP je bio 20 mjeseci. Medijan ukupnog preživljenja za prvu grupu bolesnika (sCR) još nije dosegnut, dok za drugu grupu bolesnika (CR) iznosi 81 mjesec. Postizanje striktne kompletne remisije u ove grupe bolesnika se pokazalo i kao nezavisni prognostički čimbenik. Rezultati ove studije su potvrdili važnost dubine odgovora odnosno razinu rezidualne bolesti, ali i činjenicu da još uvijek ne postoji dovoljno osjetljiv alat za detekciju minimalne rezidualne bolesti tj. da postoji još dublja razina odgovora od sCR. Ta dublja razina odgovora je molekularna razina. Međutim, za razliku od nekih drugih hematoloških bolesti npr. kronične mijeloične leukemije, u multiplom mijelomu ne postoji jedinstvena, točno definirana, molekularna promjena ili set promjena koje bi se mogle pratiti. Stoga metode molekularne analize nisu niti dio standardnog dijagnostičkog algoritma, već se izvode iznimno, najčešće u sklopu studija u specijaliziranim centrima.

Zbog toga se pokušavaju pronaći druge metode, primjenjive na sve bolesnike s multiplim mijelomom, koje bi mogle pomoći u procjeni dubine odgovora. Jedna od takvih metoda je kvantifikacija monoklonskih izotipova teškog/lakog imunoglobulina Ig´κ ili Ig´λ i njihovog omjera Ig´κ/Ig´λ. Metoda se pokazala čak superiornijom standradnim metodama detekcije monoklonskog protina, imunofiksaciji serumskih proteina i mjerenju koncentracije imunoglobulina u serumu dosadašnjim testom, jer nadvladava njihove glavne nedostatke. Za razliku od imunofiksacije proteina seruma koja je samo kvalitativna metoda, kvantifikacijom izotipova teškog/lakog imunoglobulina Ig´κ ili Ig´λ dobiva se brojčana vrijednost samog monoklonskog protiena, ali i nemonoklonskog para. Stavljanjem u omjer tih vrijednosti Ig´κ/Ig´λ dobiva se točan uvid u količinu monoklonskog imunoglobulina jer se omjerom poništava učinak promjene hematokrita, volumena plazme i metabolizma imunoglobulina koji bitno utječu na vrijednosti izmjerene standardnim testovima. Zbog ovih prednosti, vrijednosti imunoglobulina izmjerene kvantifikacijom izotipova teškog/lakog imunoglobulina Ig´κ ili Ig´λ i njihov omjera Ig´κ/Ig´λ mogu bolje korelirati s kliničkim stanjem od standradnih testova.

Osim ovih seroloških testova kojima se indirektno prati veličina tumora, važno mjesto u definiranju kompletne remisije tj. minimalne rezidulane bolesti ima i direktan dokaz plazma stanica analizom koštane srži. Za sada je kriterij za kompletnu remisiju nalaz manje od 5% plazma stanica detektiranih citološkom analizom u razmazima koštane srži. Međutim, citološkom analizom nije moguće razlikovati normalne od aberantnih plazma stanica što znači da ne omogućuje točnu, brojčanu, procjenu rezidualne bolesti. Takvu procjenu moguće je učiniti analizom koštane srži multiparametarskom imunofenotipizacijom protočnim citometrom. Odabirom i obilježavanjem različitih staničnih biljega, ovom metodom moguće je izdiferencirati populaciju aberantnih plazma stanica i izraziti njihov točan udio u ukupnoj populaciji stanica u uzorku koštane srži. Neke studije, kao one Liu i suradnika[90] i Rawstrona i suradnika[91], su pokazale da bolesnici s manjim postotkom aberantnih plazma stanica određenih multiparametarskom imunofenotipizacijom, dakle s manjom rezidualnom bolesti imaju bolji ishod te da je imunofenotipizacija u nekim slučajevima osjetljivija i od imunofiksacije serumskih protiena u procjeni minimalne rezidualne bolesti. Uz navedene prednosti, multiparamteraska imunofenotipizacija ima prednost i pred molekularnim analizama jer je primjenjiva na sve bolesnike s multiplim mijelomom.

7.2. Osjetljivost metode za kvantifikaciju monoklonskih izotipova teškog/lakog lanaca u serumu i Ig´κ/Ig´λ omjera u detekciji monoklonskog proteina

Poznato je da standardne metode detekcije i praćenja monoklonskog proteina, imunofoksacija i elektroforeza serumskih proteina te denzitometrijsko mjerenje koncentracije imunoglobulina, imaju nedostatke zbog kojih je nerijetko otežana ili onemogućena točna i pravodobna procjena stanja bolesti i/ili odgovora na liječenje.

Najvažniji nedostatak imunofiksacije je što je to samo kvalitativna metoda i ne daje informaciju o količini preostalog monoklonskog proteina. Elektroforeza serumskih proteina može biti neprecizna i nedovoljno osjetljiva, kao npr. kod monoklonskog IgA protiena koji može migrirati u beta frakciju te tako ostati potpuno nedetektiran. Denzitometrijsko mjerenje koncentracije imunoglobulina je također neprecizno jer rezultat može varirati s promjenama vrijednosti hematokrita i volumena plazme, a u slučaju IgG monoklonskog proteina vrijednost

ovisi i o metabolizmu imunoglobulina. Također, denzitometrijsko mjerenje imunoglobulina daje informaciju o ukupnoj koncentraciji pojedinih imunoglobulina, bez razlikovanja koliki je udio monoklonskog, a koliki nemonoklonskog imunoglobulina.

Navedeni nedostatci mogu bitno utjecati na kliničku procjenu stanja bolesti ili odgovora na liječenje zbog čega se pokušalo naći novu metodu kojom bi se nedostatci uklonili. Takva metoda je kvantifikacija monoklonskih i nemonoklonskih izotipova teških/lakih lanaca u serumu i određivanje Ig´κ/Ig´λ omjera. Osim što omogućuje točnu točnu kvantifikaciju monoklonskog imunoglobulina, za razliku od imunofiksacije, rezultat ne ovisi o promjenama hematokrita, volumena plazme i metabolizmu jer se stavljanjem u omjer učinici tih parametara poništavaju.

Navedene prednosti nove metode, kvantifikacije monoklonskih i nemonoklonskih izotipova teških/lakih lanaca u serumu i određivanje Ig´κ/Ig´λ omjera, su potvrđene i dokazane u nekim radovima. Tako su Ludwig i suradnici[92] proveli analizu seruma na 102 bolesnika s multiplim mijelomom (53 IgA tipa i 49 IgG tipa) te pokazali da je kvantifikacijom izotipova teških/lakih lanaca moguće pravilno detektirati i izmjeriti monoklonski protien kada to standardnim metodama nije moguće. Tako u 14 bolesnika s IgA tipom mijeloma nije bilo moguće izmjeriti monoklonskih protein elektroforezom proteina i denzitometrijom, ali su kvantifikacijom izotipova teškog/lakog lanca i određivanjem omjera IgAκ/IgAλ dokazane patološke vrijednosti tj. aktivnost bolesti. Isto su dokazali i u bolesnika s IgG tipom mijeloma u kojih je vrijednost koncentracije IgG određena denzitometrijski bila unutar referentnih vrijednosti ili niža. Slične rezultate su objavili i Bengoufa i suradnici[93] koji su napravili analizu uzoraka seruma 81 bolesnika s monoklonalnom gamapatijom (50 bolesnika s mijelomom i 31 bolesnik s MGUS-om) i utvrdili da je metoda kvantifikacije izotipova teškog/lakog lanca preciznija i osjetljivija u detekciji monoklonskog proteina, posebice u praćenju bolesnika kada monoklonski protien nije moguće mjeriti konvencionalnim metodama.

Rezultati našeg istraživanja su u suglasju s gore navedenim radovima. Ovo istraživanje je provedeno na uzorcima seruma 99 bolesnika s multiplim mijelomom (74 s IgG tipom i 25 s IgA tipom). Vrijednosti imunoglobulina izmjerene standardnom metodom i novom metodom su bile usporedive: medijani za IgG i IgA izmjereni standardnom metodom su iznosili 12,5 g/L za IgG i 5,53 g/L za IgA, dok su mediani izmjereni novom metodom iznosili 11,62 g/L IgG (IgGκ + IgGλ) i 4,87 g/L za IgA (IgAκ + IgAλ). U 38 bolesnika standardnom metodom utvrđene su vrijednosti monoklonskog imunoglobulina veće od

referentnih vrijednosti što se podudaralo s rezultatima dobivenim kvantifikacijom izotipova teškog/lakog lanca; apsolutne vrijednosti izotipova teškog/lakog lanca su bile veće od referentnog raspona za odgovarajući izotip. U ostalih bolesnika (61) u kojih je standardnom metodom utvrđena vrijednost monoklonskog imunoglobulina unutar referentnih vrijednosti, kvantifikacijom izotipova teškog/lakog lanca u 18 bolesnika nađena je vrijednost monoklonskog izotipa veća od referentnih vrijednosti za odgovarajući izotip (tablica 25). Iz ovoga proizlazi da je kvantifikacija izotipova teškog/lakog lanca preciznija i osjetljivija metoda od standardnih metoda. Čini se da se osjtljivost metode poboljšava kada se analiziraju i omjeri Ig´κ/Ig´λ. U našoj ispitavnoj populaciji, u 16 bolesnika utvrđene su normalne vrijednosti imunoglobulina izmjerene standardnom metodom i normalne vrijednosti monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca, ali kada se odredio omjer Ig´κ/Ig´λ, u svih 16 bolesnika on je bio patološki (tablica 25). Moguće objašnjenje veće osjetljivosti omjera Ig´κ/Ig´λ je to što normalna apsolutna vrijednost monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca ne znači nužno odsutnost bolesti već može biti posljedica manje ili sporije produkcije monoklonskog protiena od tumorskih stanica ili redukcije (supresije) ne-monoklonskog para izotipova teškog/lakog lanca. Stavljanjem u omjer Ig´κ/Ig´λ nedvojbeno se potvrđuje postoji li prekomjerna produkcija jednog od izotipova.

Zaključno, može se reći da rezultati našeg istraživanja ukazuju na veću preciznost i osjetljivost metode kvantifikacije monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i omjera Ig´κ/Ig´λ u detekciji monoklonskog protiena u usporedbi sa standardnim metodama.

Tablica 25. Osjetljivost metode kvantifikacije monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i omjera Ig´κ/Ig´λ u detekciji monoklonskog proteina. Ig - imunoglobulin.

Izotip	Broj bolesnika	Standardna metoda: Ig u granicama normale	Monoklonski izotip > normale	Standardna metoda Ig i monoklonski izotip normalni – omjer Ig´κ/Ig´λ abnormalan
IgAκ	14	6	2/6	1
IgAλ	11	4	1/4	0
IgGκ	54	36	8/36	13
IgGλ	20	15	7/15	2

7.3. Osjetljivost metode za kvantifikaciju monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca u serumu i Ig´κ/Ig´λ omjera u procjeni stanja kompletne remisije

U uvodnom dijelu definirano je stanje kompletne remisije te je objašnjeno kako su uvođenje metode kvantifikacije slobodnih lakih lanaca u serumu i κ/λ omjer doprinjeli definiciji kompletne remisije tj. striktne kompletne remisije i koje je kliničko značenje tih nalaza. Također, u prethodnom potpoglavlju izneseni su rezultati stranih autora, kao i rezultati našeg istraživanja, kojima su dokazane veća osjetljivost i preciznost kvantifikacije izotipova teškog/lakog lanca u serumu i Ig´κ/Ig´λ omjera u detekciji i mjerenju vrijednosti imunoglobulina u odnosu na denzitometrijsko određivanje koncentracije imunoglobulina i elektroforeze serumskih proteina. Stoga se postavlja pitanje u kakvom su odnosu kvantifikacija izotipova teškog/lakog lanca i imunofiksacija serumskih proteina kao za sada još uvijek zlatnog standarda za detekciju monoklonskog proteina. Odnosno, jesu li kvantifikacija izotipova teškog/lakog lanca imunoglobulina i Ig´κ/Ig´λ omjer osjetljivije metode od imunofiksacije i može li se tim nalazima definirati nova, dublja kompletna remisija.

Jedan od radova koji govore u prilog veće osjetljivosti nove metode u odnosu na imunofiksaciju serumskih proteina je onaj Lakomy i suradnika.[94] Autori su analizirali uzorke 16 bolesnika s multiplim mijelomom IgA tipa. Tijekom praćenja u 5 bolesnika je potvrđena kompletna remisija tj. imunofiksacija je bila negativna. Od tih 5 bolesnika, u 2 je utvrđen abnormalan IgAκ/IgAλ omjer iako je vrijednost monoklonskog izotipa bila u granicama referentnih vrijednosti. Ovo su objasnili izrazito sniženim vrijednostima ne-monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca zbog čega je omjer abnormalan. Ovakva supresija ne-monoklonskih imunoglobulina također upućuje na aktivnost bolesti. Nalaz abnormalne vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera u bolesnika kod kojih je imunofiksacija bila negativna opisali su i Ludwig i suradnici.[95] Prema njihovim rezultatima, bolesnici u kojih je utvrđena kompletna remisija temeljem standardnih metoda, a u kojih je i dalje bio prisutan abnormalan Ig´κ/Ig´λ omjer, još su uvijek imali rezidualnu bolest te su unutar nekoliko tjedana ili mjeseci utvrdili relaps i standardnim tehnikama.

U našoj ispitivanoj grupi, 23 ispitanika je bilo u stanju kompletne remisije, 8 bolesnika s IgA tipom mijeloma i 15 bolesnika s IgG tipom mijeloma. Reevaluacijom stanja bolesti kvantifikacijom izotipova teškog/lakog lanca i Ig´κ/Ig´λ omjera, u tri bolesnika je verificirana vrijednost monoklonskog izotipa veća od odgovarajućeg referentnog raspona; 1 IgA tipa i 2

IgG tipa (tablica 26). Određivanjem Ig´κ/Ig´λ omjera nađena je abnormalana vrijednost u 5 bolesnika (tablica 26). U grupi bolesnika s IgA tipom mijeloma, abnormalna vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera je verificirana u 2 bolesnika. Jedan od njih je bolesnik u kojeg je nađena i vrijednost monoklonskog izotipa veća od referentnih vrijednosti dok je u drugog bolesnika vrijednost monoklonskog izotipa bila unutar referentnog raspona. Kod ovog potonjeg bolesnika verificirana je snižena vrijednost ne-monoklonskog izotipa imunoglobulina što je također odraz aktivnosti bolesti. Pravi dokaz navedenog je činjenica da je u oba ova bolesnika potvrđen relaps za vrijeme praćenja. U grupi bolesnika s IgG tipom mijeloma abnormalna vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera je nađena u 3 bolesnika. Niti jedan od ova tri bolesnika nije imao vrijednosti monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca veće od referentnih vrijednosti, niti je nađena supresija ne-monoklonskog izotipa imunoglobulina. Jedno od objašnjenja može biti da razina produkcije monoklonskog izotipa još nije dosegla razinu koja bi se odrazila na njegovu ukupnu vrijednost i/ili još nije došlo do značajnije supresije ne-monoklonskog izotipa koja bi se odrazila na ukupnu vrijednost ne-monoklonskog para. Međutim, stavljanjem vrijednosti u omjer jasno je da postoji disbalans u produkciji imunoglobulina što upućuje na aktivnost bolesti. Spomenuto je da je u grupi bolesnika s IgG tipom mijeloma u dvoje bolesnika nađene vrijednosti monoklonskog izotipa imunoglobulina veće od referentnih vrijednosti dok je omjer Ig´κ/Ig´λ u tih bolesnika bio normalan. Moguće je da se u ta dva bolesnika radi o imunološkom oporavku jer su nađene proporcionalno povećane vrijednosti i ne-monoklonskog izotipa imunoglobulina. U tom slučaju omjer ostaje normalnih vrijednosti.

Tablica 26. Osjetljivost metode kvantifikacije monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i omjera Ig´κ/Ig´λ u procjeni stanja kompletne remisije. IF – imunofiksacija; Ig – imunoglobulin.

Tip mijeloma	Broj bolesnika u CR (IF neg.)	Standardna metoda: Ig u granicama normale	Monoklonski izotip > normale	Omjer Ig´κ/Ig´λ abnormalan
IgA	8	8	1	2
IgG	15	15	2	3

Ovi rezultati ukazuju da kvantifikacija monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca imunoglobulina, a posebice Ig´κ/Ig´λ omjer, mogu biti precizniji i osjetljiviji u definiranju kompletne remisije, odnosno dubine odgovora, i od imunofiksacije serumskih proteina. Međutim, ovu tvrdnju u određenoj mjeri dovodi u pitanje činjenica da se i u bolesnika u kojih nije postignuta kompletna remisija i u kojih je imunofiksacija serumskih proteina pozitivna

može utvrditi normalizacija Ig´κ/Ig´λ omjera. Prema nekim autorima objašnjenje ovakvih nalaza je pojava povećane sinteze poliklonskih imunoglobulina uz istovremeno smanjenje sinteze monoklonskog protiena kao rezultat dobrog odgovora na terapiju što dovodi do normalizacije omjera.[95] U našoj ispitivanoj skupini od 33 bolesnika u kojih je stanje bolesti procjenjeno kao vrlo dobra parcijalna remisija, u 12 je verificiran normalan Ig´κ/Ig´λ omjer. Od tih 12, u samo dvoje bolesnika je nađena vrijednost ne-monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca imunoglobulina veća od referentnih vrijednosti što bi potvrdilo gore navedeno objašnjenje.

7.4. Odnos omjera Ig´κ/Ig´λ izotipova imunoglobulina i omjera κ/λ slobodnih lakih lanaca u serumu

Iz gore navedenog jasno je da uloga kvantifikacije izotipova teškog/lakog lanca imunoglobulina, ne samo monoklonskog već i ne-monoklonskog para, i Ig´κ/Ig´λ omjera nije potpuno razjašnjena kada se radi o procjeni stanja kompletne remisije, odnosno negativan nalaz imunofiksacije proteina ne znači nužno i normalizaciju vrijednosti monoklosnkog izotipa i/ili Ig´κ/Ig´λ omjera. Isto se može reći i za odnos imunofiksacije serumskih protiena i omjera slobodnih lakih lanaca u serumu. No pokazalo se da bolesnici u kojih se postigne normalizacija omjera slobodnih lakih lanaca u serumu, uz negativnu imunofiksaciju serumskih proteina imaju bolji ishod tj. duže preživljenje. Iz toga se zaključilo da takvo stanje bolesti označava dublji odgovor i od kompletne remisije – tzv. striktna kompletna remisija.

Ako vrijednost monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca i posebice Ig´κ/Ig´λ omjer mogu biti osjetljivija metoda za procjenu stanja kompletne remisije, što daju naslutiti podaci iz literature i rezultati našeg istraživanja, kakav je onda odnos vrijednosti monoklonskog izotipa i Ig´κ/Ig´λ omjera s omjerom slobodnih lakih lanaca u serumu.

Poznavajući metabolizam imunoglobulina i slobodnih lakih lanaca, logično je bilo za pretpostaviti da će normalizacija vrijednosti mononklonskog izotipa i Ig´κ/Ig´λ omjera značiti i normalizaciju omjera slobodnih lakih lanaca, čak i da će do normalizacije omjera slobodnih lakih lanaca doći prije nego do normalizacije Ig´κ/Ig´λ omjera obzirom na njihov izrazito kratak poluživot (vidi poglavlje 2.1.). Međutim pokazalo se da niti u ovom odnosu nije sve do kraja poznato.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su očekivano jaku korelaciju između vrijednosti omjera slobodnih lakih lanaca i monoklonskog izotipa teškog/lakog lanaca ($p < 0,0001$) odnosno Ig´κ/Ig´λ omjera ($p = 0,0001$). Ali normalizacija Ig´κ/Ig´λ omjera nije nužno značila normalizaciju i omjera slobodnih lakih lanaca ili obrnuto (tablica 27).

Tablica 27. Vrijednosti omjera slobodnih lakih lanaca u serumu (κ/λ omjer) i vrijednosti omjera izotipova imunoglobulina (Ig´κ/Ig´λ omjer) u odnosu na postignuti odgovor. CR – kompletna remisija; VGPR – vrlo dobra parcijalna remisija; PR – parcijalna remisija; SD – stabilna bolest.

Metoda	Rezultat	CR (n = 23)	VGPR (n = 33)	PR (n = 10)	SD (n=10)
Ig´κ/Ig´λ omjer	normalan	18	12	0	1
	abnormalan	5	21	10	9
κ/λ omjer	normalan	18	19	0	3
	abnormalan	5	14	10	7
Ig´κ/Ig´λ omjer i κ/λ omjer	oba normalni	14	10	0	0
	oba abnormalni	1	12	10	6
	κ/λ omjer abnormalan / Ig´κ/Ig´λ omjer normalan	4	2	0	1
	κ/λ omjer normalan / Ig´κ/Ig´λ omjer abnormalan	4	9	0	3

Iz tablice je vidljivo da je nepodudarnost između omjera slobodnih lakih lanaca u serumu i Ig´κ/Ig´λ omjera prisutna neovisno o postignutom odgovoru. U bolesnika koji su postigli stanje stabilne bolesti (SD), stanje parcijalne remisije (PR) pa čak i u bolesnika u vrlo dobroj parcijalnoj remisiji (VGPR) ovakvi nalazi se mogu objasniti zaostalom aktivnošću bolesti zbog čega normalizacija omjera možda nije niti očekivana. Ali u bolesnika u kojih je postignuta kompletna remisija (CR), osobito u onih u kojih je postignuta striktna kompletna remisija ovakvo objašnjenje nije moguće. Ovakvu diskrepancu u nalazima omjera slobodnih lakih lanaca u serumu i Ig´κ/Ig´λ omjera opisali su i drugi autori. Jedno od mogućih objašnjenja zašto omjer slobodnih lakih lanaca može ostati abnormalan unatoč normalizaciji Ig´κ/Ig´λ omjera je činjenica da se zbog svoje male molekularne mase velik dio slobodnih lakih lanaca (čak do 80%) nalazi zapravo u ekstravaskularnom prostoru.[96] Kako se smanjuje količina slobodnih lakih lanaca u vaskularnom prostoru zbog smanjenja tumorske produkcije, tako dolazi do ponovnog prelaska lakih lanaca iz tkiva u vaskularni prostor što možda

uvjetuje dužu prisutnost abnormalnog omjera slobodnih lakih lanaca u serumu. Neki od autora smatraju da je ova diskrepanca odraz prisutnosti više malignih subklonova mijelomskih stanica od kojih neke luče samo lake lance, a neke cijelovite molekule imunoglobulina.[95] Liječenjem dolazi do unuštenja populacije dominantnog subklona, dok drugi subklon stanica perzistira zbog čega i dalje postoji produkcija nekog monoklonskog protiena što rezultira patološkim nalazom bilo omjera slobodnih lakih lanaca bilo Ig´κ/Ig´λ omjera.

Unatoč ovoj za sada još neobjašnjenoj nepodudarnosti, čini se da bi nalaz Ig´κ/Ig´λ omjera mogao biti pokazatelj dublje razine odgovora čak i od striktne kompletne remisije. U prilog tome dijelom govore i naši rezultati. Naime, od 23 bolesnika u kojih je postignuta kompletna remisija, u čak 18 je omjer slobodnih lakih lanaca u serumu bio normalan, dakle postignuta je striktna kompletna remisija (sCR). Od 18 bolesnika u sCR u 4 bolesnika je utvrđena abnormalna vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera, a dvoje je ušlo u relaps bolesti za vrijeme praćenja. Nasuprot tome, u preostalih 14 bolesnika u kojih je utvrđena normalna vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera, samo je 1 bolesnik ušao u relaps.

7.5. Odnos vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca u serumu i Ig´κ/Ig´λ omjera i postotka infiltracije koštane srži plazma stanicama

Osim opisanih seroloških metoda koje su mjera aktivnosti bolesti, za procjenu stanja bolesti nužan je i direktan dokaz veličine tumorske mase tj. postotak infiltracije koštane srži plazma stanicama. Poznato je da određivanje ukupnih imunoglobulina standardnim metodama ne daje precizne podatke o tumorskoj masi jer vrijednost tako izmjerenih imunoglobulina može ovsiti i mjenjati se ovisno o hematokritu, volumenu plazme; kada govorimo o IgA imunoglobulinima; ili o metabolizmu imunoglobulina; posebice kada govorimo o IgG imunoglobulinu i metabolizmu preko receptora za teški lanac (recikliranje putem FcRn receptora).[96] Kao što je prikazano u prethodnim potpoglavljima, metoda kvantifikacije izotipova teškog/lakog lanca omogućuje kvanitativno razlikovanje monoklonskog i nemonoklonskog dijela imunoglobulina istog razreda pa time omogućuje precizniju i osjetljiviju detekciju monoklonskog proteina. Određivanjem omjera Ig´κ/Ig´λ metoda postaje

još osjetljivija jer se poništava učinak promjene hematokrita i/ili volumena plazme te mehanizma recikliranja putem FcRn receptora budući da tim promjenama podliježu i monoklonski i ne-monoklonski izotipovi. Zbog toga nova metoda bi morala biti preciznija, korisnija, u procjeni ne samo aktivnosti bolesti, već i veličine tumorske mase (rezidualne bolesti).

Jedan od radova koji su uspoređivali odnos monoklonskih izotipova i Ig´κ/Ig´λ omjera s postotkom infiltracije koštane srži tumorskim stanicama je onaj Koulierisa i suradnika.[97] Autori su analizirali uzorke 103 bolesnika s multiplim mijelomom uzetih prilikom postavljanja dijagnoze, a uspoređivali su apsolutne vrijednosti monoklonskih izotipova i vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera s postotkom plazma stanica u koštanoj srži i indirektnim pokzateljima infiltracije koštane srži: vrijednostima hemoglobina i trombocita. Pokazali su da postoji statistički značajna povezanost vrijednosti monoklonskog izotipa IgG (IgGκ i IgGλ) većom od medijana s vrijednostima hemoglobina < 100 g/L i infiltracijom koštane srži > 50%. Za vrijednost monoklonskog izotipa IgA (IgAκ i IgAλ) većom od medijana nije nađena statistički značajna povezanost s navedenim parametrima. Autori nisu ponudili objašnjenje za ovakvu razliku, ali je moguće da je ona posljedica manjeg broja bolesnika s mijelomom tipa IgA (25, nasuprot 78 bolesnika s IgG tipom). Omjer Ig´κ/Ig´λ (neovisno o tipu monoklonskog izotipa IgG ili IgA) također je bio statistički značajno povezan s vrijednosti hemoglobina < 100 g/L i infiltracijom koštane srži > 50%.

U našem istraživanju također je učinjena analiza vrijednosti monoklonskih izotipova i vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera s postotkom plazma stanica te je nađena snažna povezanost s apsolutnim vrijednostima monoklonskih izotipova (IgG i IgA) većim od odgovarajućeg medijana ($p < 0,0001$) i abnormalnim Ig´κ/Ig´λ omjerom ($p = 0,0004$). Učinjena je i korelacija s apsolutnim vrijednostima hemoglobina gdje je utvrđena povezanost s abnormalnim Ig´κ/Ig´λ omjerom ($p = 0,05$) dok povezanost s apsolutnim vrijednostima monoklonskih izotipova nije bila statistički značajna ($p = 0,11$). Vrijednost hemoglobina < 100 g/L bila je statistički povezana samo s IgGκ/IgGλ omjerom ($p = 0,019$). Povezanost vrijednosti hemoglobina < 100 g/L i IgAκ/IgAλ omjerom nije bila analizirana jer niti jedan bolesnik s IgA tipom mijeloma nije imao vrijednosti hemoglobina niže od 100 g/L. Obzirom na različitu pojavnost imunoglobulina u serumu (IgA tvore dimere, dok su IgG monomeri) i dužinu poluživota IgG i IgA tipova imunoglobulina, ova analiza učinjena je i za svaku grupu posebno. Utvrđena je statistički značajna povezanost. na razini $p \leq 0,05$, apsolutnih vrijednosti monoklonskih izotipova većih od odgovarajućeg medijana u obje grupe i

vrijednosti IgGκ/IgGλ omjera s postotokom plazma stanica. Jedina iznimka je korelacija vrijednosti IgAκ/IgAλ omjera i postotka plazma stanica gdje je nađena povezanost na razini p = 0,064. Vjerojatni razlog ovakvom rezultatu je manji broj bolesnika s IgA tipom mijeloma (25 nasuprot 74 s IgG tipom) te činjenica da je više od polovice (14) bolesnika s IgA tipom mijeloma bila u kompletnoj ili vrlo dobroj parcijalnoj remisiji.

Prema navedenim rezultatima korelacija, vrijednosti monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca i vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera doista jesu pouzdanija i preciznija mjera veličine tumorske mase od standardnih testova.

Međutim, kada se govori o procjeni stanja minimalne rezidualne bolesti, sve više se u pitanje dovodi osjetljivost citološke procjene postotka plazma stanica u koštanoj srži jer se takvom analizom ne mogu razlikovati normalne od aberantnih plazma stanica. Razlikovanje normalnih i aberantnih plazma stanica omogućuje multiparametarska imunofenotipizacija. Već su spomenuti neki od autora koji su pokazali superiornost imunofenotipizacije nad klasičnom citološkom analizom, a sve je više radova koji pokazuju da je imunofenotipski definirana remisija povezana i s boljim ishodom bolesnika.[90,91] Prema nekim autorima imunofenotipski definirana remisija ima i veću prognostičku vrijednost od postizanja striktne kompletne remisije.[98]

Zbog toga je i u ovom istraživanju učinjena analiza koštane srži metodom multiparametarske imunofenotipizacije za jedan dio bolesnika s ciljem da se pokuša točnije definirati stanje bolesti. Analiza je učinjena u 24 bolesnika s različitom dubinom odgovora na terapiju. Korelacijom postotka patoloških plazma stanica i vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca veće od medijana dokazana je statistički značajna povezanost (p = 0,046), dok povezanost postotka patoloških plazma stanica i vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera nije bila statistički značajna (p = 0,30), čak ni kada su se u analizu uzele ekstremne vrijednosti omjera; < 0,02 ili > 40 (p = 0,12).

Rezultati analize odnosa postotka patoloških plazma stanica i vrijednosti monoklonskih izotipova i vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera pomalo odudaraju od analize s postotkom plazma stanica određenog klasičnom citološkom metodom; očekivana bi bila snažnija povezanost s postotkom patoloških plazma stanica određenih imunofenotipizacijom. Razlog ovom neslaganju može biti da se radi o malom broju bolesnika, a moguće i da je rezultat donekle narušen nehomogenošću grupe obzirom na stanje bolesti u kojem je analiza učinjena (tablica 20). Također treba uzeti u obzir i u literaturi opisane nepodudarnosti između

citološke i imunofenotipske analize plazma stanica kao što su razrjeđenje uzorka koštane srži perifernom krvi, gubitak dijela plazma-stanica u postupku pripreme uzorka i sl.[99]

Zaključno, može se reći da su vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca imunoglobulina i vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera dobra indirektna mjera za procjenu veličine rezidualne tumorske mase. U kombinaciji s multiparametarskom imunofenotipizacijom imaju veliki potencijal za definiciju dublje razine kompletne remisije, za što su potrebna daljnja istraživanja na većem broju bolesnika.

7.6. Utjecaj vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca u serumu i Ig´κ/Ig´λ omjera na ishod liječenja bolesnika

U uvodnom dijelu rasprave i u potpoglavlju 1.12. objašnjeno je kako su postizanje kompletne remisije i dubina odgovora jedan od ciljeva u liječenju bolesnika s multiplim mijelomom jer su povezani i s ishodom bolesnika. Također pokazana je snažna povezanost vrijednosti monoklonskih izotipova i vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera s postotkom plazma stanica u koštanoj srži što navodi na zaključak da su te metode dobra mjera rezidualne bolesti. Stoga, bilo bi logično pretpostaviti da će i ti paramteri imati utjecaja na ishod bolesnika.

Među prvim radovima koji su potvrdili tezu da vrijednosti monoklonskih izotipova imunoglobulina i Ig´κ/Ig´λ omjera utječu na ishod bolesnika je onaj Avet-Loiseau i suradnika.[100] Pokazali su da su ekstremeno abnormalne vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera povezane s značajno kraćim preživljenjem bez progresije bolesti. Ove rezultate su potvrdili i neki drugi autori. Ludwig[95] tako opisuje i utjecaj na vrijeme bez progresije, ali i na ukupno preživljenje bolesnika. Pokazali su da je ukupno preživljenje kraće u bolesnika u kojih je nalaz Ig´κ/Ig´λ omjera bio abnormalan; medijan preživljenja za te bolesnike je iznosio 40,5 mjeseci, dok za bolesnike s normalnim vrijednostima Ig´κ/Ig´λ omjera medijan ukupnog preživljenja nije bio dosegnut. Autori su također podjelili bolesnike prema najboljem postignutom odgovoru: grupa bolesnika koja je postigla parcijalnu remsiju ili bolji odgovor, a imala je normalnu vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera imala je i duže ukupno preživljenje od grupe bolesnika koji su postigli istu razinu odgovora, ali su imali abnormalne vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera ($p = 0,04$). Slične rezultate, kraće ukupno preživljenje i kraće vrijeme do nove terapije u bolesnika s patološkim nalazima Ig´κ/Ig´λ omjera, objavili su i Koulieris i suradnici.[101]

U našem istraživanju učinjena je Kaplan-Meierova analiza za cijelu grupu bolesnika kojom se utvrdio utjecaj vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera većeg ili manjeg od referentnih vrijednosti te ekstremnih vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera (< 0,02 ili > 40) na dužinu vremena do progresije i dužinu ukupnog preživljenja. Također, učinjena je analiza utjecaja vrijednosti monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca imunoglobulina na dužinu vremena do progresije i ukupno preživljenje, što prije spomenuti radovi nisu uzimali u razmatranje.

Prvi od analiziranih ishoda je bilo je vrijeme do progresije, odnosno vrijeme od trenutka uključivanja bolesnika u ispitavanje do pojave progresije/relapsa. Vrijeme do progresije je bilo značajno duže u bolesnika u kojih je utvrđena vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera unutar referentnih vrijednosti (p = 0,006) s medijanom vremena koji nije dosegnut za ovu grupu, dok je u bolesnika u kojih je utvrđena vrijednost omjera veća ili manja od normale medijan vremena do progresije iznosio 21,1 mjesec. Ova razlika između dvije grupe bolesnika postaje još jasnija kada se analizira utjecaj ekstremno niskih ili ekstremno visokih vrijednosti omjera (p = 0,0004) uz sada dosegnute medijane vremena u obje grupe: 23,1 mjesec u bolesnika s normalnim vrijednostima omjera, nasuprot 11,8 mjeseci u bolesnika s ekstremnim vrijednostima omjera. Za analizu utjecaja apsoultne vrijednosti monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca na ishod, kao granična točka vrijednosti određen je medijan za svaki od monoklonskih izotipova. Bolesnici su podjeljeni u dvije grupe: one s vrijednostima monoklonskog izotipa većim i one s vrijednostima monoklonskog izotipa manjim od odgovarajućeg medijana. Analizom je dobivena statistička razlika u dužini vremena do progresije između dviju grupa na razini značajnosti p = 0,08, ali se prema izgledu krivulja (vidi sliku 12) može zaključiti da postoji snažan trend dužeg vremena do progresije u grupe bolesnika s vrijednostima monoklonskog izotipa manjom od odgovarajućeg medijana. Ova statistički slabija povezanost vrijednosti monoklonskog izotipa i vremena do progresije može se objasniti činjenicom da, kao i kod kvantificiranja imunoglobulina standardnom metodom, normalne vrijednosti monoklonskih izotipova ne znače nužno i odsutnost bolesti. Ovdje do izražaja dolazi veća osjetljivost vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera jer njegova vrijednost može biti abnormalna kada su apsolutne vrijednosti monoklonskog izotipa unutar svojih referentnih granica zbog istovremene supresije ne-monoklonskog izotipa. Iz navedenog proizlazi da vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera bolje korelira s kliničkim stanjem te omogućuje raniju detekciju relpasa/progresije bolesti. Slične rezultate i zaključke o snažnoj korelaciji vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera i kliničkim stanjem te mogućnosšću ranije detekcije relapsa/progresije pokazali su u svojim radovima Harding i suradnici[102] te Decaux.[103]

Drugi ishod je bila dužina ukupnog preživljenja bolesnika, mjerena od trenutka uključivanja u studiju. Ukupno preživljenje je bilo duže za bolesnike u kojih je utvrđena vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera unutar referentnih vrijednosti (p = 0,021) te onih u kojih vrijednost omjera nije bila ekstremno niska ili ekstremno visoka (p = 0,0032). Očekivano statistička povezanost je bila snažnija kada su se uzele ekstremne granice vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera. Za razliku od vremena do progresije, ukupno preživljenje u odnosu na apsolutnu vrijednost monoklonoskog izotipa veću ili manju od odgovarajućeg medijana, bilo je statistički značajno duže u bolesnika u kojih je utvrđena vrijednost monoklonskog izotipa manja od medijana (p = 0,0033).

U zaključku jasno je da su i vrijednost monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca imunoglobulina i vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera snažno povezani s ishodom bolesnika; da vrijednost omjera bolje korelira s kliničkim stanjem bolesti te omogućuje raniju detekciju relapsa/progresije bolesti. Obzirom da obje vrijednosti značajno utječu na ukupno preživljenje, može se reći da su pouzdana mjera rezidualne bolesti.

7.6.1. Utjecaj ostalih čimbenika na ishod bolesnika

Osim utjecaja vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i Ig´κ/Ig´λ omjera na ishod bolesnika, učinjena je analiza utjecaja na vrijeme do progresije i ukupno preživljenje i drugih čimbenika za koje je već poznato da utječu na ishod bolesnika. U analizama su razmatrani vrijednosti: beta-2-mikroglobulina, serumskog albumina i omjera slobodnih lakih lanaca u serumu te stadij bolesti prema Durie-Salmonovoj i ISS klasifikaciji.

Razultati su potvrdili da bolesnici s većim vrijednostima albumina, s manjim vrijednostima beta-2-mikroglobulina te oni s omjerom slobodnih lakih lanaca u serumu unutar referentnih vrijednosti imaju duže vrijeme do progresije i duže ukupno preživljenje. Bolesnici u višem stadiju bolesti (II i III) prema ISS klasifikaciji imaju kraće vrijeme do progresije i kraće ukupno preživljenje u odnosu na bolesnike u stadiju I. Nije bilo razlike između bolesnika u I i onih u II i III stadiju bolesti prema Durie-Salmonovoj kasifikaciji u pogledu ukupnog preživljenje, dok je vrijeme do progresije bilo značajno kraće u bolesnika u II i III stadiju bolesti (vidi rezultate, potpoglavlje 6.1.7).

7.7. Odnos vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca u serumu i Ig´κ/Ig´λ omjera s prognostičkim čimbenicima – vrijednosti serumskog albumina i beta-2-mikroglobulina

Značenje vrijednosti serumskog albumina i beta-2-mikroglobulina u bolesnika s multiplim mijelomom već je duže poznato. U prvom redu ti čimbenici imaju prognostičko značenje, iako i dalje postoje neke nedoumice o točnim mehanizmima kako su povezani s prognozom bolesnika. Prema nekim autorima, vrijednost serumskog albumina odražava posredno veličinu tumorske mase jer IL-6, ključan citokin za promociju rasta mijelomskih stanica, dovodi do inhibicije sinteze albumina u jetri.[13] Drugi autori pak smatraju da snižena koncentracija albumina označava brz tumorski rast, zbog čega ima prognostičko značenje.[16] Beta-2-mikroglobulin je laki lanac proteinskog kompleksa tj. molekula tkivnog raspoznavanja razreda I (HLA – eng. human leukocyte antigen) i laki lanac u heterodimernom FcRn receptora preko kojeg dolazi do recikliranja imunoglobulina G tipa, ali i albumina. Smatra se da upravo zbog te međusobne povezanosti s vrijednosti albumina i metabolizmom imunoglobulina, beta-2-mikroglobulin ima prognostičku važnost.[13,20] Zbog snažnog prognostičkog značenja, prema vrijednostima serumskog albumina i beta-2-mikroglobulina osmišljena je i prognostička klasifikacija stadija bolesti – ISS klasifikacija.

Ako su vrijednosti serumskog albumina i beta-2-mikroglobulina indirektni pokazatelji tumorske mase, može se pretpostaviti da su povezani i s drugim pokazateljima tumorske mase kao što su vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i Ig´κ/Ig´λ omjera kada se radi o IgG monoklonskom imunoglobulinu. Ovu pretpostavku su ispitiavli i Koulieris i suradnici.[101] U svom radu pokazali su značajnu povezanost vrijednosti monoklonskih IgG izotipova s vrijednosti serumskog albumina, ali ne i s vrijednosti beta-2-mikroglobulina, dok je IgGκ/IgGλ omjer korelirao s vrijednosti beta-2-mikroglobulina većom od 3,5 mg/L.

U našem ispitivanju učinjene su korelacije vrijednosti monoklonskih izotipova i Ig´κ/Ig´λ omjera s vrijednostima serumskog albumina za cijelu grupu te za IgA i IgG tipove posebice te korelacije s vrijednostima beta-2-mikroglobulina za IgG grupu. Kada su se analizirali podatci za cijelu grupu, utvrđena je povezanost vrijednosti serumskog albumina i s vrijednosti monoklonskih izotipova većim od odgovarajućih medijana ($p = 0,05$) i s abnormalnim vrijednostima Ig´κ/Ig´λ omjera ($p = 0,046$). Međutim, kada su analizirani

podatci za pojedine skupine, prema tipu monoklonskog imunoglobulina rezultati su na prvi pogled kontradiktorni. U grupi IgG monoklonskog proteina nađena je povezanost vrijednosti serumskog albumina s abnormalnim vrijednostima IgGκ/IgGλ omjera i to na razini p = 0,085, dok s vrijednosti monoklonskih izotipova nije nađena statistički značajna povezanost (p = 0,19). U grupi IgA monoklonskog imunoglobulina nađena je granična povezanost vrijednosti monoklonskih izotipova veće od medijana i vrijednosti serumskog albumina (p = 0,07), dok korelacija s IgAκ/IgAλ omjerom nije nađena. Učinjena je analiza s vrijednostima serumskog albumina manjim od 35 g/L, ali nije nađena povezanost s parametrima monoklonskog proteina niti u jednoj uspoređivanoj grupi. Ovakvu nedosljednost u rezultatima moguće je djelomično objasniti činjenicom da je velik broj bolesnika u istraživanju imao vrijednosti serumskih albumina u granicama normale. U grupi s IgA monoklonskim imunoglobulinom polovica bolesnika (12/25), a u grupi s IgG monoklonskim imunoglobulinom 2/3 bolesnika (50/74) su imali vrijednosti albumina iznad 40 g/L. Ipak, kada se promatra cijela grupa bolesnika, neovisno o tipu monoklonskog imunoglobulina, trećina bolesnika (37/99) imala je vrijednosti serumskog albumina niže od referentnih vrijednosti što se onda odrazilo i na statistički značajnu povezanost uspoređivanih varijabli.

U grupi bolesnika s IgG monoklonskim imunoglobulinom učinjena je korelacija s vrijednostima beta-2-mikroglobulina te je dokazana povezanost i s vrijednostima monoklonskih IgG izotipova većim od medijana (p = 0,01) i s abnormalnim vrijednostima IgGκ/IgGλ omjera (p = 0,06) što je i očekivano obzirom na povezanost ovih parametara putem FcRn receptora.

Rezultati du potvrdili važnost vrijednosti serumskog albumina i beta-2-mikroglobulina u procjeni stanja bolesti te utvrdili povezanost s novim paramterima monoklonskog imunoglobulina kao mjerom veličine tumorske mase.

7.8. Abnormalna vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera kao nezavisni prognostički čimbenik – multivarijatna analiza

Pokazano je da vrijednosti monoklonskih izotipova teških/lakih lanca i Ig´κ/Ig´λ omjera značajno koreliraju s dobro definiranim paramterima bolesti, vrijednostima serumskog albumina, beta-2-mikroglobulina, abnomralnim omjerom slobodnih lakih lanaca, koji su ujedno i važni prognostički čimbenici. U slučaju takve povezanosti, nerijetko se utvrdi povezanost i ispitivanih varijabli s prognozom bolesti.

U multivarijatnu analizu bili su uključeni: abnormalna vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera, vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca veće od odgovarajućeg medijana, abnormalna vrijednost omjera slobodnih lakih lanaca u serumu, vrijednosti beta-2-mikroglobulin veće od 3,5 mg/L i vrijednosti albumina manje od 35 g/L. Rezultati su pokazali da je Ig´κ/Ig´λ omjer samostalan prognostički faktor ($p = 0,05$), dok se vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca nisu pokazale kao prognostički značajne ($p = 0,54$).

Slične rezultate su pokazali Bradwell i suradnici.[79] U svom radu su dokazali veću prognostičku važnost vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera od vrijednosti monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca. To su objasnili činjenicom da na Ig´κ/Ig´λ omjer ne utječu promjene volumena plazme i/ili hematokrita; naime te promjene jedanko utječu i na monoklonski i na nemonoklonske imunoglobuline, a stavljanjem u omjer kompenziraju se te promjene te se dobiva točniji uvid u količinu imunoglobulina proizvedenog od tumora. Također, stavljanjem u omjer poništava se razlika u brzini metabolizma monoklonskog i nemonoklonskog imunoglobulina do koje dolaze zbog zasićenja Fc receptora kod visokih koncentracija imunoglobulina kao što je slučaj u multiplom mijelomu. Na taj način dobiva se jasnija predodžba o količini tumorskog imunoglobulina. Zbog snažne povezanosti Ig´κ/Ig´λ omjera i prognoze bolesnika, autori su predložili i novi sustav klasifikacije u rizične skupine prema kojoj bi u ISS klasifikaciji vrijednost albumina bila zamjenjena vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera. Predlažu da stadij I označava stanje bolesti u kojem su vrijednosti beta-2-mikroglobulina i Ig´κ/Ig´λ omjera u granicama normale, stadij II u kojem je ili vrijednost beta-2-mikroglobulina veća od 3,5 mg/L ili vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera $< 0,01$ ili > 200, a stadij III u kojem su i vrijednost beta-2-mikroglobulina veća od 3,5 mg/L i vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera <

0,01 ili > 200. Kada su ovako stratificirali bolesnike dokazali su statistički značajno kraće preživljenje bez progresije bolesti u bolesnika u stadiju III.

Klasifikaciju bolesti koja bi sadržavala vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera predlažu i Avet-Loiseau i suradnici.[104] Prema tim autorima takav sustav klasifikacije ima veću statističku snagu od sadašnje ISS klasifikacije (p = 0,00000013 vs. p = 0,023).

Uz vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera, prema rezultatima našeg istraživanja, kao prognostički samostalni čimbenici potvrdili su se vrijednost beta-2-mikroglobulina veća od 3,5 mg/L (p = 0,03) i vrijednost albumina manja od 35 g/L (p = 0,003). Vrijednost omjera slobodnih lakih lanaca u serumu u nije utvrđena kao prognostički čimbenik (p = 0,67), iako je u nekim radovima iz literature opisana kao prognostički značajna u svih bolesnika s multiplim mijelomom.[19,105,106] Razlog ovom odstupanju u odnosu na literaturu je vjerojatno činjenica da u ovo ispitivanje nisu uključivani bolesnici s tzv. mijelomom lakih lanaca.

7.9. Značenje supresije ne-monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca imunoglobulina

Osim što omogućuje preciznije mjerenje monoklonskog izotipa, nova metoda omogućuje mjerenje i ne-monoklonskog izotipa imunoglobulina te na taj način omogućuje uvid u dubinu imunosupresije. Pokazalo se da i vrijednost ne-monoklonskog izotipa može biti jedan od važnih parametara aktivnosti bolesti, ne samo u multiplom mijelomu već i u drugim monoklonalnim gamapatijama.

Katzmann i suradnici[107] su u svom radu analizirali uzorke bolesnika s MGUS-om. Analiza je uspoređivala vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera i ne-monoklonskog izotipa u 40 bolesnika sa stabilnom bolesti, bez progresije, i 40 bolesnika s bolesti koja je kasnije progredirala u multipli mijelom. Razultati su pokazali da u prvoj grupi (stabilna bolest) 64% bolesnika je imalo abnormalnu vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera i 22% bolesnika supresiju ne-monoklonskog para dok je u grupi s progresivnom bolesti, abnormalnu vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera imalo 83% bolesnika, a supresiju ne-monoklonskog para 53% bolesnika. S progresijom bolesti, postotak bolesnika sa supresijom ne-monoklonskog para se povećao na 95%. Osim vrijednosti ne-monoklonskog para, analizrana je i razina supresije imunoglobulina drugih razreda teškog lanca – IgA i IgM. Utvrđeno je kako je razina supresije drugih razreda

imunoglobulina značajno manja (6-7% bolesnika) od supresije ne-monoklonskog para što upućuje na sposobnost klonskih stanica da učinkovitije suprimiraju poliklonske stanice koje produciraju ne-monoklonski par od poliklonskih stanica koje produciraju imunoglobuline drugog razreda teškog lanca. Autori zaključuju da je dubina supresije ne-monoklonskog para imuoglobulina mogući prediktor progresije u bolesnika s MGUS-om. U kasnijem radu isti autori, Katzmann i suradnici[108], su i dokazali tu pretpostavku. Analizirali su uzorke seruma uzete pri postavljanju dijagnoze u 999 bolesnika s MGUS-om te su dokazali da bolesnici sa supresijom ne-monoklonskog para imunoglobulina imaju veću vjerojatnost progresije u multipli mijelom od bolesnika bez supresije, da je supresija ne-monoklonskog para imunoglobulina nezavisni prognostički čimbenik u multivarijatnoj analizi te da je taj "progresivni fenotip" prisutan godinama prije kliničkih znakova progresije.[108]

Spomenuti rad Bradwella i suradnika[79] kojim su dokazali prognostičku važnost vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera također pridaje veliko značenje supresiji ne-monoklonskog para. Autori smatraju da je upravo supresija ne-monoklonskog para zaslužna za prognostičku važnost vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera jer odražava zahvaćenost mikrookoliša koštane srži rastom specifičnih klonskih stanica i supresiju poliklonskih stanica koje produciraju ne-monoklonski par monoklonskog izotipa (slično kao što su opisali Katzmann i suradnici[107,108]).

Slične opservacije se mogu napraviti i na temelju rezultata našeg ispitivanja. U našem istraživanju učinjene su korelacije vrijednosti ne-monoklonskog para manja od medijana za odgovarajući ne-monoklonski izotip sa svim varijablama kao i u slučaju monoklonskog izotipa. Utvrđeno je da su vrijednosti ne-monoklonskog para manje od odgovarajućeg medijana povezane s pokazateljima veličine infiltracije koštane srži; postotkom plazma stanica ($p = 0,006$) te vrijednostima hemoglobina manjim od 100 g/L ($p = 0,0036$); što potvrđuje teze iznesene u citiranoj literaturi. Kada se bolesnici podjele prema postignutom odgovoru također je vidljiva jasna razlika između bolesnika u kojih je postignuta kompletna remisija ili vrlo dobra parcijalna remisija i bolesnika s novodijagnosticiranom ili porgresivnom bolesti. Bolesnici s manjom tumorskom masom, oni s postignutim odgovorom na terapiju, imaju više vrijednosti ne-monoklonskog para od bolesnika s većom tumorskom masom, novodijagnosticirani ili u progresiji (tablica 28). Ovo također indirektno ukazuje da je razina supresije ne-monoklonskog izotipa indikator opsežnosti infiltracije koštane srži klonalnim stanicama.

Tablica 28. Podjela bolesnika prema stanju bolesti i vrijednosti ne-monoklonskog izotipa imunoglobulina (CR – kompletna remisija; VGPR – vrlo dobra parcijalna remisija; PD – progresivna bolest; novodg. – novodijagnosticirana bolest)

Stanje bolesti	Broj bolesnika - ukupno	Broj bolesnika s vrijednosti ne-monoklonskog para > od medijana
CR	23	20
VGPR	33	21
PD/relaps + novodg.	20	8

Da vrijednost ne-monoklonskog izotipa imunoglobulina doista također odražava veličinu tumorske mase, možda najbolje potvrđuje analiza utjecaja na ishod bolesnika. Učinjena je Kaplan-Meierova analiza utjecaja na dužinu vremena do progresije i ukupnog preživljenja, u kojoj su bolesnici podjeljeni prema vrijednosti ne-monoklonskog izotipa: grupu koja je imala vrijednosti ne-monoklonskog izotipa niže od referentnih vrijednosti (supresiju ne-monoklonskog izotipa) i grupu čije su vrijednosti ne-monoklonskog izotipa bile unutar referentnog raspona ili veće od gornje granice normale. Bolesnici sa supresijom ne-monoklonskog izotipa imali su značajno kraće vrijeme do progresije ($p = 0,029$) od druge grupe bolesnika, dok razilka u ukupnom preživljenju nije dosegla značajnost na razini značajnosti $p \leq 0,05$, ali se može reći da postoji tendencija kraćeg ukupnog preživljenja u bolesnika s vrijednostima ne-monoklonskog izotipa imunoglobulina manjim od odgovarajućih referentnih vrijednosti (vidi rezultate, slika 20).

8 ZAKLJUČCI

1. Metoda kvantifikacije monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i određivanje Ig´κ/Ig´λ omjera olakšavaju i poboljšavaju detekciju monoklonskog proteina.

2. Metoda kvantifikacije monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i određivanje Ig´κ/Ig´λ omjera omogućuju točnije mjerenje samog monoklonskog imunoglobulina, ali i poliklonskih imunoglobulina od standradne metode kvantifikacije ukupnih imunoglobulina.

3. Metoda kvantifikacije monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i određivanje Ig´κ/Ig´λ omjera mogu imati veću preciznost i osjetljivost od elektroforeze serumskih proteina.

4. Vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i Ig´κ/Ig´λ omjera snažno koreliraju s pokazateljima veličine tumorske mase zbog čega mogu služiti za procjenu veličine rezidualne bolesti.

5. Vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca, a posebice vrijednost Ig´κ/Ig´λ omjera bolje koreliraju s kliničkim statusom od standardnih metoda detekcije monoklonskog proteina.

6. Vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i Ig´κ/Ig´λ omjer imaju utjecaja i na ishod bolesnika, ukupno preživljenje i vrijeme do progresije bolesti.

7. Vrijednosti monoklonskih izotipova teškog/lakog lanca i Ig´κ/Ig´λ omjera snažno koreliraju s poznatim prognostičkim čimbenicima: vrijednostima serumskog albumina, beta-2-mikroglobulina i omjera slobodnih lakih lanaca u serumu.

8. Vrijednosti Ig´κ/Ig´λ omjera nezavisni su prognostički čimbenik u bolesnika s multiplim mijelomom.

9. Vrijednosti ne-monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca dobro odražavaju stupanj infiltracije koštane srži klonskim stanicama te imaju utjecaj na ishod bolesnika.

9 SAŽETAK

Ciljevi: ispitati vrijednost metode kvantifikacije monoklonskih izotipova teških/lakih lanaca imunoglobulina u serumu (Ig´κ ili Ig´λ) i njihova omjera (Ig´κ/Ig´λ) u procjeni stanja bolesti u bolesnika s multiplim mijelomom, utvrditi međusobni odnos standardnih metoda detekcije monoklonskog imunoglobulina i novog testa te procijeniti njegovo prognostičko značenje.

Metode: u istraživanje je uključeno 99 bolesnika s multiplim mijelomom u različitim stadijima bolesti. Reevaluacija je uključivala određivanje monoklonskog proteina standardnim testovima (elektroforeza serumskih proteina, imunofiksacija proteina seruma, kvantifikacija ukupnih imunoglobulina, kvantitativno određivanje slobodnih lakih lanaca u serumu) i novim testom te analizu koštane srži.

Rezultati: Vrijednosti monoklonskog izotipa IgGκ i IgGλ veće od medijana korelirale su postotkom plazma stanica u koštanoj srži, vrijednosti beta-2-mikroglobulina i abnormalnim vrijednostima omjera slobodnih lakih lanaca u serumu (κ/λ omjer), dok su vrijednosti monoklonskog izotipa IgAκ i IgAλ korelirale s postotkom infiltracije koštane srži i abnormalnim vrijednostima κ/λ omjera. Abnormalan omjer IgGκ/IgGλ korelirao je s postotkom plazma stanica i abnormalnim κ/λ omjerom; dok je abnormalan omjer IgAκ/IgAλ korelirao samo s abnormalnim κ/λ omjerom. Iste korelacije potvrđene su i za cijelu grupu bolesnika. Kaplan-Meierovom analizom utvrđeno je da bolesnici s vrijednosti monoklonskog izotipa teškog/lakog lanca većom od medijana imaju kraće ukupno preživljenje ($p = 0,0033$), kao i bolesnici s abnormalnim vrijednostima omjera ($p = 0,021$). Kraće vrijeme do progresije bolesti je utvrđeno za bolesnike s abnormalnim omjerom Ig´κ/Ig´λ ($p = 0,006$). Multivarijatnom analizom abnormalan omjer Ig´κ/Ig´λ je potvrđen kao nezavisni prognostički čimbenik ($p = 0,05$).

Zaključak: kvantifikacija monoklonskih izotipova teških/lakih lanaca imunoglobulina i njihova omjera omogućuje dobru procjenu veličine tumorske mase i stanja bolesti. Ig´κ/Ig´λ omjer ima prognostičko značenje jer je povezan s dužinom života bolesnika.

10 Detection of residual disease in multiple myeloma patients

Josip Batinić, 2015.

Objectives: to determine the value of the heavy/light chain (HLC) immunoassay and heavy/light chain ratio (Ig´κ/Ig´λ; HLCR) in the evaluation of multiple myeloma patients.

Methods: sera from the 99 unselected multiple myeloma patients were analysed. Disease assessement was performed using the HLC assay and by standard procedures (serum protein electrophoresis, serum immunofixation, serum free light chain assay - sFLC, quantitative immunoglobulins; basic biochemistry and hematology tests and bone marrow analysis).

Results: Abnormal IgGκ/IgGλ ratio correlated with the percentage of bone marrow plasma cells and abnormal sFLC ratio. Monoclonal IgGκ or IgGλ isotypes values above median correlated with the same plus beta-2-microglobulin values. Abnormal IgAκ/IgAλ ratio correlated only with abnormal sFLC ratio, while monoclonal IgAκ or IgAλ isotype values above median were associated with percentage of bone marrow plasma cells and abnormal sFLC ratio. A Kaplan-Meier analysis showed that patients with monoclonal HLC isotype values above median and with abnormal HLCR values had shorter overall survival ($p = 0.0033$; $p = 0.021$, respectively). Shorter time to progression was associated only with abnormal HLCR values ($p = 0.006$). In multivariate analysis abnormal HLCR was an independent prognostic risk factor ($p = 0.05$).

Conclusion: HLC immunoassay results correspond well to clinical status and tumor burden. HLCR value has prognostic value for multiple myeloma patients.

11 LITERATURA:

1. www.uptodate.com
2. Incidencija raka u Hrvatskoj 2006, Bilten br. 31. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb; 2008.
3. Sirohi B, Powles R. Multiple myeloma. Lancet 2004; 363: 875-87
4. Durie BG, Kyle RA, Belch A et al. Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. Hematol J. 2003;4(6):379-98
5. Perrotta C, Staines A, Codd M et al. Multiple Myeloma and lifetime occupation: results from the EPILYMPH study. Journal of Occupational Medicine and Toxicology 2012;7:25
6. Eriksson M, Karlsson M. Occupational and other environmental factors and multiple myeloma: a population based case-control study. British Journal of Industrial Medicine 1992;49:95-103
7. Fonesca R, Blood E, Rue M et al. Clinical and biological implications of reccurent genomic aberrations in meyloma; 2003;101:4569-4575
8. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I et al. Multiple myeloma; Lancet 2009;374:324-39
9. Bezieau S, Devilder MC, Avet-Loiseau H et al. High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. Hum.Mutat. 2001;18:212–24
10. Anderson KC, Carrasco RD. Pathogenesis of Myeloma. Annu. Rev, Pathol. Mech. Dis. 2011;6:249-74
11. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. N. Engl. J. Med. 2004;351(18): 1860-73
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;36:842-854
13. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG et al. International staging system for multiple myeloma. J Clin Oncol. 2005;23(15):3412-20
14. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. Leukemia 2009;23: 3-9

15. Liebisch P, Döhner H. Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma. Eur J Cancer. 2006;42(11):1520-9
16. Jacobson JL, Hussein MA, Barlogie B et al. A new staging system for multiple myeloma patients based on the Southwest Oncology Group (SWOG) expirience Br J Haematol. 2003;122(3): 441-50
17. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G et al. International Myeloma Working GroupInternational Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. Leukemia. 2009;23(2):215-24
18. Anderson KC, Alsina M, Bensinger W et al. National Comprehensive Cancer Network. Multiple myeloma. J Natl Compr Canc Netw. 2011;9(10):1146-83.
19. Snozek CL, Katzmann JA, Kyle RA et al. Prognostic value of the serum free light chain ratio in newly diagnosed myeloma: proposed incorporation into the international staging system. Leukemia. 2008;22(10):1933-7
20. Bataille R, Boccadoro M, Klein B et al. C-reactive protein and beta-2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. Blood. 1992;80(3):733-7
21. Dimopoulos M, Terpos E, Comenzo RL et al. (on behalf of the IMWG). International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple myeloma. Leukemia 2009;1-12
22. Walker RC, Brown TL, Jones-Jackson et al. Imaging of Multiple Myeloma and Related Plasma Cell Dyscrasias. J Nucl Med. 2012;53(7): 1091-101
23. Mikhael JR, Dingli D, Roy V et al. Mayo Clinic. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. Mayo Clin Proc. 2013;88(4):360-76.
24. Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, Dewald et al. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. Blood. 2003;102(7):2562-7
25. Fonseca R, Blood E, Rue M et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. Blood. 2003;101(11):4569-75
26. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA et al. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. Blood. 2003;101(4):1520-9

27. Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP et al. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. Blood. 2012;119(9):2100-5.
28. Avet-Loiseau H, Leleu X, Roussel M et al. Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p). J Clin Oncol 2010;28(30):4630-4
29. Alexanian R, Barlogie B, Tucker S. VAD-based regimens as primary treatment for multiple myeloma. Am J Hematol 1990;33:86-9
30. Harousseau JL, Mathiot C, Attal M et al. Bortezomib/dexamethasone versus VAD as induction prior to autologous stem cell transplantation (ASCT) in previously untreated multiple myeloma (MM): Updated data from IFM 2005/01 trial. ASCO Meeting Abstracts 2008;26:Abstract 8505
31. Harousseau JL, Avet-Loiseau H, Attal M et al. High complete and very good partial response rates with bortezomib-dexamethasone as induction prior to ASCT in newly diagnosed patients with high-risk myeloma: Results of the IFM2005/01 phase 3 trial. ASH Annual Meeting Abstracts 2009;114: Abstract 353
32. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H et al. Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristien plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005-01 phase III trial. J Clin Oncol 2010;28:4621-4629
33. Sonneveld P, Van der Holt B, Schmidt-Wolf I. First analysis of HOVON-65/GMMG-HD4 randomized phase III trial comparing bortezomib, adriamycine, dexamethasone (PAD) vs VAD as induction treatment prior high dose melphalan (HDM) in patients with multiple myeloma (MM). Haematologica 2009;94: Abstract 191
34. Kaufman JL, Nooka A, Vrana M et al. Bortezomib, thalidomide and dexamethasone as induction therapy for patients with symptomatic multiple myeloma: a retrospective study. Cancer 2010;116:3143-3151
35. Rajkumar SV, Blood E, Vesole D et al. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamthasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. J Clin Oncol 2006;24:431-436
36. Anderson KC, Alsina M, Bensinger W et al. National Comprehensive Cancer Network. Multiple myeloma version 1.2014. on-line.

37. Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomid plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open label randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2010;11(1):29-37
38. Child JA, Morgan GJ, Davies FE ez al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. N Eng J Med. 2003;348(19):1875-1883
39. Gertz MA, Ansell SM, Dingli D et al. Autologous stem cell transplant in 716 patients with multiple myeloma: low treatment related mortality, feasibility of out-patient transplant, and effect of a multidisciplinary quality initiative. Mayo Clin Proc. 2008;83(10):1131-1138
40. Fermand JP, Katsahian S, Divine M et al. High-dose therapy and autologous blood stem-cell transplantation compared with conventional treatment in meyloma patients aged 55 to 65 years: long term results of a randomized control trial from the Group Myeloma-Autogreffe. J Clin Oncol. 2005;23(36):9227-9233
41. Blade J, Rosinol L, Sureda A et al. High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA. Blood. 2005;106(12):3755-3759
42. Palumbo A, Bringhen S, Liberati AM et al. Oral melphalan, prednisone and thalidomide in elderly patients with multiple myeloma: updated results of a randomized controlled trial. Blood 2008;112:3107-3114
43. Hulin C, Facon T, Rodon P et al. Efficacy of melphalan and prednisone plus thalidomide in patients older than 75 years with newly diagnosed multiple myeloma: IFM 01/01 trial. J Clin Oncol 2009;27:3664-3670
44. Kapoor P, Rajkumar SV, Dispanzieri A et al. Melphalan and prednisone versus melphalan, prednisone and thalidomide for elderly and/or transplant inelegible patients with multiple myeloma: a meta-analysis. Leukemia 2011;25:689-696
45. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. N Engl J Med 2008;359:906-917
46. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK et al. Persistent overall survival benefit and no increased risk of second malignancies with bortezomib-melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone in patients with previously untreated multiple myeloma. J Clin Oncol 2013;31:448-455.

47. Vij R, Siegel DS, Jagannath S et al. An open-label, single-arm, phase 2 study of single-agent carfilzomib in patietns with relapsed and/or refractory multiple myeloma who have been previously treated with bortezomib. Br J Haematol 2012
48. Dimopoulos MA, Lacy MQ, Moreau P et al. Pomalidomide in combination with low-dose dexamethasone: demonstrates a significant progression free survival and overall survival advantage in relapsed/refractory MM: a pahse 3, multicenter, randomized, open-label study (abstract). Blood 2012;120:LBA-6
49. Ludwig H, Durie BG, McCarthy P et al. International Myeloma Working Group. IMWG consensus on maintenance therapy in multiple myeloma. Blood. 2012;119(13):3003-15
50. Attal M, Harousseau JL, Leyvraz S et al. Maitenance therapy with thalidomide improves survival in patients with multiplem myeloma. Blood. 2006;108(10):3289-3294
51. Spencer A, Prince HM, Roberts AW et al. Consolidaton therapy with low-dose thalidomide and prednisolone prolongs the survival the survival of multiple myeloma patients undergoing a single autologous stem cell transplantation procedure. J Clin Oncol. 2009;27(11):1788-1793
52. Barlogie B, Tricot G, Anaissie E et al. Thalidomide and hematopoietic-cell transplantation for multiple myeloma N Eng J Med. 2006;354(10):1021-1030
53. Stewart KA, Trudel S, Bahlis NJ et al. A randomized phase III trial of thalidomide and prednisone as maintenance therapy following autologous stem cell transplantation (ASCT) in patients with multiple myeloma (MM): the NCIC CTG MY 10 trial (abstract) Blood. 2010;116(21): Abstract 39
54. Morgan GJ, Gregory WM, Davies FE et al. The role of maintenance thalidomide therapy in multiple myeloma: MRC myeloma IX results and meta-analysis. Blood. 2012;119(1):7-15
55. McCarthy PL, Owzar K, Anderson KC et al. Phase III Intergroup study of lenalidomide versus placebo maintenance therapy following single autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) for multiple myeloma (MM): CALGB ECOG BMT-CTN 100104 (abstract). Haematologica. 2011;96;(s1):IMW2011. Abstract s23

56. Attal M, Cances Lauwers V, Marit G et al. Maintenance treatment with lenalidomide after transplantation for myeloma: final analysisof the IFM2005-02 (abstract). Blood 2010;116(21): Abstract 310
57. Mateos MV, Oriol A, Teruel AI et al. Maintenance therapy with bortezomib plus thalidomide (VT) or bortezomib plus prednisone (VP) in elderly myeloma patients included in the GEM2005MAS65 Spanish randomized trial (abstract). Blood. 2011;118(21): Abstract 477
58. Palumbo A, Bringhen S, Rossi D et al. Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: a randomized controlled trial. J Clin Oncol. 2010;28(34):5101-5109
59. Sonneveld P, Schmidt-Wolf I, van der Holt B et al. HOVON-65/GMMG-HD4 randomized phase III trial comparing bortezomib, doxorubicin, dexamethason (PAD) vs VAD followed by high-dose melphalan (HDM) and maintenance with bortezomib or thalidomide in patients with newly diagnosed multiple myeloma (MM) (abstract). Blood. 2010;116(21): Abstract 40
60. Hussein MA, Vrionis FD, Allison R et al. (on behalf of the International Myeloma Working Group). The role of vertebral augmentation in multiple myeloma: International Myeloma Working Group Consensus Statement. Leukemia 2008;22:1479-1484
61. Chanan-Khan A, Sonneveld P, Schuster M et al. Analysis of herpes zoster events among bortezomib-treated patietns in the pahse III APEX study. J Clin Oncol 2008;26:4784-4790
62. Durie BGM et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. Leukemia 2006;20:1467-73
63. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. Blood 2009:114(15); 3139-3146
64. Paiva B, Vidriales MB, Cervero J et al. Multiparameter flow cytometry is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. Blood 2008;112(10):4017-4023
65. Bradwell AR. Serum Free Light Chain Measurements Move to Center Stage. Clin Chem 2005; 51(5): 805-807

66. Bradwell AR Serum Free Light Chain Analysis (plus Hevylite) 6th Edition. 2010. ISBN: 9780704427969
67. Nowrousian MR, Brandhorst D, Sammet C et al. Serum Free Light Chain Analysis and Urine Immunofixation Electrophoresis in Patients with Multiple Myeloma. Clin Cancer Res 2005;11(24):8706-8714
68. Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT et al. Serum free light chain for monitoring multiple myeloma. Br J Haematol 2004;126:348-354
69. Pratt G. The evolving use of serum free light chain assays in haematology. Br J Haematol. 2008;141(4):413-22).
70. Singhal S, Vickrey E, Krishnamurthy J et al. The relationship between the serum free light chain assay and serum immunofixation electrophoresis, and the definition of concordant and discordant free light chain ratio. Blood. 2009;114(1):38-9
71. Fernandez de Larrea C, Cibeira MT, Elena M et al. Abnormal serum free light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission has strong association with the presence of oligoclonal bands: implications for stringent complete remission definition. Blood. Oct 1, 2009 (prepublished online)
72. Munshi NC. Investigative Tools for Diagnosis and Managment. Hematology 2008;298-305
73. Bradwell AR, Harding SJ, Fourrier NJ et al. Assessment of Monoclonal Gammopathies by Nephelometric Measurment of Individual Immunoglobulin κ/λ Ratios. Clin Chem 2009;55(9):1646-1655
74. Harding SJ, Margetts C, Fourrier N et al. Quantification of IgAκ/IgAλ in Monoclonal Gammopathies. XII International Myeloma Workshop, February 2009
75. Harding SJ, Mead GP, Hobbs JAR et al. Free Light and Heavy/Light Chain Monitoring in IgGλ Sera. XII International Myeloma Workshop, February 2009
76. Margetts CD, Harding SJ, Drayson MT et al. Serum IgGκ/IgGλ Measurements in Monoclonal Gammopathies. XII International Myeloma Workshop, February 2009
77. Kaur A, Snelus T, Mitchell F et al. Turbidimetric immunoassays for IgA κ and IgA λ quantification for assessment of patients with multiple myeloma. Clin Chem 2010;56:B 170a
78. Alvi AJ, Fourrier NJ, Shemar M et al. Turbidimetric immunoassays for IgGκ and IgGλ quantification for assessment of patients with IgG multiple myeloma. Clin Chem 2011;57:A 26a

79. Bradwell A, Harding S, Fourrier N et al. Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig´κ/Ig´λ ratios in multiple myeloma patients. Leukemia 2013;27(1):202-7
80. Chee CE, Kumar S, Larson DR et al. The importance of bone marrow examination in determining complete response to therapy in patients with multiple myeloma. Blood. 2009;114(13):2617-8
81. Paiva B, Vidriales MB, Cerveró J et al. GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) Cooperative Study Groups. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. Blood. 2008;112(10):4017-23
82. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M et al. (on behalf of the European Myeloma Network). Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. Haematologica 2008 Mar;93(3):431-438
83. Paiva B, Vidriales MB, Mateo G et al. The persistence of immunophenotypically normal residual bone marrow plasma cells at diagnosis identifies a good prognostic subgroup of symptomatic multiple myeloma patients. Blood. 2009 Sep 15
84. Bataille R, Jego G, Robillard N et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. Hematologica 2006;91:1234-1240
85. Sertić J i suradnici. Katalog dijagnostičkih laboratorijskih pretraga. Medicinska naklada. 2009
86. Bradwell AR. Serum Free Light Chain Measurements Move to Center Stage. Clin Chem 2005; 51(5): 805-807
87. Bossuyt X, Bogaerts A, Schiettekatte et al. Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system. Clin Chem. 1998;44(5):944-9
88. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. Blood 2009;114(15):3139-3146
89. Kapoor P, Kumar SK, Dispanzieri A et al. Importance of Achieving Stringent Complete Response After Autologous Stem-Cell Transplantation in Multiple Myeloma. J Clin Onco. Dec 2013;31(36):4529-4535

90. Liu H, Yuan C, Heinerich J et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: a retrospective study. Leuk Lymphoma. 2008;49:306-314
91. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. Blood. 2002;99:3095-3100
92. Ludwig H, Mirbahai L, Zojer N et al. Monitoring multiple myeloma patients with heavy/light chain antibodies for IgA and IgG. 6th International Symposium of Clinical Applications of Serum Free Light Cahin Analysis (plus *Hevylite*), Bath, UK, 23 – 24 September 2010. Hematology Reports ISSN 2038 – eISSN 2038-8330
93. Bengoufa D, Arnulf B, Bugnot L et al. Usefulness of a Hevylite immunoassay in serum for the diagnosis and the follow up of IgA monoclonal gammopathy. 6th International Symposium of Clinical Applications of Serum Free Light Cahin Analysis (plus *Hevylite*), Bath, UK, 23 – 24 September 2010. Hematology Reports ISSN 2038 – eISSN 2038-8330
94. Lakomy D, Dejoie T, Lafon I et al. IgA heavy/light chain assay for diagnosis and monitoring of myeloma patients. 6th International Symposium of Clinical Applications of Serum Free Light Cahin Analysis (plus Hevylite), Bath, UK, 23 – 24 September 2010. Hematology Reports ISSN 2038 – eISSN 2038-8330
95. Ludwig H, Milosavljević D, Zojer N et al. Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients Leukemia 2013;27(1):213-9
96. Bradwell AR Hevylite: Concepts. 6th International Symposium of Clinical Applications of Serum Free Light Cahin Analysis (plus *Hevylite*), Bath, UK, 23 – 24 September 2010. Hematology Reports ISSN 2038 – eISSN 2038-8330
97. Koulieres E, Mirbahai L, Maltezas D et al. Heavy/light chain analysis as an aid in monitoring IgA and IgG multiple myeloma patients. 6th International Symposium of Clinical Applications of Serum Free Light Cahin Analysis (plus *Hevylite*), Bath, UK, 23 – 24 September 2010. Hematology Reports ISSN 2038 – eISSN 2038-8330
98. Paiva B, Martinez-Lopez J, Vidriales MB et al. Comparison of immunofixation, serum free light chain and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma. J Clin Oncol 2011;29:1627-1633

99. Smock KJ, Perkins SL, Bahler DW. Quantitation of Plasma Cells in Bone Marrow Aspirates by Flow Cytometric Analysis Compared With Morphologic Assesment. Arch Pathol Lab Med 2007;131:951-955
100. Avet-Loiseau H, Mirbahai L, Harousseau JL et al. Serum immunoglobulin heavy/light chain ratios are indipendent risk factors for predicting progression free survival in multiple myeloma. Haematologica 2010;95(395):095
101. Koulieris E, Panayiotidis P, Harding SJ et al. Ratio of involved/uninvolved immunoglobulin quantification by HevyliteTM assay: clinical and prognostic impact in multiple myeloma. Experimental Hematology and Oncology 2012;1:9
102. Harding S, Koulieres E, Kyrtsonis MC et al. Hevylite Ig'κ/Ig'λ ratios in multiple myeloma correlate with clinical status. 6th International Symposium of Clinical Applications of Serum Free Light Cahin Analysis (plus *Hevylite*), Bath, UK, 23 – 24 September 2010. Hematology Reports ISSN 2038 – eISSN 2038-8330
103. Decaux O, Beaumont MP, Besnard S et al. Serial sample analysis of 5 multiple myeloma patients using heavy/light chain specific immunoglobulin ratios. 6th International Symposium of Clinical Applications of Serum Free Light Cahin Analysis (plus *Hevylite*), Bath, UK, 23 – 24 September 2010. Hematology Reports ISSN 2038 – eISSN 2038-8330
104. Avet-Loiseau H, Mirbahai L, Mead G et al. A new staging system for multiple myeloma. 6th International Symposium of Clinical Applications of Serum Free Light Cahin Analysis (plus *Hevylite*), Bath, UK, 23 – 24 September 2010. Hematology Reports ISSN 2038 – eISSN 2038-8330
105. Kyrtsonis MC, Vassilakopoulos TP, Kafasi N et al. Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma. Br J Haematol 2007;137:240-243
106. van Rhee F, Bolejack V, Hollmig K et al. High serum-free light chain levels and their rapid reduction in response to therapy define an aggressive multiple myeloma subtype with poor prognosis. Blood 2007;110:827-832
107. Katzmann JA, Clark R, Dispanzieri A et al. Prognostic role of Hevylite in MGUS. 6th International Symposium of Clinical Applications of Serum Free Light Cahin Analysis (plus *Hevylite*), Bath, UK, 23 – 24 September 2010. Hematology Reports ISSN 2038 – eISSN 2038-8330

108. Katzmann JA, Clark R, Kyle RA et al. Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. Leukemia. 2013;27(1):208-12.

12 ŽIVOTOPIS

Josip Batinić, rođen 1982. god. u Zagrebu. Nakon mature u XVI. gimnaziji u Zagrebu, 2000. godine upisuje dodiplomski studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na kojem je diplomirao 2006. godine. Nakon obavljenog obaveznog pripravničkog staža, od 2008. godine zaposlen je kao znanstveni novak na Medicinskom fakultetu u Zagrebu na projektu "Limfoproliferativne bolesti i transplantacija krvotvornih matičnih stanica" voditelja prof. dr. sc. D. Nemeta u Zavodu za hematologiju KBC-a Zagreb. Godine 2012. uspješno je završio doktorski poslijediplomski studij iz biomedicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U lipnju 2010. započeo je specijalizaciju iz interne medicine te uspješno položio specijalistički ispit u prosincu 2014. godine. Izlaganjima sudjelovao na nekoliko domaćih i međunarodnih hematološki kongresa.