

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Nikolina Penić**

**ZNAČAJ ODREĐIVANJA  
MONOKLONSKIH SLOBODNIH LAKIH  
LANACA U SERUMU BOLESNIKA S  
MULTIPLIM MIJELOMOM**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2017.**

Rad je ostvaren na: Poliklinici Zavoda za hematologiju, KBC Zagreb

Mentor rada: prof. dr. sc. Silva Zupančić – Šalek, dr. med.

Neposredni voditelj: prof. dr. sc. Danica Matišić, spec. med. biokemije

Rad ima 33 listova, 6 tablica i 6 slika.

## ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Silvi Zupančić – Šalek, dr. med. na brojnim stručnim savjetima, strpljenju i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Srdačno zahvaljujem prof. dr. sc. Danici Matišić, spec. med. biokemije na susretljivosti i predanoj pomoći tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Hvala svim kolegama i prijateljima bez kojih studiranje ne bi završilo lako i zabavno.

Najveće hvala mojoj obitelji na strpljenju, razumijevanju i podršci koje mi nikada nije manjkalo, posebno ne tijekom studiranja.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Multipli mijelom.....	1
1.1.1. Epidemiologija.....	1
1.1.2. Patofiziologija .....	1
1.1.3. Dijagnostički postupak i dijagnostički kriteriji multiplog mijeloma .....	2
1.1.4. Liječenje.....	3
1.2. Značenje određivanja monoklonskih proteina.....	4
1.2.1. Slobodni laki lanci .....	5
2. HIPOTEZA .....	6
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	7
4. MATERIJALI I METODE .....	8
4.1. Ispitanici .....	8
4.2. Metode .....	8
4.3. Statističke metode.....	11
5. REZULTATI.....	12
5.1. Karakteristike promatrane populacije.....	12
5.2. Testiranje utjecaja terapije na koncentraciju lakih lanaca .....	16
6. RASPRAVA.....	20
8. ZAKLJUČAK .....	22
9. SAŽETAK.....	23
9. SUMMARY .....	24
10. LITERATURA.....	25
11. ŽIVOTOPIS .....	28

## KRATICE

**Ag** – antigen

**At** – antitijelo

**DNK** – deoksiribonukleinska kiselina

**FISH** – fluorescentna *in-situ* hibridizacija

**FLC** (engl. *free light chains*) – slobodni laki lanci

**g/L** – gram po litri

**hgb** – hemoglobin

**Ig** – imunoglobulin (IgA, IgD, IgE, IgG i IgM)

**IMWG** (engl. *International Myeloma Working Group*) – međunarodna radna skupina za mijelom

**KKS** – kompletna krvna slika

**M** – monoklonski

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

**MM** – multipli mijelom

**MP** – kemoterapijski protokol (malfalan/prednizon)

**PC** – plazma stanica

**SE** – sedimentacija

**SZO** – Svjetska zdravstvena organizacija

**TKS** – transplantacija koštane srži

**VAD** – kemoterapijski protokol (vankristin/andromicin/deksametazon)

**κ** – kapa

**λ** – lambda

## **1. UVOD**

### **1.1. Multipli mijelom**

Multipli mijelom (MM) zloćudna je novotvorina hematopoetskog tkiva svrstana u zloćudne novotvorine zrelih B limfocita prema podjeli Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) (1). Bolest nastaje klonalnom neoplastičnom proliferacijom plazma stanica (PC) (2), što dovodi do opsežnog stvaranja nefunkcionalnih gamaglobulina ili njihovih dijelova (3). Za MM karakteristično je javljanje boli u kostima, hiperkalcijemija, insuficijencija bubrega, anemija i učestale infekcije. Dijagnoza se postavlja dokazivanjem M-proteina (4).

#### **1.1.1. Epidemiologija**

Multipli mijelom drugi je najčešći karcinom krvi, a čini oko 1 % svih karcinoma cijelog svijeta i 2 % smrti povezanih s karcinomom (5). Incidencija bolesnih u Hrvatskoj iznosi 4,2 do 4,8 oboljelih na 100 000 stanovnika godišnje (6). Bolest je starijih ljudi, a prosječna je dob kod dijagnoze oko 65 godina (7). Samo je 3 % pacijenata MM mlađe od 40 godina (5). Odnos oboljelih muškaraca prema ženama je 1,6:1 (4). Bolest je kod crnaca učestalija 2 x više nego kod bijelaca (5)

#### **1.1.2. Patofiziologija**

Etiologija bolesti nepoznata je, ali se spominju kromosomski i genetski čimbenici, zračenje te neki kemijski čimbenici (2).

Kod multiplog mijeloma maligna je ili kancerogena mijelomska stanica. Ona nastaje oštećenjem DNK jedne jedine plazma stanice i nekontrolirano stvara veliki broj mijelomskih stanica (8,9). Mijelomske stanice identične su po fizikalnim i kemijskim svojstvima, proizvode velike količine potpuno istih netipičnih i neučinkovitih protutijela ili samo dijelova protutijela – paraproteine. Paraproteine stvara jedna klon plazma stanica, pa ih zovemo monoklonskim (M) proteinima (8). Specifični M protein kod jednog je bolesnika uvijek isti, no razlikuje se od bolesnika do bolesnika (7).

Multipli mijelom klinički se može različito očitovati. Bolesnici su skloniji osteolitičkim lezijama, hiperkalcijemiji, anemiji, zatajenju bubrega, amiloidozi i čestim infekcijama. 20 % bolesnika kod postavljanja dijagnoze nema simptoma (4, 10).

Koštane lezije javljaju se kod 70 – 80 % bolesnika, nastaju zbog lučenja citokina koji potiču aktivnost osteoklasta, a istovremeno inhibiraju diferencijaciju osteoblasta (2). Tipične su osteolitičke promjene lubanjskih kostiju, a česte su promjene u zdjelici, kralježnici i rebrima (4,10). Povećanje razgradnje kostiju utječe na povećanje razine kalcija u krvi (11).

Do oštećenja bubrežne funkcije dolazi zbog proteinurije lakih lanaca, tzv. Bence-Jonesov protein (10). Bubrežna insuficijencija („mijelomski bubreg“) tubulointersticijska je promjena nastala zbog obilnog stvaranja cilindara u tubulima (12).

Bolesnici su skloni čestim infekcijama zbog oslabljenog stvaranja protutijela, superesije humoralne i stanične imunosti (10). Česti su uzrok smrti *Staphylococcus aureus* i gram-negativne bakterije (2).

Multipli mijelom ima tri osnovne kategorije, a to su monoklonska gamapatija neutvrđenog značenja (MGUS), asimptomatski (indolentni, šuljajući) MM i simptomatski, takozvani aktivni MM (7).

### **1.1.3. Dijagnostički postupak i dijagnostički kriteriji multiplog mijeloma**

Za dijagnostiku i praćenje bolesnika s MM-om uz uobičajene hematološke i biokemijske pretrage, koriste se radiološke i histopatološke metode (13). U rutinske hematološke pokazatelje ubrajaju se KKS i SE (4). Od biokemijskih pokazatelja određuju se: ukupni proteini u serumu, elektroforeza serumskih imunoglobulina,  $\beta_2$ -mikroglobulin, kreatinin i kalcij u serumu te Bence-Jonesov protein u serumu i mokraći (14). Elektroforeza se radi pomoću visokorezolutnih tehnika razdvajanja, a to su: kapilarna elektroforeza i zonska elektroforeza na gelu, gdje se proteini seruma razdvajaju na uobičajenih 5 frakcija (albumini,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - globulini) djelovanjem električnog polja (15). U 80 – 90 % slučajeva elektroforeza otkriva M-protein (4).

Na radiološkim nalazima najčešće se vide multiple litičke lezije u kostima koje sadržavaju hematopoetičku koštanu srž (13).

FISH tehnika ubraja se u citogenetičke pretrage, a njom se određuje delecija kromosoma 13, čija prisutnost znači lošu prognozu (10).

Dijagnostički kriteriji za simptomatski multipli mijelom prema *International Myeloma Working Group* (IMWG) smjernicama:

1. monoklonske plazma stanice u koštanoj srži > 10 % i/ili prisutnost biopsijom potvrđenog plazmocitoma
2. monoklonski protein u serumu ili urinu
3. disfunkcija organa vezana uz mijelom (1 ili više) (C) hiperkalcijemija (R) renalna insuficijencija (kreatinin >173 mmol/L) (A) anemija (hgb < 100 g/L ili 20 g/L < normale) (B) koštane lezije: litičke lezije kosti ili osteoporoza s kompresivnim frakturama.

Za dijagnozu simptomatske bolesti potrebna je prisutnost svih triju kriterija. Ako su zadovoljena samo prva dva kriterija i nema oštećenja organa govorimo o asimptomatskom MM-u (2).

#### **1.1.4. Liječenje**

Cilj je liječenja postići redukciju tumora, kontrolirati simptome te pokušati pretvoriti malignu u kroničnu bolest i tako bolesniku produljiti život i popraviti kvalitetu života. Liječenje se provodi konvencionalnom kemoterapijom ili transplantacijom matičnih stanica, što ovisi o dobi i općem stanju bolesnika (2).

Transplantacijom autolognih matičnih krvotvornih stanica (autotransplantacija) liječe se bolesnici mlađi od 65 godina starosti, dobrog općeg stanja i sa zadovoljavajućom funkcijom svih organa (7). Prije primjene velikih doza kemoterapija i transplantacije krvotvornih matičnih stanica, potrebno je primijeniti indukcijsku ili uvodnu terapiju, odnosno početnu kemoterapiju, čiji je cilj brzo smanjenje broja mijelomskih stanica lijekovima koji ne oštećuju krvotvorne matične stanice, što omogućuje njihovo kasnije skupljanje (8). Uvodna terapija za tu skupinu bolesnika najčešće je VAD protokol (vinkristin, adramicin, deksametazon) (5, 8).



Prednost VAD protokola značajan je postotak početnog odgovora (60 – 70 %), a nedostaci su primjena u kontinuiranoj infuziji tijekom četiri dana, neurotoksičnost i kardiotoksičnost (2).

Dvostruka transplantacija ili takozvana tandem transplantacija pokazuje bolje rezultate od jednostruke. Ujedno, ta transplantacija rezultira duljim trajanjem života nego konvencionalna kemoterapija (2, 10).

Konvencionalna kemoterapija sastoji se od citostatika (melfalan, vinkristin, ciklofosamid i doksorubicin). Primjer kemoterapijskog protokola jest MP protokol, koji se primjenjuje u 6-tjednim ciklusima (4).

Danas se u liječenju multiplog mijeloma obavezno kombiniraju novi lijekovi i to inhibitori proteasoma (bortezomib) i imunomodulatorni lijekovi (talidomid, lenalidomid) s kemoterapijom.

U liječenju multiplog mijeloma iznimnu važnost ima potporna terapija zbog prirode bolesti uz koju se javlja niz komplikacija i oštećenja organa. Primjena bisfosfonata standard je u liječenju koštanih bolesti. Terapija zračenjem provodi se u slučaju kompresije kralježnične moždine, teške refraktorne boli te zbog liječenja ili prevencije patoloških fraktura. Kod bolesnika s kompresivnim frakturama kralješaka potrebna je kirurška intervencija. Kod bolesnika s multiplim mijelomom česte su infekcije inkapsuliranim bakterijama. Zbog toga se preporučuje cijepljenje pneumokoknim i *hemofilus influenzae* cjepivom, također i cijepljenje protiv gripe, iako se može očekivati slabiji imunski odgovor na cjepivo (2, 8, 12).

## **1.2. Značenje određivanja monoklonskih proteina**

Limfociti B tijekom niza dioba diferenciraju se u zrele plazma stanice koje izlučuju imunoglobuline (gamaglobulini). Imunoglobulin je molekula građena od dvaju identičnih teških lanaca i dvaju lakih lanaca. Ovisno o tipu teškog lanca sva protutijela pripadaju jednom od 5 imunoglobulinskih razreda ili izotipova (IgA, IgD, IgE, IgG ili IgM). Ovisno o tipu lakih lanaca imunoglobulini mogu biti građeni od kapa ( $\kappa$ ) ili lambda ( $\lambda$ ) lanca. Jedna plazma stanica proizvodi jednu vrstu imunoglobulina (na primjer IgA kapa ili IgG kapa). Imunoglobulini se nalaze u plazmi, međustaničnoj tekućini, sekretima egzokrinih žlijezda te vezani uz površinu limfocita B kao receptori (16, 17).

U normalnim okolnostima tijelo sadrži različite plazma stanice (poliklonske), tako da su imunoglobulini u serumu također različiti (poliklonski). U slučaju multiplog mijeloma, maligne stanice su kopije iste plazma stanice (monoklonske), te proizvode iste (monoklonske) imunoglobuline. Monoklonski imunoglobulin zove se M-protein ili paraprotein (17).

### **1.2.1. Slobodni laki lanci**

Laki se lanac sastoji od 220 aminokiselina i svrstava se u skupinu kapa i lambda. Za  $\kappa$  lanac nisu nađene podvrste, ali postoje 4 različita lanca  $\lambda$  u svakome serumu. Oni se razlikuju u zamjenama jedne aminokiseline na određenom položaju nekom drugom. Oba lanca zastupljena su u svim razredima i podrazredima imunoglobulina, ali uvijek tako da su u istoj molekuli oba laka lanca jednaka, ili kapa ili lambda, a nikada kapa i lambda zajedno. U serumu svakog čovjeka nalaze se oba lanca u imunoglobulinima u omjeru 2/3:1/3 lambda. (16).

Laki se lanci stvaraju od više teških lanaca, zbog čega ih nalazimo u slobodnom, nevezanom obliku. Slobodni laki lanci mogu se kvantificirati u serumu, međutim većina lakih lanaca izlučena je urinom (Bence-Jonesovi proteini). U slučaju bolesti lakog lanca, maligne plazma stanice više ne proizvode potpuni imunoglobulin, već samo lake lance (17). Koncentracija slobodnih lakih lanaca u serumu ovisi o produkciji u plazma stanicama i bubrežnom klirensu.

## **2. HIPOTEZA**

Osnovna pretpostavka ovog istraživanja jest da slobodni monoklonski laki lanci mogu biti marker aktivnosti multiplog mijeloma.

### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj je ovog istraživanja utvrditi prisutnost slobodnih monoklonskih lakih lanaca u serumu bolesnika s multiplim mijelomom te pratiti koncentraciju slobodnih lanaca prije i nakon citostatske terapije, biološke terapije i transplantacije.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ispitanici

U ovom istraživanju uključeno je 20 novih bolesnika kojima je dijagnosticiran multipli mijelom. Ispitanici su obrađivani u Poliklinici Zavoda za hematologiju, KBC-a Zagreb. Uključeni su svi bolesnici liječeni od siječnja 2017. godine pa do kraja kolovoza 2017. godine.

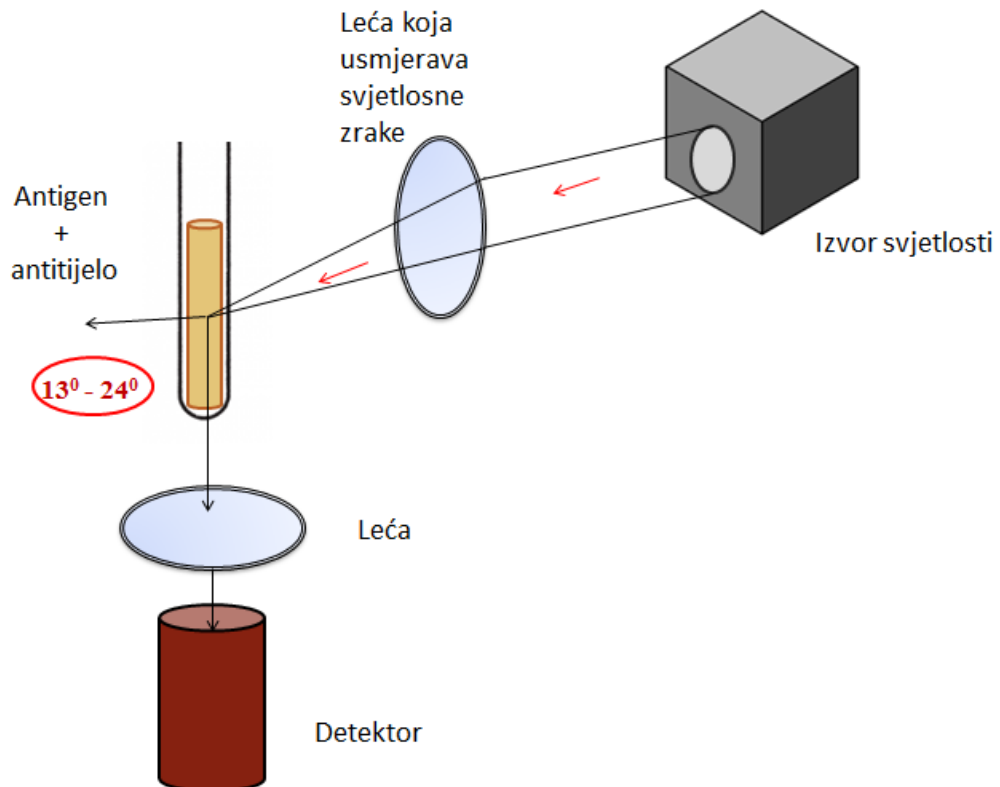
Svi bolesnici detaljno su informirani o istraživanju i suglasni s korištenjem njihove medicinske dokumentacije. Uzorak za istraživanje jest serum bolesnika.

### 4.2. Metode

U uzorcima seruma bolesnika s dijagnozom MM provedeno je određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca imunoglobulina, kapa ( $\kappa$ ) i lambda ( $\lambda$ ) tipa, nefelometrijski. Također je određen i omjer  $\kappa/\lambda$  slobodnih lakih lanaca imunoglobulina.

Nefelometrija je metoda za kvantitativno određivanje proteina. Temelji se na pojavi ogiba zrake svjetlosti o stvoreni kompleks antigen-antitijelo (Ag-At), koji lebdi u otopini. Kada svjetlost prolazi kroz suspenziju u reakcijskoj kivetu, dio se rasipa oko nastalog kompleksa pod određenim kutem u odnosu na izvor svjetlosti (18, 19).

Izvor svjetlosti stvara elektromagnetske valove valne duljine 840 nm. Zraka svjetla gotovo paralelno pada na reakcijsku kivetu i ogiba se o stvorene Ag-At komplekse. Detektor mjeri kut ogiba zrake pod kutem od  $13^\circ$  do  $24^\circ$ . Disperzirano se svjetlo sustavom optičkih leća fokusira na detektor koji ga prevodi u električni signal. Shematski prikaz nefelometrijskog mjerenja prikazan je na Slici 1. (18, 19).



Slika 1. Shematski prikaz nefelometrijskog mjerenja

Za kvantitativno određivanje slobodnih lakih lanaca imunoglobulina  $\kappa$  i  $\lambda$  tipa u našim uzorcima seruma koristili smo reagense tvrtke Siemens i to:

N Latex FLC kappa za lance  $\kappa$  tipa i

N Latex FLC lambda za lance  $\lambda$  tipa.

Određen je i omjer koncentracija  $\kappa/\lambda$  slobodnih lakih lanaca imunoglobulina.

Isti testovi koriste se također i za kvantitativno određivanje  $\kappa$  i  $\lambda$  lanaca u urinu.

N Latex FLC reagensi sadrže polistirenske čestice obložene s At na humane slobodne lake lance  $\kappa$  ili  $\lambda$  tipa i oni se vežu u kompleks Ag-At s lakim lancima prisutnima u uzorku seruma koji sada imaju ulogu Ag. Mjerenje reakcije između Ag i At, u zoni ekvivalencije, kada je postignuta maksimalna koncentracija kompleksa Ag-At, naziva se metoda krajnje točke (engl. *End-point method*). Svaki uzorak Ag pomiješa se sa stalnom koncentracijom At u prisutnosti

polietilenglikola 6000 koji pojačava reakciju vezanja, pomiče točku ekvivalencije prema višim koncentracijama Ag i održava homogenost kompleksa Ag-At koji lebde u otopini. Nakon inkubacije mjeri se rasap svjetla. Standardna krivulja apsorpcije ili rasapa svjetlosti dobije se mjerenjem poznatih koncentracija Ag-a.

Kod te tehnike mjeriti se može i brzina stvaranja kompleksa Ag-At, i to unutar prvih nekoliko minuta reakcije između Ag-a i At-a, jer se tada dobiju najveće promjene intenziteta rasapa svjetlosti s obzirom na vrijeme (engl. *Fixed-time method*). Osjetljivost nefelometrije iznosi 1 – 10 µg/mL.

Kao referentne vrijednosti slobodnih lakih lanaca imunoglobulina  $\kappa$  i  $\lambda$  tipa te omjera  $\kappa/\lambda$  u serumu korištene su vrijednosti proizvođača dobivene mjerenjem u serumu kod 369 zdravih odraslih osoba. Vrijednosti referentnih intervala za serum prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Referentne vrijednosti koncentracije slobodnih lakih lanaca  $\kappa$  i  $\lambda$  i njihovog  $\kappa/\lambda$  omjera u serumu

Tip lakog lanca	Medijan	Referentni interval (mg/L)
FLC kapa	14,55	6,70 – 22,40
FLC lambda	17,65	8,30 – 27,00
$\kappa/\lambda$ omjer	0,94	0,31 – 1,56

Kvantitativna mjerenja u našim uzorcima provedena su na nefelometru BN ProSpec Nephelometer (Siemens).

### 4.3. Statističke metode

Za statističku obradu podataka korišten je statistički program Statistica 12.7 (StatSoft na Pc Inc. TULSA, OK, USA). Obrada podataka izvedena je deskriptivnom statistikom. Razlike numeričkih varijabli između dviju skupina testirane su testom za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test, ovisno o njihovoj distribuciji, dok je razlika između kategoričkih varijabli testirana Hi - kvadrat testom. Razina značajnosti postavljena je na manje od 0,05. Sve P vrijednosti prilagođene su Bonferronijevom testu za višestruko testiranje.



## 5. REZULTATI

U istraživanju je sudjelovalo 20 ispitanika s dijagnozom multiplog mijeloma.

Metodama grafičkog i tabelarnog prikazivanja prikazana je struktura ispitanika prema demografskim obilježjima, kao i dijagnozi te primijenjenoj terapiji. Metodama deskriptivne statistike prikazana je srednja vrijednost i pokazatelj odstupanja pokazatelja bolesti.

### 5.1. Karakteristike promatrane populacije

Raspon starosne dobi ispitanika je od 46 do 80 godina. Iz distribucije frekvencija može se uočiti da u uzorku bolesnika prevladavaju osobe starosne dobi od 56 do 70 godina (Tablica 2.)

Tablica 2. Starosna dob ispitanika

Starosna dob	N
46 – 50	2
51 – 55	2
56 – 60	3
61 – 65	3
66 – 70	3
71 – 75	1
76 – 80	2
Ukupno	20

Prema spolu može se utvrditi da je veći broj ispitanika ženskog roda. (Tablica 3.)

Tablica 3. Podjela ispitanika prema spolu

Spol	<i>N</i>
Ž	11
M	9
Ukupno	20

Ispitanicima je dijagnosticirano 4 tipova multiplog mijeloma. Četiri bolesnika ima dijagnozu kapa laki lanci, pet bolesnika boluje od IgG kapa tipa i dva su bolesnika IgG lambda tipa. Prema postavljenoj dijagnozi najveći broj ispitanika ima dijagnozu lambda laki lanci, njih sedam.

Od 20 bolesnika, kod 14 je bolesnika multipli mijelom dijagnosticiran od 2010. do 2016. godine.

1995. godina je najranija godina dijagnosticiranja MM-a u ovom istraživanju (Tablica 4.).

Tablica 4. Analiza godina dijagnosticiranja bolesti

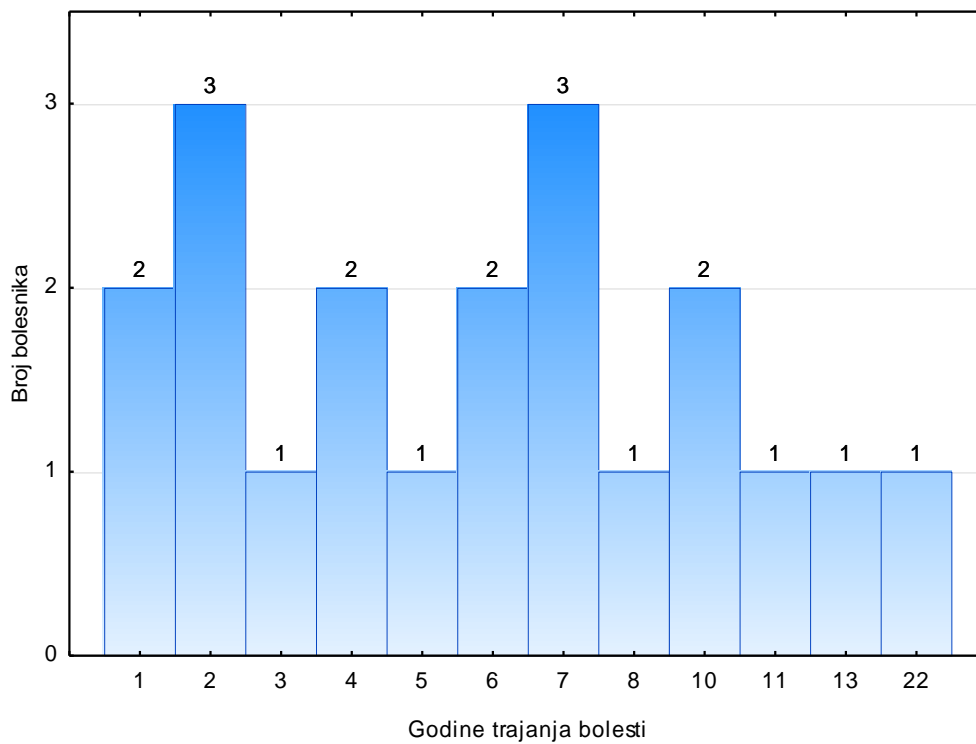
Godina dijagnosticiranja	<i>N</i>
<b>1995 – 1999</b>	1
<b>2000 – 2004</b>	1
<b>2005 – 2009</b>	4
<b>2010 – 2014</b>	9
<b>2015 – 2016</b>	5
<b>Ukupno</b>	20

Prema starosnoj dobi ispitanika može se uočiti da je najveći broj bolesnika kod dijagnoze bolesti imao 55 godina (Tablica 5.).

Tablica 5. Analiza starosne dobi kod postavljanja dijagnoze

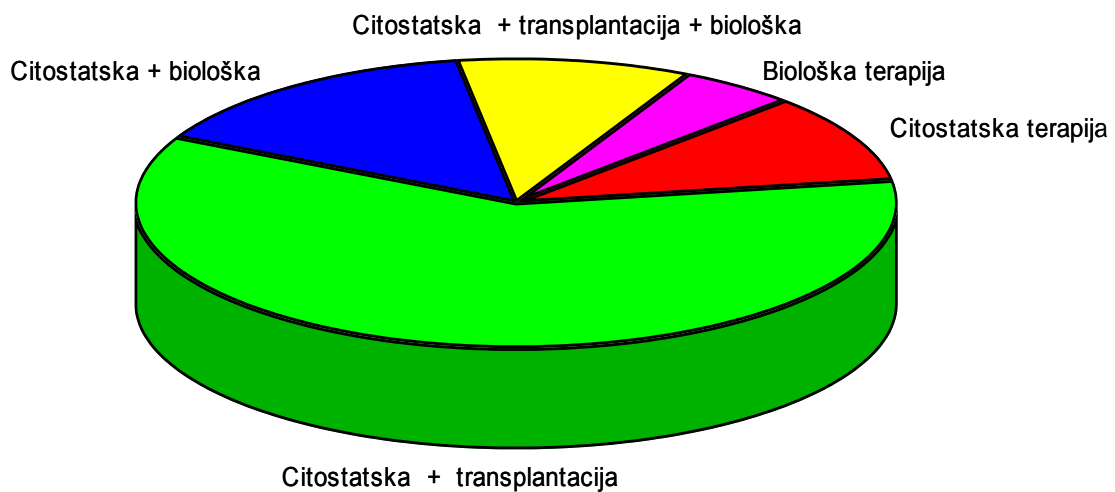
Starost kod dijagnoze	<i>N</i>
<b>30 – 39</b>	1
<b>40 – 49</b>	3
<b>50 – 59</b>	9
<b>60 – 69</b>	5
<b>70 – 79</b>	2
<b>Ukupno</b>	20

Prema trajanju bolesti može se uočiti da kod najvećeg broja bolesnika bolest traje jedne do sedam godina (Slika 2.)



Slika 2. Godine trajanja bolesti

Od 20 ispitanika, kod njih 19 u liječenju je korištena citostatska terapija, dok je biološka terapija korištena u najmanjoj mjeri kod šest bolesnika. Transplantacija matičnih stanica učinjena je kod 14 bolesnika. U liječenju multiplog mijeloma potrebno je često koristiti više vrsta terapije, a najčešće korištena kombinirana terapija u ovom istraživanju jest citostatska terapija s transplantacijom koja je korištena kod 12 bolesnika . Od 20 bolesnika, tri bolesnika liječeno je kombinacijom citostatske terapije s biološkom terapijom, te dva bolesnika kombinirala su sva tri oblika terapije (Slika 3.).



Slika 3. Zastupljenost kombiniranih terapija

## 5.2. Testiranje utjecaja terapije na koncentraciju lakih lanaca

Koncentracija lakih lanaca mjerena je dva puta, odnosno prije i nakon određene terapije. Svakom ispitaniku mjeren je laki lanac kapa tipa, laki lanac lambda tipa i omjer kapa/lambda.

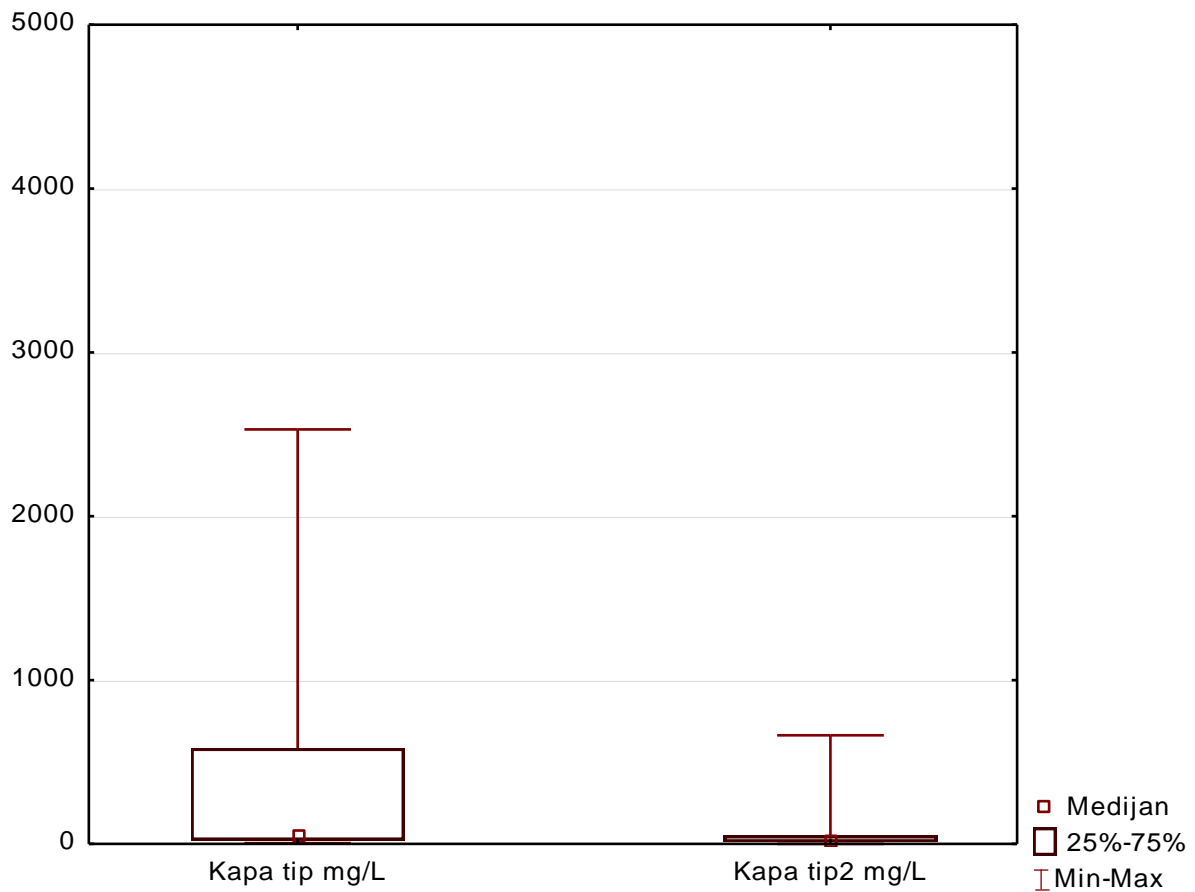
Laki lanac kapa tipa prije terapije ima medijan 57,20 mg/L, dok je raspon 31,00 mg/L – 2530,00 mg/L, nakon terapije medijan je 21,40 mg/L, a raspon 0,07 mg/L – 663,00 mg/L. Laki lanac lambda tipa prije terapije ima medijan 52,30 mg/L, a raspon od 3,48 mg/L – 10100,00 mg/L, nakon terapije vrijednosti su pale tako da medijan iznosi 22,20 mg/L s rasponom od 2,62 mg/L – 102,00. mg/L. Omjer kapa/lambda ima medijan 3,29 mg/L, a raspon 0,01 mg/L – 726,00 mg/L, nakon terapije medijan iznosi 1,27 mg/L i raspon 0,03 mg/L – 96,37 mg/L (Tablica 6.)

Tablica 6. Medijan i pokazatelji disperzije vrijednosti koncentracije lakih lanaca prije i nakon terapije (kapa tip 2, lambda tip 2 i omjer kapa/lambda 2 označavaju navedene koncentracije nakon terapije)

Pokazatelj	N	Medijan	Q1	Q3
Kapa tip mg/L	20	57,20	23,10	582,86
Lambda tip mg/L	20	52,30	13,82	102,10
Omjer kapa/lambda	20	3,29	0,13	26,61
Kapa tip 2 mg/L	20	21,40	12,55	49,25
Lambda tip 2 mg/L	20	22,20	10,65	65,80
Omjer kapa/lambda 2	20	1,27	0,69	2,66

Laki lanac kapa tipa bitan je za praćenje terapije bolesnika s dijagnozom kapa laki lanci i IgG kapa tip kojih u ovom istraživanju ima 11.

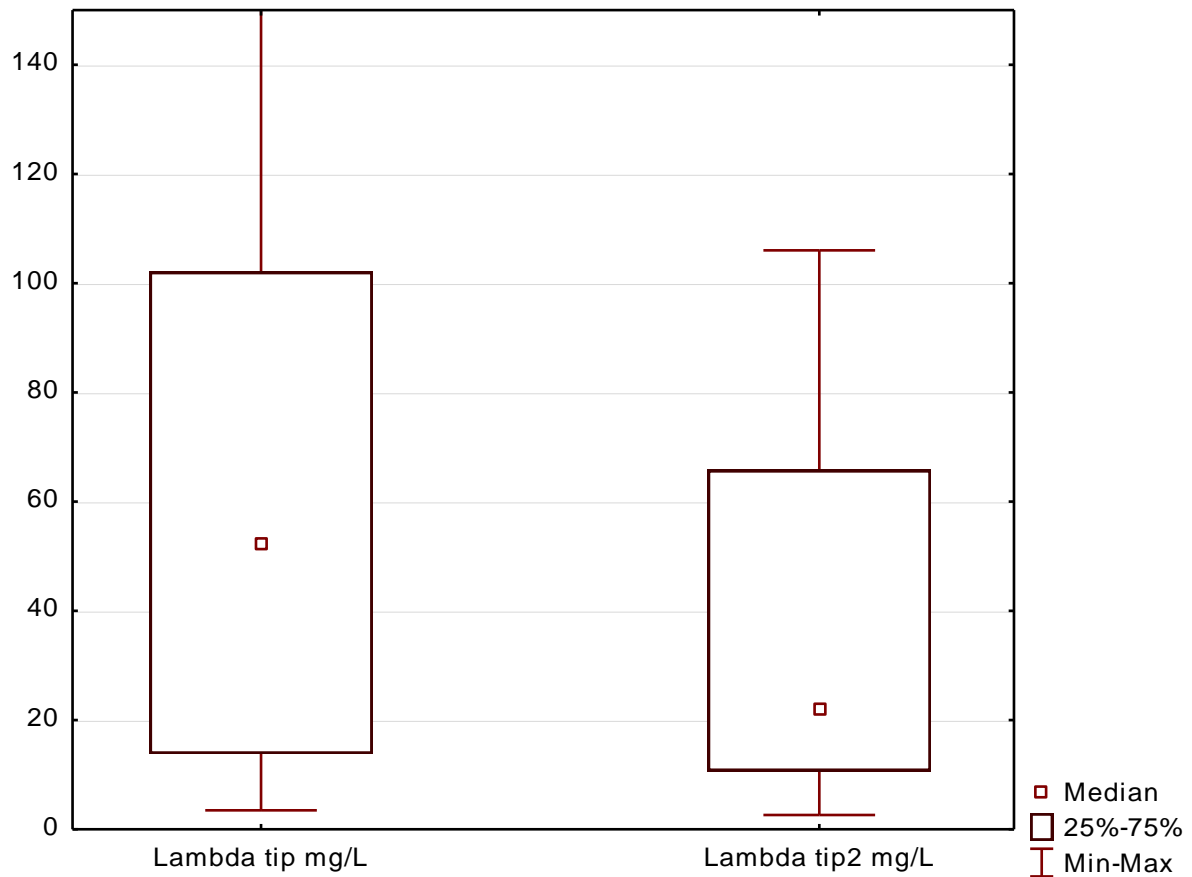
Empirijska vrijednost (Wilcoxonov test)  $p = 0,03$  upućuje da je riječ o statistički značajnom smanjenju vrijednosti lakog lanca kapa tipa nakon primljene terapije (Slika 4.).



Slika 4. Razlika u serumskoj koncentraciji slobodnih lakih lanaca kapa tip prije i nakon terapije

Laki lanac lambda tipa bitan je za praćenje terapije bolesnika s dijagnozom lambda laki lanci i IgG lambda tip kojih u ovom istraživanju ima 9 (45 %).

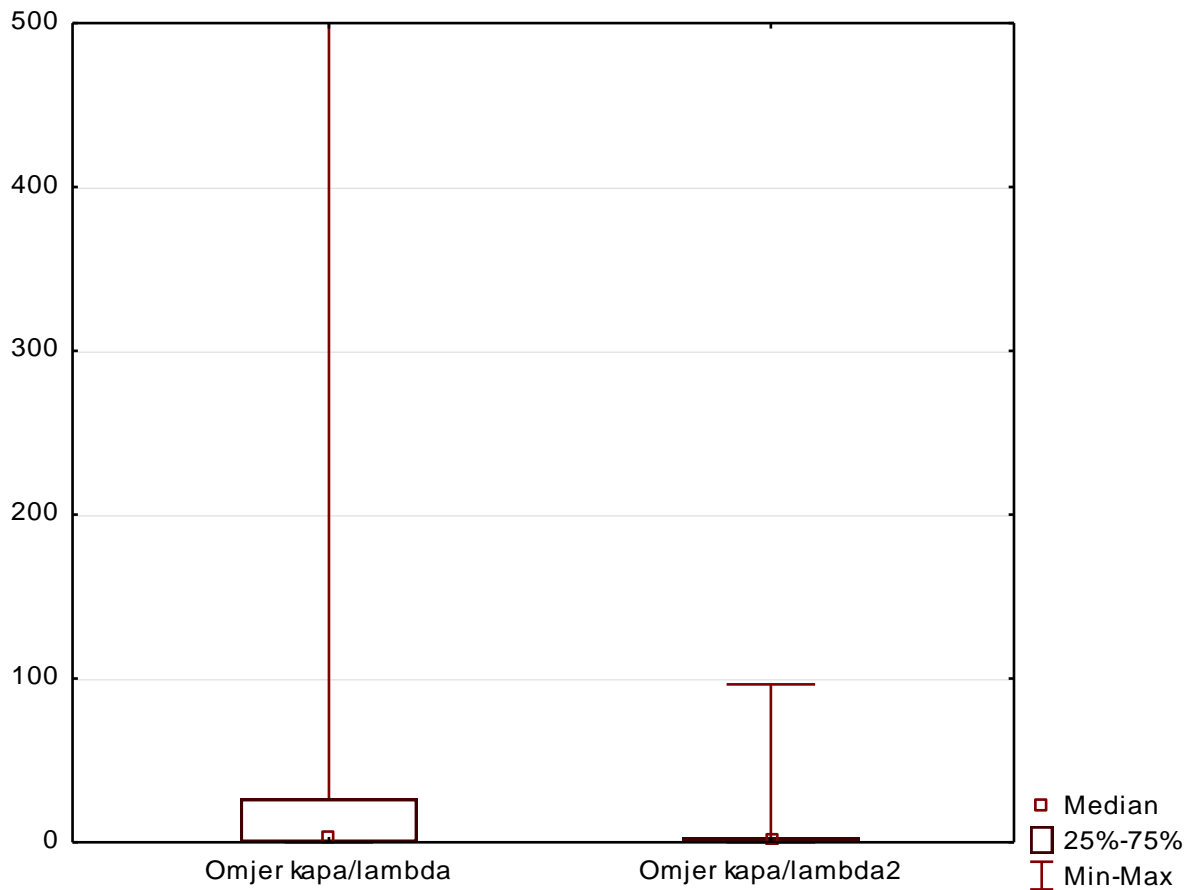
Empirijska vrijednost (Wilcoxonov test)  $p = 0,01$  upućuje da je riječ o statistički značajnom smanjenju vrijednosti lakog lanca lambda tipa nakon primljene terapije (Slika 5.).



Slika 5. Razlika u serumskoj koncentraciji slobodnih lakih lanaca lambda tip prije i nakon terapije

Omjer lakih lanaca kapa i lambda statistički je praćen kod svih 20 ispitanika.

Empirijska vrijednost (Wilcoxonov test)  $p = 0,12$  upućuje da nije riječ o statistički značajnom smanjenju vrijednosti omjera kapa/lambda nakon primljene terapije, ali vrijednost omjera kapa/lambda ima trend pada vrijednosti nakon primijenjene terapije (Slika 6.).



Slika 6. Razlika u serumskoj koncentraciji omjera kapa/lambda prije i nakon terapije



## 6. RASPRAVA

Multipli mijelom drugi je najčešći karcinom krvi koji ima definirane načine dijagnosticiranja, liječenja i praćenja terapije. Odgovor bolesnika na terapiju iznimno je važan. Ako primijenjenom terapijom ne dolazi do ozdravljenja, može doći do uvođenja novih načina liječenja. Odgovor na terapiju prati se koncentracijom monoklonskih lakih lanaca u serumu nefelometrijskom metodom (20).

U ovom istraživanju sudjelovalo je 20 ispitanika s dijagnozom multiplog mijeloma. Starosna dob ispitanika je od 46 do 80 godina, prevladavaju osobe od 56 do 70 godina. Prema tipu multiplog mijeloma ispitanici imaju dijagnozu kapa laki lanci, IgG kapa tip, lambda laki lanci, IgG lambda tip. Najvećem broju ispitanika bolest je dijagnosticirana od 2010. do 2016. godine. Najveći broj ispitanika kod dijagnoze bolesti imao je 55 godina .

Koncentracije slobodnih monoklonskih lakih lanaca u serumu mjerene su dva puta. Prvi put kod postavljanja dijagnoze, nakon čega se odredila terapija, a drugo mjerenje radilo se nakon terapije. Ispitanici su primali citostatsku terapiju, biološku terapiju i transplantaciju matičnih stanica. Terapiju često čine kombinacije navedenih, a najčešća je kombinacija citostatske terapije s transplantacijom.

Metoda kvantifikacije monoklonskih lakih lanaca pogodna je za kliničku procjenu stanja bolesti ili odgovora na terapiju jer rezultati ne ovise o volumenu plazme, promjenama hematokrita i metabolizmu jer se stavljanjem u omjer učinci tih parametara poništavaju (20).

Izmjerena koncentracija slobodnih lakih lanaca kapa tipa prije terapije ima medijan 57,20 mg/L, a nakon terapije je 21,40 mg/L. Vrijednost je pala i približila se medijanu referentne vrijednosti koji je 14,55 mg/L. Slična je promjena kod slobodnih lakih lanaca lambda tipa koji imaju medijan prije terapije 52,30 mg/L, a nakon terapije 22,20 mg/L, dok je medijan referentnih vrijednosti 17,65 mg/L. Omjer kapa/lambda također ima pad vrijednosti nakon terapije, medijan prije terapije iznosi 3,29 mg/L, dok je nakon terapije 1,27 mg/L te medijan referentnog intervala od 0,94 mg/L.

Kod ispitanika s dijagnozom kappa lakih lanaca i IgG kapa tipa statistički je značajno smanjenje vrijednosti lakog lanca kapa tipa nakon primijenjene terapije.

Također je statistički značajno smanjenje vrijednosti nakon terapije bilo kod bolesnika s dijagnozom lambda lakih lanaca i IgG lambda. Prateći vrijednost omjera kapa/lambda nije utvrđeno statistički značajno smanjenje, ali je vidljiv trend pada vrijednosti omjera kapa/lambda nakon primijenjene terapije.

Rezultati su u suglasju s istraživanjem koje su proveli Larsen i kolege. Cilj istraživanja je potvrditi da kao biomarker maligne transformacije u visokorizičnom multiplom mijelomu i otkrivanju bolesnika koji su u neposrednoj opasnosti od progresije može poslužiti jako povišen omjer serumskog lakog lanca. Studija je retrospektivno proučavala povišene koncentracije omjera kapa/lambda, a uključno/isključni kriterij istraživanja bio je omjera kapa/lambda  $\geq 100$ . Dokazano je da se analizom omjera kapa/lambda može predvidjeti prognoza simptomatskog multiplog mijeloma unutar dvije godine od dijagnoze (21).

Pavan M. i kolege su u radu prikazali slučaj gdje se lambda laki lanci talože u bubrežnim tubulima. Tridesetpetogodišnja žena s dijagnozom multiplog mijeloma lambda laki lanci predstavljena je s akutnim zatajenjem bubrega koji zahtijeva hemodijalizu. Nakon određene terapije laki lanci su u potpunoj remisiji (22).

## 8. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Kod ispitanika pri dijagnozi multiplog mijeloma nalazimo povišene koncentracije slobodnih lakih lanaca kapa tipa koje iznose 57,20 mg/L, dok medijan referentne vrijednosti iznosi 17,65 mg/L. Nakon provedene kombinirane terapije (kemoterapija, biološka terapija i TKS) kod ispitanika s dijagnozom kapa lakih lanaca i IgG kapa tipa mijeloma koncentracija slobodnih lakih lanaca pada i iznosi 21,40 mg/L, što je unutar referentnih normalnih vrijednosti 6,70 – 22,40 mg/L i statistički je značajna razlika između početne vrijednosti koncentracije slobodnih lakih lanaca kapa tipa i nakon provedene terapije.
2. Kod ispitanika s dijagnozom lambda lakih lanca i IgG lambda tipa nalazimo pri dijagnozi povišene vrijednosti slobodnih lakih lanca lambda 52,30 mg/L, a nakon terapije 22,30 mg/L, što je unutar referentnog vrijednosti i predstavlja statistički značajnu razliku.
3. Prateći vrijednosti omjera kapa/lambda pri dijagnozi bolesti i nakon provedene terapije ne nalazi se statistički značajna razlika, ali vrijednost omjera kapa/lambda ima trend pada nakon primijenjene terapije.
4. Određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca imunoglobulina u serumu ispitanika nefelometrijskom metodom služe kao marker aktivnosti bolesti multiplog mijeloma pri dijagnozi i nakon provedene kombinirane terapije.

## 9. SAŽETAK

**Uvod:** Multipli mijelom (MM) zloćudna je novotvorina hematopoetskog tkiva svrstana u zloćudne novotvorine zrelih B limfocita koji čini drugi najčešći karcinom krvi. Bolest nastaje klonalnom neoplastičnom proliferacijom plazma stanica (PC), što dovodi do opsežnog stvaranja nefunkcionalnih gamaglobulina ili njihovih dijelova.

Imunoglobulin je molekula građena od dvaju identičnih teških lanaca i dvaju lakih lanaca. Laki lanci temeljno se svrstavaju u skupinu kapa i lambda. Oba lanca zastupljena su u svim razredima i podrazredima imunoglobulina, ali uvijek tako da su u istoj molekuli oba laka lanca jednaka, ili kapa ili lambda, a nikada kapa i lambda zajedno.

**Cilj istraživanja:** Cilj je ovog istraživanja utvrditi prisutnost slobodnih monoklonskih lakih lanaca u serumu bolesnika s multiplim mijelomom te pratiti koncentraciju slobodnih lanaca prije i nakon citostatske terapije, biološke terapije i transplantacije.

**Materijal i metoda:** U ovo istraživanje uključeno je 20 novih bolesnika kojima je dijagnosticiran multipli mijelom. U uzorcima seruma bolesnika s dijagnozom MM provedeno je određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca imunoglobulina, kapa ( $\kappa$ ) i lambda ( $\lambda$ ) tipa nefelometrijskom metodom. Također je određen i omjer  $\kappa/\lambda$  slobodnih lakih lanaca imunoglobulina. Mjerenja su izvedena dva puta, prije i nakon terapije.

**Rezultati:** Postoji značajan pad koncentracije slobodnih lakih lanaca kapa tipa i lambda tipa nakon primijenjene terapije, vrijednost omjera kapa/lambda ne bilježi značajan pad.

**Zaključak:** Određivanje slobodnih lakih lanaca kapa/lambda imunoglobulina u serumu ispitanika s MM pri dijagnozi i nakon provedene terapije može služiti kao marker aktivnosti osnovne bolesti.

**Ključne riječi:** multipli mijelom, laki lanci, kapa lanac imunoglobulina, lambda lanac imunoglobulina, nefelometrija

## 9. SUMMARY

### **Significance of determining monoclonal serum free light chains in multiple myeloma patients**

**Introduction:** Multiple myeloma (MM) is a malignant neoplasm of hematopoietic tissue classified as malignant neoplasms of mature B lymphocytes, which is the second most common blood cancer. The disease is caused by clonal neoplastic plasma cell proliferation (PC), resulting in extensive formation of non-functional gamma globulins or their parts.

Immunoglobulin is a molecule built of two identical heavy chains and two light chains. Light chains are classified in kappa and lambda groups. Both chains are represented in all classes and subclasses of immunoglobulin, but in the same molecule both light chains are always equal, either kappa or lambda, and never kappa and lambda together.

**Research objective:** The aim of this study is to determine the presence of free monoclonal light chains in multiple myeloma patients' serum and to monitor the free chain concentration before and after cytostatic therapy, biological therapy and transplantation.

**Materials and Methods:** This study included 20 patients recently diagnosed with multiple myeloma. Samples of MM patients' serum were analysed to determine the concentration of free light chains of the immunoglobulin, kappa ( $\kappa$ ) and lambda ( $\lambda$ ) type by nephelometric analysis. The  $\kappa/\lambda$  ratio of free light chains of immunoglobulin was also determined. All parameters were measured twice, before and after the therapy.

**Results:** There is a significant drop in the concentration of free light chain of both kappa and lambda type after the applied therapy, the kappa/lambda ratio did not significantly decrease.

**Conclusion:** Analysis of free light kappa/lambda chains of immunoglobulin in serum of patients diagnosed with MM during the diagnosis and after the therapy may serve as an activity marker of the primary disease.

**Key words:** multiple myeloma, light chains, immunoglobulin kappa chains, immunoglobulin lambda chains, nephelometry

## 10. LITERATURA

1. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema, dostupno na stranici:  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44081/1/9789241547666\\_hrv.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44081/1/9789241547666_hrv.pdf) , datum pristupa: 03.07.2017.
2. Vrhovac B. Interna medicina: limfoproliferativne bolesti. 4.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2008. Str. 1027-1034
3. Lund Johan, Clinical studies in Multiple Myeloma, Stockholm:Karolinska Institutet; 2016. dostupno na: [www.sfhem.se/Files.aspx?f\\_id=133295](http://www.sfhem.se/Files.aspx?f_id=133295), pristupila: 03.07.2017.
4. MSD priručnik dijagnostike i terapije, Multipli mijelom, dostupno na:  
<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/hematologija-i-onkologija/bolesti-plazma-stanica/multipli-mijelom>, datum pristupa:03.07.2017.
5. News medical life sciences, Multiple myelome epidemiology, dostupno na:  
<http://www.news-medical.net/health/Multiple-Myeloma-Epidemiology.aspx>, datum pristupa:03.07.2017.
6. Cybermed, Multipli mijelom, dostupno na:  
[http://www.cybermed.hr/clanci/multipli\\_mijelom](http://www.cybermed.hr/clanci/multipli_mijelom), datum pristupa:03.07.2017.
7. Baz R, Bolwell B. Multiple Myeloma, 2009 dostupno na:  
<http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hematology-oncology/multiple-myeloma/#top> , datum pristupa:03.07.2017.
8. Ljiljana P. Multipli mijelom. 2 izd. Zagreb: M.E.P.;2012.  
dostupno na stranici: [http://www.kbmerkur.hr/userfiles/pdfs/Djelatnost/Klinika%20za%20unutarnje%20bolesti/Hematologija/LjiljanaPomper\\_MultipliMijelom\\_2\\_izdanje.pdf](http://www.kbmerkur.hr/userfiles/pdfs/Djelatnost/Klinika%20za%20unutarnje%20bolesti/Hematologija/LjiljanaPomper_MultipliMijelom_2_izdanje.pdf), datum pristupa:06.07.2017.
9. Multipli mijelom, Opis bolesti dostupno na stranici <http://mijelom.hr/sto-je-mm/opis-bolesti/>, datum pristupa:07.07.2017

10. Labar B, Hauptmann E. Hematologija: Zloćudni tumori limfocita . Zagreb: Školska knjiga; 2007. Str. 288-294.
11. American cancer society, What is multiple myeloma, dostupno na stranici: <https://www.cancer.org/cancer/multiple-myeloma/about/what-is-multiple-myeloma.html>, datum pristupa :07.07.2017.
12. MSD priručnik, Mijelomska nefropatija, dostupno na stranici: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/genitourinarne-bolesti/tubulointersticijske-bolesti/mijelomska-nefropatija>, datum pristupa: 07.07.2017.
13. Damjanov I, Jukić S i Nola M. Patologija: Plazmatične neoplazme i slične bolesti. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. Str. 438-439.
14. Danica Matišić, Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija. Bance- Jones proteinurija, dostupno na: <https://bib.irb.hr/datoteka/355904.MONOKLONTECAJ.doc>, datum pristupa 07.07.2017.
15. Vlašić Tanasović J, Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija, Pula, 2014. dostupno na stranici: <http://hrcak.srce.hr/file/205863>., datum pristupa:07.07.2017.
16. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Luković-Škudar V, Marušić M i sur. Imunologija: Građa protutijela i antigenskih receptora limfocita B. 7.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. Str. 59-79.
17. Hovon, M- protein in multiple myeloma, dostupno na stranici: [http://www.hovon.nl/upload/File/Studies\\_AlgoStudInfo\\_HovonRichtlijnenDocs/M-protein in MM\\_v02jun04.pdf](http://www.hovon.nl/upload/File/Studies_AlgoStudInfo_HovonRichtlijnenDocs/M-protein%20in%20MM_v02jun04.pdf) , datum pristupa:18.07.2017.
18. Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F i sur. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju: Spektroskopske metode, Zagreb: Medicinska naklada;1997 str. 37-41
19. Turgeon ML, Ringsrud MK, Linne J. Clinical laboratory science:the basics and routine techniques, 6.izd, Marylann Heights, MO: Mosby Elsevier; 2012. Str:139- 140. Dostupno na stranici: <https://books.google.hr/books?id=Y7fwAwAAQBAJ&pg=PA139&dq=nephelometry>

&hl=hr&sa=X&ved=0ahUKEwjF8q6ZsMrVAhWFXRQKHZpXCVkQ6AEIzAA#v=onepage&q=nephelometry&f=false, datum pristupa:09.08.2017.

20. Batinić J, Perić Z, Šegulja D, Last J, Prijić D, Dubravčić K i sur, Immunoglobulin heavy/light chain analysis enhances the detection of residual disease and monitoring of multiple myeloma patients, *Croat Med* 2015. 56(3):263-71, dostupno na stranici: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26088851>, datum pristupa:05.01.2018.
21. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Rajkumar SV, Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma, *Leukemia* 27, 2013. 941 – 946 , dostpno na stranici: <https://www.nature.com/articles/leu2012296>, datum pristupa: 05.01.2018.
22. Pavan M, Ashwini KA, Ravi R, Suratkal LH, Complete remission of lambda light chain myeloma presenting with acute renal failure following treatment with bortezomib and steroids, *Indian J Nephrol* 2010. 20(2): 94–96, dostupno na stranici: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2931142/> datum pristupa: 05.01.2018.



## 11. ŽIVOTOPIS

Nikolina Penić

Datum i mjesto rođenja: 06. 12. 1993., Karlovac, Republika Hrvatska

Adresa: Krašić 2, 10454 Krašić

E-adresa: penicnikolina@gmail.com

Obrazovanje:

2015. – 2017.: Medicinski fakultet u Osijeku – diplomski sveučilšni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

2012. – 2015.: Zdravstveno veleučilište Zagreb – preddiplomski stručni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

2008. – 2012.: Srednja škola Jastrebarsko