



**Α' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΣΠΥΡΟΣ Δ. ΛΑΔΑΣ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ, ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΙ
ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΑΜΙΓΩΣ
ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΣΤΙΣ
ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΥΣΚΡΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΤΑ
Β-ΛΕΜΦΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ**

**ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ Β. ΚΟΥΛΙΕΡΗΣ
ΙΑΤΡΟΣ- ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2013

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ, ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΙ
ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΑΜΙΓΩΣ
ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΣΤΙΣ
ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΥΣΚΡΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΤΑ
Β-ΛΕΜΦΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ**

Επιστήμη ποιητική ευδαιμονίας

μτφρ: η γνώση είναι δημιουργός της ευτυχίας

Πλάτων 427-347 π.Χ.

Στην οικογένειά μου και
στους φίλους μου

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Αρχαίο κείμενο

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, Ἱστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσιν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὅρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἱητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρῆσθαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἶρξιν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοιως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὁκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἑὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαίων καὶ ἀνδρώων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ ὃ ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἦ ἀκούσω, ἦ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἔς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Απόδοση στη νεοελληνική γλώσσα

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατὰ τη δύναμη και την κρίση μου τον ὅρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή. Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ἴσο με τους γονεῖς μου και την κοινωνία του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του ἀδελφία μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς διδάκτρα ή άλλη συμφωνία. Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό ὅρκο, αλλά σε κανέναν άλλο. Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατὰ τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε ἔγκυο μέσο που προκαλεῖ ἔκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και ἀσπιλή και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης. Σε ὅσα σπῆτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα ἀπέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ἰδίως από γενετήσιες πράξεις με ἄνδρες και γυναῖκες, ἐλεύθερους και δούλους. Και ὅσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατὰ τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ἀσχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά. Αν τηρώ τον ὅρκο αυτό και δεν τον παραβῶ, ἀς χαίρω πάντοτε υπολήψεως ἀνάμεσα στους ἀνθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν ὁμως τον παραβῶ και ἐπιорκήσω, ἀς πάθω τα ἀντίθετα.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παναγιώτης Παναγιωτίδης Αναπληρωτής Καθηγητής Αιματολογίας

Μαρία-Χριστίνα Κυρτσώνη Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας

Αθανάσιος-Μελέτιος Δημόπουλος Καθηγητής Θεραπευτικής

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	8
ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΑ ΑΡΘΡΑ	14
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	33
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	34
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Κεφάλαιο 1.	
Η Ανοσοσφαιρίνη	37
1.1 Εισαγωγή	
1.2 Η εξέλιξη και η διαφοροποίηση των Β-Λεμφοκυττάρων	
1.3 Η κλωνική εξαλλαγή των Β- Λεμφοκυττάρων	
1.4 Η δομή και τα μέρη των ανοσοσφαιρινών	
1.5 Η σύνθεση και η αποδόμηση των ανοσοσφαιρινών	
1.6 Οι λειτουργίες των φυσιολογικών και των μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών	
1.7 Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών	
1.8 Η χρήση της μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης στα αιματολογικά νοσήματα	
Κεφάλαιο 2.	
Οι Βιολογικοί παράγοντες νόσου-Το μικροπεριβάλλον	50
2.1 Εισαγωγή	
2.2 Ο παράγοντας Syndecan-1	
2.3 Ο παράγοντας που διεγείρει τα Β-Λεμφοκύτταρα (BLys)	
2.4 Ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β (TGF-β)	
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Κεφάλαιο 3.	
Το Πολλαπλούν Μυέλωμα	58
3.1 Εισαγωγή	
3.2 Το Πολλαπλούν Μυέλωμα στη διάγνωση	
3.2.1 Ασθενείς	
3.2.2 Μεθοδολογία	
3.2.3 Αποτελέσματα	
3.3 Το Πολλαπλούν Μυέλωμα στην πορεία	
3.3.1 Ασθενείς	
3.3.2 Μεθοδολογία	
3.3.3 Αποτελέσματα	

Κεφάλαιο 4.	
Η Μακροσφαιριναιμία του Waldenström	92
4.1 Εισαγωγή	
4.2 Η Μακροσφαιριναιμία του Waldenström στη διάγνωση	
4.2.1 Ασθενείς	
4.2.2 Μεθοδολογία	
4.2.3 Αποτελέσματα	
Κεφάλαιο 5.	
Η Χρόνια Λεμφογενής Λευχαιμία	111
5.1 Εισαγωγή	
5.2 Η Χρόνια Λεμφογενής Λευχαιμία στη διάγνωση	
5.2.1 Ασθενείς	
5.2.2 Μεθοδολογία	
5.2.3 Αποτελέσματα	
Κεφάλαιο 6.	
Το Λέμφωμα Οριακής Ζώνης	129
6.1 Εισαγωγή	
6.2 Το Λέμφωμα Οριακής Ζώνης στη διάγνωση	
6.2.1 Ασθενείς	
6.2.2 Μεθοδολογία	
6.2.3 Αποτελέσματα	
Κεφάλαιο 7.	
Συζήτηση	143
7.1 Εισαγωγή	
7.2 Το Πολλαπλούν Μυέλωμα	
7.2.1 Το Πολλαπλούν Μυέλωμα στη διάγνωση	
7.2.2 Το Πολλαπλούν Μυέλωμα στην πορεία	
7.3 Η Μακροσφαιριναιμία του Waldenström στη διάγνωση	
7.4 Η Χρόνια Λεμφογενής Λευχαιμία στη διάγνωση	
7.5 Το Λέμφωμα Οριακής Ζώνης στη διάγνωση	
Κεφάλαιο 8.	
Συμπεράσματα – Περίληψη	156
Κεφάλαιο 9.	
Αγγλική Περίληψη	158
Κεφάλαιο 10.	
Βιβλιογραφικές Αναφορές	159

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ Β. ΚΟΥΛΙΕΡΗΣ ΙΑΤΡΟΣ - ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ

6 Αυγούστου 1977

ΣΠΟΥΔΕΣ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Απρίλιος 2012: Απόκτηση Τίτλου Ιατρικής Ειδικότητας

Μάρτιος 2010: Υποψήφιος Διδάκτορας τομέα Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα: “ Διερεύνηση της πιθανής Κλινικής, Βιολογικής και Προγνωστικής σημασίας της παρουσίας Αμιγώς Μονοκλωνικής Ανοσοσφαιρίνης στις Πλασματοκυτταρικές Δυσκρασίες και τα Β-Λεμφοεπιδερμικά νοσήματα ”.

Τριμελής Επιτροπή: Π. Παναγιωτίδης, Μ.Χ. Κυρτσώνη, Α.Μ. Δημόπουλος

Ιούνιος 2009-Ιανουάριος 2012: Ειδικευόμενος ιατρός Αιματολογίας Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών « Αλεξάνδρα »

Οκτώβριος 2007-Μάρτιος 2009: Ειδικευόμενος ιατρός Αιματολογίας Α΄

Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών.

Αύγουστος 2006-Αύγουστος 2007: Κατάταξη στο Πολεμικό Ναυτικό και θητεία στο Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών τμήμα Παθολογίας– Αιματολογίας

Οκτώβριος 2004-Ιούλιος 2006: Ειδικευόμενος ιατρός τμήματος Παιδιατρικής Γενικού Νοσοκομείου Καλαμάτας, για απόκτηση τίτλου ειδικότητας στην Αιματολογία

Μάιος 2003-Μάιος 2004: Ιατρός υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου στο Π.Ι. Χατζή του δήμου Βουφράδος, Μεσσηνίας

Ιανουάριος 2003-Μάιος 2003: Υποχρεωτική τρίμηνη εκπαίδευση στις ειδικότητες της Καρδιολογίας, Παθολογίας και Χειρουργικής στο Νοσοκομείο Καλαμάτας

Σεπτέμβριος 2002: Αναγνώριση τίτλου σπουδών από ΔΙ.ΚΑ.ΤΣΑ και απόκτηση άδειας ασκήσεως ιατρικής στην Ελλάδα

Σεπτέμβριος 1995-Σεπτέμβριος 2001: Φοίτηση στο Αγγλόφωνο τμήμα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Debrecen Ουγγαρίας (Βαθμός πτυχίου 9,27 και χαρακτηρισμός ‘Άριστα’)

Ιούνιος 1995: Αποφοίτηση από το Ενιαίο Πολυκλαδικό Λύκειο Καλαμάτας

ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Παρακολούθηση 8 συνεδρίων

Συμμετοχή στη συγγραφή 33 εργασιών

ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Παρακολούθηση 17 συνεδρίων και ημεριδών

Συμμετοχή στη συγγραφή 45 εργασιών

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΣΕ ΒΙΒΛΙΑ

“The Contribution of Prognostic Factors to the Better Management of Multiple Myeloma Patients”

Marie-Christine Kyrtsolis, Dimitrios Maltezas, **Efstathios Koulrieris**, Catherine Bitsanis, Ilias Pessach, Anna Efthymiou, Vassiliki Bartzis, Tatiana Tzenou, Panayiotis Panayiotidis

Multiple Myeloma An Overview Chapter 8: Pages 145-174 ISBN 978-953-307-768-0

ΑΡΘΡΑ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Review article:

“Staging systems and Prognostic Factors as a Guide to Therapeutics Decisions in Multiple Myeloma”

Marie-Christine Kyrtsolis, Tatiana Tzenou, Dimitrios Maltezas, **Efstathios Koulrieris** and Arthur Bradwell

Seminars in Hematology 2009 46:110–117. PMID:19389494

2. Original article:

“Response to Bortezomib in Refractory/Relapsed Multiple Myeloma Patients: A Single Center Experience with Discussion on Specific Issues”

M-C Kyrtsolis, D Maltezas, **E Koulrieris**, C Zaroulis, T Tzenou, S Sachanas, V Bartzis, G Georgiou, M Dimou, S Siakavellas, TP Vassilakopoulos, MK Angelopoulou, E Koutra, A Mouzaki, GA Pangalis and P Panayiotidis

The Asian and Pacific Journal of Oncology and Hematology Vol 1. Issue 4 open access

3. Original article:

“Validation of the International Prognostic Scoring System (IPSS) for Waldenstrom's macroglobulinemia (WM) and the importance of serum lactate dehydrogenase (LDH)”

Kastritis E, Kyrtsolis MC, Hadjiharissi E, Symeonidis A, Michalis E, Repoussis P, Tsatalas C, Michael M, Sioni A, Kartasis Z, Stefanoudaki E, Voulgarelis M, Delimpasi S, Gavriatopoulou M, **Koulieris E**, Gika D, Zomas A, Roussou P, Anagnostopoulos N, Economopoulos T, Terpos E, Zervas K, Dimopoulos MA; on behalf of the Greek Myeloma Study Group

Leukemia Research 34 (2010) 1340–1343 PMID:20447689

4. Review article:

“Genetic and Molecular Mechanisms in Multiple Myeloma : a route to better understand disease pathogenesis and heterogeneity”

M-C Kyrtsolis, V. Bartzis ,X Papanikolaou, **E. Koulieris** , G. Georgiou, M. Dimou, T. Tzenou, P. Panayiotidis

The Application of Clinical Genetics 2010:3 41-5

5. Original article:

“CD138 Expression Helps Distinguishing Waldenström's Macroglobulinemia (WM) From Splenic Marginal Zone Lymphoma(SMZL)”

Kyrtsolis MC, Levidou G, Korkolopoulou P, **Koulieris E**, Bartzi V, Maltezas D, Pangalis GA, Kalpadakis C, Dimou M, Georgiou G, Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Salpeas V, Tsaftaridis P, Patsouris E, Panayiotidis P, Tzenou TK
Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2011 Feb 1;11(1):99-102 PMID:21454223

6. Original article:

“Novel M-Component Based Biomarkers In Waldenström's Macroglobulinemia”

Leleu X, **Koulieris E**, Maltezas D, Itzykson R, Xie W, Manier S, Dulery R, Boyle E, Gauthier J, Poulain S, Tatiana T, Panayiotidis P, Bradwell AR, Harding S, Leblond V, Kyrtsolis MC, Ghobrial IM

Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2011 Feb 1;11(1):164-7 PMID:21454223

7. Original article:

"No Significant Improvement In the Outcome of Patients with Waldenström's Macroglobulinemia Treated Over the Last 25 Years"

Efstathios Kastritis, Marie-Christine Kyrtsonis, Evdoxia Hadjiharissi, Argiris Symeonidis, Eurydiki Michalis, Panagiotis Repoussis, Konstantinos Tsatalas, Michael Michael, Anastasia Sioni, Zafiris Kartasis, Ekaterini Stefanoudaki, Michael Voulgarelis, Sosana Delimpasi, Maria Gavriatopoulou, **Efstathios Koulteris**, Dimitra Gika, Elissavet Vervesou, Konstantinos Konstantopoulos, Garyfalia Kokkini, Athanasios Zomas, Paraskevi Roussou, Nikolaos Anagnostopoulos, Theofanis Economopoulos, Evangelos Terpos, Konstantinos Zervas and Meletios A. Dimopoulos On behalf of the Greek Myeloma Study Group, Greece

American Journal of Hematology 86(6):479-83 PMID:21509798

8. Original article:

"Ratio of involved/uninvolved immunoglobulin quantification by Hevylite™ assay: clinical and prognostic impact in multiple myeloma"

Efstathios Koulteris, Panayiotis Panayiotidis, Stephen J Harding, Nikoitsa Kafasi, Dimitris Maltezas, Vassiliki Bartzis, Tatiana Tzenou, Maria Dimou, George Georgiou, Ladan Mirbahai, Arthur R Bradwell, Marie-Christine Kyrtsonis
Experimental Hematology and Oncology 2012, 1:9 doi:10.1186/2162-3619-1-9
PMID:23211046

9. Original article:

"Re-evaluation of prognostic markers including staging, serum free light chains or their ratio and serum lactate dehydrogenase in multiple myeloma patients receiving novel agents"

Maltezas D, Dimopoulos MA, Katodritou I, Repousis P, Pouli A, Terpos E, Panayiotidis P, Delimpasi S, Michalis E, Anargyrou K, Gavriatopoulou M, Stefanoudaki A, Tzenou T, **Koulteris E**, Sachanas S, Dimou M, Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Pangalis GA, Kyrtsonis MC
Hematol Oncol. 2012 Sep 7. doi: 10.1002/hon.2026 PMID: 22961993

10. Original article:

“ Incidence , clinical features, laboratory findings and outcome of Multiple Myeloma patients presentnd extramedullary relapse“

Papanikolaou X, Repousis P, Tzenou T, Maltezas D, Kotsopoulou M, Megalakaki K, Angelopoulou MK, Dimitrakopoulou E, **Koulieris E**, Bartzis V, Pangalis GA, Panayiotis Panayiotidis, , Kyrtsionis MC

Leuk Lymphoma 2012 Nove 14 PMID:23151071

11. Original article:

“Prognostic contribution of new immunoglobulin biomarkers (Freelite, Hevylite) in Waldenstrom’s Macroglobulinemia (WM)“

MC Kyrtsionis, **E. Koulieris**, D. Maltezas, T. Tzenou, S. Harding, E. Kastitis, N. Kafassi, V. Bartzi, A. Efthymiou, K. Bitsanis, M. Gavriatopoulou, E. Terpos, C. Kalpadakis, M K Angelopoulou, T. P. Vassilakopoulos, AR Bradwell, PH. Berris, GA Pangalis, P. Panayiotidis, MA Dimopoulos

American Journal of Medicine and Medical p-ISSN: 2165-901X e-ISSN: 2165-9036
2012; 2(6): 136-143 doi: 10.5923/j.ajmms.20120206.05

ΑΡΘΡΑ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1.Review article:

“Ιδιοποαθής θρομβοπενική πορφύρα και κύηση.“

Χάρις Ματσούκα, Αθανασία Σταμέλου, **Ευστάθιος Κουλιέρης**

AIMA 1 (2) Αυτοάνοση Θρομβοπενία Κεφάλαιο 6: σελ. 157-162 ISSN: 1108-2682

2.Συμμετοχή σε κεφάλαιο που γράφτηκε μετά από προσκεκλημένη εισήγηση της Μαρίας Χριστίνας Κυρτσώνη

M-X Κυρτσώνη, **E Κουλιέρης**, Β Μπάρτζη, Α Ευθυμίου,Κ Μπιτσάνη Γ ,Τ Τζένου ,Δ Μαλτέζας “ Προσδιορισμός Ελεύθερων Ελαφριών Αλυσίδων Ανοσοσφαιρινών Στον Ορό: Συμβολή Στην Διαχείριση Ασθενών Με Παραπρωτεϊναιμία.”

Ημερίδα Τμήματος Λεμφοϋπερπλαστικών Νόσων Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρίας
Θεραπευτικές εξελίξεις στα Λεμφώματα: Δύσκολα ερωτήματα, πρόσφατες απαντήσεις, νέες προκλήσεις. Σαντορίνη 2010

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ-WORKSHOPS

1. “Publication Workshop” of the Vienna School of Clinical Research
2. “Statistical analysis of Clinical Data” Dpt of Statistics, Business and Finance
University of Athens, Hellas

ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ-ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- 1 **Βραβείο Νέου Ερευνητή (Young Investigator Award)**, 6th International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia, Venice Italy 2010

E. Koulieris, M-C Kyrtsonis, D. Maltezas, T. Tzenou, Ladan Mirbahai, Graham Mead, P. Panayiotidis, A.R. Bradwell, S. Harding : "Quantification of serum IgM kappa and IgM lambda in Patients with Waldenström's Macroglobulinemia"
IWMM-6 SESSION-12 2010 : 96-97- YOUNG INVESTIGATOR AWARD

Dimitrios Maltezas, Tatiana Tzenou, Nikolitsa Kafassi, **Efstathios Koulieris**, Vassiliki Bartzis, Maria Dimou, Anna Efthymiou, George Georgiou, Theodoros P. Vassilakopoulos, Maria K. Angelopoulou, Panayiotis Tsaftaridis, Panayiotis Panayiotidis, Photis Beris, Marie-Christine Kyrtsonis : "Clinical Impact of Increased Serum Free Light Chains (sFLCs) or Their Ratio (FLCR) on WM at Diagnosis and During Disease Course"

IWMM-6 SESSION-12 2010 : 105-106-YOUNG INVESTIGATOR AWARD

- 2 **Βραβείο καλύτερης Αναρτημένης Ανακοίνωσης**, 21^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 2010

E. Κουλιέρης, M-X Κυρτσώνη, T. Τζένου, Δ. Μαλτέζας, N. Καφάση, M. Δήμου, B. Μπάρτζη, Γ. Γεωργίου, L. Mirbahai, G. Mead, Γ. Πάγκαλης, Π. Παναγιωτίδης, A.R. Bradwell, S. Harding "Προσδιορισμός του επιπέδου των IgMκ και IgMλ στον ορό ασθενών με Μακροσφαιριναιμία του Waldenström (WM) στη διάγνωση. Κλινικοεργαστηριακές συσχετίσεις ". Περίληψη No 106

- 3 **Travel Grant Winner**, 16^ο Συνέδριο της Ευρωπαϊκής Αιματολογικής Εταιρίας (EHA), Λονδίνο Αγγλία 2011

E. Koulieris, V. Bartzis, T. Tzenou, N. Kafasi, A. Efthymiou, K. Mpitsanis, M. Dimou, G. Georgiou, D. Maltezas, P. Panayiotidis, M.C. Kyrtsonis : "Free Light Chain Clonal Escape Is Useful For Early Detection Of Relapse In Intact Immunoglobulin Multiple Myeloma ".

Hematologica (16th EHA Congress abstracts) 2011: abstract 899

- 4 **Υπότροφος του Ιδρύματος της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρίας για το έτος 2012-2013**

RESEARCH

Open Access

Ratio of involved/uninvolved immunoglobulin quantification by Hevylite™ assay: clinical and prognostic impact in multiple myeloma

Efstathios Koulieris¹, Panayiotis Panayiotidis¹, Stephen J Harding², Nikoleta Kafasi³, Dimitris Maltezas¹, Vassiliki Bartzis¹, Tatiana Tzenou¹, Maria Dimou¹, George Georgiou¹, Ladan Mirbahai², Arthur R Bradwell^{4*} and Marie-Christine Kyrtsou^{1*}

Abstract

Background: Hevylite™ is a new, recently developed method that facilitates separate quantification of the kappa- and lambda-bounded amounts of a given immunoglobulin (Ig). Using this method, we measured intact immunoglobulin (heavy/light chain; HLC) IgG-kappa, IgG-lambda, IgA-kappa, IgA-lambda individually, as well as their deriving ratios (HLCR) in a series of IgG or IgA multiple myeloma (MM) patients, to investigate and assess the contribution of these tests to disease evaluation.

Patients and methods: Hevylite™ assays were used in sera from 130 healthy individuals (HI) and 103 MM patients, at time of diagnosis. In patients, the level of paraprotein was IgG in 78 (52 IgG-kappa, 26 IgG-lambda) and IgA in 25 (13 IgA-kappa, 12 IgA-lambda). Durie-Salmon and International Staging System stages were evenly distributed. Symptomatic patients (n = 77) received treatment while asymptomatic ones (n = 26) were followed. Patients' median follow-up was at 32.6 months. HLCR was calculated with the involved Ig (either G or A) as numerator.

Results: In HI, median IgG-kappa was 6.85, IgG-lambda 3.81, IgA-kappa 1.19 and IgA-lambda 0.98 g/L. The corresponding median involving HLC values in MM patients were 25.8, 23.45, 28.9 and 36.4 g/L. HLC-IgG related to anemia, high serum free light chain ratio and extensive bone marrow infiltration, while high HLCR correlated with the same plus increased β 2-microglobulin. In addition, increased HLCR and the presence of immunoparesis correlated with time to treatment. Patients with high HLCR had a significantly shorter survival ($p = 0.022$); HLCR retained its prognostic value in multivariate analysis.

Conclusions: HLC and HLCR quantify the precise amount of the involved immunoglobulin more accurately than other methods; moreover, they carry prognostic information regarding survival in MM patients.

Keywords: Multiple myeloma, Prognosis, Serum immunoglobulin, Heavy/light chain measurements, HLCR

Introduction

Multiple myeloma (MM) is characterized by bone marrow (BM) plasma cell infiltration and the presence of serum/urine monoclonal immunoglobulin (Ig). Disease manifestations and behavior vary widely, while survival ranges from a few months to more than a decade.

Serum monoclonal Ig quantification is part of MM diagnostic criteria, and one of Durie and Salmon (DS) staging system's risk factors [1]. It is also used for monitoring response and relapse. However, MM aggressiveness is not related to the amount of Ig secretion, and newer staging systems did not retain Ig quantity as a risk parameter [2].

The poor utility of IgG and IgA measurements may be related to the following: 1) Changes in hematocrit and blood volume occur in MM leading serum Ig concentrations to vary by 50% or more, independently of changes in tumor production [3]; 2) Serum IgG concentrations

* Correspondence: A.R.Bradwell@bham.ac.uk; mck@ath.forthnet.gr

¹Haematology Section of 1st Department of Propedeutic Internal Medicine, Athens Medical School, Athens, Greece

⁴Department of Immunity and Infection, Medical School, University of Birmingham, Birmingham, UK

Full list of author information is available at the end of the article



are affected by variable clearance rates, so measurements do not reliably relate to tumor production. For example, IgG is recycled many times by neonatal Fc receptors (FcRn), therefore at normal serum concentration, its half-life is extended from 3 to 21 days. At higher IgG concentration, FcRn receptors are saturated, so IgG half-life is reduced [4]. Thus, clearance rates vary with different IgG levels. Similar arguments may apply to IgA measurements [5]. When measuring IgA, proteins such as transferrin can co-migrate in protein electrophoresis gels, contributing to falsely elevated results [6].

A new method was recently developed and validated for the separate quantification of the kappa- and lambda-bounded amounts of circulating IgG and IgA [7,8]. This was achieved by developing antibodies targeting unique junctional epitopes between the heavy and light chains of each Ig molecule. Immunoassay such as Hevylite™ using these antibodies as target has been manufactured for the analysis of Ig heavy/light chain (HLC) pairs. The aforementioned assay allows the quantification of the absolute value of the involved IgG κ , IgG λ , IgA κ and IgA λ separately, along with their deriving ratios (HLCR): IgG κ /IgG λ , IgG λ /IgG κ , IgA κ /IgA λ and IgA λ /IgA κ [7].

In paraproteinemias, the "classical" nephelometric quantification of total "intact" Ig comprises the paraprotein *per se*, and the remaining kappa- and lambda-bounded Ig of the same class. With the Hevylite™, if the involved Ig (iHLC) is calculated as a nominator, the ratio's (HLCR) denominator represents only polyclonal intact Ig of the same class (p-HLC), bounded to the "non-restricted" light chain; the nominator (iHLC) is made up of the monoclonal protein and the remaining polyclonal Ig of the same class and light chain restriction, the value of which is much closer to the exact paraprotein amount than otherwise. In addition, increased polyclonal suppression leads to HLCR elevation because of the denominator's reduction. The purpose of this study was to investigate the contribution of HLCs and their deriving ratios (HLCR) in a series of MM patients at diagnosis.

Patients and methods

A. Patients

103 patients characterized by the presence of heavy chain paraprotein and referred to herein as "intact" Ig MM patients, were studied at diagnosis. There were 46 women and 57 men with a median age of 67. Of these, 31%, 27% and 42% were in DS stage I, II and III respectively, and 36%, 30%, and 34% were stages 1, 2 and 3 by ISS [9]. Anemia (Hb < 10 g/L) was present in 25% of all patients, with renal failure (creatinine $\geq$ 2 mg/dl) in 11%, thrombocytopenia (PLT < 140 $\times$ 10⁹/L) in 13.5%, hypoalbuminaemia (alb < 3.5 g/L) in 20.8%,

hypercalcemia in 12.6% and increased LDH (above normal) in 7%. 26% of these patients presented severe bone disease (osteolyses with fractures) and 48% had an extensive BM plasma cell infiltration ($\geq$ 50%). Paraprotein type was determined by serum immunofixation, which was IgG in 78 patients (52 IgG κ , 26 IgG λ) and IgA in 25 (13 IgA κ , 12 IgA λ). Median total paraprotein level as routinely determined by nephelometry, which we called "total" paraprotein, was 31.78 g/L for IgG and 29.10 g/L for IgA at presentation. Median free light chain ratio (FLCR) was 9.44 in kappa-restricted patients and 19.62 in those who were lambda-restricted.

77 patients were already symptomatic or became symptomatic during follow up. Symptomatic patients were treated with conventional modalities. The 26 asymptomatic patients were only followed. Patients' median follow-up was for 32.6 months.

B. Methods

HLC were determined nephelometry on a Dade Behring BN II Nephelometer at the Binding Site laboratory in Birmingham, U.K. Polyclonal sheep antibodies (Hevylite™, Binding Site, U.K.) were used as described [6]. The HLCRs were calculated with the involved intact Ig as numerator, and the polyclonal intact Ig of the same class as denominator (IgG κ /p-IgG λ , IgG λ /p-IgG κ , IgA κ /p-IgA λ and IgA λ /p-IgA κ). Measurements were reproducible.

Frozen sera from the aforementioned 103 patients, drawn at the time of diagnosis, were retrospectively analyzed. In addition, HLC measurements performed in 130 healthy individuals (HI) were used for control values.

We called the presence of hypogammaglobulinemia of uninvolved Igs systemic immunoparesis (SI); it was defined using our laboratory lower cut-off values as IgG < 6.9 g/L and/or IgM < 0.34 g/L in IgA-patients and IgA < 0.88 g/L and/or IgM < 0.34 g/L in IgG-patients.

Immunoparesis of the same class (ISC) was defined as any p-HLC value below the 95th percentile range of p-HLCs in HI sera. Thus, IgG λ , IgG κ , IgA λ and IgA κ patients were considered to have ISC when their p-IgG κ , p-IgG λ , p-IgA κ and p-IgA λ were below 4.03 g/L, 1.97 g/L, 0.48 g/L and 0.38 g/L respectively.

"High" HLCR was defined as any value above median.

HLCs and HLCR values were compared with disease parameters such as beta2-microglobulin (β 2M), haemoglobin (Hb), serum albumin (alb), creatinine (cr), hypercalcemia, LDH, severe bone disease, serum free light chains (sFLC) and their ratio (sFLCR), bone marrow (BM) infiltration and survival.

Statistical analysis was performed using SPSS v15.0. Hazard ratios and the prognostic significance of "high" HLCR were determined by univariate Cox regression analysis. Kaplan Meier method was used for pictorial

representation of survival and time to treatment. Categorical variables were compared with the chi square test (χ^2).

All sera were obtained with informed consent and the use of frozen sera for the retrospective evaluation of HLCs was approved by the local ethical committee.

Results

Hevylite™ assays in HI

In 130 HI, IgG-kappa ranged from 4.03 to 9.78 g/L (median 6.85), IgG-lambda from 1.97 to 5.71 (median 3.81), IgA-kappa from 0.48 to 2.82 (median 1.19) and IgA-lambda from 0.36 to 1.98 (median 0.98). The ratio IgG-kappa/IgG-lambda ranged from 0.98 to 2.75 (median 1.87), the IgG-lambda/IgG-kappa from 0.37 to 0.893 (median 0.54), the IgA-kappa/IgA-lambda from 0.8 to 2.04 (median 1.27) and the IgA-lambda/IgA-kappa from 0.49 to 1.256 (median 0.79) (Table 1).

Hevylite™ assays in multiple myeloma patients at diagnosis

Median iHLC in IgG patients was 25.61 g/L; it ranged from 1.80 to 101 g/L (median 25.8) for iIgG-kappa, and from 2.27 to 86.3 g/L (median 23.45) for iIgG-lambda. Median iHLC in IgA patients was 34.9 g/L, ranging from 5.59 to 71.6 g/L (median 28.9) in iIgA-kappa and from 7.23 to 60.4 g/L (median 36.4) in iIgA-lambda patients, respectively. Corresponding correlations with total IgG and IgA were $r = 0.8$ and 0.9 . All patients had abnormal HLCR at diagnosis. The median HLCR in IgG-MM was 21.47, and 72.42 in IgA-MM.

Correlations between disease variables and HLC measurements

Involved HLC-IgG absolute values above median correlated with Hb ≤ 10 g/L ($p = 0.019$), BM infiltration $> 50\%$ ($p = 0.011$) and sFLCR above median ($p = 0.017$), while iHLC-IgA did not correlate to any disease parameters. "High" HLCR correlated with $\beta 2M > 3.5$ mg/L ($p = 0.024$), Hb ≤ 10 g/L ($p = 0.003$), BM infiltration $>$

50% ($p = 0.002$) and sFLCR above median ($p = 0.004$). SI was present in 76 out of 103 patients, ISC in 83/103 and both in 63/103.

Relationship between HLC measurements and time to progression

As expected, "high" HLCR correlated with time to treatment ($p < 0.001$) (Figure 1). This was indeed also the case for "total" paraprotein. ISC was also associated with shorter time to treatment ($p = 0.032$). The same was true for SI ($p = 0.002$). (Figure 2A & 2B).

Relationship between HLC measurements and overall survival

Disease variables with an adverse prognostic impact on survival were Durie and Salmon stage ($p = 0.046$), ISS stage ($p < 0.001$), $\beta 2M$ above 3.5 mg/L ($p < 0.001$), Hb ≤ 10 g/L ($p = 0.004$), platelet counts $\leq 140 \times 10^9/L$ ($p < 0.001$), alb < 3.5 g/L ($p = 0.015$), Cr > 2 mg/dL ($p < 0.001$), BM plasma cell infiltration $> 50\%$ ($p < 0.001$), sFLCR above median ($p = 0.022$) and "high" HLCR values ($p = 0.022$) (Figure 3). On the contrary, IgG and IgA paraprotein levels, HLC, SI, ISC and IgM levels, were not of any significance with regard to prognosis. In multivariate analysis, only platelet count, $\beta 2M$ and HLCR remained significant.

Discussion

In the present study the clinical utility of the new intact immunoglobulin heavy chain/light chain (Hevylite™) method was assessed in a series of "intact" Ig MM patients, studied from the time of diagnosis. Sex, age, stage groups and clinical manifestations were representative and equivalent to any other non-selected MM patients cohort, with the exclusion of light chain and non-secretory patients. Paraprotein quantification with Hevylite™ assays correlated with "total" Ig measurements, as expected; in addition, it revealed the exact amount of remaining polyclonal Ig of paraprotein class, as well as the patient's light chain restriction.

We showed here that iHLC-IgG related to parameters of disease activity, severity and tumor burden, including anemia, sFLCR and extensive bone marrow infiltration, while HLCR with the same plus increased $\beta 2M$. Usually, when such correlations are obtained with the aforementioned markers, relationship with prognosis is also found. In our study, this was proven true, and the ratio of involved/uninvolved Ig (HLCR) correlated with time to treatment, and most importantly with outcome; thus, patients with "high" HLCR had a significantly shorter survival. The improved prognostic information given by HLCR compared to "total" Igs probably relates to biased classical Igs measurement in some cases, as discussed

Table 1 HLC-IgG, -IgA and HLCR Results in 130 Healthy Individuals

	Median	95th Percentile range
IgG kappa (g/L)	6.85	4.03-9.78
IgG lambda (g/L)	3.81	1.97-5.71
IgG kappa/IgG lambda HLCR	1.87	0.98-2.75
IgG lambda/IgG kappa HLCR	0.54	0.37-0.893
IgA kappa (g/L)	1.19	0.48-2.82
IgA lambda (g/L)	0.98	0.36-1.98
IgA kappa/IgA lambda HLCR	1.27	0.80-2.04
IgA lambda/IgA kappa HLCR	0.79	0.49-1.256

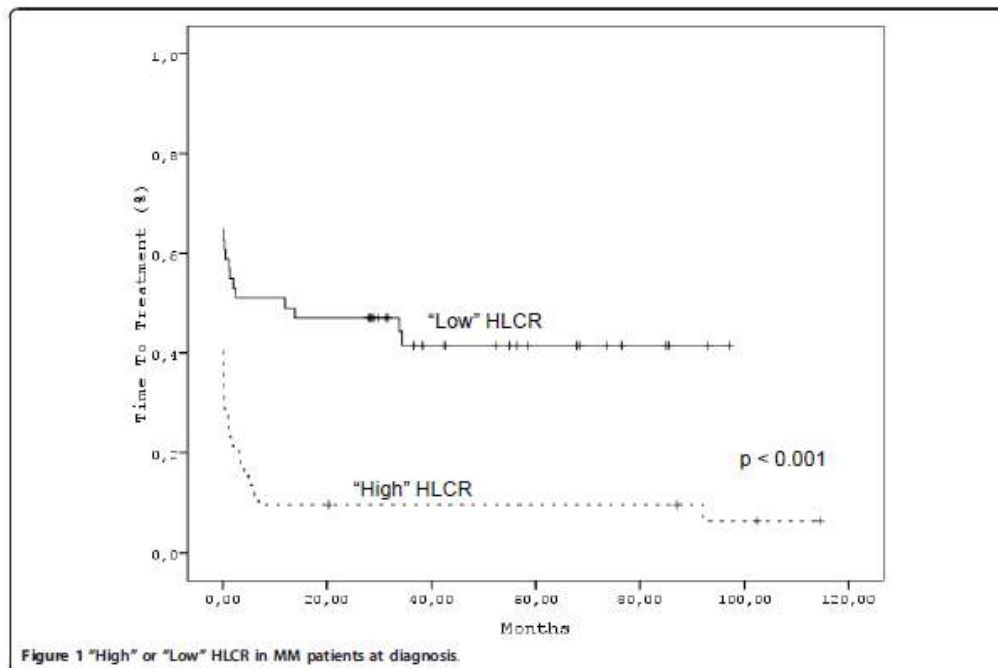


Figure 1 "High" or "Low" HLCR in MM patients at diagnosis.

earlier; also because polyclonal, non-tumour Ig are included in "total" Ig quantification. HLCR importance for progression free survival was recently reported by others [10]. We additionally confirmed that polyclonal immunosuppression (in the form of systemic immunoparesis or immunoparesis of the same class or both) was related to time to treatment [11]; although it had no impact on overall survival. The importance of IgM with regard to survival was recently reported by Perosa *et al* [12]; nevertheless, IgM levels determined by conventional method did not carry any prognostic information in this series.

Myeloma cells from individual bone marrow biopsies can produce either "intact" immunoglobulins, free light chains, or both [13], allowing presumption that the prognostic information provided by the new M-component-based markers (FLC and HLC) could be complementary; however, in this study, sFLCR and HLCR strongly correlated and their respective prognostic power was equivalent.

Both albumin and beta₂-microglobulin (β_2 M) are linked to IgG metabolism via FcRn molecules. β_2 M is the light chain component of the heterodimeric FcRn receptor, while albumin is recycled via the same molecule [7]. We speculate that some of the clinical utility of

albumin and β_2 M in the ISS may be linked to IgG metabolism. In our study, HL IgG was related to albumin but not to β_2 M, although "high" HLCR correlated with increased β_2 M.

Other disease parameters with an adverse prognostic impact in this series were, as expected [2], ISS stage [9], FLCR above median [14], β_2 M above 5.5 mg/L [15], albumin below 3.5 g/L [16], haemoglobin below 10 g/L, platelet counts below $140 \times 10^9/L$ [17], serum creatinine above 2 mg/L [18] and extensive BM plasma cell infiltration. Significantly, in multivariate analysis only platelets, β_2 M and HLCR retained their statistical significance.

In conclusion, we provide evidence that HLCR values correlate with adverse markers and are themselves independently prognostic in patients with MM. Thus, by having the quadruple advantage of determining separately the kappa- and lambda-bounded amounts of circulating IgG and IgA, of assessing the light chain restriction as well as the depth of suppression of the polyclonal Ig of the same and of the uninvolved class, and of contributing to prognostication, the new intact Ig HLC assay, Hevylite™, may conceivably replace "classical" total Ig quantitative measurements in the future. Retrospective and prospective

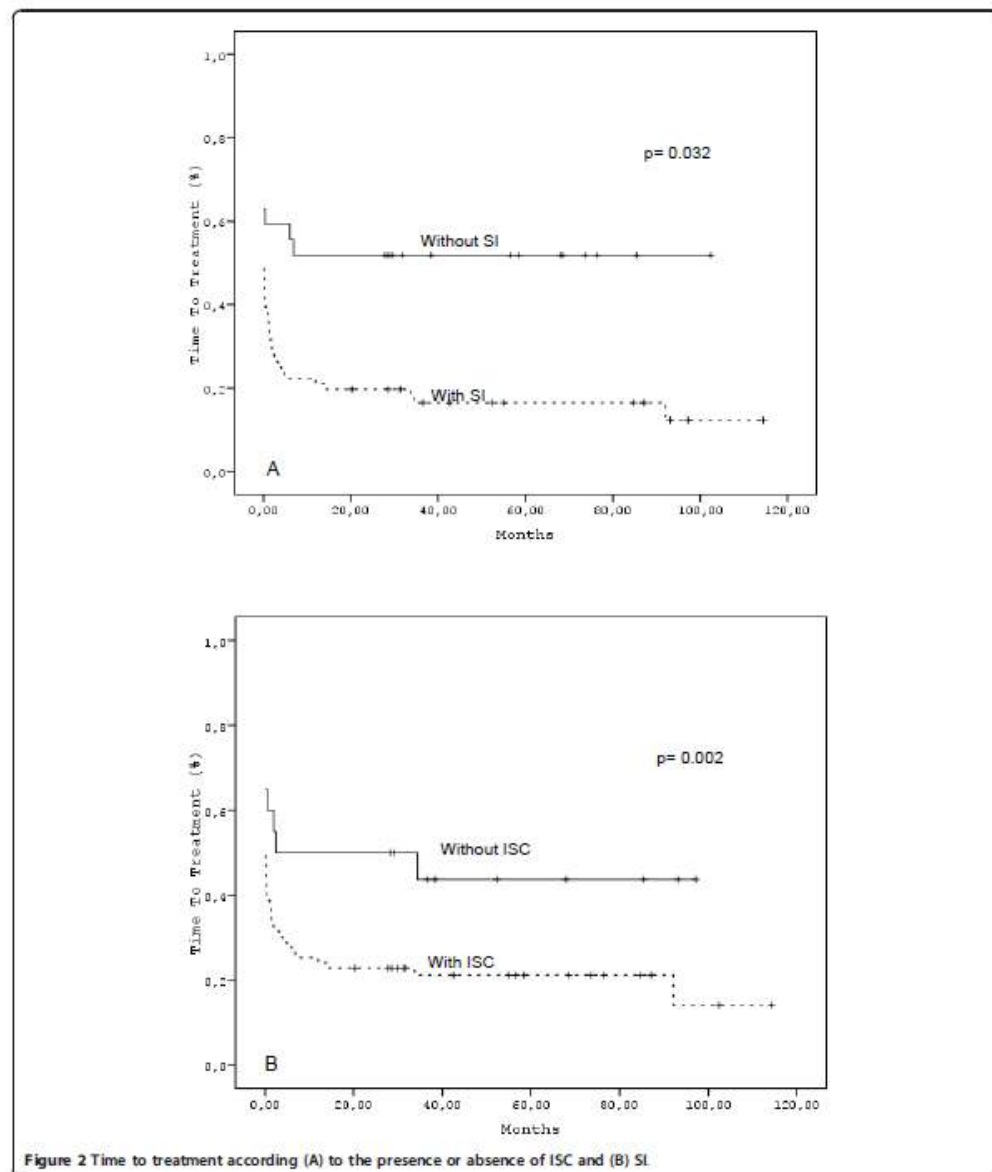


Figure 2 Time to treatment according (A) to the presence or absence of ISC and (B) SI

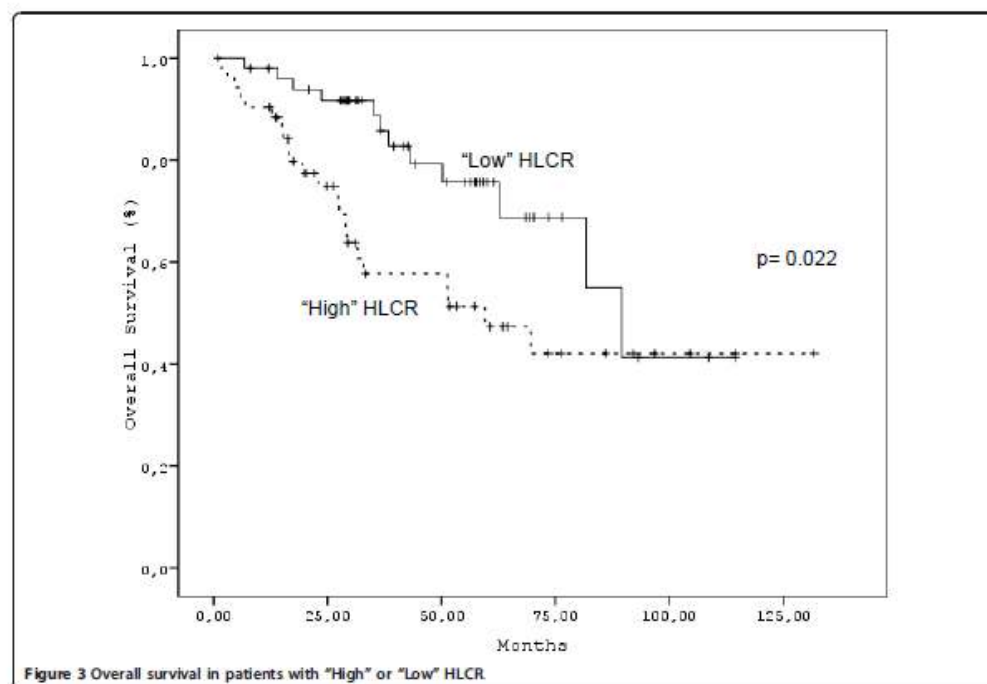


Figure 3 Overall survival in patients with "High" or "Low" HLCR.

analyses of larger patient cohorts are necessary for further validation.

Acknowledgements

We wish to thank The Binding Site Ltd, for having graciously conducted all HLC measurements, and to Mrs. Irini Rissaki for her technical support.

Author details

¹Haematology Section of 1st Department of Propedeutic Internal Medicine, Athens Medical School, Athens, Greece. ²The Binding Site Group Ltd, Birmingham, UK. ³Department of Immunology and Histocompatibility, Laikon University Hospital, Athens, Greece. ⁴Department of Immunology and Infection, Medical School, University of Birmingham, Birmingham, UK.

Authors' contributions

Contribution: EK provided the clinical samples, reviewed patients' files and wrote the paper. M-CK followed patients, wrote the manuscript, provided the clinical samples, and supervised the study. SJH analysed the data and wrote the manuscript. DM analysed the data and co-authored the manuscript. NK supervised total Igs and FLC measurements in Greece and co-authored the manuscript. VB, TT, MD and GG followed patients, PP followed patients, provided facilities for sample storage and co-authored the paper. LM analysed the data. A/RB wrote the manuscript and developed the study hypothesis. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

A/RB is a director and shareholder of The Binding Site Ltd. S.J.H. and L.M. are employees of Binding Site. EK, DM, NK, VB, TT, MD, GG, PP and MCK declare that they have no competing interests.

References

1. 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.
2. Kyrtonis M-C, Maltezas D, Tzenou T, Koulieris E, Bradwell AR: Staging systems and prognostic factors as a guide to therapeutic decisions in multiple myeloma. *Semin Hematol* 2009, **46**:110-117.
3. Alexanian R: Blood volume in monoclonal gammopathy. *Blood* 1977, **49**:301-307.
4. Kim J, Hayton W, Robinson J, Anderson C: Kinetics of FcRn-mediated recycling of IgG and albumin in humans: Pathophysiology and therapeutic implications using a simplified mechanism-based model. *Clin Immunol* 2007, **122**:146-155.
5. Wines BD, Hogarth PM: IgA receptors in health and disease. *Tissue Antigens* 2006, **68**:103-114.
6. Bradwell AR, Harding SJ, Fournier NJ, Wallis G, Dayson M, Hugh D, et al: Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurements of individual immunoglobulin κ/λ ratios. *Clin Chem* 2009, **55**:1646-1655.
7. Bradwell AR: *Serum Free Light Chain Analysis (Plus Hxlyte)*. 6 edition. Birmingham, UK: The Binding Site Ltd; 2010.
8. Keren DF: Heavy/Light-Chain Analysis of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009, **55**:1606-1608.
9. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al: International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005, **23**:412-420.
10. Avert-Loiseau H, Harousseau JL, Moreau P, Mathiot C, Facon T, Attal M, et al: Heavy/light chain specific ratios at presentation are prognostic for progression-free survival in the IFM 2005-01 myeloma trial. [Abstract]. *Blood* 2009, **114**:1818.

11. Avez-Louiseau H, Mirbahai L, Harousseau JL, Moreau P, Mathiot C, Facon T, et al: Serum immunoglobulin heavy/light chain ratios are independent risk factors for predicting progression free survival in multiple myeloma. [Abstract]. *Hematologica* 2010, **95**(Suppl 1):395.
12. Perosa F, Minija C, Favoino E, Prete M, Dammacco F: Staging multiple myeloma patients with active disease using serum levels of beta2m-free HLA class I heavy chain together with IgM or platelet count. *Blood Cells Mol Dis* 2010, **42**:71-76.
13. Ayliffe MJ, Davies FE, Castro D, Morgan G: Demonstration of changes in plasma cell subsets in multiple myeloma. *Haematologica* 2007, **92**:135-138.
14. Kyrtonis MC, Vassilekopoulos TP, Kafasi N, Sachanas S, Tzenou T, Papadogiannis A, Galanis Z, et al: Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007, **137**:240-243.
15. Bettini R, Redaelli S, Maino C, Bertoni S, Costantini C, Lazzarini A, et al: Prognostic value of serum beta-2 microglobulin in multiple myeloma. *Recent Prog Med* 2005, **96**:81-85.
16. Simonsson B, Kallander CF, Bienen G, Kilander A, Gronowicz JS, Bergstrom R: Biochemical markers in multiple myeloma: a multivariate analysis. *J Haematol* 1988, **69**:47-53.
17. Cavo M, Galieni P, Zuffa E, Baccarani M, Gobbi M, Tura S: Prognostic variables and clinical staging in multiple myeloma. *Blood* 1989, **74**:1774-1780.
18. Eleuterakis-Papalakou V, Bamias A, Gika D, Simeonidis A, Pouli A, Anagnostopoulos A, et al: Renal failure in multiple myeloma: incidence, correlations and prognostic significance. *Leuk Lymphoma* 2007, **48**:337-341.

doi:10.1186/2162-3619-1-9

Cite this article as: Koulieris et al: Ratio of involved/uninvolved immunoglobulin quantification by Hevylite™ assay: clinical and prognostic impact in multiple myeloma. *Experimental Hematology & Oncology* 2012 **1**:9.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Novel M-Component Based Biomarkers in Waldenström's Macroglobulinemia

Xavier Leleu,¹ Efstathios Koulieris,² Dimitrios Maltezas,² Raphael Itzykson,⁴
Wanling Xie,³ Salomon Manier,¹ Remy Dulery,¹ Eileen Boyle,¹
Jordan Gauthier,¹ Stéphanie Poulain,¹ Tzenou Tatiana,² Panayiotis Panayiotidis,²
Arthur R. Bradwell,⁵ Stephen Harding,⁶ Veronique Leblond,⁴
Marie-Christine Kyrtsionis,² Irene M. Ghobrial³

Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia, Vol. 11, No. 1, 164-167, 2011; DOI: 10.3816/CLML.2011.n.039

Abstract

Waldenström's macroglobulinemia (WM) is an indolent B-cell lymphoma of the lymphoplasmacytic type accompanied by a serum IgM component. However, conventional IgM quantification lacks sensitivity, does not precisely reflect tumor burden of WM, and, although being the main marker for monitoring response to treatment, may not be accurate. New serum M-component based biomarkers were developed for routine practice in recent years, such as the Freelite® test and more recently the Hevlyte test®. Studies have shown that Freelite was a prognostic marker for time to treatment in WM that helps monitoring disease response or progression. Hevlyte measures IgMkappa and IgMlambda, separately, and might provide true quantitative measurement of the IgM M-spike. Although current data are preliminary, Hevlyte® might replace the current technique to measure IgM M-spike in the years to come. We summarize herein studies conducted to delineate the role of these tests in WM.

Introduction

Waldenström's macroglobulinemia (WM) is an indolent B-cell lymphoma of the lymphoplasmacytic type accompanied by a serum IgM component. Although quantified IgM is a compelling marker of WM, its resolution on serum protein electrophoresis (SPEP) can make accurate measurement difficult. The same applies to total IgM quantification by nephelometry which inherently includes monoclonal and polyclonal immunoglobulins. IgM levels by either technique do not accurately reflect tumor load or prognosis in WM. There is a need to identify new markers that reflect disease burden and correlate with patients' outcome. The diagnostic and prognostic potential of other serum M-component based biomarkers such as the Freelite® test or the most recent Hevlyte test® are under investigation. We summarized herein studies conducted to delineate the role of these tests in WM.

Patients and Methods

Patient characteristics in existing studies on Freelite and Hevlyte assays in WM are summarized in Table 1.

The serum free light chain assay (sFLC; Freelite® test, the Binding Site, Birmingham, UK) is a nephelometric measurement of kappa and lambda light chains that circulate as light chain monomers or dimers and that are not bound to immunoglobulin heavy chain.¹⁻³

The serum Hevlyte® immunoassay (the Binding Site) is based on specific polyclonal antibodies that recognise epitopes spanning the junction of the heavy and light chains of the individual immunoglobulin isotypes. The serum IgG and IgA Hevlyte assays have been reported to be more sensitive than serum protein electrophoresis (SPEP) and nephelometry for identifying and quantifying monoclonal immunoglobulins.⁴⁻⁵ The serum IgM Hevlyte assay measures specifically IgMkappa and IgMlambda, separately.⁶ A normal range of IgM Hevlyte assay was produced from normal (blood donor) sera, median (and 95-percentile ranges) were: IgMkappa, 0.634 g/L (0.29-1.82); IgMlambda, 0.42g/L

¹Service des Maladies du Sang, Hôpital Hurter, CHRU, Lille, France

²First Department of Propedeutic Internal Medicine and Hematology, Laikon University hospital, Athens, Greece

³Department of Medical oncology, Dana-Farber Cancer Institute and Harvard Medical School Boston, MA

⁴Service d'Hématologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, APHP, Paris, France

⁵Departments of Immunity and Infection, Medical School, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham B15 2TT, UK

⁶The Binding site, Birmingham, UK

Address for correspondence: Irene M. Ghobrial, MD, Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, 02115

Fax: 617-632-4862; e-mail: irene_ghobrial@dfci.harvard.edu

Marie-Christine Kyrtsionis, MD, First Department of Propedeutic Internal Medicine and Hematology Laikon University Hospital, Agiou Thoma 17, 11527 Athens, Greece
E-mail: mckgath.forthnet.gr

2152-2650/\$ - see frontmatter

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.



The summary may include the discussion of investigational and/or unlabeled uses of drugs and/or devices that may not be approved by the FDA.
Electronic forwarding or copying is a violation of US and International Copyright Laws.
For authorization to photocopy items for internal or personal use, visit www.elsevier.com/permissions.

Table 1 Summary of Results in Studies That Have Studied Freelite Assay and Hevylite Assay in Waldenstrom Macroglobulinemia		
Study	N	Main Findings
Freelite® Assay		
Leleu et al ⁷	72 (15 at diagnosis and 57 at relapse/refractory)	- Median value sFLC WM > IgM MGUS - Correlation with poor prognostic markers (high b2m, high IgM, anemia) - Median value sFLC higher in High Risk IPSS-WM, as compared to intermediate and low risk IPSS groups
Itzykson et al ¹⁰	42 at diagnosis	- Correlation with prognostic markers (high b2m, low Albumin) - Median value sFLC WM symptomatic > asymptomatic WM - High sFLC values predict for shorter time to treatment
Kyrtsos et al ⁹	29 at diagnosis	- Correlation with prognostic markers (high b2m, Anemia)
Leleu et al ⁸	48 (26 at diagnosis and 37 at relapse/refractory)	- sFLC values marker of response and progression - sFLC value predict for early response and progression
Maltezas et al ¹¹	44 at diagnosis (33 requiring treatment of whom 16 with sequential follow-up measurements received as front-line)	- High sFLC value predict for shorter time to treatment - sFLC > 60 mg/L correlated at diagnosis with shorter overall survival
Hevylite® Assay		
Koulieris et al ¹³	43 at diagnosis (37 WM, 6 IgM-MGUS) (29 WM requiring treatment of whom 9 with sequential follow-up measurements received as front-line)	- Hevylite levels higher in WM/IgM-MGUS - Hevylite levels higher in WM symptomatic/asymptomatic WM - Hevylite level > median predict for shorter time to treatment - Hevylite level > median, b2M > 5.5 mg/L and elevated LDH at diagnosis contributed to a model highly predictive for survival (Figure 1)
Manier et al ¹²	59 (44 at diagnosis and 15 at relapse/refractory)	- Hevylite level correlated well with markers of tumor burden and of poor prognosis - Hevylite level higher in the high risk IPSS group - Hevylite levels higher in WM symptomatic/asymptomatic WM - High Hevylite level in progressing patients

Abbreviations: MGUS = monoclonal gammopathy of undetermined significance; MCL = mantle cell lymphoma

(0.17-0.94); IgMkappa/IgMlambda ratio, 1.6 (0.95-2.3). For ease of comparison IgM hevylite ratios were expressed as the involved monoclonal immunoglobulin/uninvolved polyclonal immunoglobulin (IgMi HLR).

Measurement of the serum IgM M-protein was done using either SPEP or nephelometry.

Results

Range for Freelite

The median (range min-max) reported values of sFLC were 36 mg/L (16-140),⁷ 103.5 mg/L (22.5-3540),⁸ and 36.6 mg/L (6.6-825) and 47.6 mg/L (10.5-498) in kappa and lambda WM patients respectively.⁹ Involved sFLC level was found by others elevated and was > 80 mg/L in 83% and 28% of patients requiring or not treatment, respectively.¹⁰ Importantly, the sFLC level was not related to the M-component level ($P = .89$), and is not simply a surrogate of the M-component value.¹⁰ The sFLC also accurately differentiated patients with IgM MGUS compared to WM, 20 mg/L (16-33) vs. 36 mg/L (16-140), respectively ($P = .0003$).⁷

The Involved sFLC, a Reliable Marker

At least 2 studies have shown that involved sFLC was not inferior to the difference between involved and uninvolved (not clonal) sFLC and was preferred to the ratio of involved to uninvolved sFLC.^{8,10}

Correlation of sFLC With Tumor Burden

Leleu et al⁷ showed in a logistic regression model a significant

association of sFLC with elevated b2m (beta-2 microglobulin) and IgM level > 40g/L, with 25% vs. 66% of patients with high sFLC in b2m ≤ 3 mg/L vs. > 3 mg/L (OR = 3.3; $P = .03$). Interestingly, modeling results also demonstrated significant association of sFLC with b2m, and anemia when they applied the WM-IPSS cut-offs. Itzykson et al confirmed that the sFLC level was higher in patients with b2m > 3 mg/L ($P = .03$) or with albumin < 35 g/L ($P = .04$).¹⁰ In agreement, Kyrtsos et al found that sFLC correlated with b2m and anemia.⁹

Symptomatic patients had higher median sFLC values, 59.4 mg/L vs. 32.0 mg/L if asymptomatic, $P = .046$.¹⁰ However, it was similar for previously treated and untreated patients.⁷ Median sFLC values were higher in high-risk WM-IPSS sub-groups, 32, 37, and 95, in low, intermediate, and high-risk, respectively ($P = .05$).⁷

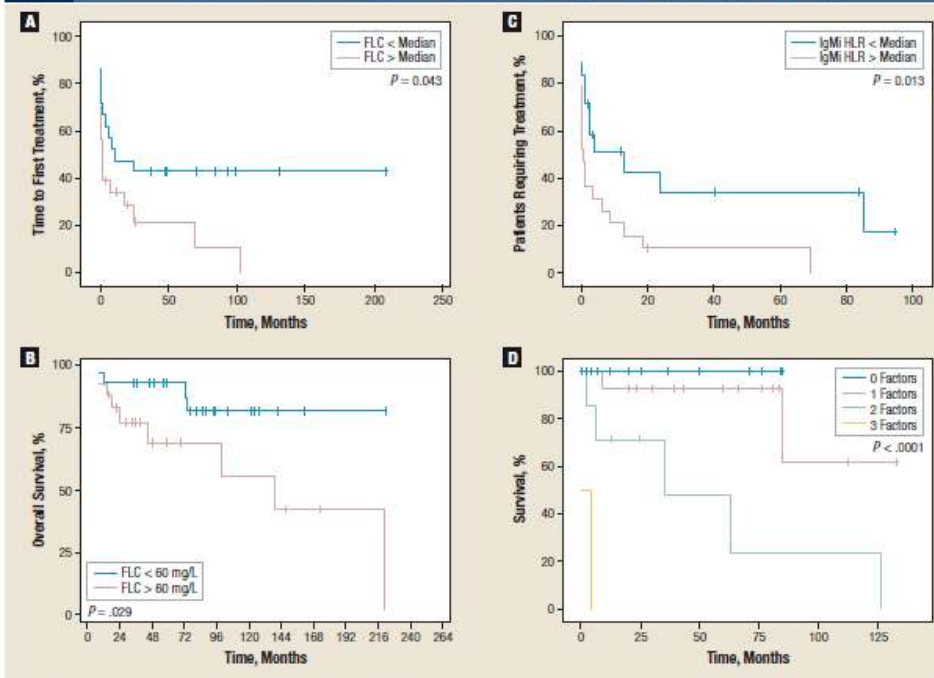
sFLC Values Predict for Time to Treatment (TTT)

Two studies have demonstrated that sFLC level influenced negatively and independently TTT ($P = .006$) in patients with symptomatic and asymptomatic WM.^{10,11} The treatment started in a median of one year after diagnosis if the sFLC value was over > 80 mg/L.¹² Similar results showed that sFLC > 60 mg/L correlated well with TTT ($P = .044$)¹¹ (Figure 1 Panel A). Maltezas et al also showed that sFLC > 60 mg/L correlated at diagnosis with overall survival¹¹ (Figure 1 panel B).

sFLC as Marker of Response

Leleu et al have recently presented that involved sFLC response occurred in 79% patients vs. 60% based on protocol criteria in

Figure 1 Survival and Time to Treatment According to Freelite Test (panel A and B) and to Hevlyte Test (panel C and D)



(A) sFLC values predict for time to treatment (TTT). (B) Survival according to sFLC < or > 60 mg/L. (C) IgMi HLR predict for TTT. (D) Survival according to presence of 0, 1, 2, or 3 factors: IgMi HLR > median, b2m > 5.5 mg/L, abnormal LDH.

WM patients (kappa concordance = 0.38).⁸ Interestingly, the median time to sFLC response was one month shorter compared to the median time to IgM response, 2.1 months vs. 3.0 months ($P = .07$), respectively. The authors also showed that attaining an early response (response within 2 months after therapy initiation) using sFLC could be a predictor of overall response to therapy, but did not correlate strongly with time to progression. In this study, among patients who had an IgM response, 46% had an early sFLC response vs. 8% in non-IgM responders.

sFLC as Marker of Progression

The median time to progression was also earlier by use of sFLC (progression if sFLC > 25%) as per M-component level increase, 13.7 months and 18.9 months (Kappa = 0.63).⁵

Previous studies have described a transient increase in M-spike that has occurred post-treatment with rituximab, called "flare", that may require specific treatment in rare patients. Leleu et al. confirmed the existence of a flare by sFLC in post-rituximab therapy that did not correlate to a lack of response or a shorter time to progression. However, these results also confirmed that sFLC can not replace IgM to differentiate progression from flare when patients are treated with rituximab therapy.

Hevlyte, a New Marker

The median (range min-max) IgMi HLR was 90.88 (1.91-1000)¹² and 104 (3.61-15000)¹³ in WM patients, vs. 14 (1.08-75.62) in IgM-MGUS ($P = 0.013$).¹³ The IgMi HLR correlated well with the M-spike measured using SPEP ($r = 0.601$, $P < .0001$).¹² Koulieris et al also reported a good correlation between summated IgMκ + IgMλ and total IgM ($r = 0.832$, $P < .0001$).¹³

High IgMi HLR correlated well with markers of high tumor burden and of poor prognosis. The median IgMi HLR was higher in the high risk IPSS group (208) than in the intermediate and low-risk groups, (75 and 98, respectively; $P = .033$).¹² The median IgMi HLR was also significantly higher in the 27 progressing symptomatic patients, 210 vs. 60 in the 32 asymptomatic patients, respectively ($P = .014$; Figure 1 panel C). Koulieris et al reported similar data, with median IgMi HLR significantly higher in WM patients requiring treatment ($n = 29$) than in patients not requiring treatment ($n = 8$; 236 vs. 17.4; $P = .029$). Furthermore, it correlated with BM infiltration ($P = .029$) and time to treatment ($P = .013$).¹³ Koulieris et al proposed a risk stratification model utilizing IgMi HLR > median, b2m > 5.5 mg/L and abnormal LDH values, that identified 3 prognostic groups with respect to survival ($P < .0001$; Figure 1 panel D).

Although preliminary, Hevylite was a marker of response and might help to accurately monitor progression of WM. Moreover, Kouliris et al have shown that in one WM patient, who flared during treatment with rituximab, only the involved monoclonal immunoglobulin increased, and subsequently IgMi HLR.

Conclusion

New serum M-component based biomarkers are under investigation in WM; Freelite and Hevylite tests look promising. The former is very sensitive and provide earlier appreciation of the response status of the patients, and the latter might become the reference technique to monitor the IgM M-spike protein in years to come.

References

1. Bradwell AR, et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001; 47:673-80.
2. Mead GP, et al. Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004; 126:348-54.
3. Dispenzieri A, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009; 23:215-24.
4. Bradwell A, et al. Serum free-light chain analysis (plus hevylite). ed. T.B.S. Ltd. 2010; Birmingham, UK: 304-5.
5. Keren DF. Heavy/Light-chain analysis of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009; 55:1606-8.
6. Fourier NJ, et al. Nephelometric immunoassay measurements of IgMK and IgML for the assessment of patients with IgM monoclonal gammopathies. (abs. 120a). *Clin Chem* 2010; 56.
7. Leleu X, et al. Serum immunoglobulin free light chain correlates with tumor burden markers in Waldenström macroglobulinemia. *Leuk Lymphoma* 2008; 49:1104-7.
8. Leleu X, et al. The role of serum immunoglobulin free light chain in response and progression in Waldenström Macroglobulinemia. *Blood* 2010; 116: (abstract 3095).
9. Kyrtsonis M, et al. Serum free-light chains in Waldenström's macroglobulinemia (WM) patient at diagnosis. *Haematologica* 2008; 93:418 (abstract 1057).
10. Izykson R, et al. Serum-free light chain elevation is associated with a shorter time to treatment in Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica* 2008; 93:793-4.
11. Maltezas D, et al. Clinical Impact of Increased Serum Free Light Chains (sFLCs) or their Ratio (FLCR) in WM at diagnosis and during disease course. Proceeding of the 6th International Workshop on Waldenström's macroglobulinemia. Venice 6-10/10/2010; 105.
12. Manier S, et al. IgM Hevylite® accurately measured serum IgM M-spike level in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2010 (personal data, unpublished).
13. Kouliris E, et al. Quantification of serum IgMK and IgML in patients with Waldenström's macroglobulinemia (WM) at diagnosis and during disease course: clinical correlations. *Blood* 2010; 116: (abstract 3004).

Prognostic Contribution of the New Immunoglobulin (Ig) Biomarkers (Freelite™ and Hevylite™) in Waldenstrom's Macroglobulinemia (WM)

M.C. Kyrtsonis^{1*}, E. Koulieris^{1,2}, D. Maltezas¹, T. Tzenou¹, S. Harding¹, E. Kastiris¹,
N. Kafassi¹, V. Bartzis¹, A. Efthymiou¹, K. Bitsanis¹, M. Gavriatopoulou¹, E. Terpos¹,
C. Kalpadakis¹, M. K. Angelopoulou¹, T. P. Vassilakopoulos¹, A. R. Bradwell³,
Ph. Beris¹, G. A. Pangalis¹, P. Panayiotidis¹, M. A. Dimopoulos²

¹Haematology Unit of First Dpt of Propaeutic Internal Medicine and Haematology Clinic, Athens Medical School Greece, Laikon Hospital

²Dpt of Therapeutics Alexandra Hospital, Athens Medical School, Greece

³The Binding Site Group Ltd PO Box 11712 Birmingham, B14 4ZB UK

⁴Dpt of Immunology, Laikon Hospital, Athens

⁵Dpt of Immunity and Infection Medical School University of Birmingham Edgbaston Birmingham, B15 2TT UK

Abstract Clinical utility of serum free light chains (sFLC) and heavy chain (HLC) IgM were assessed, using Freelite and Hevylite assays in 70 WM patients. The result showed that median involved (i) sFLC -kappa and -lambda were 45.6 and 78.3mg/L respectively; median sFLC (kappa+lambda) was 67.4 mg/L. While, median FLCR (involved/uninvolved FLC ratios) were 2.7 and 6.9 in kappa- and lambda- restricted patients respectively. Moreover, increased iFLC, sFLC (kappa+lambda) and FLCR were correlated significantly with shorter time to first treatment (TFT) and adverse survival (OVS). Median IgM-kappa and IgM -lambda were 25.4 and 34.8g/L respectively; median HLCR (involved/uninvolved HLC ratios) were 185.5 and 101.9 in kappa- and lambda- restricted patients respectively. In addition, the increased iHLC and HLCR correlated significantly with shorter TFT. Hence, sFLC and HLC measurements appeared to be both prognostic in WM.

Keywords: Waldenstrom's Macroglobulinemia, IgM Quantification, Freelite™, Hevylite™, Monitoring, Prognosis

1. Introduction

Waldenstrom's macroglobulinemia (WM) is an indolent B cell lymphoproliferative disease, characterized by lymphoplasmacytic infiltration of the bone marrow (BM), lymph nodes or other organs accompanied by serum monoclonal immunoglobulin IgM production[1-3]. It is classified as a separate entity of the lymphoplasmacytic lymphoma type in the WHO classification[4]. Twenty-five to forty percent of patients are asymptomatic and do not need treatment, at least until disease progression, while the majority presents a wide clinical spectrum including fatigue, hyperviscosity manifestations, lymphadenopathy, organomegaly, recurrent infections, peripheral neuropathy and other, as well as varying laboratory findings such as anemia or other cytopenias, blood lymphocytosis,

hypoalbuminemia, autoimmune manifestations, increased β_2 -microglobulin (β_2 -M) and LDH, polyclonal hyper- or more frequently hypo-gammaglobulinemia, independently of IgM levels[5-8]. As a consequence of disease variability, survival ranges from 60 to 120 months. Symptomatic patients should be treated. Response to treatment is evaluated by the regression of signs and symptoms and the decrease of monoclonal IgM serum levels; serum IgM fluctuations is used for disease monitoring[9]. Thus IgM detection, including quantification by serum protein electrophoresis, densitometry and immunofixation, is mandatory for diagnosis and monitoring of WM patients. The accuracy of the tests depends upon the position of the migrating monoclonal protein, the quantification of which requires skilled personnel[10-12]. Furthermore, user operator error may account for unexpected results particularly at low concentration.

New methods for paraprotein free light and heavy chain quantification were recently developed and manufactured [13]. The serum free light chain assay (sFLC, Freelite™ test, the Binding Site, Birmingham, UK) is a decade old by now.

* Corresponding author:

mck@ath.btfnet.gr (M.C. Kyrtsonis)

Published online at <http://journal.sciencepub.org/ajmms>

Copyright © 2012 Science & Academic Publishing. All Rights Reserved

Using antibodies that bind exclusively to the hidden FLC molecules, it allows sensitive nephelometric quantification of circulating unbound serum kappa and lambda light chains. sFLC measurements as well as the resultant FLC ratio (sFLCR) proved to be of clinical and prognostic utility in plasma cell dyscrasias[13-17] and also in B-cell lymphoproliferative disorders including chronic lymphocytic leukemia[18-20].

The most recent Hevlyte™ immunoassay uses antibodies that target unique junctional epitopes between the heavy and light chains of each Ig molecule and determines immunoglobulin heavy chain/light chain (HLC) pairs[10,21]. The serum IgM Hevlyte assay has been very recently released on the market; it specifically quantifies IgMkappa and IgMlambda separately allowing the calculation of the deriving ratios (HLCR: IgMkappa/IgMlambda and vice versa)[21].

Immunoglobulin (Ig) quantification by Freelite™ and Hevlyte™ assays overcome some of the technical bias, while in addition they allow a much closer evaluation of the absolute value of the monoclonal intact and free component. Likewise when, for example, the monoclonal component is IgM-kappa, classical IgM measurements include the monoclonal IgM-kappa along with the remaining polyclonal IgM-kappa and the polyclonal IgM-lambda; Freelite™ measurement quantifies the monoclonal free kappa (monoclonal and polyclonal) light chain and separately the polyclonal free lambda light chain and Hevlyte™ assay determines the monoclonal IgM-kappa along with the remaining polyclonal IgM-kappa while the polyclonal IgM-lambda is quantified separately.

In the present study, we evaluated the contribution of the new Ig biomarkers (Freelite™ and Hevlyte™) in patients with WM.

2. Materials and Methods

2.1. Patients Selection

Seventy WM patients diagnosed and followed in 2 Hellenic centers were included in the study with their characteristics as shown in Table 1.

They were 33 women and 37 men with a median age 66 years. Forty-four, 28 and 28 were in WM-IPSS[22] stage 1, 2 and 3 respectively. Anemia (Hb < 10g/L) was present in 29% of the patients, thrombocytopenia (PLT < 140x10⁹/L) in 13%, and blood absolute lymphocytosis (Lymphocytes > 4x10⁹/L) in 13%. Hypoalbuminemia (serum albumin < 3.5 g/dL) was present in 22% and increased LDH (above normal) in 16%. Twenty-two percent of patients had high levels of β₂-M (≥ 5.5 mg/L) while in 43% an extensive BM lymphoplasmacytic infiltration (≥ 50%) was found. Splenomegaly was present in 13% and lymphadenopathy in 17% of our patients. Paraprotein by serum immunofixation were IgM-kappa in 52 patients and IgM-lambda in 18 patients. Median IgM paraprotein level at presentation as routinely determined by

nephelometry was 24.55 g/L (range 1.5-110), median IgG 8.83 g/L (range 1.96- 47.50) and median IgA 0.93 g/L (range 0.22-10.9).

Fifty-one patients (73%) were or became symptomatic during follow up and received treatment according to the international criteria for treatment initiation. The 19 asymptomatic patients (27%) were only followed. Patients' median follow-up was 47 months (range 0.5-155 months).

Table 1. Patients' characteristics

Number of patients	70
Sex M/F	37/33
Median age	66 years (range 44-93)
Median follow-up	47 months
Disease Characteristics	%
Lymphadenopathy	17
Splenomegaly	13
Symptomatic	68
WM-IPSS stage	
1	44
2	28
3	28
Hb < 10 g/L	29
PLT < 140x10 ⁹ /L	13
Lymphocytes > 4x10 ⁹ /L	13
alb < 3.5 g/dL	22
LDH above normal	16
β ₂ M ≥ 5.5 mg/L	40
β ₂ M ≥ 5.5 mg/L	22
Immunofixation	
IgM-kappa	74
IgM-lambda	26
BM lymphoplasmacytic infiltration (≥ 50%)	43

2.2. Sample Collection and Data Generation

Frozen sera collected from the 70 WM patients at the time of diagnosis and from 120 blood donor healthy individuals (HI) were retrospectively analyzed using polyclonal sheep antibodies (Freelite™ and Hevlyte™, Binding Site, UK). HLCs measurements were performed by nephelometry on a Dade Behring BN™II nephelometer at the Binding Site laboratory in Birmingham. sFLCs measurements were also performed on a Dade Behring BN™II nephelometer either at the Binding Site laboratory or at the Laikon's Immunology laboratory, using Freelite™ assay, according to the manufacturer's instructions.

The FLCRs were calculated with the involved sFLC as numerator. The HLCRs were calculated with the involved intact Ig as numerator and the polyclonal intact Ig of the same class as denominator, meaning that the ratio was calculated as IgM-kappa/IgM-lambda and IgM-lambda/IgM-kappa in IgM-kappa- and IgM-lambda- patients respectively.

Abnormal FLCR and HLCR were defined as any value above the 95th percentile range of HI. Abnormal polyclonal sFLC was also defined using as cut-off values the 95th percentile range of the HI. For kappa-restricted patients, lambda values above 32.1 mg/L were considered as polyclonal sFLC raise and values below 12.7 mg/L as polyclonal sFLC suppression. While, for lambda-restricted patients, kappa values above 14.9 mg/L were taken as polyclonal raise and that below 1.88 mg/L as suppression.

Systemic IgG and IgA hypogammaglobulinemia (IgG-SH and IgA-SH) were defined using our laboratory lower cut-off values as IgG < 7g/L and as IgA < 0.7g/L respectively. Immunosuppression of the same class (ISC) was defined as any polyclonal HLC value below the 95th percentile range of polyclonal HLCs in healthy individuals' (HI) sera. Thus IgM-kappa patients were considered to have ISC when their IgM-kappa was below 0.17 g/L and IgM-lambda when their IgM-kappa was below 0.29 g/L.

"High" sFLC, HLC and ratios were defined as any value above median. HLCs, HLCR, sFLC and FLCR values were compared with disease parameters such as beta2-microglobulin (β_2 M), haemoglobin (Hb), serum albumin (alb), platelets (PLT) lymphocytosis, LDH, albumin (alb), bone marrow (BM) infiltration presence of splenomegaly and lymphadenopathy and survival.

2.3. Statistical Analysis

Statistical analysis of the generated data was performed using SPSS v15.0 for windows. Hazard ratios and prognostic significance of "high" sFLC, HLC and ratios were determined by univariate Cox regression analysis. Kaplan Meier method was used for pictorial representation of survival and time to treatment. Categorical variables were compared with the chi square test (χ^2). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

2.4. Ethical Consideration

All sera were obtained with informed consent and the use of frozen sera for the retrospective evaluation of sFLCs and HLCs was approved by the local ethical committee.

3. Results

3.1. sFLC, FLCR, HLC and HLCR in Healthy Individuals

Serum FLCs and FLCRs, IgM-kappa, IgM-lambda and HLCRs (IgM-kappa/IgM-lambda and IgM-lambda/IgM-kappa) values are shown in Table 2.

3.2. sFLC, FLCR, HLC and HLCR in Patients

Median involved kappa-sFLC was 45.65 mg/L (range 7.64 to 3090mg/L) and lambda-sFLC was 78.3 mg/L (range 4.49 to 1400 mg/L). Involved sFLC values above median correlated significantly with low serum albumin levels ($p=0.038$; $p<0.05$), BM infiltration $\geq 50\%$ ($p<0.001$; $p<0.05$)

and β_2 -M values above 3.5 mg/L or 5.5 mg/L ($p=0.019$; $p<0.05$ and $p=0.035$; $p<0.05$ respectively).

Median sFLC kappa+lambda was 67.4 mg/L (range 18.44-3093.36 mg/L) and levels above median correlated significantly with anemia ($p=0.016$; $p<0.05$), β_2 -M values above 3.5 mg/L or 5.5 mg/L ($p=0.023$; $p<0.05$ and $p=0.002$; $p<0.05$ respectively) BM infiltration $\geq 50\%$ ($p=0.006$; $p<0.05$) and with advanced IPSS stage ($p=0.01$; $p<0.05$).

FLCR levels were abnormal in 57/70 patients at diagnosis. Median FLCR in kappa restricted patients was 2.78 (range 0.55-9.19) and 6.95 in lambda ones (range 0.94-161.47). FLCR values above median correlated significantly with BM infiltration $\geq 50\%$ ($p=0.001$; $p<0.05$) and anemia ($p=0.016$; $p<0.05$). In 22/70 (31%) of patients polyclonal sFLC were low and it only correlated significantly with BM infiltration $\geq 50\%$ ($p=0.029$; $p<0.05$).

Median involved IgM-kappa was 25.45 g/L (range 0.11 to 173) and IgM-lambda was 34.80 g/L (range 0.08 to 138). Involved HLC-IgM above median correlated with BM infiltration $\geq 50\%$ ($p=0.007$; $p<0.05$) and with low serum albumin levels ($p=0.041$; $p<0.05$).

HLCR was abnormal in 66/70 patients at diagnosis. Median HLCR in IgM-kappa WM was 185.57 (range 0.90-15000) and in IgM-lambda WM 101.9 (range 2.86-1000). HLCR values above median correlated with BM infiltration $\geq 50\%$ ($p=0.013$) and the presence of splenomegaly ($p=0.028$).

In 24/70 (34%) IgG-SH was observed, in 28/70 (40%) IgA-SH and in 27/70 (39%) ISC were observed respectively. Altogether 49/70 (70%) patients had some type of polyclonal hypogammaglobulinemia (IgG-SH, IgA-SH, ISC or polyclonal sFLC) and it significantly correlated only to anemia ($p=0.023$; $p<0.05$).

Table 2. HI's and Patients' results

	Median	95%ile range
Kappa sFLC (mg/L)	8.85	1.88 - 14.9
Lambda sFLC (mg/L)	20.5	12.7 - 32.1
Kappa+Lambda sFLC (mg/L)	30.15	17.5 - 44.5
Kappa/Lambda FLCR	0.43	0.09 - 0.83
Lambda/Kappa FLCR	2.34	1.21 - 13.1
IgM kappa (g/L)	0.63	0.29 - 1.82
IgM lambda (g/L)	0.40	0.17 - 0.94
IgM kappa/IgM lambda HLCR	1.59	0.96 - 2.30
IgM lambda/IgM kappa HLCR	0.63	0.43 - 1.04

3.3. Relationship between sFLC, HLC and Corresponding Ratios with Time to First Treatment

Involved sFLC, sFLC (kappa+lambda) and FLCR values above median correlated significantly with time to first

treatment (TFT) ($p=0.002$; $p<0.05$, $p=0.002$; $p<0.05$ and $p=0.011$; $p<0.05$ respectively)

Involved FLC and HLCR above median correlated with TFT (both $p<0.001$). Figures 1A and B" showed TFT according to FLCR and HLCR. Indeed, increased total IgM paraprotein measured by standard methods was also related to TFT ($p<0.001$). The presence of SH, ISC sFLC polyclonal suppression or raise was not associated with TFT.

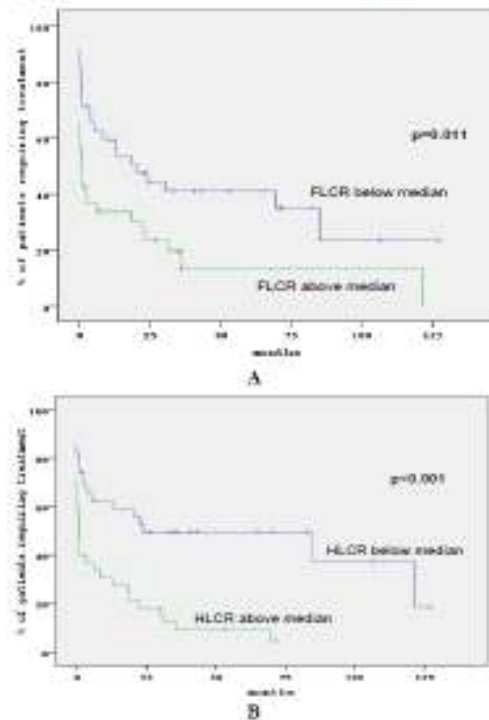


Figure 1. TFT in correlation to FLCR (A) and HLCR (B)

3.4. Relationship Between sFLC, FLC, Corresponding Ratios and Hypogammaglobulinemia with Overall Survival

Disease variables with an adverse prognostic impact on survival were WM-IPSS stage ($p<0.001$), high β_2M levels ($p<0.001$), abnormal LDH ($p=0.001$; $p<0.05$), the involved sFLC values above median ($p=0.003$; $p<0.05$) was shown in Figure 2A and sFLC (kappa+lambda) above median ($p=0.002$; $p<0.05$) was also shown in Figure 2B.

In addition, patients with any type of hypogammaglobulinemia (IgG-SH, IgA-SH or ISC) had a tendency for longer overall survival (OVS) than the ones without hypogammaglobulinemia ($p=0.139$; $p<0.05$) as shown in Figure 2C.

In univariate analysis, high β_2M levels (≥ 5.5 mg), abnormal LDH, involved sFLC values above median kept their significance.

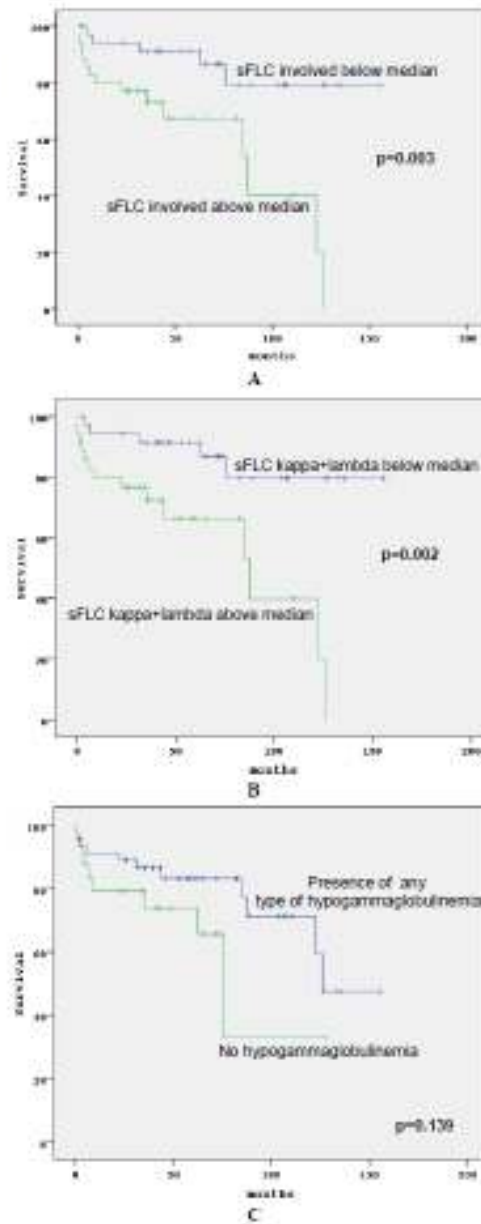


Figure 2. OVS in correlation to sFLC (A), sFLC kappa+lambda (B) and presence of hypogammaglobulinemia (C)

4. Discussion

Due to the WM wide range of manifestations and varying phenotype, resembling either a lymphoma or a frank plasma

cell dyscrasia or even an IgM gammopathy of undetermined origin, the exact paraprotein quantification and sensitive prognostication are needed for improved diagnosis, monitoring and management[3,5].

IgM paraprotein, like any other immunoglobulin (Ig), is composed of two Ig heavy chains and two light chains. It was shown, as already mentioned, that Ig light chains are normally secreted in slight excess [10] and that the amount of the excess may consistently increase and carry prognostic information in monoclonal diseases.

With regard to the contribution of sFLC levels in WM patients at diagnosis, a restricted number of studies reported that they can be increased and in such case, correlate with markers of disease activity, such as increased β 2M, anemia [23,24], low serum albumin levels as well as with a shorter time to treatment[25,26]. sFLC levels were also found to constitute a marker of response and of disease progression[23]. We confirmed previous results and showed, in addition, that increased sFLC levels at diagnosis correlated significantly with a shorter overall survival. Intriguingly, sFLC levels were more valuable for monitoring and prognostication than FLCR; this was not observed in multiple myeloma[16,17] and chronic lymphocytic leukemia [27].

In the present study, we also demonstrated that increased HLC-IgM correlated significantly with markers of disease activity such as extensive BM infiltration and low serum albumin levels, while high HLCR values with extensive BM infiltration also and the presence of splenomegaly. A recent study[28] suggested that, in WM, IgM secretion is related to the number of BM infiltrating plasma cells, as evaluated by CD138 staining, a finding in keep with results from our group, showing that bone marrow infiltration by CD138 expressing lymphoplasmacytes in WM strongly correlated with IgM levels[29]. In any case, although paraprotein levels are not considered reflecting tumor burden, an association with the percentage of malignant infiltrating cells has been found. Thus, it is suggested that HLC-IgM and HLCR better reflect tumor burden than IgM as classically determined.

In addition, due to the wide range of clinical manifestations and varying survival of WM, the establishment of prognostic factors is needed. Retrospective studies had highlighted a number of adverse factors for survival in WM, including advanced age, anemia, thrombocytopenia, hypoalbuminemia, elevated serum β 2M, increased serum LDH, high serum IgM concentrations, a poor performance status, the pattern or the percentage of BM infiltration and the presence of lymphadenopathy and organomegaly[6-8, 30-38]. In addition, several investigators have applied and validated in WM[7, 39,40], the staging systems used in similar disorders such as IPI[41] for high grade lymphoma, ISS[42] for multiple myeloma and FLIPI[43] for follicular lymphoma. Five years ago, 7 cooperative research teams designed and successfully applied a scoring system for WM patients requiring therapy, the International Prognostic Scoring System for Waldenström's Macroglobulinemia (ISSWM)[22], that was

further validated by others[44,45].

In this study, the adverse prognostic impacts of increased serum β 2M, LDH levels and WM-IPSS staging system were observed again, while in addition, monoclonal sFLC and sFLC (kappa+lambda) above median correlated with a shorter overall survival. Recently, the prognostic superiority of the sum of monoclonal and polyclonal sFLC compared to the FLCR was shown in chronic lymphocytic leukemia [19,20], a disease with similarities to WM. Hence, in the present study was found that the sum also apply prognostically for TTT and OVS in WM.

Polyclonal hypogammaglobulinemia is a common finding in WM; however a consistent proportion of patients present normal or even increased uninvolved Igs[7].

In the present study, we found that the presence of hypogammaglobulinemia involving Igs of the same and/or of other classes was in favour of a longer survival, while on the contrary, increased uninvolved Igs was not. This finding is in keep with the observation that in CLL, uninvolved light chain increase confer a worse outcome compared to patients with a normal secretion[19,20]. The finding is intriguing and opens issues on the biologic role of the reactive lymphocytic component in indolent lymphoproliferative disorders. Others unanswered issues on possible suppressive inherent mechanisms, such as TGF β [46] and others that affect both normal and malignant lymphocytes and may contribute in disease control should also be explored. However, others reported on the contrary that low levels of serum IgG and IgA were associated with disease progression[47] and further investigations are needed.

5. Conclusions

Serum FLC measurements appear useful for prognostic purposes, HLCR powerfully predicted time to first treatment and therefore may be useful in diagnostic and prognostic settings, while HLC and HLCR also help for follow-up of WM patients. In addition the HevyLite assay provides information about the amounts of the uninvolved Ig subsets that may reflect biology important mechanisms. Further studies are awaited.

REFERENCES

- [1] Liu P, Medeiros J, "Lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström's macroglobulinemia: An evolving concept", *Adv Anat Pathol*, vol.12, pp. 246-255, 2005.
- [2] Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Grepp PR, McMaster ML, Morra E, Pangalis GA, San Miguel JF, Braasga AR, Dimopoulos MA, "Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: Consensus panel recommendations from the second international workshop on Waldenström's macroglobulinemia", *Semin Oncol*, vol.30, pp.110-115, 2003.
- [3] Pangalis GA, Kyrstou MC, Koutopoulos EN, Sakantaris MP,

- Dimopoulos MN, Vassilakopoulos TP, Tzanos T, Kokoris S, Distiradiou E, Kapadakis C, Tsolmala K, Tsiftaris P, Panayiotidis P, Angelopoulos MK. "Differential diagnosis Of Waldenstrom's macroglobulinemia and other B-cell disorders". *Clin Lymphoma*, vol.5, pp.235-240, 2005.
- [4] Swerdlow SH, Berger F, Pileri SA, Harris NL, Jaffe ES, Stein H. "Lymphoplasmacytic lymphoma" In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiel J, Vardiman JW. "Who classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues". Lyon IARC Press, pp 194-195, 2008.
- [5] Dimopoulos MA, Kyle RA, Anagnostopoulos A, Treon SP. "Diagnosis and management of Waldenstrom's macroglobulinemia". *J Clin Oncol*, vol.23, pp.1564-1577, 2005.
- [6] Facon T, Brouillard M, Duhamel A, Morel P, Simon M, Jour JP, Bantier F, Fennat P. "Prognostic factors in Waldenstrom's macroglobulinemia: a report of 167 cases". *J Clin Oncol*, vol.11, pp.1553-1558, 1993.
- [7] Kyrtsonis MC, Vassilakopoulos TP, Angelopoulos MK, Sakantaris P, Kontopoulou FN, Dimopoulos MN, Bousiokis V, Gribas A, Konstantopoulos K, Vassopoulos GA, Fessas P, Kittas C, Pangalis GA. "Waldenstrom's macroglobulinemia: clinical course and prognostic factors in 60 patients. Experience from a single hematology unit". *Ann Hematol*, vol.80, pp.722-727, 2001.
- [8] Garcia-Sanz R, Montoto S, Torreguadrada A, de Coca AG, Petit J, Sureda A, Rodriguez-Garcia JA, Manso P, Perez-Aliaga A, Montegudo MD, Navarro I, Moreno G, Toledo C, Alonso A, Besses C, Besaduch J, Jarque I, Salma P, Rivas JA, Navarro B, Blade J, Miguel JF. "Waldenstrom macroglobulinemia: presenting features and outcome in a series with 217 cases". *Br J Haematol*, vol.115, pp.575-582, 2001.
- [9] Treon SP, Gertz MA, Dimopoulos M, Anagnostopoulos A, Blade J, Branagan AR, Garcia-Sanz R, Johnson S, Kimbly E, Leblond V, Fernandez JP, Maloney DG, Merlini G, Morel P, Morra E, Nichols G, Ocio EM, Owen R, Stone MJ. "Update on treatment recommendations from the Third International Workshop on Waldenstrom's macroglobulinemia". *Blood*, vol.107, pp.3442-3446, 2006.
- [10] Habel M-E, Emond JP. "Monoclonal IgM gammopathy: Drastic bias between nephelometry and electrophoresis peak measurement". *Clinical Biochemistry abstr* 117, pp.1269, 2008.
- [11] Schnebele A, Sweet K, Marshall J, Bombardieri J. "Alleviation of IgM monoclonal protein interference in nephelometric assays by sample treatment with reducing agent in a chaotropic salt solution". *Am J Clin Pathol*, vol.137, pp.26-8, 2012.
- [12] Bradwell AR. "Serum Free Light Chain Analysis (Plus Bevelite)". 6th ed. Birmingham, UK: The Binding Site Ltd, pp.18-58, 301-318, 2010.
- [13] Bradwell AR, Harding SJ, Fournier NJ, Wallis GL, Drayson MT, Carr-Smith HD, Mead GP. "Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurements of individual immunoglobulin κ/λ ratios". *Clin Chem*, vol.55, pp.1646-55, 2009.
- [14] Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G, Kröger N, Eneche H, Vesole DH, Dimopoulos M, San Miguel J, Avet-Loiseau H, Hajeck R, Chen WM, Anderson KC, Ludwig H, Sonneveld P, Pavlovsky S, Pahuho A, Richardson PG, Barlogie B, Greipp P, Vescio R, Tureson I, Westin J, Boccadoro M. "Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management". *Leukemia*, vol.24, pp.1121-7, 2010.
- [15] Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC, Drayson MT. "Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma". *Lancet*, vol.361(9356), pp.489-9, 2003.
- [16] Kyrtsonis MC, Vassilakopoulos TP, Kafisi N, Sachanas S, Tzanos T, Papadogiannis A, Galanis Z, Kapadakis C, Dimon M, Kyriakou E, Angelopoulos MK, Dimopoulos MN, Sakantaris MP, Distiradiou EM, Kokoris SI, Panayiotidis P, Pangalis GA. "Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma". *Br J Haematol*, vol.137, pp.240-3, 2007.
- [17] Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajeck R, Pahuho A, Jagannath S, Blade J, Lonial S, Dimopoulos M, Comenzo R, Eneche H, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Harousseau JL, Attal M, Tosi P, Sonneveld P, Boccadoro M, Morgan G, Richardson P, Sezer O, Mateos MV, Cavo M, Joshua D, Tureson I, Chen W, Shimizu K, Powles R, Rajkumar SV, Durie BG. "International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders". *Leukemia*, vol.23, pp.215-24, 2009.
- [18] Yegia ZA, Ozkurt ZN, Yagci M. "Free light chain: a novel predictor of adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia". *Eur J Haematol*, vol.84, pp.406-11, 2010.
- [19] Maurer MJ, Cerhan JR, Katzmann JA, Laik BK, Allner C, Zent CS, Call TG, Robe EG, Hanson CA, Kay NE, Singer SL, Witzig TE, Shanafelt TD. "Monoclonal and polyclonal serum free light chains and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia". *Blood*, vol.118, pp.2821-6, 2011.
- [20] Morabito F, De Filippi R, Lauretti L, Zuti K, Recchia AG, Giarle M, Morelli E, Vigna E, Gigliotti V, Calzavara R, Amoroso B, Neri A, Cistrona G, Ferrarini M, Molica S, Del Poeta G, Tripodo C, Pisto A. "The cumulative amount of serum-free light chain is a strong prognosticator in chronic lymphocytic leukemia". *Blood*, vol.118, pp.6353-61, 2011.
- [21] Keren DF. "Heavy/Light-Chain analysis of monoclonal gammopathies". *Clinical Chemistry* vol. 55, pp.1606-1608, 2009.
- [22] Morel P, Duhamel A, Gobbi P, Dimopoulos MA, Dhodapkar MV, McCoy J, Crowley J, Ocio EM, Garcia-Sanz R, Treon SP, Leblond V, Kyle RA, Barlogie B, Merlini G. "International prognostic scoring system for Waldenstrom macroglobulinemia". *Blood*, vol.113, pp.4163-70, 2009.
- [23] Leleu X, Koulteris E, Mahtezas D, Kyrtsonis R, Xie W, Manier S, Dstery R, Boyle E, Gauthier J, Poulain S, Tatiana T, Panayiotidis P, Bradwell AR, Harding S, Leblond V, Kyrtsonis MC, Ghobrial IM. "Novel M-component based biomarkers in Waldenstrom Macroglobulinemia (WM)". *Clin Lymphoma Myeloma Leukemia*, vol.11, pp.164-7, 2011.
- [24] Avet-Loiseau H, Marbahi L, Harousseau JL. "Serum immunoglobulin heavy/light chain ratios are independent risk

- factors for predicting progression free survival in multiple myeloma", *E.H.A. Haematologica*, vol.95 abstr 395, 2010.
- [25] Koulteris E, Kyrtonis MC, Maltezas D, Tzenou T, Mirbahai L, Kafassi N, Bartzis V, Dimou M, Georgiou G, Matsouka C, Pangalis G, Panayiotidis P, Bradwell AR, Harding S, "Quantification of Serum IgM κ and IgM λ In Patients with Waldenstrom's Macroglobulinemia (WM) at Diagnosis and During Disease Course; Clinical Correlations", *ASH, Blood*, vol.116, abstr.3004, 2010.
- [26] Leleu X, Xie W, Rourke M, Banwait R, Leduc R, Roper N, Weller E, Ghobrial E, "The Role of Serum Immunoglobulin Free Light Chain In Response and Progression In Waldenstrom Macroglobulinemia", *ASH, Blood* vol.116, abstr.3095, 2010.
- [27] Kyrtonis MC, Vassilakopoulos T.P., Tzenou T, Kafasi N, Sachanas S, Koulteris E, Maltezas D, Dimopoulou M, Kokoris SI, Dimitriadou E, Siakantaris MP, Angelopoulou MK, Panayiotidis P, Pangalis GA, "Serum free-light chains in Waldenstrom's macroglobulinemia (WM) patient at diagnosis", *EHA, Haematologica*, vol. 93(s1), abstr.1058, pp.418, 2008.
- [28] Itzykson R, Le Garff-Tavernier M, Katsahian S, Diemert MC, Musset L, Leblond V, "Serum-free light chain elevation is associated with a shorter time to treatment in Waldenstrom's macroglobulinemia", *EHA, Haematologica*, vol. 93(s1), pp.793-4, 2008.
- [29] Dimitrios Maltezas, Tatiana Tzenou, Nikolitsa Kafassi, Efsthios Koulteris, Vassiliki Bartzis, Maria Dimou, Anna Efthymiou, George Georgiou, Theodoros P. Vassilakopoulos, Maria K. Angelopoulou, Panayiotis Tsiftaris, Panayiotis Panayiotidis, Photis Beris, Marie-Christine Kyrtonis, "Clinical Impact of Increased Serum Free Light Chains (sFLCs) or their Ratio (FLCR) in WM at diagnosis and during disease course", *Proceeding of the 6th International Workshop on Waldenstrom's macroglobulinemia*, Venice, pp. 105, 2010.
- [30] Pratt G, Harding S, Holder R, Fegan C, Pepper C, Oscier D, Gardiner A, Bradwell AR, Mead G, "Abnormal serum free light chain ratios are associated with poor survival and may reflect biological subgroups in patients with chronic lymphocytic leukemia", *Br J Haematol.*, vol.141, pp.217-2, 2009.
- [31] Pasricha SR, Juneja SK, Westerman DA, Came NA, "Bone-marrow plasma cell burden correlates with IgM paraprotein concentration in Waldenstrom macroglobulinaemia", *J Clin Pathol*, vol.64, pp.520-523, 2011
- [32] Kyrtonis MC, Levidou G, Korkolopoulou P, Koulteris E, Bartzis V, Maltezas D, Pangalis GA, Kalpadakis C, Dimou M, Georgiou G, Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Salpeas V, Tsiftaris P, Patsouris E, Panayiotidis P, Tzenou TK., "CD138 Expression Helps Distinguishing Waldenstrom's Macroglobulinemia (WM) From Splenic Marginal Zone Lymphoma (SMZL)", *Clin Lymphoma Myeloma Leukemia*, vol.11, pp.99-102, 2011.
- [33] Morel P, Monconduit M, Jacomy D, Lenain P, Grosbois B, Bateli C, Facon T, Dervite I, Bauters F, Najman A, de Gramont A, Wattel E, "Prognostic factors in Waldenstrom's macroglobulinemia: a report on 232 patients with the description of a new scoring system and its validation on 253 other patients", *Blood*, vol.96, pp.852-858, 2000.
- [34] Merlini G, Baldini L, Brogna C, Comelli M, Goldaniga M, Palladini G, Delilieri GL, Gobbi PG, "Prognostic factors in symptomatic Waldenstrom's macroglobulinemia", *Semin Oncol*, vol.30, pp.211-215, 2003.
- [35] Owen RG, Barrans SL, Richards SJ, O'Connor SJ, Child JA, Parapia LA, Morgan GJ, Jack AS, "Waldenstrom macroglobulinemia: development of diagnostic criteria and identification of prognostic factors", *Am J Clin Pathol*, vol.116, pp.420-428, 2001.
- [36] Gobbi PG, Bettini R, Montecucco C, Cavanna L, Morandi S, Pieresca C, Merlini G, Bertoloni D, Grignani G, Pozzetti U, Roberto Caporali, and Edoardo Ascari, "Study of prognosis in Waldenstrom's macroglobulinemia: a proposal for a simple binary classification with clinical and investigational utility", *Blood*, vol.83, pp.2939-2945, 1994.
- [37] Anagnostopoulos A, Zervas K, Kyrtonis M, Symeonidis A, Gika D, Bourantas K, Zomas A, Anagnostopoulos N, Pangalis G, Dimopoulos MA, "Prognostic value of serum beta(2)-microglobulin in patients with Waldenstrom's macroglobulinemia requiring treatment", *Clin Lymphoma & Myeloma*, vol.7: pp.205-209, 2006.
- [38] Ghobrial IM, Fonseca R, Gertz MA, Plevak MF, Larson DR, Thernau TM, Wolf RC, Hoffmann RJ, Lust JA, Witzig TE, Lacy MQ, Dispenzieri A, Vincent Rajkumar S, Zeldenrust SR, Greipp PR, Kyle RA, "Prognostic model for disease-specific and overall mortality in newly diagnosed symptomatic patients with Waldenstrom macroglobulinaemia", *Br J Haematol*, vol.133, pp.158-164, 2006.
- [39] Dimopoulos M, Gika D, Zervas K, Kyrtonis M, Symeonidis A, Anagnostopoulos A, Bourantas K, Matsouka C, Pangalis GA, "The International Staging System for Multiple Myeloma is Applicable in Symptomatic Waldenstrom's Macroglobulinemia", *Leukemia and Lymphoma*, vol.45, pp.1809-13, 2004.
- [40] Tzenou T, Kyrtonis MC, Kalpadakis C, Vassilakopoulos TP, Sachanas S, Galanis Z, Masouridis S, Dimopoulou M, Kokoris SI, Dimitriadou E, Korkolopoulou P, Siakantaris MP, Angelopoulou MK, Panayiotidis P, Pangalis GA, "The follicular lymphoma International Prognostic Index is applicable in lymphoplasmacytic lymphoma / Waldenstrom's macroglobulinemia", *EHA, Haematologica*, vol.92(s1), pp.266, 2007.
- [41] Shipp MA, Harrington DP, Anderson JR, "A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma", *N Engl J Med*, vol.329, pp.987-994, 1993.
- [42] Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J, "International staging system for multiple myeloma", *J Clin Oncol*, vol.23, pp.3412-3420, 2005.
- [43] Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, Au WY, Bellei M, Brice P, Caballero D, Coiffier B, Conde-Garcia E, Doyen C, Federico M, Fisher R, Garcia-Conde JF, Guglielmi C, Hagenbeek A, Haioun C, LeBlanc M, Lister AT, Lopez-Guillermo A, McLaughlin P, Mipied N, Morel P, Mounier N, Proctor SJ, Rohatiner A, Smith P, Soubeyran P, Tilly H, Vitolo U, Zinzani PL, Zucca E, Montserrat E, "Follicular lymphoma international prognostic index", *Blood*, vol.104, pp.1258-1265, 2004.
- [44] Kastritis E, Kyrtonis MC, Hadjiharissi E, Symeonidis A,

- Michailis E, Repousis P, Tsatalas C, Michael M, Sieni A, Kartasos Z, Stefanoudaki E, Voulgarelis M, Delampasi S, Gavriatopoulou M, Kouluris E, Gaka D, Zomas A, Roussou P, Anagnostopoulos N, Economopoulos T, Terpos E, Zervas K, Dimopoulos MA. "Validation of the International Prognostic Scoring System (IPSS) for Waldenström's macroglobulinemia (WM) and the importance of serum lactate dehydrogenase (LDH)", *Leuk Res.*, vol.34, pp. 1340-3, 2010.
- [45] Hivert B, Tamburini J, Vekhoff A, Tournilhac O, Leblond V, Morel P. "Prognostic value of the International Scoring System and response in patients with advanced Waldenström macroglobulinemia", *Haematologica*, vol.96, pp. 785-788, 2011.
- [46] Kyrionis M-C, Mouraki A, Maniatis A. "Mechanisms of polyclonal hypogammaglobulinemia in multiple myeloma (MM)", *Med Oncol*, vol.16, pp.73-77, 1999.
- [47] Hunter ZR, Manning RJ, Hanzis C, Ciccarelli BT, Ioakimidis L, Patterson CJ, Lewicki MC, Tseng H, Gong P, Liu X, Zhou Y, Yang G, Sun J, Xu L, Sheehy P, Morra M, Treon SP. "IgA and IgG hypogammaglobulinemia in Waldenström's macroglobulinemia", *Haematologica*, vol.95, pp. 470-475, 2010.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε κατά τη διάρκεια της άσκησής μου στην ειδικότητα της Αιματολογίας στην Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την εποπτεία του Αναπληρωτή Καθηγητή Αιματολογίας κ. Παναγιώτη Παναγιωτίδη, τον οποίο αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω από καρδιάς για τις ευκαιρίες που μου έδωσε, τόσο σε κλινικό όσο και σε ερευνητικό επίπεδο. Συνέβαλλε έτσι ουσιαστικά, στην εκπαίδευσή μου ως κλινικού Αιματολόγου, αλλά και στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης, αποτελώντας ξεχωριστό παράδειγμα ακαδημαϊκού και επιστημονικού ήθους.

Ιδιαίτερη μνεία θα πρέπει να κάνω στην Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας κα Μαρία-Χριστίνα Κυρτσώνη, γιατί κοντά της μυήθηκα στην επιστημονική σκέψη και την ερευνητική δραστηριότητα. Χάρη στη συνεχή δημιουργική της καθοδήγηση και παρότρυνση, καθώς και στις πολύτιμες οδηγίες της, θα ήταν εξαιρετικά δύσκολη αν όχι αδύνατη, η ολοκλήρωση αυτής της μελέτης, η οποία άλλωστε αποτελεί κομμάτι του δικού της επιστημονικού έργου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Θεραπευτικής κ. Αθανάσιο-Μελέτιο Δημόπουλο για την αμέριστη συμπαράσταση, την συνεχή επίβλεψη και την έμπρακτη ενίσχυσή του.

Ευχαριστώ τις κ.κ. Ματσούκα Χαρά και Μπαρμπαρούση Δέσποινα που μου δίδαξαν την αγάπη για την Αιματολογία και την ανιδιοτελή και υπεύθυνη φροντίδα των ασθενών. Θα πρέπει να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου κ.κ. Μπάρτζη Βασιλική, Τζένου Τατιάνα και Μαλτέζα Δημήτριο για την εξασφάλιση ενός φιλικού, σταθερού, γεμάτου κατανόηση και αλληλοϋποστήριξη εργασιακού περιβάλλοντος, που κατέστησε δυνατή την ολοκλήρωση του διδακτορικού αυτού πονήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Bradwell R. Arthur και τους κ.κ. Harding Stephen και Fourrier Nikolas για την παραχώριση των αντιδραστηρίων και για την εκπαίδευσή μου πάνω στη μεθοδολογία στο Birmingham του Ενωμένου Βασιλείου. Πολύτιμη ήταν η βοήθεια της κα Ειρήνης Ρισσάκη στην επίλυση τεχνικών προβλημάτων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, για την βοήθεια, την υποστήριξη και την κατανόηση τους.

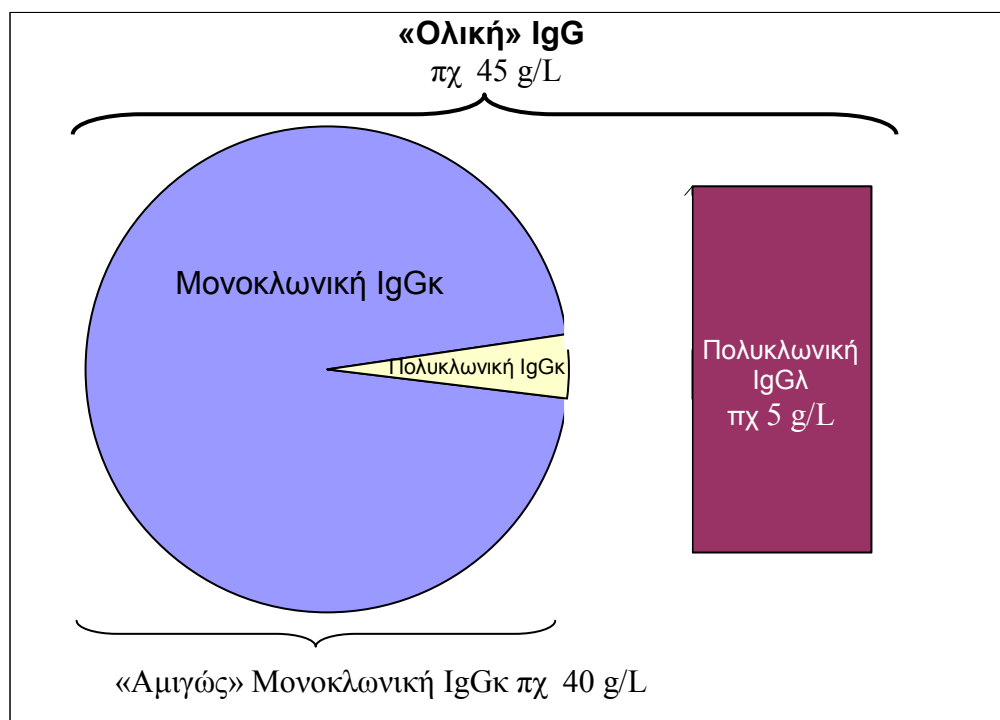
ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην καθημερινή κλινική πράξη ο ποσοτικός προσδιορισμός των ανοσοσφαιρινών με κλασσική νεφελομετρία αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο μέτρησης των ανοσοσφαιρινών και προσμετρά αυτό που στην παρούσα διατριβή θα αποκαλούμε «ολική ανοσοσφαιρίνη ή ολική Ig».

Πάνω στο μόριο της ανοσοσφαιρίνης υπάρχουν μοναδικοί κομβικοί επίτοποι ανάμεσα στις σταθερές περιοχές των βαριών και των ελαφρών αλυσίδων. Πρόσφατα παρασκευάστηκαν πολυκλωνικά αντισώματα (Hevylite™) που προσδένονται στις περιοχές αυτές και επιτρέπουν τον ξεχωριστό ποσοτικό προσδιορισμό των IgGκ, IgGλ, IgAκ, IgAλ, IgMκ και IgMλ. Έτσι αποτελεί προς το παρόν τη μέθοδο που μπορεί να προσδιορίσει ποσοτικά με τη μεγαλύτερη προσέγγιση την μονοκλωνική Ig, που στην παρούσα διατριβή θα αποκαλούμε «αμιγώς μονοκλωνική Ig», παρά το γεγονός ότι μικρή ποσότητα πολυκλωνικής Ig της ίδιας τάξης και με την ίδια προσδεδεμένη ελαφρά αλυσίδα προσμετράται μαζί. (ειδέ Εικόνα)

Σκοπός της διατριβής ήταν να μελετήσουμε αν η «αμιγώς μονοκλωνική Ig», μετρημένη με Hevylite™ προσφέρει περισσότερες κλινικές, διαγνωστικές και προγνωστικές πληροφορίες από την «ολική Ig» στις πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες και τα B- λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, καθώς και να αναζητήσουμε πιθανές συσχετίσεις με βιολογικούς παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της.

Εικόνα: Παράδειγμα Ασθενούς με IgGκ Πολλαπλούν Μυέλωμα και 45 g/L παραπρωτεΐνη. Ορισμοί των «ολική» IgG, «αμιγώς» μονοκλωνική IgGκ και πολυκλωνική IgGλ



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. Η Ανοσοσφαιρίνη

1.1. Εισαγωγή

Οι ανοσοσφαιρίνες (Igs) παράγονται από τελικά διαφοροποιημένα Β λεμφοκύτταρα και ο ρόλος τους είναι να συνδέονται με τα αντίστοιχα αντιγόνα (Ag). Σε διάφορα κακοήθη αιματολογικά νοσήματα αντί για τα φυσιολογικά αντισώματα συντίθεται και εκκρίνεται μία μονοκλωνική Ig, γνωστή και ως παραπρωτεΐνη. Πηγή είναι ένας παθολογικός κλώνος πλασματοκυττάρων, ενώ η Ig ανιχνεύεται στον ορό ή/και στα ούρα.

Τόσο οι μονοκλωνικές όσο και η φυσιολογικές (πολυκλωνικές) Ig έχουν την ίδια δομή. Το μόριο της αμιγούς Ig αποτελείται από 4 αλυσίδες, 2 πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες (Heavy ή IgH) και 2 πανομοιότυπες ελαφρές (Light ή IgL). Υπάρχουν πέντε τύποι IgH, οι μ, δ, γ, α και ε, και δύο IgL, οι κ και λ. Κάθε αλυσίδα έχει μία σταθερά περιοχή (constant domain ή IgC) και μία μεταβλητή περιοχή (variable domain ή IgV).

1.2. Η Εξέλιξη και η Διαφοροποίηση των Β-Λεμφοκυττάρων

Η Β λεμφοκυτταροποίηση ξεκινά κατά την 18^η εβδομάδα της κύησης στον μυελό των οστών, το πρωτογενές λεμφικό όργανο των Β λεμφοκυττάρων. Το πολυδύναμο λεμφικό αρχέγονο κύτταρο (CFU-Ly) δίνει γένεση στο δεσμευμένο προγονικό Β-λεμφοκύτταρο (CFU-LyB), και αυτό με τη σειρά του στο Β-λεμφοβλάστη. Η ωρίμανση σε Β προ-λεμφοκύτταρο εξαρτάται από του μεταγραφικούς παράγοντες E12 και E47 και τους ρυθμιστικούς μεταγραφικούς παράγοντες EBF και Pax-5. [van Zelm και συν, 2005; Bende, 2010]. Σε αυτό το στάδιο ωρίμανσης το κύτταρο πρέπει να συνθέσει και να εκφράσει στην επιφάνειά του τους υποδοχείς BCRs (B cell receptors) για την αναγνώριση αντιγόνων. Οι BCRs είναι μόρια IgM και IgD συνδεδεμένα στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ πάνω σε κάθε κύτταρο υπάρχουν περίπου 100.000 τέτοιοι υποδοχείς. Μετά την έκφραση των BCR και πριν τα κύτταρα φύγουν από τον μυελό των οστών προς τα περιφερικά, δευτερογενή λεμφικά όργανα (λευκός πλύνος του σπλήνα, λεμφαδένες, λεμφικοί ιστοί βλεννογόνων), ελέγχονται από το ανοσοποιητικό σύστημα ως προς την σύνδεση τους με αυτό-αντιγόνα. Σε περιπτώσεις ισχυρής ένωσης οδηγούνται σε απόπτωση (κλωνική διαγραφή ή clonal deletion), ή σε επεξεργασία και αναδιάταξη του υποδοχέα (receptor editing) ή σε απενεργοποίηση του κυττάρου (anergy). [Nemazee και συν, 1989; Gay και συν, 1993].

Στη περιφέρεια τα ώριμα αθώα/παρθενικά κύτταρα (mature naïve cells, CD5⁺, CD10⁺, CD24^{high} CD38^{high} και L-selectin^{low}) συνδέονται με τους υποδοχείς τους (L-Selectins) στα μόρια προσκόλλησης (Addressins) των φλεβιδίων με υψηλό ενδοθήλιο και εγκαθίστανται στα πρωτογενή λεμφικά θυλάκια, στα βλαστικά κέντρα των λεμφαδένων και στο λευκό πλύνος του σπλήνα. Αντιγόνα εισέρχονται στα περιφερικά λεμφικά όργανα και έρχονται σε επαφή με τα λεμφοκύτταρα. Ανάλογα με τη δομή του Ag, η ενεργοποίηση του λεμφοκυττάρου μπορεί να είναι εξαρτώμενο από την παρουσία Τ βοηθητικών (T_h) κυττάρων (Ag εξαρτώμενο από τον θύμο αδένος) ή ανεξάρτητο από τα T_h (Ag μη-εξαρτώμενο από τον θύμο αδένος).

Στην περίπτωση πεπτιδικών Ag σύνδεση με τον BCR προκαλεί ενδοκυττάρωση του Ag, παρουσιάσή του με το MCH II στην επιφάνεια του κυττάρου και αύξηση της έκφρασης του συνδιεγερτικού μορίου B7. [Tsuiji και

συν, 2006] Τα T_H συνδέονται με το MCH II μέσω των CD4 και TCR (T cell receptor) και με το B7 μέσω του CD28. Αυτό προκαλεί διαφοροποίησή τους σε T_{H2} , έκφραση του CD40L, και έκκριση κυτταροκινών (IL-4, IL-5, IL6, IL-13, TGF- β). Τα B κύτταρα διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που παράγουν αντισώματα και διαιρούνται ως κεντροβλάστες που εκφράζουν CD10+,CD38+ και BCL-6 δημιουργώντας θυγατρικά κύτταρα με όμοιο υποδοχέα με αυτά (κλωνική φύση ανοσολογικής απάντησης). Σημειακές μεταλλάξεις στην μεταβλητή περιοχή του BCR (somatic hypermutations ή SHM) αυξάνουν τον βαθμό συγγένειας με το Ag και τα κύτταρα με το μεγαλύτερο βαθμό συγγενείας επιλέγονται προς επιβίωση. [Berek και συν, 1991; Lindhout και συν, 1997]. Κάθε αθώο κύτταρο επανακυκλοφορεί συνεχώς ώστε να περνά από τον κάθε λεμφαδένα κάθε μέρα και από τον σπλήνα κάθε δύο μέρες για να αυξηθεί η πιθανότητα να έρθει σε επαφή ο BCR του με το Ag.

Τελικά διαφοροποιημένα B λεμφοκύτταρα γίνονται πλασματοκύτταρα ή κύτταρα μνήμης. [MacLennan και συν, 1994]. Τα κύτταρα μνήμης είναι CD27+CD20+ και εκφράζουν ανοσοσφαιρίνη επιφανείας (IgG, IgA ή IgE). Έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής και μετά από έκθεση σε Ag ερεθισμό μετατρέπονται ταχέως σε εξειδικευμένα πλασματοκύτταρα.

Τα πλασματοκύτταρα είναι CD138+CD38+ IRF/MUM+ cytIg+ και παράγουν αντισώματα. Αρχικά τα πλασματοκύτταρα παράγουν IgM. Αποτελεί πενταμερές μόριο με 10 θέσεις για σύνδεση με Ag. Αυτό του δίνει το πλεονέκτημα να παγιδεύει πολύ εύκολα τα Ag και να τα παρουσιάζει στα λεμφοκύτταρα. Επιπλέον λόγω της δομής του είναι το πιο αποτελεσματικό αντίσωμα για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος καθώς χρειάζεται μόνο ένα μόριο του για να το πραγματοποιήσει και όχι δύο όπως η IgG. Η έλλειψη τμήματος F_c του στερεί το χρήση του στην οψωνινοποίηση και στην κυτταροτοξικότητα προκαλούμενη από κύτταρο και εξαρτώμενη από αντίσωμα (ADCC).

Παρουσία των εκκρινόμενων κυτταροκινών από τα T_{H2} ξεκινά η σύνθεση διαφορετικών IgC_H διατηρώντας ίδιες τις μεταβλητές περιοχές και συντίθενται έτσι αντισώματα (IgG, IgA, IgE) με διαφορετικές φυσικές ιδιότητες άλλα ίδιο Ag στόχο (Ig class switch ή Ig-CS). [Liu και συν, 1996; Schwartz και συν, 1995; Küppers και συν, 1999].

Η IgG ενεργοποιεί το συμπλήρωμα και δρα στην οψωνινοποίηση και στον ADCC. Επιπλέον μεταφέρεται μέσω του πλακούντα και προστατεύει το έμβρυο. Η IgA συντίθεται λόγω της IL-5 και του TGF- β και δρα στην προστασία των βλεννογόνων, ενώ η αντοχή του σε πρωτεολυτικά ένζυμα το καθιστά συστατικό του μητρικού γάλακτος. Η IgE συντίθεται λόγω της IL-4 και του IL-13 και δρα στην προστασία κατά ελμινθικών λοιμώξεων.

Σε περίπτωση μη πεπτιδικών Ag έχουμε απευθείας διέγερση και πολλαπλασιασμό των B λεμφοκυττάρων χωρίς συμμετοχή των T_{h2} , παραγωγή μόνο IgM ενώ δεν δημιουργούνται κύτταρα μνήμης.

1.3. Η Κλωνική Εξαλλαγή των Β Λεμφοκυττάρων

Όπως περιγράφηκε τα Β κύτταρα πολλαπλασιάζονται με μεγάλο ρυθμό και ο ανασυνδυασμός του DNA είναι απαραίτητο στοιχείο στην εξέλιξή τους. Εξαλλαγή σε οποιοδήποτε στάδιο μπορεί να προσφέρει στο κύτταρο πλεονέκτημα επιβίωσης. Τα θυγατρικά κλωνικά κύτταρα κληρονομούν το πλεονέκτημα και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που παράγουν μονοκλωνική Ig. Το αρχικό βήμα στην κακοήγη εξαλλαγή των Β κυττάρων αφορά την αναδιάταξη των γονιδίων για την σύνθεση των Ig. Η μεγαλύτερη όμως πιθανότητα να προκληθεί γενετική εξαλλαγή είναι κατά την προσαρμογή του BCR με σωματικές υπερμεταλλάξεις και κατά την αλλαγή τάξης της Ig εξαιτίας της μεγάλης αναδιαμόρφωσης του DNA.

Χρωμοσωμικές μεταθέσεις που αφορούν τις περιοχές που κωδικοποιούν τις IgH (χρωμόσωμα 14) και τις IgL (χρωμόσωμα 2 και 22) ανευρίσκονται σε Β λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα. Στο ΠΜ πιο συχνά συναντάμε αντιμεταθέσεις μεταξύ της περιοχής 14q32 της IgH και των περιοχών 11q13, 4p16, 16q23, 21q12, 6p21, 12p13 και 8q24 οι οποίες συσχετίζονται με την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων CCND1, CCND2, CCND3, MAF, MAFB, MAFA και FGFR3/MMSET. [Bergsagel και συν, 2001]. Στο λέμφωμα Burkitt βρίσκονται χαρακτηριστικά μεταθέσεις του ογκογονιδίου c-myc με την IgH [t(8;14)(q24;q32)], ή πιο σπάνια με τις IgL [t(2;8)(p12;q24), t(8;22)(q24;q11) για την κ και την λ αντίστοιχα]. [Dang και συν, 1999]. Στο λέμφωμα μανδύα η t(11;14)(q13;q32) με ενεργοποίηση των ογκογονιδίων CCND1 και έκφραση της κυκλίνης D₁ [Williams και συν, 1997] και στο οζώδες λέμφωμα η t(14;18)(q32;q21) με έκφραση της BCL-2. Η τελευταία ανευρίσκεται και σε περιπτώσεις MALT λεμφωμάτων. [Du και συν, 2007].

1.4. Η Δομή και τα Μέρη των Ανοσοσφαιρινών

Οι Igs ή αντισώματα συντίθενται κατά την εξέλιξη των B κυττάρων. Πρόκειται για πρωτεϊνικά μόρια σε σχήμα «Υ», που συμμετέχουν στην ανοσολογική απάντηση. Στα B νεοπλασματικά νοσήματα οι Igs δεν διατηρούν την λειτουργία τους, με εξαίρεση τη δράση τους ως αυτοαντισώματα. Υπάρχουν πέντε τάξεις οι IgM, IgG, IgA, IgD και IgE ανάλογα με την IgH. Αποτελείται από δύο τμήματα, το F_c που συνδέονται στου αντίστοιχους υποδοχείς και οδηγεί σε οψωνινοποίηση και σε ADCC και την Fab που έχει τις θέσεις ακριβείας για τη δέσμευση των αντιγόνων. [Attaelmannan και συν, 2000].

1.5. Η Σύνθεση και η Αποδόμηση των Ανοσοσφαιρινών

Η περιοχή που κωδικοποιεί τις IgH αλυσίδες βρίσκεται πάνω στο χρωμόσωμα 14. Αποτελείται από 51 μεταβλητά (variable ή V_H), 27 ποικίλα (diversity ή D), και 6 συνδετικά (joining ή J_H) τμήματα υπεύθυνα για την σύνθεση της IgV_H και από εννέα τμήματα υπεύθυνα για την σύνθεση των IgC_H. Η περιοχή που κωδικοποιεί τις κ-IgL αλυσίδες βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 και αποτελείται από 40- μεταβλητά (V_L) και 2- συνδετικά (J_L) για την σύνθεση της κ-IgV_L και ένα για την κ-IgC_L. Η περιοχή που κωδικοποιεί τις λ-IgL αλυσίδες βρίσκεται στο χρωμόσωμα 22 και αποτελείται από 30- V_L , 4- J_L για την σύνθεση της λ-IgV_L και τέσσερα για την λ-IgC_L. [Küppers και συν, 1999].

Έτσι κατά την σύνθεση της μεταβλητής περιοχής του αντισώματος συνδυάζονται ένα από τα 51- V_H , ένα από τα 27-D και ένα από τα 6- J_H , με ένα από τα 40- V_L και ένα από 2- J_L , (για σύνθεση κ αλυσίδας) ή με ένα από τα 30- V_L και ένα από τα 4- J_L (για σύνθεση λ αλυσίδας). Απαραίτητοι για αυτή τη διαδικασία είναι οι παράγοντες ενεργοποίησης ανασυνδυασμού των γονιδίων (RAG-1 και RAG-2), ενώ σε αυτό κυρίως οφείλεται η δυνατότητα σύνθεσης περισσότερων από 5×10^7 αντισωμάτων με διαφορετικές μοναδικές θέσεις για δέσμευση αντιγόνων. [Schwartz και συν, 1995; Attaelmannan και συν, 2000; Matsuda και συν, 1998].

Στο μόριο του DNA τα γονίδια για την σύνθεση της IgH στην κωδική αλυσίδα είναι κατά σειρά 5' V_HDJ_H -μ-δ-γ₃-γ₁-α₁-γ₂-γ₄-ε-α₂- 3'. Η RNA πολυμεράση συνδέεται στη μη-κωδική αλυσίδα και ξεκινά να διαβάζει την γενετική πληροφορία με κατεύθυνση 3' to 5' προσθέτοντας νυκλεοτίδια στο 3' άκρο του προ-RNA μεταγράφου. Εναλλακτικό μάτισμα του προ-RNA φέρνει σε επαφή το V_HDJ_H με τις IgC_H φτιάχνοντας την IgH. Αρχικά φτιάχνεται IgM ενώ στη συνέχεια γίνεται αλλαγή της τάξης τη Ig. Στο DNA ενεργοποιούνται οι περιοχές εναλλαγής (switch regions), που βρίσκονται ανάμεσα στα τμήματα που κωδικοποιούν τις IgC_H, προκαλώντας αντικατάσταση της C_μ κατά σειρά από τις C_δ, C_{γ₃}, C_{γ₁}, C_{α₁}, C_{γ₂}, C_{γ₄}, C_ε και C_{α₂} και φτιάχνοντας τις αντίστοιχες μεταγενέστερες Igs, IgD, IgG₃, IgG₁, IgA₁, IgG₂, IgG₄, IgE και IgA₂. Η IgC_H που αφαιρείται αποδομείται, η δε φορά της διαδικασίας είναι μονόδρομη. Το κύτταρο που φτιάχνει μία μεταγενέστερη Ig δεν μπορεί να γυρίσει πίσω και να συνθέσει μια προγενέστερη. Κατά την διαδικασία αυτή γίνεται μια

πλεονάζουσα σύνθεση των IgL, οι οποίες εκκρίνονται στον ορό με τη μορφή των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων (sFLC).

Στον ορό ασθενών με B λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα υπάρχει αύξηση την ολικής Ig και των sFLC. Οι IgM και IgA έχουν χρόνο ημίσειας ζωής 5-6 ημέρες ενώ η IgG από μερικές μέχρι 21 ημέρες ανάλογα με τα επίπεδά της λόγω της ιδιαίτερης σχέσης της με του νεογνικού υποδοχείς (FcRn) που την προστατεύουν από την αποδόμηση. Εισέρχονται στα κύτταρα με πινοκύτωση όπου και αποδομούνται. Οι sFLC έχουν χρόνο ημίσειας ζωής 2-6 ώρες, διηθούνται ελεύθερα στο σπείραμα και απορροφώνται στο εγγύς εσπειρωμένο σωληνάριο όπου και αποδομούνται. [Bradwell, 2010].

1.6. Οι Λειτουργίες των Φυσιολογικών και των Μονοκλωνικών Ανοσοσφαιρινών

Τα αντισωμάτων είναι μέρος της χυμικής ανοσίας και συμμετέχουν στην πρωτογενή και τη δευτερογενή ανοσολογική απάντηση. [Janeway και συν, 2001; Litman και συν, 1993; Pier και συν, 2004; Rus και συν, 2005; Ravetch και συν, 2001]. Τα ειδικά χαρακτηριστικά των πέντε διαφορετικών τάξεων δίδονται στον πίνακα 1.

Σε περιπτώσεις κλωνικής εξαλλαγής των Β κυττάρων παράγονται ανεξέλεγκτα μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία δεν έχουν δράση κατά των παθογόνων οργανισμών. Το Πολλαπλούν Μυέλωμα και η Μακροσφαιριναιμία του Waldenström αποτελούν τα πρότυπα νοσήματα που χαρακτηρίζονται από παραγωγή μονοκλωνικής Ig. Ο κλωνικός πληθυσμός αναστέλλει την παραγωγή φυσιολογικών αντισωμάτων προκαλώντας πολυκλωνική υπογαμμασφαιριναιμία και ευαισθησία στην ανάπτυξη λοιμώξεων. Επίσης πολλές φορές έχουν την ιδιότητα να προκαλούν συγκόλληση των ερυθρών κυττάρων του αίματος (νόσος ψυχροσυγκολλητινών), να συσσωρεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (κρυοσφαιριναιμία), να λειτουργούν σαν αυτοαντισώματα (αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία και θρομβοπενία, νευροπάθεια) και να εναποτίθενται σε ιστούς (αμυλοείδωση, νόσος εναπόθεσης ανοσοσφαιρινών). [Merlini και συν, 2006]

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά των πέντε διαφορετικών τάξεων αντισωμάτων

Τάξη Ανοσοσφαιρίνης	IgM	IgG	IgA	IgD	IgE
IgC _H	μ	γ	α	δ	ε
Φυσιολογικά επίπεδα ορού(g/L)	0,50-3,45	7,00-15,00	0,70-3,90	0-13,65 κIU/L	0-380 κIU/L
Ποσοστό εκ της Ig ορού (%)	10	70	20	0,2	0,002
Χρόνος ημίσειας ζωής(ημέρες)	5	7-21	6	3	2
Δομή	πενταμερές	μονομερές	διμερές	μονομερές	μονομερές
Θέσεις για δέσμευση αντιγόνων	10	2	4	2	2
Κύρια εντόπιση	ενδοαγγειακή	εξωαγγειακή	εκκρίσεις	ενδοαγγειακή	ενδοαγγειακή
Υποκατηγορίες	-	IgG ₁ -IgG ₄	IgA ₁ , IgA ₂	-	-
Συμμετοχή στην πρωτογενή ΑΑ	+++	+++	++	++	++
Συμμετοχή στη δευτερογενή ΑΑ	+	+++	++	++	++
Ενεργοποίηση συμπληρώματος	+	+	-	-	-
Προκαλούν οψωνινοποίηση	-	+	-	-	-
Προκαλούν ADCC	-	+	-	-	-
Διαπερνούν τον πλακούντα	-	+	-	-	-
Εντόπιση στο μητρικό γάλα	-	-	+	-	-
Εντόπιση στις εκκρίσεις	-	-	+	-	-
Ενεργοποιεί τα μαστοκύτταρα	-	-	-	-	+
Αντίδραση υπερευαισθησίας	τύπου II, III	τύπου II, III, V	-	-	τύπου I
Αποτελούν υποδοχείς BCR	+	-	-	+	-
Έκφραση στα κύτταρα μνήμης	-	+	+	-	+

IgC_H: σταθερά περιοχή βαριάς αλυσίδας, Ig: ανοσοσφαιρίνη, ΑΑ: ανοσολογική απάντηση, ADCC:

κυτταροτοξικότητα προκαλούμενη από κύτταρα και εξαρτώμενη από τα αντισώματα, BCR: υποδοχείς των Β λεμφοκυττάρων

1.7. Η Ανίχνευση και ο Ποσοτικός Προσδιορισμός των Μονοκλωνικών Ανοσοσφαιρινών

Οι μονοκλωνικές Ig ανιχνεύονται με την ηλεκτροφόρηση λευκωμάτων ορού (SPEL), ταυτοποιούνται με την ανοσοκαθήλωση (IF) και προσδιορίζονται ποσοτικά με νεφελομετρία.

Η πρώτη ένδειξη για την πιθανή ύπαρξη μονοκλωνικής Ig προκύπτει από τα επίπεδα των ολικών λευκωμάτων ορού στον βιοχημικό έλεγχο. Η χρήση της SPEL είναι απαραίτητη για ανίχνευσή της, με την εμφάνιση μπάντας. Οι Ig έχουν ιδιαίτερο ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό, ανάλογα με την τάξη τους, ενώ το μέγεθος της μπάντας δίνει το ύψος της παραπρωτεΐνης (m-peak). Οι διεθνείς οδηγίες συνιστούν την χρήση της SPEL, για τη παρακολούθηση των επιπέδων της μονοκλωνικής Ig, σαν δείκτη ανταπόκρισης και υποτροπής. Η μέθοδος είναι ανακριβής σε χαμηλές συγκεντρώσεις Ig (<3,0 g/L), σε περιπτώσεις πολυμερισμού της και στην παρουσία πολλαπλών μικρών κλώνων. Σε αυτές τις περιπτώσεις συνίσταται ο ποσοτικός προσδιορισμός με νεφελομετρία. Το μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι προσμετρά την ολική Ig αδυνατώντας να διαχωρίσει την μονοκλωνική από την πολυκλωνική Ig, ενώ δεν μπορεί να υπολογίσει τις Ig σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

Πάνω στο μόριο της Ig υπάρχουν μοναδικοί κομβικοί επίτοποι ανάμεσα στις σταθερές περιοχές των βαριών και των ελαφρών αλυσίδων (ανάμεσα στην IgC_H και στην IgC_L). Πρόσφατα παρασκευάστηκαν πολυκλωνικά αντισώματα (Hevylite™) που προσδένονται σε αυτούς και επιτρέπουν την αναγνώριση και τον ξεχωριστό προσδιορισμό των IgGκ, IgGλ, IgAκ, IgAλ, IgMκ, IgMλ (Hevylite chains ή HLC). Έτσι καθίσταται δυνατή η μέτρηση της αμιγούς μονοκλωνικής Ig και της πολυκλωνικής Ig της ίδιας τάξης και ο υπολογισμός του λόγου μονοκλωνικής Ig / πολυκλωνικής Ig της ίδιας τάξης (HLCR). [Bradwell, 2010; Harding και συν, 2009; Keren και συν, 2009].

1.8. Η Χρήση της Μονοκλωνικής Ανοσοσφαιρίνης στα Αιματολογικά Νοσήματα

Τα επίπεδα της μονοκλωνικής ολική Ig και των sFLC χρησιμοποιούνται στη διάγνωση, τη σταδιοποίηση, την παρακολούθηση και τον ορισμό της ανταπόκρισης στις πλάσματοκυτταρικές δυσκρασίες και στα Β λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα. Επιπλέον αποτελούν προγνωστικό παράγοντα για κάποια από αυτά.

Πίνακας 2 : Συμβολή των Επιπέδων της Ολικής Ig και των sFLC/sFLCR στις Πλασματοκυτταρικές Δυσκρασίες και στα Β Λεμφοϋπερπλαστικά Νοσήματα

Ολική μονοκλωνική Ig					
	Διάγνωση	Σταδιοποίηση	Παρακολούθηση	Ανταπόκριση στη θεραπεία	Πρόγνωση
MGUS	√	-	√	-	√
ΠΜ					
1. έρπων	√	√ ^{D-S}	√	-	-
2. αμιγούς Ig	√	√ ^{D-S}	√	√	-
3. ελαφρών αλύσων	-	-	-	-	-
4. μη-εκκριτικό	-	-	-	-	-
Μονήρες πλασματοκύττωμα	-	-	-	√*	-
Πρωτοπαθής αμυλοείδωση	-	-	-	√*	-
MW	√	√ ^{WM-IPSS}	√	√	-
ΧΛΛ	-	-	-	-	-
B-NHL	-	-	-	-	-
sFLC/FLCR					
MGUS	√	√	√	-	√
ΠΜ					
1. έρπων	√	-	√	-	√
2. αμιγούς Ig	-	-	√	√	√
3. ελαφρών αλύσων	√	-	√	√	√
5. μη-εκκριτικό	√**	-	√**	√**	√**
Μονήρες πλασματοκύττωμα	-	-	-	-	√**
Πρωτοπαθής αμυλοείδωση	√	√	√	√	√
MW	-	-	?	?	√
ΧΛΛ	-	√ [†]	-	-	√
B-NHL	?	-	-	-	?

MGUS: Μονοκλωνική Γαμμοπάθεια Αδιευκρίνιστης Σημασίας, ΠΜ: Πολλαπλούν Μυέλωμα,

MW: Μακροσφαιριναιμία του Waldenström, ΧΛΛ: Χρόνια Λεμφογενής Λευχαιμία,

B-NHL: Β Μη-Hodgkin Λέμφωμα, Ig: ανοσοσφαιρίνη, sFLC/FLCR ελεύθερες ελαφρές αλυσίδες ορού και λόγος

√: χρήσιμο, -: μη χρήσιμο, ?: άγνωστο, √^{D-S}: σταδιοποίηση Durie και Salmon ,

√^{WM-IPSS} σταδιοποίηση WM-IPSS, *Αν υπάρχει στη διάγνωση, ** : χρήσιμα στην παρουσία

παθολογικού λόγου, [†]: συμπεριλαμβάνεται σε πρόσφατα προτεινόμενα μοντέλα σταδιοποίησης

της ΧΛΛ

Κεφάλαιο 2. Οι Βιολογικοί Παράγοντες Νόσου - Το Μικροπεριβάλλον

2.1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί εκτενώς ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος στη βιολογία των αιματολογικών νοσημάτων. Τα κύτταρα στον μυελό των οστών αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα του υποστρώματος, τα οποία εκκρίνουν κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες και οδηγούν στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους, αλλά και επηρεάζουν την επιβίωσή τους. Ο παράγοντας διαλυτός -Syndecan-1, ο Παράγοντας που Διεγείρει τα Β-Λεμφοκυττάρων και ο Μετατρεπτικός Αυξητικός Παράγοντας β αποτελούν 3 κυτταροκίνες των οποίων η μελέτη έχει δείξει ότι συμμετέχουν στη βιολογία των Β-λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων.

2.2. Ο Syndecan-1

Ο Syndecan-1 (SDC1 ή CD138) ανήκει στην οικογένεια των διαμεμβρανικών πρωτεογλυκανών Syndecan. Συντίθεται κυρίως από τα επιθηλιακά κύτταρα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα και τα Β-προ λεμφοκύτταρα και αποτελεί δείκτη διαφοροποίησης των πλασματοκυττάρων. Δρα ρυθμιστικά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική κινητοποίηση και μετανάστευση, ενώ συμμετέχει στην σύνδεση μεταξύ των κυττάρων, στη μεταφορά σημάτων, στην οργάνωση του κυτταροσκελετού και στην αλληλεπίδραση του κυττάρου με την εξωκυττάρια ύλη. Επίσης αποτελεί σημείο πρόσδεσης για αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες και πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ύλης. [Dhodapkar και συν, 1998].

Αποκόπτεται πρωτεολυτικά από την κυτταρική μεμβράνη και κυκλοφορεί διαλυτός στον ορό (διαλυτός-Syndecan-1)

Σε ασθενείς με ΠΜ έχουν παρατηρηθεί ότι:

1. τα αυξημένα επίπεδα στη διάγνωση σχετίζονται με τη συνολική επιβίωση [Seidel και συν, 2000; Kyrtsolis και συν, 2004].
2. ο βαθμός της πτώσης του από τη διάγνωση στη φάση πλατώ μετά από συμβατική θεραπεία εφόδου έχει προγνωστική σημασία για τη συνολική επιβίωση [Lovell και συν, 2005]
3. στην υποτροπή σε ασθενείς που έλαβαν λεναλιδομίδη ο βαθμός της πτώσης στη φάση πλατώ έχει προγνωστική σημασία για τη συνολική επιβίωση [Kyrtsolis και συν, 2010]

Σε ασθενείς με MW έχουν παρατηρηθεί ότι:

1. υπάρχει αυξημένη και ισχυρότερη έκφραση του CD138 σε βιοψίες μυελού σε σχέση με το λέμφωμα οριακής ζώνης [Kyrtsolis και συν, 2011].
2. η αυξημένη έκφραση συσχετίστηκε με αυξημένη παραγωγή IgM από τον νεοπλασματικό πληθυσμό [Kyrtsolis και συν, 2011].

Σε ασθενείς με ΧΛΛ έχουν παρατηρηθεί ότι:

1. υπάρχουν αυξημένα επίπεδα σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες
2. τα υψηλά επίπεδα σχετίζονται με μειωμένη πρόοδο νόσου [Wolowiec και συν, 2006].

2.3. Ο Παράγοντας που Διεγείρει τα Β-Λεμφοκύτταρα (BLys)

Ο παράγοντας που Διεγείρει τα Β-λεμφοκύτταρα (B Lymphocyte stimulator) ανήκει στην υπερικογένεια των συνδετών των Παραγόντων Νέκρωσης Όγκου (TNF ligand). Συντίθεται από μια πλειάδα διαφορετικών κυττάρων, όπως μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα, δένδριτικά κύτταρα, Τ και Β λεμφοκύτταρα και ανευρίσκεται στον σπλήνα, τους λεμφαδένες και το μυελό των οστών. Είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, που παρουσία της ιντερφερόνης- γ , αποκόπτεται πρωτεολυτικά από την κυτταρική μεμβράνη και κυκλοφορεί διαλυτή στον ορό. Συνδέεται σε τρεις διαφορετικούς TNF υποδοχείς (BAFF-R, TACI και BCMA) στην κυτταρική μεμβράνη των Β λεμφοκυττάρων και πλασματοκυττάρων και ενέχεται στη διαφοροποίηση, στον πολλαπλασιασμό, στην επιβίωσή τους καθώς και στην παραγωγή ανοσοσφαιρινών.

Σε ασθενείς με ΠΜ έχουν παρατηρηθεί:

1. αυξημένη έκφραση BAFF-R υποδοχέων [Zhou και συν, 2012].
2. αυξημένα επίπεδα διαλυτού BLys στον ορό και στο υπερκείμενο μυελού των οστών [Fragoudaki και συν, 2012].
3. τα υψηλά επίπεδα σχετίζονται με αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα και χειρότερη επιβίωση [Fragoudaki και συν, 2012].

Σε ασθενείς με ΜW έχουν παρατηρηθεί:

1. έκφραση στον νεοπλασματικό πληθυσμό των υποδοχέων του BLys
2. έκφραση του BLys σε κύτταρα του υποστρώματος του μυελού των οστών
3. τα υψηλά επίπεδα σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή IgM από το νεοπλασματικό πληθυσμό [Elsawa και συν, 2006].

Σε ασθενείς με ΧΛΛ έχουν παρατηρηθεί:

1. έκφραση στο νεοπλασματικό πληθυσμό των υποδοχέων του BLys [Ferrer και συν, 2009].
2. έκφραση του BLys σε κύτταρα του υποστρώματος του μυελού των οστών που σχετίζονται με την αγγειογένεση [Novak και συν, 2002; Cols και συν, 2012].
3. αντίσταση του νεοπλασματικού πληθυσμού στην απόπτωση παρουσία του BLys [Kern και συν, 2004].
4. χαμηλά επίπεδα του BLys σε σχέση με άλλα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα και με υγιείς μάρτυρες [Langneau και συν, 1995].
5. συσχέτιση με πρόοδο νόσου [Novak και συν, 2002].

2.4. Ο Μετατρεπτικός Αυξητικός Παράγοντας β (TGF-β)

Ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β είναι ένα πολυπεπτίδιο που συντίθεται από μια πλειάδα διαφορετικών κυττάρων και ανευρίσκεται σε όλους τους ιστούς. Εκκρίνεται σε μία ανενεργό μορφή και μετατρέπεται παρουσία πρωτεασών στην ενεργό. Συνδέεται στην κυτταρική μεμβράνη σε δύο υποδοχείς (τύπου I και II) με δράση κινάσης. Αυτό προκαλεί ενεργοποίηση των SMAD και DAXX οδών, που οδηγούν στη σύνθεση μεταγραφικών παραγόντων, προκαλώντας κυτταρική απόπτωση.

Παίζει πρωτεύοντα ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επιπλέον εμπλέκεται στην έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης καθώς και στην επίλυσή της προκαλώντας χημειοτακτική έλξη κυττάρων που συσχετίζονται με αυτή. Ασκεί τη δράση του μέσω τριών μηχανισμών:

1. αναστέλλει την κυτταρική διαίρεση στα περισσότερα κύτταρα
2. διεγείρει την κυτταρική ανάπτυξη σε μερικά μεσεγχυματικά κύτταρα
3. προκαλεί ανοσορυθμιστική δράση μέσω διαφοροποίηση των FOXP3 ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων και των Τ-17 βοηθητικών κυττάρων και ενισχύει την σύνθεση εξωκυττάριας ύλης

Ο υπότυπος TGF-β1:

1. αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των Τ και Β λεμφοκυττάρων
2. αναστέλλει την ωρίμανση και την ενεργοποίηση των μακροφάγων και των κυττάρων «φυσικών δολοφόνων»
3. αναστέλλει την παραγωγή κυταροκινών
4. προκαλεί ίνωση μυελού λόγω ενεργοποίησης των ινοβλαστών.

Σε ασθενείς με ΠΜ έχει παρατηρηθεί ότι τα υψηλά επίπεδα του TGF-β1 συσχετίζονται με χαμηλά επίπεδα πολυκλωνικών ανοσοσφαιρινών ανεξαρτήτως τάξεως της ανοσοσφαιρίνης. [Kyrtsolis και συν, 1998]

Σε ασθενείς με ΧΛΛ έχει παρατηρηθεί ότι:

1. τα κύτταρα του υποστρώματος παράγουν περισσότερο TGF-β1 σε σχέση με τα φυσιολογικούς μάρτυρες και ότι ο ορός περιέχει αυξημένα επίπεδα ενεργού μορφής
2. ο νεοπλασματικός πληθυσμός παρουσιάζει αντίσταση στη αποπτωτική δράση του TGF-β1 λόγω μειορρύθμισης των υποδοχέων τύπου I [Decoteau και συν, 1997].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 3. Το Πολλαπλούν Μυέλωμα

3.1. Εισαγωγή

Το Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ) αποτελεί ένα νεοπλασματικό νόσημα που ανήκει στις πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες, δηλαδή στα αιματολογικά νοσήματα που προκύπτουν από κλωνική εξαλλαγή «ώριμων», τελικώς διαφοροποιημένων Β λεμφοκυττάρων που παράγουν μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη [Swerdlow και συν, 2008]. Συγκεκριμένα χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό μονοκλωνικών πλασματοκυττάρων σε πολλαπλές εστίες στο μυελό των οστών ή σε εξωμυελικές περιοχές (πλασματοκυττώματα) και από την παραγωγή μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης (παραπρωτεΐνης), η οποία ανιχνεύεται στον ορό ή/και στα ούρα.

Πρόκειται για ένα ετερογενές νόσημα με κλινική συμπεριφορά που κυμαίνεται από τελείως ασυμπτωματικό (έρπων μυέλωμα) ως πολύ επιθετικό.

Για την διάγνωση του έρποντος μυελώματος απαιτούνται και τα 2 κάτωθι κριτήρια [Swerdlow και συν, 2008] :

1. Η παρουσία παραπρωτεΐνης ορού (IgG ή IgA) λιγότερη από 30g/L ή/και παρουσία τουλάχιστον 10% μονοκλωνικών πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών.
2. Η πλήρης απουσία βλαβών σε ιστούς ή όργανα στόχους

Για την διάγνωση του συμπτωματικού μυελώματος απαιτούνται και τα 3 κάτωθι κριτήρια [Swerdlow και συν, 2008] :

1. Η παρουσία βλαβών σε ιστούς ή όργανα στόχους που είναι ευρέως γνωστά με το ακρωνύμιο C.R.A.B.

Calcium, δηλαδή παρουσία επιπέδων ασβεστίου ορού περισσότερο από 11,5 mg/dL

Renal-νεφρική ανεπάρκεια με επίπεδα κρεατινούς ορού περισσότερο από 2,0 mg/dL ή κάθαρση κρεατινίνης λιγότερο από 40 mL/min

Anemia, δηλαδή ορθόχρωμη ορθοκυτταρική αναιμία με πτώση της αιμοσφαιρίνης περισσότερο από 2 g/dL σε σχέση με το φυσιολογικό κατώτερο όριο ή αιμοσφαιρίνη λιγότερο από 10 g/dL.

Bone, δηλαδή παρουσία εκτεταμένης οστεοπενίας ή λυτικών βλαβών ή παθολογικών καταγμάτων

2. Η παρουσία παραπρωτεΐνης στον ορό ή στα ούρα
3. Η παρουσία μονοκλωνικών πλασματοκυττάρων στον μυελό των οστών ή παρουσία πλασματοκυττώματος.

Η σημασία των επιπέδων της παραπρωτεΐνης ως δείκτης φορτίου νόσου και συνεπαγόμενης κλινικής συμπεριφοράς είχε εκτιμηθεί από τους Durie και Salmon προ 40 ετίας, [Durie και συν, 1975], οι οποίοι και την συμπεριέλαβαν στην σταδιοποίηση τους (D-S Staging System) :

Στάδιο I : απαιτείται η παρουσία όλων των κάτωθι:

1. Χαμηλά επίπεδα παραγόμενης παραπρωτεΐνης
IgG λιγότερο από 50,0 g/L
IgA λιγότερο από 30,0 g/L
2. Επίπεδα αιμοσφαιρίνη περισσότερο από 10 g/dL
3. Επίπεδα ασβεστίου ορού μικρότερα ή ίσο με 12 mg/dL
4. Φυσιολογικός οστικός έλεγχος ή παρουσία μονήρους πλασματοκυττώματος σε ακτινογραφικό έλεγχο

Στάδιο II : όταν δεν πληρούνται τα κριτήρια για κατάταξη ούτε στο στάδιο I ούτε στο στάδιο III

Στάδιο III : απαιτείται η παρουσία μόνο ενός από τα κάτωθι:

1. Υψηλά επίπεδα παραγόμενης παραπρωτεΐνης
IgG περισσότερο από 70,0 g/L
IgA περισσότερο από 50,0 g/L
2. Επίπεδα αιμοσφαιρίνη λιγότερο από 8,5 g/dL
3. Επίπεδα ασβεστίου ορού μεγαλύτερα από 12 mg/dL
4. Εκτεταμένες οστεολυτικές βλάβες.

A: Φυσιολογική νεφρική λειτουργία (κρεατινίνη ορού < 2,0 mg/dL)

B: Μη φυσιολογική νεφρική λειτουργία (κρεατινίνη ορού > 2,0 mg/dL)

Στην πορεία διαφάνηκε ότι τα επίπεδα παραπρωτεΐνης δεν εκφράζουν αξιόπιστα το φορτίο νόσου και δεν προσφέρουν ιδιαίτερη προγνωστική αξία, με αποτέλεσμα να εξαλειφθούν από μεταγενέστερα συστήματα, [Kyrtsolis και συν, 2009], όπως το International Scoring System (ISS), που πλέον χρησιμοποιείται ευρέως. [Greipp και συν, 2005].

Στάδιο 1: Τιμές β_2 - μικροσφαιρίνης ορού λιγότερο από 3,5 mg/L και λευκωματίνη ορού περισσότερο από 3,5 g/dL

Στάδιο 2 : Τιμές β_2 - μικροσφαιρίνης ορού λιγότερο από 3,5 mg/L και λευκωματίνη ορού λιγότερο από 3,5 g/dL ή τιμές β_2 - μικροσφαιρίνης ορού από 3,5 mg/L έως 5,5 mg/L

Στάδιο 3 : Τιμές β_2 - μικροσφαιρίνης ορού πάνω από 5,5 mg/L

Πρόσφατα με την εφαρμογή σύγχρονων τεχνικών κατέστη δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων και αποδείχθηκε ότι ο λόγος τους (sFLCR) στη διάγνωση έχει ισχυρή προγνωστική σημασία. Το γεγονός αυτό διεγείρει το ερώτημα αν ο προσδιορισμός των ανοσοσφαιρινών με εξίσου νέες τεχνικές μπορεί να συντελέσει στην κατανόηση της συμπεριφοράς του νοσήματος.

Τα προσδιοριζόμενα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών επηρεάζονται από μεταβολές που συμβαίνουν στον οργανισμό εξαιτίας της νόσου. Μεταβολές του αιματοκρίτη και του όγκου του πλάσματος είναι συχνό εύρημα με αποτέλεσμα τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών να μεταβάλλονται κατά 50% ή περισσότερο ανεξάρτητα από τον ρυθμό παραγωγής τους. Η IgG ανοσοσφαιρίνη μεταβολίζεται με διαφορετικό ρυθμό σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ανεξάρτητα από τον ρυθμό παραγωγής της [Alexanian και συν, 1977]. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις όλη η IgG συνδέεται στους νεογνικούς υποδοχείς FcRn στα ενδοθηλιακά κύτταρα, προστατεύεται από τον καταβολισμό και παρατείνεται ο χρόνος ημίσειας ζωής της από 3 στις 21 ημέρες. Σε υψηλές όμως συγκεντρώσεις οι νεογνικοί υποδοχείς FcRn είναι κορεσμένοι με αποτέλεσμα να μειώνεται ο χρόνος ημίσειας ζωής και αυξάνεται ο καταβολισμός της [Kim και συν, 2007]. Τα επίπεδα της IgA μπορούν να εκτιμηθούν εσφαλμένα στην ηλεκτροφόρηση καθώς άλλες πρωτεΐνες όπως η τρανσφερρίνη ή η β -λιποπρωτεΐνη μπορούν να «τρέξουν» στη ηλεκτροφόρηση στη περιοχή που «τρέχει» και η IgA [Bradwell και συν, 2009].

Κατά την ανταπόκριση στην θεραπεία τα επίπεδα της Ig χρησιμοποιούνται για τον ορισμό της ποιότητας της ύφεσης [Kyle και συν, 2009]. Έτσι σαν «stringent Complete Response» (sCR) ορίζεται η παρουσία αρνητικής ανοσοκαθήλωσης ορού και ούρων, φυσιολογικός λόγος ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων και απουσία κλωνικών πλασματοκυττάρων στην βιοψία μυελού των οστών, ως «Complete Response» (CR) η παρουσία αρνητική ανοσοκαθήλωσης ορού και ούρων και παρουσία λιγότερων από 5% πλασματοκυττάρων στον μυελό, ως «near Complete Response» (nCR) η παρουσία αρνητικής ηλεκτροφόρησης ορού αλλά θετικής ανοσοκαθήλωσης ορού, ως «Partial Response» (PR) η μείωση της παραπρωτεΐνης περισσότερο από 50%, ως «Minimal Response» (MR) η μείωση της παραπρωτεΐνης περισσότερο από 25%, ως «Stable Disease» (SD) η μείωση της παραπρωτεΐνης λιγότερο από 25% και ως «Progressive Disease» (PD) η αύξηση της παραπρωτεΐνης κατά 25% ή η αύξηση του ποσοστού των πλασματοκυττάρων κατά 10% ή η εμφάνιση νέων οστικών βλαβών ή υπερασβεστιαμίας.

3.2. Το Πολλαπλούν Μυέλωμα στη Διάγνωση

3.2.1 Ασθενείς

Μελετήθηκε σειρά 103 ασθενών με νεοδιάγνωση πολλαπλού μυελώματος. Δεν συμπεριλήφθησαν ασθενείς με μυέλωμα ελαφρών αλυσίδων καθώς σκοπός ήταν ο προσδιορισμός της βαριάς αλυσίδας της παραπρωτεΐνης. Το φύλο ήταν άρρεν για τους 57 και θήλυ για τους 46. Η διάμεση ηλικία ήταν 67 έτη (εύρος 31-89 έτη). Η σταδιοποίηση σύμφωνα με το διεθνές σύστημα Durie-Salmon ήταν 31% σε στάδιο I, 27% σε στάδιο II και 42% σε στάδιο III. Σύμφωνα με το International Scoring System (ISS) οι ασθενείς σε στάδιο 1 ήταν 36%, σε στάδιο 2 ήταν 30% και σε στάδιο 3 το 34%. Τα χαρακτηριστικά νόσου ήταν τα ακόλουθα:

Το 25% εξ αυτών είχαν αναιμία με τιμές αιμοσφαιρίνης λιγότερης των 10 gr/dl ενώ στο 11% υπήρξε νεφρική ανεπάρκεια με τιμές κρεατινίνης ορού μεγαλύτερης των 2 mg/dl. Το 13,5% παρουσίαζε θρομβοπενία με τιμές αιμοπεταλίων λιγότερα από $140 \times 10^9/L$, ενώ το 20,8% είχε χαμηλή τιμή λευκωματίνης ορού (λιγότερη από 3,5gr/L). Αυξημένη β_2 -μικροσφαιρίνη ορού άνω των 3,5 mg/L υπήρξε στο 61% και άνω της 5,5mg/L στο 33%. Παρουσία υπερασβεστιαϊμίας με τιμές άνω των 10,5 mg/dL ή 2.6 mmol/L διαπιστώθηκε στο 12,6% εκ των ασθενών. Αυξημένη τιμή του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) ευρέθη στο 7%. Εκτεταμένη οστική νόσος με παρουσία πολλαπλών οστεολύσεων ή και καταγμάτων σε ακτινογραφίες διαπιστώθηκε στο 26% των ασθενών. Ένα σημαντικό ποσοστό της τάξης του 48% παρουσίαζε στη βιοψία μυελού των οστών εκτεταμένη διήθησή από πλασματοκύτταρα (διήθηση > 50%).

Η ταυτοποίηση της παραπρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με ανοσοκαθήλωση ορού και ήταν IgG σε 78 ασθενείς, εκ των οποίων οι 52 είχαν IgGκ και οι 26 IgGλ, και IgA σε 25, εκ των οποίων οι 13 είχαν IgAκ και οι 12 IgAλ.

Η διάμεση τιμή της παραπρωτεΐνης με τη μέθοδο της κλασσικής νεφελομετρίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ανοσοσφαιρινών ήταν 31,78g/L (εύρος 3,15-113,00 g/L) για τους IgG ασθενείς και 29,62g/L (εύρος 3,94-78,50 g/L) για τους IgA ασθενείς.

Η διάμεση τιμή του λόγου των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων ορού (sFLCR) με τη χρήση της μεθόδου Freelite™ ήταν 9,14 (εύρος 0,045-7403) για τους ασθενείς με κάππα ελεύθερες ελαφρές αλυσίδες ορού και 14,85 (εύρος 0,95-3701) για αυτούς με λάμδα.

Κατά την διάρκεια της παρακολούθησης των ασθενών οι 77/103 χρειάστηκε να λάβουν θεραπεία σύμφωνα με τα διεθνή κριτήρια έναρξης θεραπείας για το Πολλαπλούν Μυέλωμα. Η επιλογή της θεραπείας έγινε βάση των διεθνών οδηγιών. Οι υπόλοιποι 26/103 παρέμειναν ασυμπτωματικοί. Η διάμεση παρακολούθηση ήταν 33 μήνες (εύρος 1-131 μήνες).

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά ασθενών με Πολλαπλούν Μυέλωμα στη Διάγνωση

Αριθμός		103
Διάμεση ηλικία		67 έτη (εύρος 31-89)
Φύλο Α/Θ		57/46
Ανοσοκαθήλωση ορού	IgGκ	52/103
	IgGλ	26/103
	IgAκ	13/103
	IgAλ	12/103
Στάδιο νόσου κατά Salmon-Durie	I	31%
	II	27%
	III	42%
Στάδιο νόσου κατά ISS	1	36%
	2	30%
	3	34%
Αιμοσφαιρίνη < 10 g/dL		25%
Αιμοπετάλια < 140x10 ⁹ /L		13,5%
Κρεατινίνη ορού > 2 mg/dl		11%
Λευκωματίνη ορού < 3,5gr/L		20,8%
β ₂ -μικροσφαιρίνη < 3,5 mg/L		61%
β ₂ -μικροσφαιρίνη > 5,5 mg/L		33%
Υπερασβεστιαμία		12,6%
Παθολογική LDH		7%
Εκτεταμένη οστική νόσος		26%
Εκτεταμένη διήθηση μυελού > 50%		48%
Συμπτωματικοί		77/103
Διάμεση παρακολούθηση		33 μήνες (εύρος 1-131)

3.2.2. Μεθοδολογία

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των HLC πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της νεφελομετρίας με τη χρήση Dade Behring BN II Nephelometer στα εργαστήρια της Binding Site, στο Birmingham, Ενωμένο Βασίλειο καθώς και στο Τμήμα Ανοσολογίας του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών. Χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα από πρόβατα (Hevylite™, Binding Site, U.K.).

Ο λόγος HLCR υπολογίστηκε με την αμιγώς μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη ως αριθμητής και την πολυκλωνική ανοσοσφαιρίνη της ίδιας τάξης ως παρονομαστής δηλαδή mono-IgGκ/poly-IgGλ στους IgGκ ασθενείς, mono-IgGλ/poly-IgGκ στους IgGλ, mono-IgAκ/poly-IgAλ στους IgAκ ασθενείς και mono-IgAλ/poly-IgAκ στους IgAλ. Τα αποτελέσματα ήταν αναπαραγωγίσιμα.

Η μελέτη ήταν αναδρομική και χρησιμοποιήθηκαν οροί ασθενών με ΠΜ οι οποίοι είχαν αποθηκευτεί στους -80°C κατά τη διάγνωση του νοσήματος. Παράλληλα έγιναν μετρήσεις και σε 130 υγιείς δότες αίματος οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σαν τιμές έλεγχου.

Ορίσαμε ως «IgG-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» την παρουσία επιπέδων IgG μικρότερων των 7 gr/L στους ασθενείς με IgA-ΠΜ. Ως «IgA-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» την παρουσία επιπέδων IgA μικρότερων των 0,7 gr/L στους ασθενείς με IgG-ΠΜ και ως «IgM-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» την παρουσία επιπέδων IgM μικρότερων των 0.5 gr/L σε οποιοδήποτε ασθενή.

Ορίσαμε ως «Ανοσοπάρεση της Ίδιας Ig Τάξης» την παρουσία χαμηλών επιπέδων πολυκλωνικών HLC βάση της κατώτερων τιμών των υγιών δοτών αίματος ως ακολούθως: Στους IgGκ ασθενείς τιμές poly-IgGλ μικρότερες από 1,97 gr/L, στους IgGλ τιμές poly-IgGκ μικρότερες από 4,03 gr/L, στους IgAκ τιμές poly-IgAλ μικρότερες 0,36 gr/L και στους IgAλ τιμές poly-IgAκ μικρότερες από 0,48 gr/L.

«Υψηλή τιμή» ορίστηκε ως κάθε τιμή πάνω από τη διάμεση τιμή.

Οι τιμές HLC και ο λόγος τους συσχετίστηκαν με παράγοντες νόσου όπως τη β₂-μικροσφαιρίνη, τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης, την κρεατινίνη και την λευκωματίνη ορού, την παρουσία υπερασβεστιαϊμίας, των υψηλών επιπέδων

LDH, της εκτεταμένης οστικής νόσου καθώς και των τιμών των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων και του λόγου αυτών. Έγινε συσχέτιση με τη διήθηση του μυελού των οστών και με τα επίπεδα βιολογικών παραγόντων όπως τα επίπεδα των κυτταροκινών διαλυτός-Syndecan-1, BLys και TGF-β. Επιπλέον συσχετίστηκαν με τη συνολική επιβίωση.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα «Statistical Package for the Social Sciences» (SPSS) v 15.0. Τα όρια των λόγων και η προγνωστική σημασία του λόγου HLCR έγινε με την μονοπαραγοντική Cox regression ανάλυση. Η μέθοδος Kaplan Meier χρησιμοποιήθηκε για την σχηματική απεικόνιση των καμπύλων επιβίωσης και ενάρξεως θεραπείας. Οι μεταβλητές προς μελέτη συγκρίθηκαν με τη μέθοδο του χ^2 τετραγώνου (χ^2).

Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν μετά από ενημέρωση και έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών ενώ η χρήση των βιολογικών δειγμάτων εκκρίθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών, σύμφωνα με τις επιταγές της επιτροπής ηθικής και δεοντολογίας.

3.2.3. Αποτελέσματα

Ανάλυση των Ορών των Υγιών Δοτών Αίματος

Όπως προαναφέρθηκε μετρήθηκαν οι HLC σε 130 υγιείς δότες αίματος.

Τα επίπεδα των IgGκ διακυμανθήκαν από 4,03 έως 9,78 gr/L με διάμεση τιμή 6,85 gr/L. Τα IgGλ επίπεδα διακυμανθήκαν από 1,97 έως 5,71 gr/L με διάμεση τιμή 3,81 gr/L. Τα επίπεδα των IgAκ διακυμανθήκαν από 0,48 έως 2,82 gr/L με διάμεση τιμή 1,19 gr/L και επίπεδα των IgAλ διακυμανθήκαν από 0,36 έως 1,98 gr/L με διάμεση τιμή 0,98 gr/L.

Ο λόγος IgGκ/IgGλ διακυμάνθηκε από 0,98 έως 2,75 με διάμεση τιμή 1,87 και ο λόγος IgGλ/IgGκ διακυμάνθηκε από 0,37 έως 0,89 με διαμεση τιμή 0,54. Ο λόγος IgAκ/IgAλ διακυμάνθηκε από 0,8 έως 2,04 με διάμεση τιμή 1,27 και ο λόγος IgAλ/IgAκ διακυμάνθηκε από 0,49 έως 1,25 με διάμεση τιμή 0,79.

Πίνακας 2 : Τιμές HLC και HLCR σε Υγιείς Δότες Αίματος

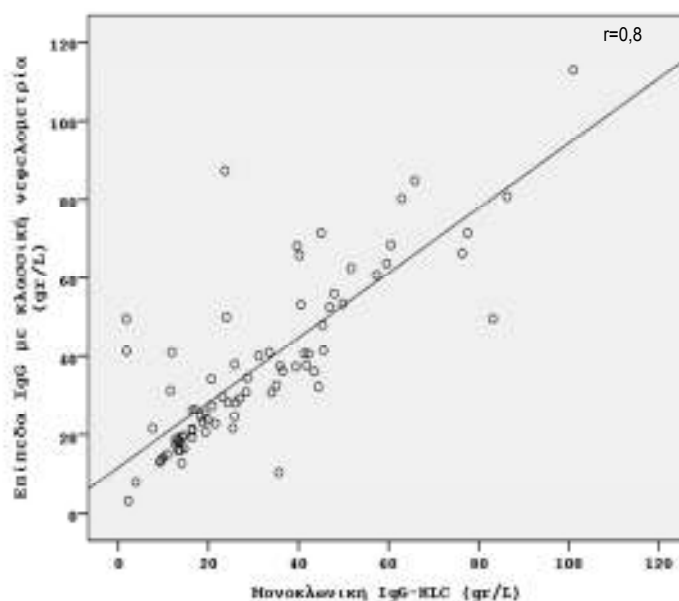
	Διάμεση τιμή	Εύρος 95%
IgGκ (gr/L)	6,85	4,03 - 9,78
IgGλ (gr/L)	3,81	1,97 - 5,71
IgAκ (gr/L)	1,19	0,48 - 2,82
IgAλ (gr/L)	0,98	0,36 - 1,98
IgGκ/IgGλ	1,87	0,98 - 2,75
IgGλ/IgGκ	0,54	0,37 - 0,89
IgAκ/IgAλ	1,27	0,8 - 2,04
IgAλ/IgAκ	0,79	0,49 - 1,25

Ανάλυση των Ορών Ασθενών με ΠΜ στη Διάγνωση της Νόσου

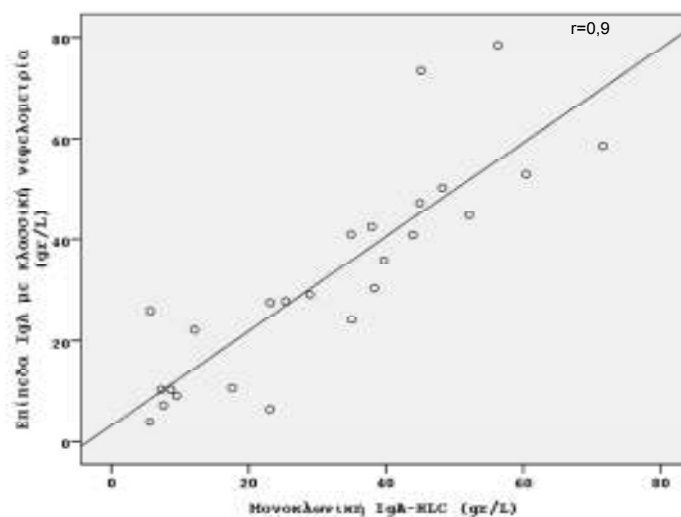
Τα επίπεδα της μονοκλωνικής IgGκ-HLC διακυμανθήκαν από 1,8 έως 101 gr/L με διάμεση τιμή 25,8 gr/L. Τα επίπεδα της μονοκλωνικής IgGλ-HLC διακυμανθήκαν από 2,27 έως 86,3 gr/L με διάμεση τιμή 23,45 gr/L. Τα επίπεδα της μονοκλωνικής IgAκ-HLC διακυμανθήκαν από 5,59 έως 71,6 gr/L με διάμεση τιμή 28,9 gr/L και τα επίπεδα της μονοκλωνικής IgAλ-HLC διακυμανθήκαν από 7,23 έως 60,4 gr/L με διάμεση τιμή 36,4 gr/L. Στους IgG ασθενείς η διάμεση τιμή της μονοκλωνικής παραπρωτεΐνης με τη μέθοδο Hevylite™ ήταν 25,61 gr/L και στους IgA ασθενείς η διάμεση τιμή της μονοκλωνικής παραπρωτεΐνης με τη μέθοδο Hevylite™ ήταν 34,9 gr/L. Η συσχέτιση των τιμών της μονοκλωνικής παραπρωτεΐνης με τη μέθοδο Hevylite™ συγκριτικά με την κλασσική νεφελομετρία ήταν $r=0,8$ για την IgG και $r=0,9$ για την IgA (Σχήμα 1, 2).

Στη διάγνωση όλοι οι ασθενείς είχαν παθολογικό λόγο HLCR. Στους IgG ασθενείς τα επίπεδα του λόγου HLCR διακυμανθήκαν από 1,4 έως 365 με διάμεση τιμή 21,47 ενώ στους IgA ασθενείς τα επίπεδα του λόγου HLCR διακυμανθήκαν από 2,5 έως 2084 με διάμεση τιμή 72,42.

Σχήμα 1
Συσχέτιση της IgG με κλασσική
νεφελομετρία με τη μονοκλωνική
IgG-HLC



Σχήμα 2
Συσχέτιση της IgA με κλασσική
νεφελομετρία με τη μονοκλωνική
IgA-HLC



Συσχέτιση των HLC με Παράγοντες Νόσου

Στους ασθενείς με IgG-ΠΜ οι τιμές της μονοκλωνική IgG-HLC πάνω από τη διάμεση τιμή συσχετίστηκαν με το στάδιο D-S ($p=0,001$), τις τιμές της αιμοσφαιρίνης λιγότερο από 10 gr/dL ($p=0,01$), με την εκτεταμένη διήθηση μυελού των οστών από πλασματοκύτταρα ($p=0,007$), με το λόγο των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων πάνω από τη διάμεση τιμή ($p=0,012$), με την παρουσία «IgM-Συστηματικής Υπογαμμασφαιριναιμίας» και «IgA-Συστηματικής Υπογαμμασφαιριναιμίας» ($p<0,001$ και για τις δύο).

Στους ασθενείς με IgA-ΠΜ οι τιμές της μονοκλωνική IgA-HLC πάνω από τη διάμεση τιμή δεν συσχετίστηκαν με κάποιον από τους παράγοντες νόσου.

Ο λόγος HLCR πάνω από τη διάμεση τιμή συσχετίστηκε με το στάδιο D-S ($p=0,003$), τις τιμές της β_2 -μικροσφαιρίνη πάνω από 3,5mg/L ($p=0,027$), με τις τιμές αιμοσφαιρίνης λιγότερο από 10 gr/dL ($p<0,001$), με την εκτεταμένη διήθηση μυελού των οστών από πλασματοκύτταρα ($p<0,001$), με την παρουσία «IgM-Συστηματικής Υπογαμμασφαιριναιμίας» και «IgA-Συστηματικής Υπογαμμασφαιριναιμίας», ($p<0,001$ και για τις δύο), και με τον λόγο των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων πάνω από τη διάμεση τιμή ($p<0,001$).

«IgG-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» παρουσίαζαν οι 19 από τους 25 IgA ασθενείς, «IgA-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» παρουσίαζαν οι 45 από τους 78 IgG ασθενείς και «IgM-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» οι 75 από τους 103 ασθενείς. «Ανοσοπάρεση της Ίδιας Ig Τάξης» παρουσίαζαν οι 83 από τους 103, ενώ «Συστηματική υπογαμμασφαιριναιμία» και «Ανοσοπάρεση της Ίδιας Ig Τάξης» οι 69 από τους 103.

Η «IgG-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» συσχετίστηκε με τον λόγο των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων πάνω από τη διάμεση τιμή ($p=0,031$).

Η «IgA-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» συσχετίστηκε με τον λόγο των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων πάνω από τη διάμεση τιμή ($p=0,004$), με την παρουσία αναιμίας ($p=0,046$), με τη β_2 -μικροσφαιρίνη πάνω από 3,5mg/L ($p=0,021$), με την εκτεταμένη διήθηση μυελού ($p=0,003$) και με τον «υψηλό λόγο» HLCR ($p<0,001$).

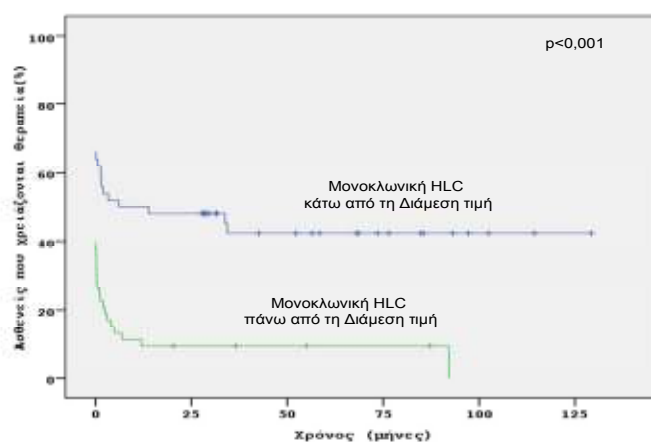
Η «IgM-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» συσχετίστηκε με τον λόγο των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων πάνω από τη διάμεση τιμή ($p=0,013$), με την παρουσία αναιμίας ($p=0,047$), με τη β_2 -μικροσφαιρίνη πάνω από 3,5mg/L ($p<0,001$), με την εκτεταμένη διήθηση μυελού ($p=0,005$), με τα στάδια νόσου D-S και ISS ($p=0,005$ και $p<0,001$ αντίστοιχα) και τον «υψηλό λόγο» HLCR ($p<0,001$).

Η «Ανοσοπάρεση της ίδιας Ig Τάξης» δεν συσχετίστηκε με κάποιο από τους παράγοντες νόσου.

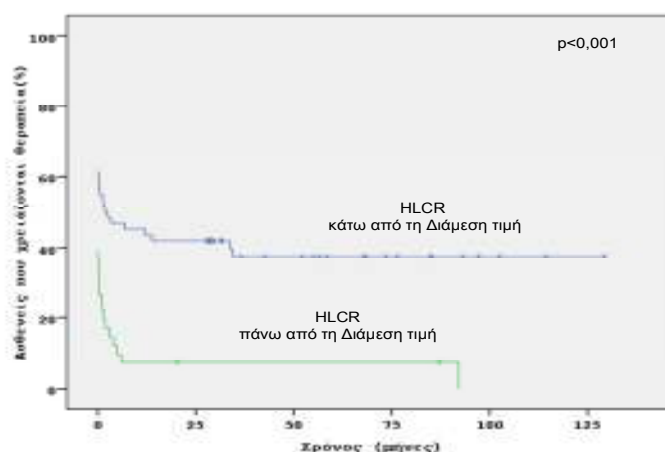
Συσχέτιση των HLC με το Χρόνο Έναρξης Θεραπείας (ΧΕΘ)

Με τον χρόνο έναρξης θεραπείας συσχετίστηκαν οι «υψηλές τιμές» IgG με την κλασσική μέθοδο νεφελομετρίας ($p < 0,001$), οι «υψηλές τιμές» μονοκλωνικής IgG-HLC ($p < 0,001$) και μονοκλωνικής IgA-HLC ($p = 0,039$) (Σχήμα 3). Επίσης σχετίστηκαν ο «υψηλός λόγος» HLCR ($p < 0,001$) (Σχήμα 4), η παρουσία «IgM-Συστηματικής Υπογαμμασφαιριναιμίας» ($p = 0,001$) (Σχήμα 5), «IgA-Συστηματικής Υπογαμμασφαιριναιμίας» ($p = 0,007$) και «Ανοσοπάρεση της Ίδιας Ig Τάξης» ($p = 0,002$) (Σχήμα 6).

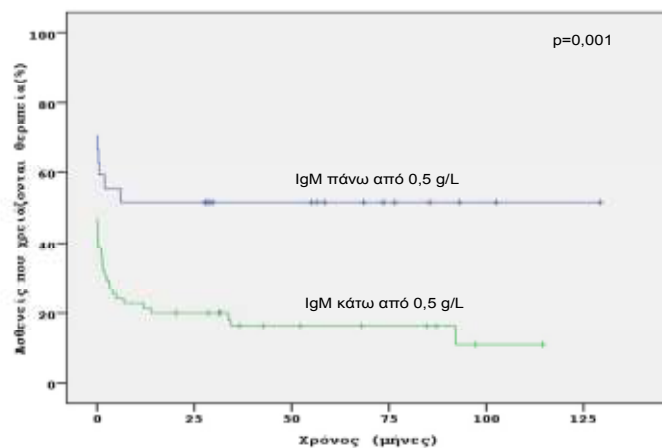
Σχήμα 3
Συσχέτιση της μονοκλωνικής
HLC με το ΧΕΘ



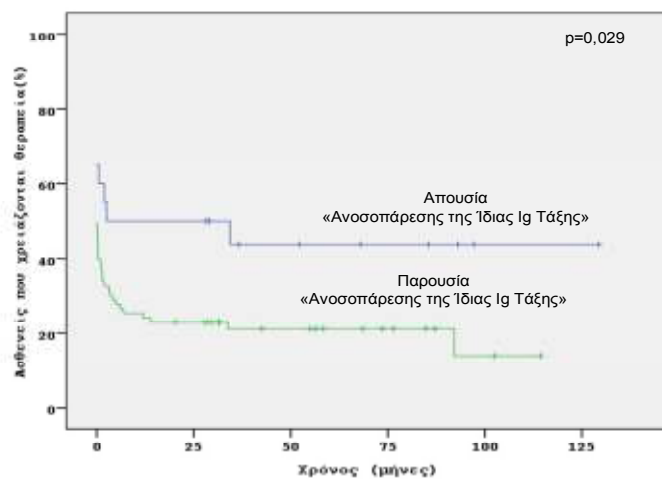
Σχήμα 4
Συσχέτιση του λόγου HLCR με
το ΧΕΘ



Σχήμα 5
Συσχέτιση της «IgM-
Συστηματικής
Υπογαμμασφαιριναιμίας» με το
ΧΕΘ



Σχήμα 6
Συσχέτιση της «Ανοσοπάρεση
της Ίδιας Ig Τάξης» με το ΧΕΘ



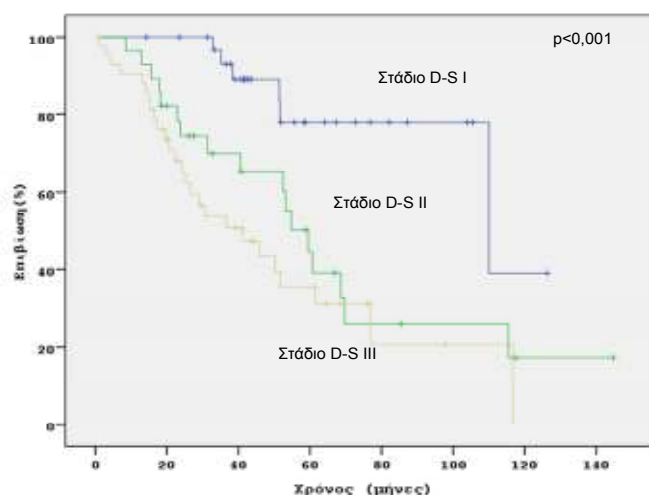
Συσχέτιση των HLC με τη Συνολική Επιβίωση (ΣΕ)

Ως προς την συνολική επιβίωση παρουσίασαν προγνωστική σημασία τα στάδια Durie-Salmon ($p < 0,001$) και ISS ($p < 0,001$) (Σχήμα 7,8), οι τιμές αιμοσφαιρίνης λιγότερο από 10 gr/dL ($p < 0,001$), οι τιμές αιμοπεταλίων μικρότερο από $140 \times 10^9/L$ ($p < 0,001$), οι τιμές λευκωματίνης ορού λιγότερο από 3,5 gr/L ($p = 0,001$), οι τιμές κρεατινίνης ορού μεγαλύτερης των 2 mg/dl ($p < 0,001$), οι τιμές της β_2 - μικροσφαιρίνη πάνω από 3,5mg/L και 5,5 mg/L ($p < 0,001$ και για τα δύο), η παρουσία υπερασβεστιαϊμίας ($p = 0,003$), η εκτεταμένη διήθηση του μυελού των οστών από πλασματοκύτταρα, ($p < 0,001$), η εκτεταμένη οστική νόσος ($p = 0,028$), η «IgM-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» ($p = 0,001$) (Σχήμα 9), ο λόγος των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων πάνω από τη διάμεση τιμή ($p = 0,006$) και ο «υψηλός λόγος» HLCR ($p = 0,015$) (Σχήμα 10).

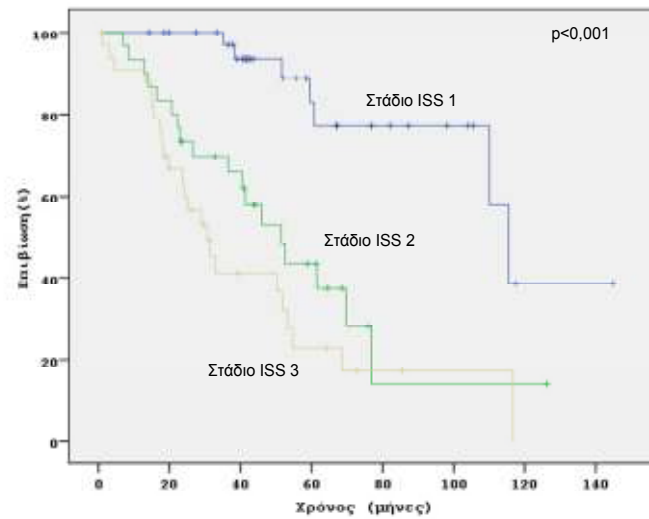
Αντιθέτως τα επίπεδα των IgG, IgA, οι τιμές HLC, η «IgG- και η IgA-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» και η «Ανοσοπάρεση της Ίδιας Ig Τάξης» δεν συσχετίστηκαν με τη συνολική επιβίωση.

Στην πολυπαραγοντική ανάλυση το στάδιο κατά ISS, οι τιμές των αιμοπεταλίων και η παρουσία υπερασβεστιαϊμίας διατήρησαν την σημαντικότητά τους ως προς τη συνολική επιβίωση.

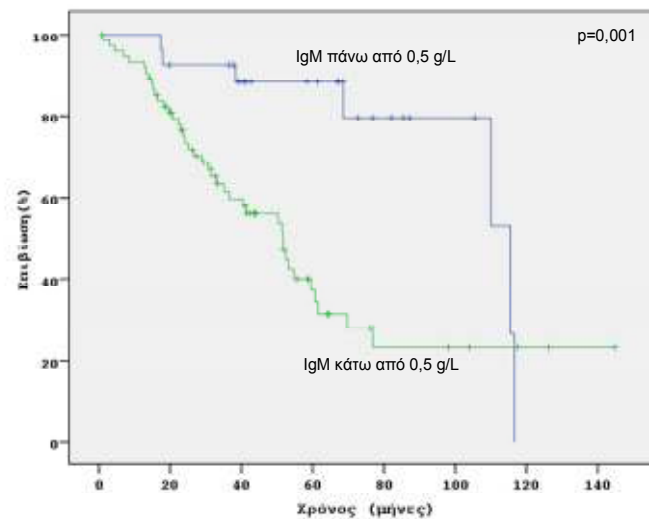
Σχήμα 7
Συσχέτιση του σταδίου Durie-Salmon με τη ΣΕ



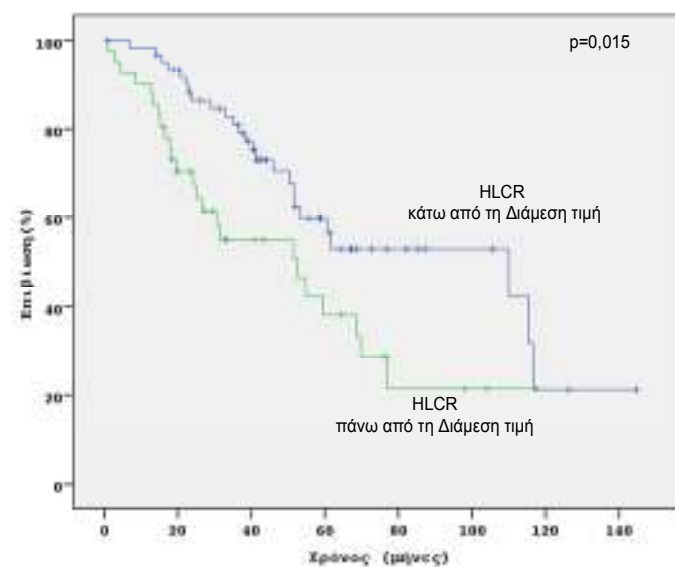
Σχήμα 8
Συσχέτιση του σταδίου ISS με
τη ΣΕ



Σχήμα 9
Συσχέτιση της «IgM-Συστηματικής
Υπογαμμασφαιριναιμία» με τη ΣΕ



Σχήμα 10
Συσχέτιση του λόγου HLCR με τη
ΣΕ



Πίνακας 3 : Σύνοψη των Συσχετίσεων της Ανοσοσφαιρίνης στο Πολλαπλούν Μυέλωμα στη Διάγνωση

	μονοκλωνική HLC	HLCR	SH	ISC
Συσχέτιση με παράγοντες νόσου	στάδιο D-S Hgb BM >50% sFLCR «IgM-SH» «IgA-SH»	στάδιο D-S Hgb BM >50% sFLCR «IgM-SH» «IgA-SH» β ₂ -μικροσφαιρίνη	στάδιο D-S Hgb BM >50% sFLCR β ₂ -μικροσφαιρίνη ISS	-
Συσχέτιση με χρόνο έναρξης θεραπείας	✓	✓	✓ IgM-SH, IgA-SH	✓
Συσχέτιση με συνολική επιβίωση	-	✓	✓ IgM-SH	-

HLC/HLCR :αμιγώς μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη και λόγος μονοκλωνικής/πολυκλωνικής της ίδιας τάξης, SH:

Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία, ISC: Ανοσοπάρεση της ίδιας Ig Τάξης

✓: συσχετίζεται, -: δεν συσχετίζεται, ✓^{IgM-SH}: μόνο στην IgM-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία ,

✓^{IgM-SH, IgA-SH} μόνο στις IgM- και IgA-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία

Συσχέτιση των HLC με τους Βιολογικούς Παράγοντες Νόσου

Α. Ο διαλυτός-Syndecan-1 στο Πολλαπλούν Μυέλωμα στη Διάγνωση

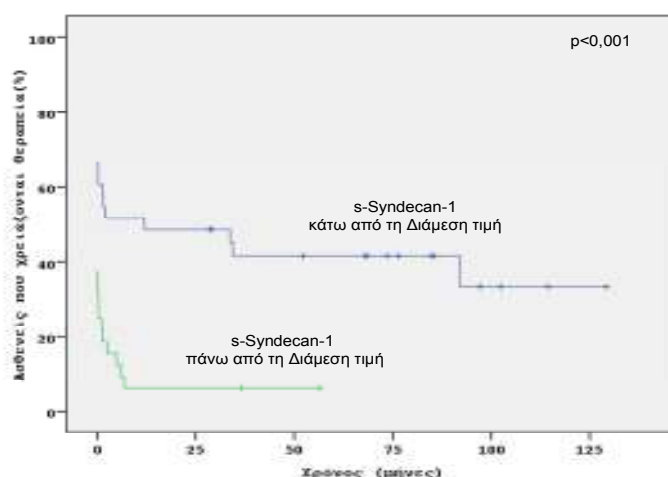
Τα επίπεδα του διαλυτού-Syndecan-1 (s-Syndecan-1) στους ασθενείς με ΠΜ διακυμανθήκαν από 7 έως 5044 ng/mL με διάμεση τιμή 75 ng/mL, ενώ στους φυσιολογικούς μάρτυρες από 5,4 έως 86 ng/mL με διάμεση τιμή 36 ng/mL.

Οι τιμές του διαλυτού-Syndecan-1 πάνω από τη διάμεση τιμή συσχετίστηκαν με τα στάδια Durie-Salmon ($p=0,002$) και ISS ($p=0,025$), με τις τιμές λευκωματίνης ορού λιγότερο από 3,5 gr/L ($p=0,005$) και με την εκτεταμένη διήθηση μυελού των οστών από πλασματοκύτταρα ($p=0,017$).

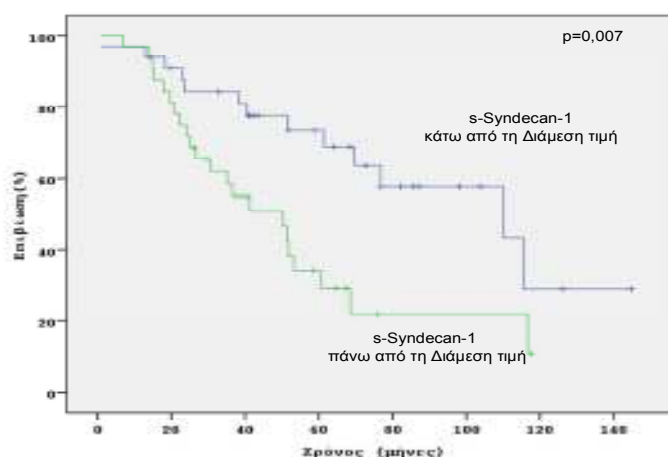
Επίσης συσχετίστηκαν με την ελάττωση του χρόνου έναρξης θεραπείας ($p<0,001$) (Σχήμα 11), όπως επίσης και με βραχύτερη συνολική επιβίωση ($p=0,007$) (Σχήμα 12).

Τα επίπεδα του διαλυτού-Syndecan-1 σαν συνεχής μεταβλητή δεν συσχετίστηκαν με τις τιμές HLC ούτε με τον λόγο HLCR.

Σχήμα 11
Συσχέτιση του s-Syndecan-1 με το ΧΕΘ



Σχήμα 12
Συσχέτιση του s-Syndecan-1 με τη ΣΕ



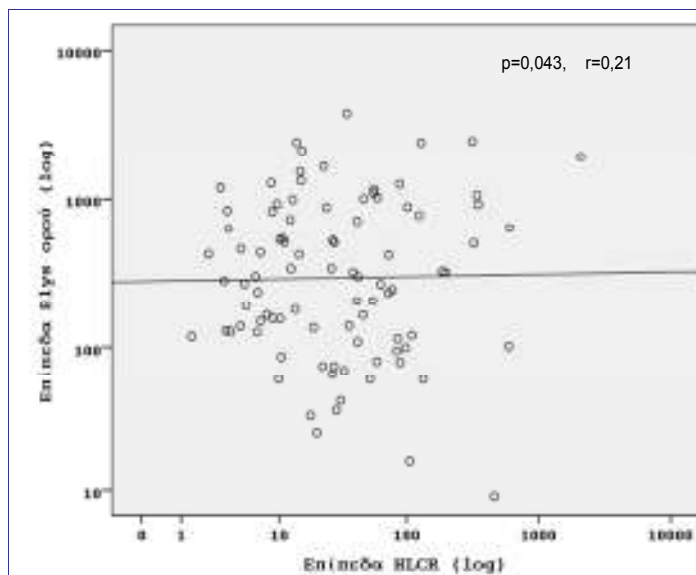
B. Ο BLys στο Πολλαπλούν Μυέλωμα στη Διάγνωση

Τα επίπεδα του BLys στους ασθενείς με ΠΜ διακυμανθήκαν από 9 έως 3734 pg/mL με διάμεση τιμή 299 pg/mL, ενώ στους φυσιολογικούς μάρτυρες από 62 έως 381 pg/mL με διάμεση τιμή 204 pg/mL.

Οι τιμές του BLys πάνω από διάμεση τιμή συσχετίστηκαν με την παρουσία υπερασβεστιαϊκής ($p=0,012$) και με την εκτεταμένη οστική νόσος ($p=0,047$), ενώ δεν συσχετίστηκαν με το χρόνο έναρξης θεραπείας ούτε με τη συνολική επιβίωση.

Τα επίπεδα του BLys σαν συνεχής μεταβλητή δεν συσχετίστηκαν με τις τιμές HLC αλλά συσχετίστηκαν με το λόγο HLCR ($p= 0,043$, $r=0,21$) (Σχήμα 13).

Σχήμα 13
Συσχέτιση του BLys με το λόγο
HLCR



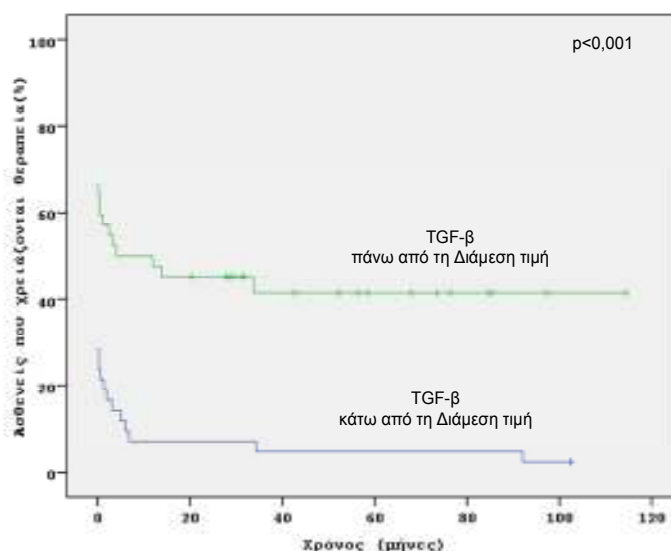
Γ. Ο TGF-β1 στο Πολλαπλούν Μυέλωμα στη Διάγνωση

Τα επίπεδα του TGF-β1 στους ασθενείς με ΠΜ διακυμανθήκαν από 125 έως 99000 pg/mL με διάμεση τιμή 36430 pg/mL, ενώ στους φυσιολογικούς μάρτυρες από 30000 έως 90000 pg/mL με διάμεση τιμή 57000 pg/mL.

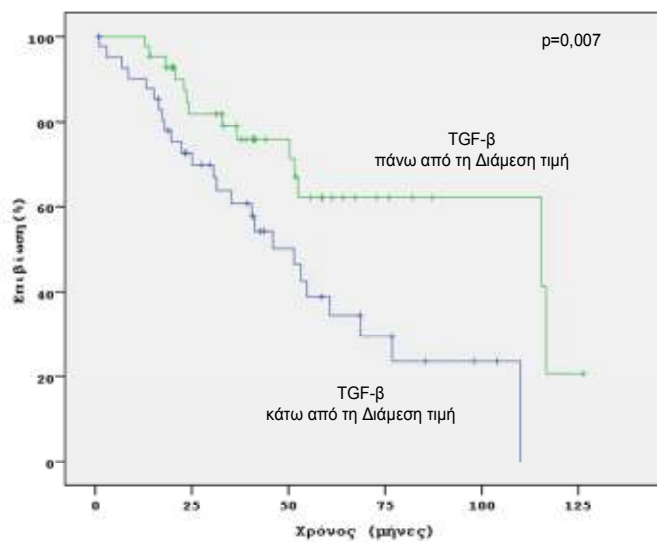
Οι τιμές του TGF-β1 πάνω από διάμεση τιμή συσχετίστηκαν με το στάδιο Durie-Salmon ($p=0,006$), με τις τιμές αιμοσφαιρίνης λιγότερο από 10 gr/dL ($p=0,001$), με τις τιμές αιμοπεταλίων μικρότερο από $140 \times 10^9/L$ ($p=0,013$), με τις τιμές της β_2 -μικροσφαιρίνη πάνω από 3,5mg/L ($p=0,032$), με την παρουσία υπερασβεσταιμίας ($p=0,013$), με την εκτεταμένη διήθηση μυελού των οστών από πλασματοκύτταρα ($p=0,017$), με τον λόγο των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων πάνω τη διάμεση τιμή ($p=0,029$) και με την παρουσία «IgA-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» ($p=0,017$). Επίσης συσχετίστηκαν με παράταση του χρόνου προς έναρξη θεραπείας ($p<0,001$) (Σχήμα 14), όπως επίσης και με μεγαλύτερη συνολική επιβίωση ($p=0,007$) (Σχήμα 15).

Τα επίπεδα του TGF-β1 σαν συνεχής μεταβλητή συσχετίστηκαν με τις τιμές HLC ($p=0,006$, $r=0,3$) (Σχήμα 16) αλλά δεν συσχετίστηκαν με το λόγο HLCR.

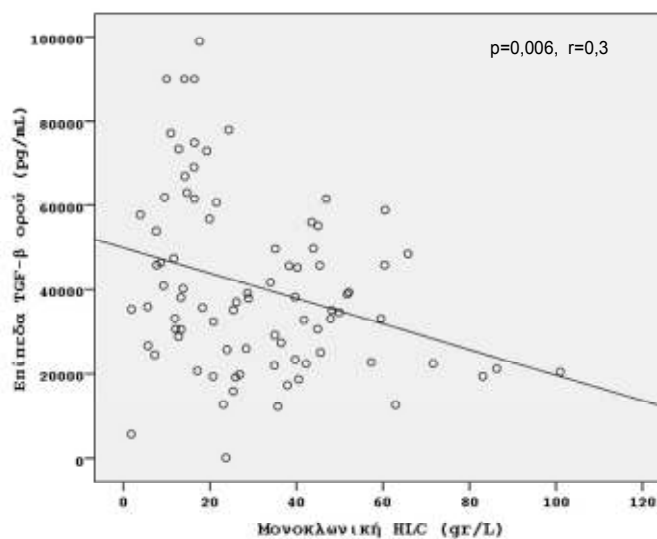
Σχήμα 14
Συσχέτιση του TGF-β1 με το ΧΕΘ



Σχήμα 15
Συσχέτιση του TGF-β1 με τη ΣΕ



Σχήμα 16
Συσχέτιση του TGF-β1 με τη
μονοκλωνική HLC



Πίνακας 4: Κυτταροκίνες στον ορό ασθενών με ΠΜ στη διάγνωση και σύνοψη συσχετίσεων

	διαλυτός-Syndecan-1	BLys	TGF-β1
Από τους 103 ασθενείς μετρήθηκε στον ορό στους	78	91	84
Διάμεση τιμή	75 ng/mL	299 pg/mL	36430 pg/mL
Εύρος	7 - 5044 ng/mL	9 - 3734 pg/mL	125 - 99000 pg/mL
Συσχέτιση με HLC/HLCR	-	√	√
Συσχέτιση με παράγοντες νόσου	στάδιο Durie-Salmon ISS λευκωματίνη ορού BM > 50%	υπερασβεστιαμία οστική νόσο	στάδιο Durie-Salmon BM > 50% υπερασβεστιαμία Hgb PTLs β ₂ - μικροσφαιρίνη sFLCR «IgA-συστηματική υπογαμμασφαιριναιμία»
Συσχέτιση με χρόνο έναρξης θεραπείας	√	-	√
Συσχέτιση με συνολική επιβίωση	√	-	√

√: συσχετίζεται, -: δεν συσχετίζεται

3.3. Πολλαπλούν Μυέλωμα στην Πορεία

3.3.1. Ασθενείς

Μελετήθηκε σειρά 51 ασθενών με Πολλαπλούν Μυέλωμα από την διάγνωση τους μέχρι την τελευταία επίσκεψη ή τον θάνατό τους. Όλοι οι ασθενείς ήταν συμπτωματικοί κατά την διάγνωση. Η έναρξη και η επιλογή της θεραπείας έγινε σύμφωνα με τα διεθνή κριτήρια. Το φύλο ήταν άρρεν για τους 28 από αυτούς και θήλυ για τους υπόλοιπους 23. Η διάμεση ηλικία στη διάγνωση ήταν 66 έτη (εύρος 43-89 έτη). Η ταυτοποίηση της παραπρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με ανοσοκαθήλωση ορού και ήταν IgGκ σε 26, IgGλ σε 12, IgAκ σε 7 και IgAλ σε 6. Δεν συμπεριλήφθησαν ασθενείς με μυέλωμα ελαφρών αλυσίδων καθώς σκοπός ήταν ο προσδιορισμός της βαριάς αλυσίδας της παραπρωτεΐνης.

Πίνακας 5 : Χαρακτηριστικά ασθενών με Πολλαπλούν Μυέλωμα σε πορεία

Αριθμός ασθενών		51
Διάμεση ηλικία		66 έτη (εύρος 43-89)
Φύλο Α/Θ		28/23
Ανοσοκαθήλωση ορού	IgGκ IgGλ IgAk IgAλ	26/51 12/51 7/51 6/51
Στάδιο νόσου κατά ISS στη διάγνωση	1 2 3	34%, 34% 32%
Γραμμές Θεραπείας	1 2 3 4 > 4	45,5% 24,1% 13,4% 7,1% 9,9%
Θεραπεία	VAD PAD / VelDex / MPVel RevDex ThalDex / MPThal MP Άλλη ή συνδυασμός των παραπάνω + ABMT	20,7%, 25,7% 14,3% 7,9% 6,4% 25%
Γραμμές θεραπειών που περιλάμβαναν Νέους Παράγοντες		65%
Ανταπόκριση στη θεραπεία	sCR nCR+CR PR MR SD / PD	10,7%, 34,8% 16,1% 17,9% 20,5%
Διάμεσος Χρόνος Ελεύθερης Νόσου	1 ^{ης} γραμμής 2 ^{ης} γραμμής 3 ^{ης} γραμμής 4 ^{ης} γραμμής	13,5 μήνες 10 μήνες 8,7 μήνες 9 μήνες
Διάμεση παρακολούθηση		33 μήνες (εύρος 7-144)

V: Vincristine, A: Adriamycin, D/Dex: Dexamethasone, P/Vel: Bortezomib, M: Melphalan,

P: Prednisone, Thal: Thalidomide, Rev: Lenalidomide, ABMT: Autologous Stem Cell Transplantation

3.3.2. Μεθοδολογία

Σε συνολικά 312 στιγμές νόσου (διάγνωση, ύφεση, υποτροπή) πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός ανοσοσφαιρινών και ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων ορού με κλασσική νεφελομετρία, ανοσοκαθήλωση ορού και ούρων και προσδιορισμός των HLC είτε σε φρέσκους ορούς στο πλαίσιο της κλινικής πρακτικής, είτε αναδρομικά σε κατεψυγμένους ορούς. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των HLC πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της νεφελομετρίας με τη χρήση Dade Behring BN II Nephelometer στα εργαστήρια της Binding Site, στο Birmingham, Ενωμένο Βασίλειο καθώς και στο Τμήμα Ανοσολογίας του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών. Χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα από πρόβατα (Hevylite™, Binding Site, U.K.).

Η ανταπόκριση στην θεραπεία (sCR, CR, nCR, PR, SD, PD) ορίστηκε σύμφωνα με τα διεθνή κριτήρια.

Ο λόγος HLCR υπολογίστηκε με την μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη ως αριθμητής και την πολυκλωνική ανοσοσφαιρίνη της ίδιας κατηγορίας ως παρονομαστής δηλαδή mono-IgGκ/poly-IgGλ στους IgGκ ασθενείς, mono-IgGλ/poly-IgGκ στους IgGλ, mono-IgAκ/poly-IgAλ στους IgAκ ασθενείς και mono-IgAλ/poly-IgAκ στους IgAλ. Τα αποτελέσματα ήταν αναπαραγωγίσιμα.

Παράλληλα έγιναν μετρήσεις και σε 130 υγιείς δότες αίματος οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σαν τιμές έλεγχου.

Ορίσαμε την «μη φυσιολογική HLC» βάση της τιμών των υγιών δοτών ως IgGκ πάνω από 9,78gr/L, IgGλ πάνω από 5,71 gr/L, IgAκ πάνω από 2,82 gr/L και IgAλ πάνω από 1,98 gr/L.

Ορίσαμε τον «φυσιολογικό λόγο HLCR» βάση της τιμών των υγιών δοτών αίματος ως ακολούθως mono-IgGκ/poly-IgGλ από 0,98 έως 2,75, mono-IgGλ/poly-IgGκ από 0,37 έως 0,89, mono-IgAκ/poly-IgAλ από 0,8 έως 2,04 και mono-IgAλ/poly-IgAκ από 0,49 έως 1,25.

Ορίσαμε την «φυσιολογικό λόγος ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων» βάση της τιμών των υγιών δοτών αίματος ως ακολούθως κ/λ από 0,09 έως 0,83 και ως λ/κ από 1,21 έως 13,1.

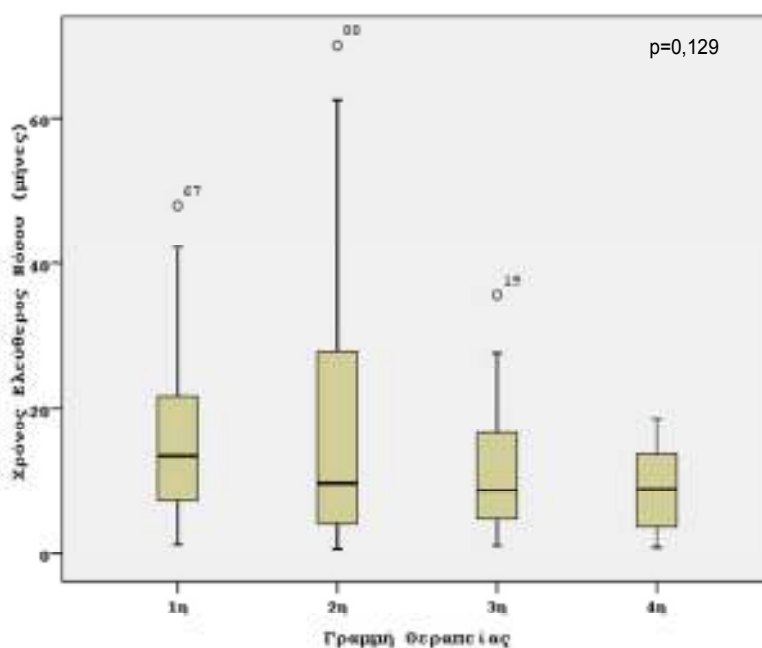
Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα «Statistical Package for the Social Sciences» (SPSS) v15.0. Τα όρια των λόγων και η προγνωστική σημασία του λόγου των HLCR έγινε με την μονοπαραγοντική Cox regression ανάλυση. Η μέθοδος Kaplan Meier χρησιμοποιήθηκε για την σχηματική απεικόνιση των καμπυλών επιβίωσης και ενάρξεως θεραπείας.

Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν μετά από ενημέρωση και έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών ενώ η χρήση των βιολογικών δειγμάτων εκκρίθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών σύμφωνα με τις επιταγές της επιτροπής ηθικής και δεοντολογίας.

3.3.3. Αποτελέσματα

Κατά τη διάρκεια παρακολούθησης εκτιμήθηκε 145 φορές η ανταπόκριση του συνόλου των ασθενών μετά τη θεραπεία. Ο διάμεσος αριθμός των θεραπευτικών γραμμών ήταν 2 (εύρος 1-11) και ο διάμεσος χρόνος παρακολούθησης ήταν 33 μήνες (εύρος 7-144 μήνες).

Ο διάμεσος χρόνος ελεύθερης νόσου (ΧΕΝ) για την πρώτη γραμμή θεραπείας ήταν 13,5 μήνες για την δεύτερη γραμμή 10 μήνες, για την τρίτη 8,7 και για την τέταρτη 9 μήνες. Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά των διάμεσων των χρόνων ελεύθερης νόσου στις 4 γραμμές θεραπείας (Σχήμα 13).



Σχήμα 13
Συσχέτιση των διάμεσων
των ΧΕΝ στις 4 γραμμές
θεραπείας

Προσδιορισμός της Παραπρωτεΐνης με την Κλασσική Μέθοδο της Νεφελομετρίας και Συσχέτιση με το Χρόνο Ελεύθερης Νόσου (XEN)

Στην διάγνωση τα επίπεδα της IgG παραπρωτεΐνης διακυμανθήκαν από 3,2 έως 113 gr/L με διάμεση τιμή 41,15 gr/L, και της IgA παραπρωτεΐνης διακυμανθήκαν από 3,9 έως 73,4 gr/L με διάμεση τιμή 40,9 gr/L.

Στην ανταπόκριση τα επίπεδα της IgG παραπρωτεΐνης ή της φυσιολογικής πια IgG διακυμανθήκαν από 2,54 έως 118 gr/L με διάμεση τιμή 16,30 gr/L

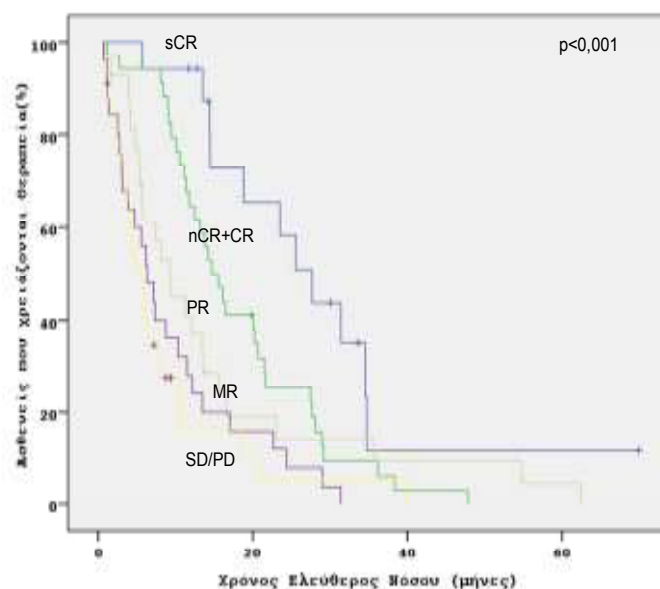
Στην ανταπόκριση τα επίπεδα της IgA παραπρωτεΐνης ή της φυσιολογικής πια IgA διακυμανθήκαν από 0,24 έως 34,7 gr/L με διάμεση τιμή 4,92 gr/L.

Το 12,5% των ανταποκρίσεων ήταν sCR, το 25% CR+nCR, το 20% PR, το 18,5% MR, και το 24% περιπτώσεις ανθεκτικής ή επιδεινούμενης νόσου.

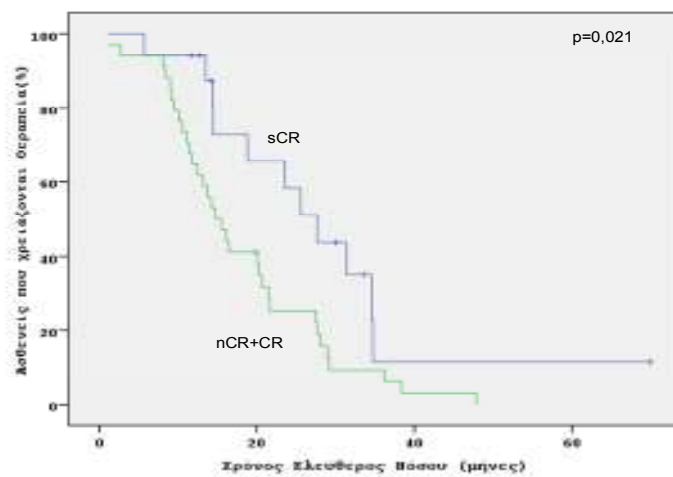
Οι ασθενείς σε sCR και CR+nCR είχαν μεγαλύτερο χρόνο ελεύθερης νόσου σε σχέση με τους υπόλοιπους ($p < 0,001$) (Σχήμα 14).

Οι ασθενείς σε sCR είχαν μεγαλύτερο χρόνο ελεύθερης νόσου σε σχέση με αυτούς σε CR+nCR ($p=0,021$) (Σχήμα 15).

Σχήμα 14
Συσχέτιση της
Ανταπόκρισης με το XEN



Σχήμα 15
Συσχέτιση του ΧΕΝ στις
ανταποκρίσεις sCR και
nCR+CR



Ανάλυση HLC και sFLC στους Ορούς Υγιών Δοτών Αίματος

Όπως προαναφέρθηκε μετρήθηκαν οι HLC σε 130 υγιείς δότες αίματος.

Τα επίπεδα των IgGκ διακυμανθήκαν από 4,03 έως 9,78 gr/L με διάμεση τιμή 6,85 gr/L. Τα IgGλ επίπεδα διακυμανθήκαν από 1,97 έως 5,71 gr/L με διάμεση τιμή 3,81 gr/L. Τα επίπεδα των IgAκ διακυμανθήκαν από 0,48 έως 2,82 gr/L με διάμεση τιμή 1,19 gr/L και επίπεδα των IgAλ διακυμανθήκαν από 0,36 έως 1,98 gr/L με διάμεση τιμή 0,98 gr/L.

Ο λόγος IgGκ/IgGλ διακυμάνθηκε από 0,98 έως 2,75 με διάμεση τιμή 1,87 και ο λόγος IgGλ/IgGκ διακυμάνθηκε από 0,37 έως 0,893 με διάμεση τιμή 0,54. Ο λόγος IgAκ/IgAλ διακυμάνθηκε από 0,8 έως 2,04 με διάμεση τιμή 1,27 και ο λόγος IgAλ/IgAκ διακυμάνθηκε από 0,49 έως 1,256 με διάμεση τιμή 0,79.

Τα επίπεδα της κ ελεύθερης ελαφράς αλυσίδας διακυμανθήκαν από 1,88 έως 14,9 mg/L με διάμεση τιμή 8,85 mg/L. Τα επίπεδα της λ ελεύθερης ελαφράς αλυσίδας διακυμανθήκαν από 12,7 έως 31,2 mg/L με διάμεση τιμή 20,5 mg/L. Ο λόγος κ/λ διακυμάνθηκε από 0,09 έως 0,83 με διάμεση τιμή 0,43 και ο λόγος λ/κ διακυμάνθηκε από 1,21 έως 13,1 με διάμεση τιμή 2,34.

Πίνακας 6 : Τιμές HLC/HLCR και sFLC/sFLCR σε Υγιείς Δότες Αίματος

	Διάμεση τιμή	Εύρος 95%
IgGκ (gr/L)	6,85	4,03 – 9,78
IgGλ (gr/L)	3,81	1,97 – 5,71
IgAκ (gr/L)	1,19	0,48 – 2,82
IgAλ (gr/L)	0,98	0,36 – 1,98
IgGκ/IgGλ	1,87	0,98 – 2,75
IgGλ/IgGκ	0,54	0,37 – 0,89
IgAκ/IgAλ	1,27	0,8 - 2,04
IgAλ/IgAκ	0,79	0,49 – 1,25
κ sFLC (mg/L)	8,85	1,88 - 14,9
λ sFLC (mg/L)	20,5	12,7 – 32,1
κ/λ sFLCR	0,43	0,09 – 0,83
λ/κ sFLCR	2,34	1,21 – 13,1

HLC/HLCR : αμιγώς μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη και λόγος μονοκλωνικής/πολυκλωνικής της ίδιας τάξης

sFLC/ sFLCR: ελεύθερες ελαφρές αλυσίδες ορού και λόγος, λόγος των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων ορού

HLC στην Διάγνωση και την Ανταπόκριση και Συσχέτιση με το Χρόνο Ελεύθερης Νόσου

Στη διάγνωση τα επίπεδα της μονοκλωνικής IgGκ-HLC διακυμανθήκαν από 1,8 έως 101 gr/L με διάμεση τιμή 37,93 gr/L. Τα επίπεδα της μονοκλωνικής IgGλ-HLC διακυμανθήκαν από 2,27 έως 86,3 gr/L με διάμεση τιμή 31,7 gr/L. Τα επίπεδα της μονοκλωνικής IgAκ-HLC διακυμανθήκαν από 5,59 έως 71,6 gr/L με διάμεση τιμή 43,9 gr/L και τα επίπεδα της μονοκλωνικής IgAλ-HLC διακυμανθήκαν από 12,1 έως 60,4 gr/L με διάμεση τιμή 42,4gr/L. Στους IgG ασθενείς η διάμεση τιμή της μονοκλωνικής-HLC ήταν 37,93 gr/L και στους IgA ασθενείς η διάμεση τιμή της μονοκλωνικής-HLC ήταν 43,9 gr/L.

Στη διάγνωση όλοι οι ασθενείς είχαν «μη-φυσιολογικό λόγο HLCR». Στους IgG ασθενείς τα επίπεδα του λόγου HLCR διακυμανθήκαν από 1,4 έως 365 με διάμεση τιμή 40,23 ενώ στους IgA ασθενείς τα επίπεδα του λόγου HLCR διακυμανθήκαν από 12,91 έως 2084 με διάμεση τιμή 255,33.

Στην ανταπόκριση τα επίπεδα της IgGκ-HLC παραπρωτεΐνης ή της φυσιολογικής πια IgGκ-HLC διακυμανθήκαν από 0,53 έως 92,10 gr/L με διάμεση τιμή 12 gr/L, τα επίπεδα της IgGλ-HLC παραπρωτεΐνης ή της φυσιολογικής πια IgGλ-HLC διακυμανθήκαν από 1,4 έως 75,70 gr/L με διάμεση τιμή 8,21 gr/L. Στην ανταπόκριση τα επίπεδα της IgAκ-HLC παραπρωτεΐνης ή της φυσιολογικής πια IgAκ-HLC διακυμανθήκαν από 0,72 έως 27,10 gr/L με διάμεση τιμή 5,36 gr/L. Στην ανταπόκριση τα επίπεδα της IgAλ-HLC παραπρωτεΐνης ή της φυσιολογικής πια IgAλ-HLC διακυμανθήκαν από 0,22 έως 35,90 gr/L με διάμεση τιμή 9,55 gr/L.

Στην ανταπόκριση στους IgG ασθενείς τα επίπεδα του λόγου HLCR διακυμανθήκαν από 0,52 έως 132,52 με διάμεση τιμή 9,7 ενώ στους IgA ασθενείς τα επίπεδα του λόγου HLCR διακυμανθήκαν από 0,85 έως 466,23 με διάμεση τιμή 20,54.

Οι ασθενείς με «φυσιολογικό λόγο HLCR» στην ανταπόκριση είχαν μεγαλύτερο χρόνο ελεύθερης νόσου σε σχέση με τους υπόλοιπους ($p=0,046$) ανεξάρτητα από τη γραμμή θεραπείας (Σχήμα 16).

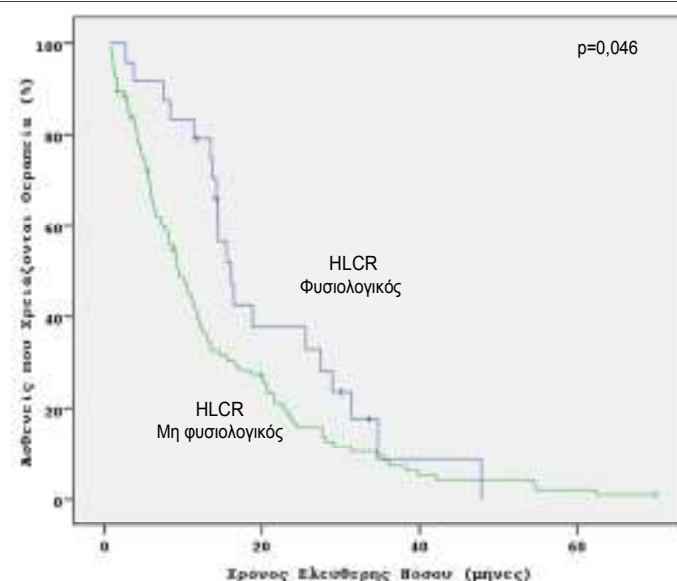
Σε ασθενείς σε sCR βρέθηκε «μη-φυσιολογικός λόγος HLCR» στο 23% των περιπτώσεων, ενώ το γεγονός αυτό δεν αποτέλεσε αρνητικό προγνωστικό παράγοντα ως προς το χρόνο ελεύθερης νόσου.

Σε ασθενείς σε CR+nCR βρέθηκε «μη-φυσιολογικός λόγος HLCR» στο 60% των περιπτώσεων και μη φυσιολογική HLC στο 35%. Αυτό το γεγονός δεν αποτέλεσε αρνητικό προγνωστικό παράγοντα ως προς το χρόνο ελεύθερης νόσου.

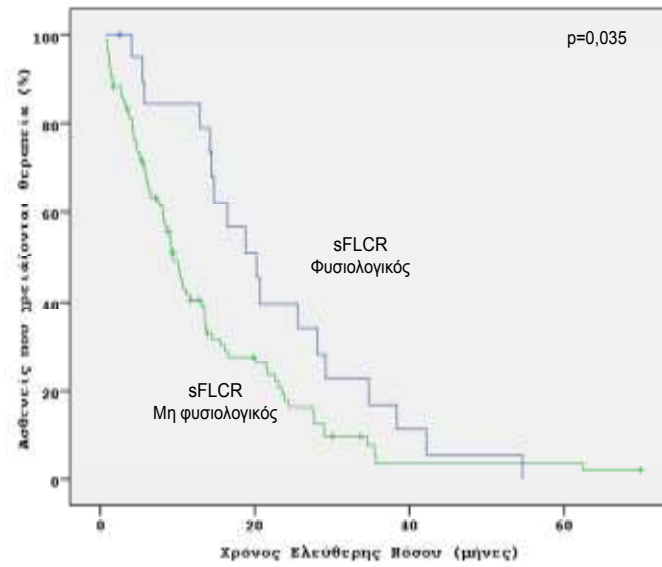
Οι ασθενείς με φυσιολογικό λόγο ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων στην ανταπόκριση είχαν μεγαλύτερο χρόνο ελεύθερης νόσου σε σχέση με τους υπόλοιπους ανεξαρτήτως γραμμής θεραπείας ($p=0,035$) (Σχήμα 17).

Στους ασθενείς σε CR+nCR όσοι είχαν φυσιολογικό λόγο ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων είχαν μεγαλύτερο χρόνο ελεύθερης νόσου σε σχέση με τους υπόλοιπους ανεξαρτήτως γραμμής θεραπείας ($p=0,036$) (Σχήμα 18).

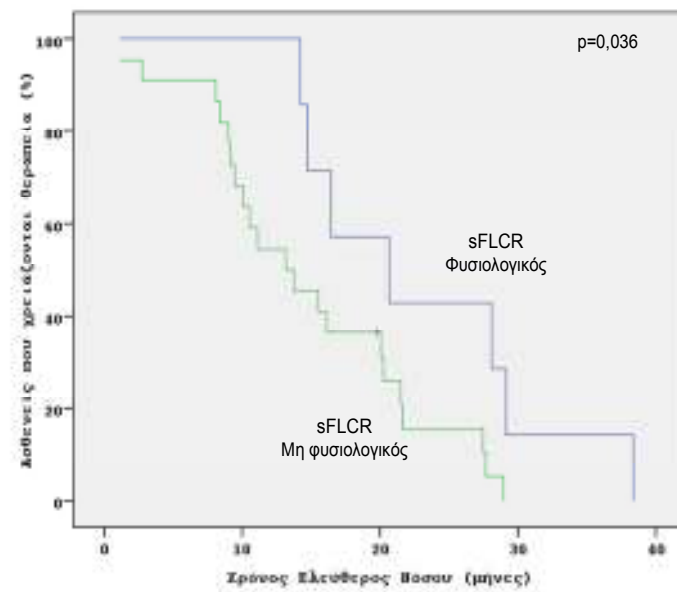
Σχήμα 16
Συσχέτιση του λόγου
HLCR στην ανταπόκριση
με τον XEN



Σχήμα 17
Συσχέτιση του λόγου
sFLCR στην ανταπόκριση
με τον XEN



Σχήμα 18
Συσχέτιση του λόγου
sFLCR στην ανταπόκριση
nCR+CR με τον XEN



Κεφάλαιο 4. Η Μακροσφαιριναιμία του Waldenström

4.1. Εισαγωγή

Η Μακροσφαιριναιμία του Waldenström (MW) αποτελεί ένα σπάνιο Β λέμφωμα χαμηλής κακοήθειας, που κατατάσσεται στην τρέχουσα κατάταξη των λεμφωμάτων (WHO) στην ξεχωριστή ομάδα των λεμφοπλασματοκυτταρικών λεμφωμάτων (LPL). Χαρακτηρίζεται από λεμφοπλασματοκυτταρική διήθηση του μυελού των οστών και συνυπάρχουσα IgM παραπρωτεΐναιμία ανεξαρτήτως συγκέντρωσης [Lin και συν, 2005; Owen και συν, 2003; Pangalis και συν, 2003]. Η διάγνωση βασίζεται στη μορφολογία των κυττάρων, τα οποία είναι Β μικρά λεμφοκύτταρα, λεμφοκύτταρα με πλασματοκυτταροειδή διαφοροποίηση και πλασματοκύτταρα, στον αποκλεισμό άλλων λεμφωμάτων χαμηλής κακοήθειας, που παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογία, καθώς και στην παρουσία IgM παραπρωτεΐνης, αφού σε απουσία της το νόσημα χαρακτηρίζεται ως LPL και όχι ως WM [Swerdlow και συν, 2008].

Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ως παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου την προϋπαρξη κάποιου αυτοάνοσου νοσήματος, κυρίως μετά από συστηματική σκλήρυνση, σύνδρομο Sjögren, ρευματική πολυμυαλγία και γιγαντοκυτταρική αρτηρίτιδα [Swerdlow και συν, 2008; Landgren, 2012].

Σε μοριακό επίπεδο μετά από ανάλυση αλληλουχιών ολόκληρου γονιδιώματος (whole genome sequencing) βρέθηκε ότι οι ασθενείς με MW είχαν αυξημένο επιπολασμό της μετάλλαξης MYD88 L265P, η οποία ενεργοποιεί το μονοπάτι του NF-κΒ (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells) και οδηγεί σε μειωμένη απόπτωση των νεοπλασματικών κυττάρων [Treon και συν, 2012].

Το 25-40% των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί στην διάγνωση και δεν χρειάζονται άμεσα θεραπεία. Οι υπόλοιποι παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος εκδηλώσεων καθώς αποτελεί ένα ετερογενές νόσημα ως προς τα κλινικά σημεία και συμπτώματα. Αφενός πολλά από αυτά είναι εκδηλώσεις του λεμφώματος καθεαυτού όπως η λεμφαδενοπάθεια, η σπληνομεγαλία, η ανεπάρκεια του μυελού των οστών και η Β συμπτωματολογία, αφετέρου είναι απόρροια της παραπρωτεΐνης [Facon και συν, 1995; Kytsonis και συν, 2001;

Garcia-Sanz και συν, 2001; Dimopoulos και συν, 2005;]. Η IgM αποτελεί ενδοαγγειακό μόριο με αποτέλεσμα σε υψηλά επίπεδα να προκαλεί σύνδρομο υπεργλοιοπάθειας, να δρα ως ψυχροσυγκολλητίνη και ως κρυσταλλίνη οδηγώντας σε αυτοάνοσες κυτταροπενίες και σε φαινόμενο Raynaud, να συνδέεται με την γλυκοπρωτεΐνη συσχετιζόμενη με την μυελίνη (MAG) και την γαγγλιοσίδη M₁ (GM₁) στα νευρικά κύτταρα προκαλώντας νευροπάθεια και να εναποτίθεται στους ιστούς σαν αμυλοειδές.

Η σημασία των επιπέδων της παραπρωτεΐνης ως δείκτης φορτίου νόσου και συνεπαγόμενης κλινικής συμπεριφοράς είχε ως αποτέλεσμα να συμπεριληφθεί στο International Prognostic Staging System για την WM (IPSS-WM), το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη. Το (IPSS-WM) συνεκτιμά τις κάτωθι 5 παραμέτρους [Morel και συν, 2009] :

1. ηλικία μεγαλύτερη από 65 έτη
2. επίπεδα αιμοσφαιρίνης λιγότερο από 11,5 g/dL
3. αριθμός αιμοπεταλίων μικρότερος από 100x10⁹/L
4. τιμές β₂- μικροσφαιρίνης ορού μεγαλύτερη από 3,0 mg/L
5. επίπεδα IgM ορού περισσότερο από 70,0 g/L

Οι ασθενείς κατατάσσονται σε ομάδες χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού ρίσκου ανάλογα με τους παράγοντες

1. **Ομάδα χαμηλού ρίσκου:** παρουσία ενός παράγοντα εκτός της ηλικίας
2. **Ομάδα ενδιάμεσου ρίσκου:** ηλικία άνω από 65 έτη ή παρουσία δύο από τους υπόλοιπους παράγοντες.
3. **Ομάδα υψηλού ρίσκου:** παρουσία περισσότερων από δύο παράγοντες.

Τα επίπεδα της IgM χρησιμοποιούνται για της εκτίμηση της ανταπόκρισης στην θεραπεία [Owen και συν, 2013].

Ως «πλήρης ανταπόκριση» (Complete Response ή CR) ορίζεται η παρουσία αρνητικής ανοσοκαθήλωσης ορού, η αρνητική βιοψία μυελού των οστών και η εξαφάνιση της λεμφαδενοπάθειας, της οργανομεγαλίας και των συμπτωμάτων εκ της νόσου.

Ως «μερική ανταπόκριση» (Partial Response ή PR) η μείωση της παραπρωτεΐνης περισσότερο από 50% και η μείωση του μεγέθους των λεμφαδένων και της οργανομεγαλίας περισσότερο από 50%.

Ως «ελάσσων ανταπόκριση» (Minor Response ή MR) μείωση της παραπρωτεΐνης περισσότερο από 25%, αλλά λιγότερο από 50%.

Ως «σταθερή νόσος» (Stable Disease ή SD) η μείωση της παραπρωτεΐνης λιγότερο από 25% ή αύξηση της παραπρωτεΐνης λιγότερο από 25% χωρίς περαιτέρω αύξηση του μεγέθους των λεμφαδένων και της οργανομεγαλίας ή εμφάνιση νέων συμπτωμάτων και κυτταροπενιών.

Ως «επιδεινούμενη νόσος» (Progressive Disease ή PD) η αύξηση της παραπρωτεΐνης περισσότερο από 25% ή η αύξηση του μεγέθους των λεμφαδένων ή της οργανομεγαλίας ή την εμφάνιση κυτταροπενιών ή Β συμπτωμάτων.

Η ανίχνευση λοιπόν και ο ποσοτικός προσδιορισμός της IgM αποτελεί ένα αναπόσπαστο βήμα στη διάγνωση και της παρακολούθηση του νοσήματος. Η εγκυρότητα των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό μπορούν να επηρεαστούν από τα χαρακτηριστικά της παραπρωτεΐνης. Στην ηλεκτροφόρηση λευκωμάτων ορού η IgM εξαρτάται από τον πρότυπο μετανάστευσής της στην γέλη. Επίσης παρουσιάζει την τάση να πολυμερίζεται και να δημιουργεί συμπλέγματα στον ορό δυσκολεύοντας την μέτρησή τους, ενώ τα επίπεδά της μπορούν να επηρεαστούν από την παρουσία αιμόλυσης. Η πρόκληση είναι ακόμα πιο έντονη σε περιπτώσεις που η παραπρωτεΐνη ανευρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα [Habel και συν, 2008; Schnebelen 2012; Bradwell, 2010]. Στο 20-25% των ασθενών ανευρίσκεται και πολυκλωνική υπεργαμμασφαιριναιμία, η οποία περαιτέρω επηρεάζει τον ακριβή υπολογισμό της.

4.1. Η Μακροσφαιριναιμία του Waldenström στη Διάγνωση

4.1.2. Ασθενείς

Μελετήθηκε σειρά 70 ασθενών με νεοδιάγνωση Μακροσφαιριναιμίας του Waldenström οι οποίοι παρακολουθούνται στο Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών και στο Νοσοκομείο Αθηνών Αλεξάνδρα. Το φύλο ήταν άρρεν στους 37 και θήλυ στους 33. Η διάμεση ηλικία ήταν 66 έτη (εύρος 44-91). Η σταδιοποίηση σύμφωνα με το διεθνές σύστημα WM-International Prognostic Scoring System (WM-IPSS) ήταν 44% σε στάδιο 1, 28% σε στάδιο 2 και 28% σε στάδιο 3. Τα χαρακτηριστικά νόσου ήταν τα ακόλουθα:

Το 29% εξ' αυτών είχαν αναιμία με τιμές αιμοσφαιρίνης λιγότερης των 10 gr/dl, ενώ το 13% παρουσίαζε θρομβοπενία με τιμές αιμοπεταλίων λιγότερα από $140 \times 10^9/L$. Το 13% είχε απόλυτο αριθμό λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος μεγαλύτερο των $4 \times 10^9/L$. Χαμηλή τιμή λευκωματίνης ορού (λιγότερη από 3,5gr/L) είχαν το 22%, ενώ αυξημένη τιμή του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) ευρέθη στο 16%. Υψηλές τιμές β_2 -μικροσφαιρίνη ($> 5,5$ mg/L) είχε το 22% και το 44% παρουσίαζε στην βιοψία μυελού των οστών εκτεταμένη διήθησή του από λεμφοπλασματοκύτταρα (διήθηση $> 50\%$). Παρουσία σπληνομεγαλίας είχαν το 13% και λεμφαδενοπάθεια το 17%.

Η ταυτοποίηση της παραπρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με ανοσοκαθήλωση ορού και ήταν IgMκ σε 52 ασθενείς και IgMλ σε 18.

Με τη μέθοδο της κλασσικής νεφελομετρίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ανοσοσφαιρινών η διάμεση τιμή της IgM ήταν 24,55g/L (εύρος 1,5-110,00 g/L) η διάμεση τιμή της IgG 8,83 g/L (εύρος 1,96-47,50 g/L) και της IgA 0,93 g/L (εύρος 0,22-10,9 g/L).

Η διάμεση τιμή της μονοκλωνικής κ-ελεύθερης ελαφράς αλυσίδας ήταν 45,65 mg/L (εύρος 7,64-3090 mg/L) και η διάμεση τιμή της μονοκλωνικής λ-ελεύθερης ελαφράς αλυσίδας 78,3 mg/L (εύρος 4,49-1400 mg/L). Η διάμεση τιμή του αθροίσματος κ+λ ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων ήταν 67,4 mg/L (εύρος 18,44-3093 mg/L).

Ο λόγος των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων ήταν παθολογικός στους 57 από τους 70 ασθενείς. Η διάμεσος του λόγου των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων ήταν 2,78 στους ασθενείς με κ-μονοκλωνική ελεύθερη ελαφρά αλυσίδα και 6,95 στους ασθενείς με λ-μονοκλωνική ελεύθερης ελαφρά αλυσίδα.

Κατά την διάρκεια της παρακολούθησης των ασθενών το 77% χρειάστηκε να λάβουν θεραπεία σύμφωνα με τα διεθνή κριτήρια έναρξης θεραπείας για την Μακροσφαιριναιμία του Waldenström. Η επιλογή της θεραπείας έγινε βάση των διεθνών οδηγιών. Οι υπόλοιποι ασθενείς παρέμειναν ασυμπτωματικοί. Η διάμεση παρακολούθηση ήταν 47 μήνες (εύρος 7-155 μήνες).

Πίνακας 1 : Χαρακτηριστικά Ασθενών με Μακροσφαιριναιμία του Waldenström

Αριθμός ασθενών		70
Διάμεση Ηλικία		66 έτη (εύρος 44-91)
Φύλο Α/Θ		37/ 33
Ανοσοκαθήλωση ορού	IgMκ	52/70
	IgMλ	18/70
WM-IPSS στάδιο	1	44%
	2	28%
	3	28%
Αιμοσφαιρίνη < 10 g/L		29%
Αιμοπετάλια < 140×10^9 /L		13%
Λεμφοκύτταρα > 4×10^9 /L		13%
Λευκωματίνη ορού <3,5 g/dL		22%
β_2 -μικροσφαιρίνη $\geq 3,5$ mg/L		40%
β_2 -μικροσφαιρίνη $\geq 5,5$ mg/L		22%
Παθολογική LDH		16%
Εκτεταμένη διήθηση του μυελού των οστών από λεμφοπλασματοκύτταρα ($\geq 50\%$)		43%
Λεμφαδενοπάθεια		17%
Σπληνομεγαλία		13%
Συμπτωματικοί		68%
Διάμεση Παρακολούθηση		47 μήνες (εύρος 7-155)

4.2.2. Μεθοδολογία

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των HLC πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της νεφελομετρίας με τη χρήση Dade Behring BN II Nephelometer στα εργαστήρια της Binding Site, στο Birmingham, Ενωμένο Βασίλειο καθώς και στο Τμήμα Ανοσολογίας του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών. Χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα από πρόβατα (Hevylite™, Binding Site, U.K.).

Ο λόγος HLCR υπολογίστηκε με την αμιγώς μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη ως αριθμητή και την πολυκλωνική ανοσοσφαιρίνη της ίδιας τάξης ως παρονομαστή δηλαδή mono-IgMκ/poly-IgMλ στους IgMκ ασθενείς και mono-IgMλ/poly-IgMκ στους IgMλ. Τα αποτελέσματα ήταν αναπαραγωγίσιμα.

Η μελέτη ήταν αναδρομική και χρησιμοποιήθηκαν οροί ασθενών με Μακροσφαιριναιμία του Waldenström οι οποίοι είχαν αποθηκευτεί στους -80°C κατά τη διάγνωση του νοσήματος. Παράλληλα έγιναν μετρήσεις και σε 130 υγιείς δότες αίματος οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σαν τιμές έλεγχου.

«Μη φυσιολογικός λόγος HLCR» ορίστηκε κάθε τιμή άνω ή κάτω του εύρους 95% για τους υγιείς μάρτυρες.

Ορίσαμε ως «Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» την παρουσία χαμηλών επιπέδων ανοσοσφαιρινών βάση των κατώτερων τιμών των εργαστηρίων. Έτσι οι ασθενείς με IgG τιμές κάτω των 7 gr/L θεωρήθηκαν ότι είχαν «IgG-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία», ενώ αυτοί με IgA τιμές κάτω των 0,7 gr/L θεωρήθηκαν ότι είχαν «IgA-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία».

Ορίσαμε ως «Ανοσοπάρεση της Ίδιας Ig Τάξης» την παρουσία χαμηλών επιπέδων πολυκλωνικών-HLC βάση της κατώτερων τιμών των υγιών δοτών αίματος ως ακολούθως: στους IgMκ ασθενείς τιμές poly-IgMλ-HLC μικρότερες από 0,17 gr/L και στους IgMλ τιμές poly-IgMκ-HLC μικρότερες από 0,29 gr/L.

«Υψηλή» τιμή HLC και «υψηλός» λόγος HLCR ορίστηκε ως κάθε τιμή άνω του διαμέσου.

Οι τιμές HLC και ο λόγος τους συσχετίστηκαν με παράγοντες νόσου όπως η β₂-μικροσφαιρίνη, τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης, ο αριθμός των αιμοπεταλίων, η παρουσία λεμφοκυττάρωσης, η λευκωματίνη ορού, τα υψηλά επίπεδα της LDH και οι τιμές των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων και του λόγου αυτών.

Έγινε συσχέτιση με τη διήθηση του μυελού των οστών, με την παρουσία σπληνομεγαλίας και λεμφαδενοπάθειας, καθώς και με τον χρόνο έναρξης θεραπείας και την συνολική επιβίωση.

Επιπλέον έγινε συσχέτιση και με τα επίπεδα βιολογικών παραγόντων όπως τα επίπεδα των κυτταροκινών διαλυτός-Syndecan-1, BLys και TGF-β.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα «Statistical Package for the Social Sciences» (SPSS) v 15.0. Τα όρια των λόγων και η προγνωστική σημασία του λόγου των HLC έγινε με την μονοπαραγοντική Cox regression ανάλυση. Η μέθοδος Kaplan Meier χρησιμοποιήθηκε για την σχηματική απεικόνιση των καμπύλων επιβίωσης και ενάρξεως θεραπείας. Οι μεταβλητές προς μελέτη συγκρίθηκαν με τη μέθοδο του χ^2 τετραγώνου (χ^2).

Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν μετά από ενημέρωση και έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών, ενώ η χρήση των βιολογικών δειγμάτων εκκρίθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών και σύμφωνα με τις επιταγές της επιτροπής ηθικής και δεοντολογίας.

4.2.3. Αποτελέσματα

Ανάλυση των Ορών των Υγιών Δοτών Αίματος

Όπως προαναφέρθηκε μετρήθηκαν οι HLC σε 130 υγιείς δότες αίματος.

Τα επίπεδα των IgMκ-HLC διακυμανθήκαν από 0,29 έως 1,82 gr/L με διάμεση τιμή 0,63 gr/L. Τα IgMλ-HLC επίπεδα διακυμανθήκαν από 0,17 έως 0,94 gr/L με διάμεση τιμή 0,49 gr/L.

Ο λόγος IgMκ/IgMλ διακυμάνθηκε από 0,96 έως 2,30 με διάμεση τιμή 1,59 και ο λόγος IgMλ/IgMκ διακυμάνθηκε από 0,43 έως 1,04 με διάμεση τιμή 0,63.

Πίνακας 2 : Τιμές HLC και HLCR σε Υγιείς Δότες Αίματος

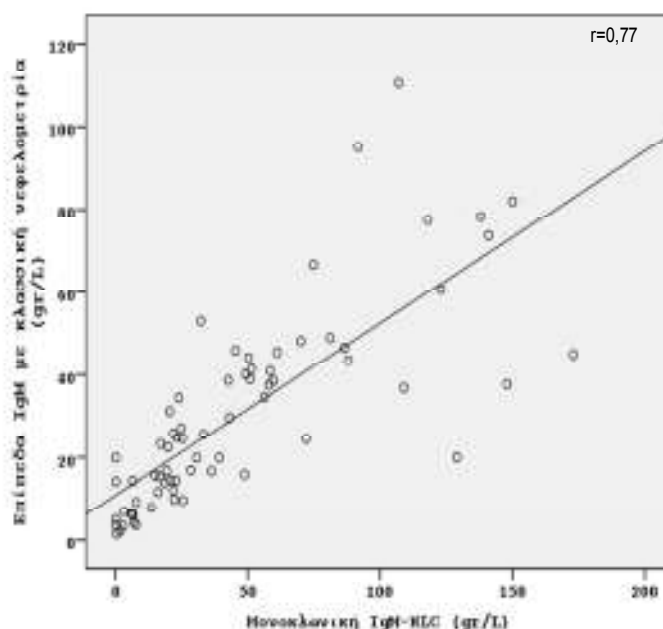
	Διάμεση τιμή	Εύρος 95%
IgMκ (g/L)	0,63	0,29 – 1,82
IgMλ (g/L)	0,49	0,17 - 0,94
IgMκ/IgMλ	1,59	0,96 – 2,30
IgMλ/IgMκ	0,63	0,43 – 1,04

Ανάλυση των Ορών Ασθενών με WM στη Διάγνωση της Νόσου

Τα επίπεδα της μονοκλωνικής IgMκ-HLC διακυμανθήκαν από 0,11 έως 173 gr/L με διάμεση τιμή 25,45 gr/L. Τα επίπεδα της μονοκλωνικής IgMλ-HLC διακυμανθήκαν από 0,08 έως 138 gr/L με διάμεση τιμή 34,8 gr/L. Η συσχέτιση των τιμών της μονοκλωνικής παραπρωτεΐνης με τη μέθοδο Hevylite™ συγκριτικά με την κλασσική νεφελομετρία ήταν $r = 0,77$ (Σχήμα 1).

Στη διάγνωση 66/70 ασθενείς είχαν «μη φυσιολογικό λόγο HLCR». Στους IgMκ ασθενείς τα επίπεδα του λόγου HLCR διακυμανθήκαν από 0,90 έως 15000 με διάμεση τιμή 185,57 ενώ στους IgMλ ασθενείς τα επίπεδα του λόγου HLCR διακυμανθήκαν από 2,86 έως 1000 με διάμεση τιμή 101,9.

Σχήμα 1
Συσχέτιση της IgM με κλασσική
νεφελομετρία με τη μονοκλωνική
IgM-HLC



Συσχέτιση των HLC με Παράγοντες Νόσου

Οι τιμές της μονοκλωνική IgM-HLC πάνω από τη διάμεση τιμή συσχετίστηκαν με την εκτεταμένη διήθηση μυελού των οστών από λεμφοπλασματοκύτταρα ($p=0,005$) και με τις χαμηλές τιμές λευκωματίνης ορού ($p=0,029$).

Ο «υψηλός» λόγος HLCR συσχετίστηκε το στάδιο νόσου WM-IPSS ($p=0,041$), με την εκτεταμένη διήθηση μυελού των οστών από λεμφοπλασματοκύτταρα ($p=0,01$), με τις τιμές αιμοσφαιρίνης λιγότερο από 10 gr/dL ($p=0,031$), με την παρουσία σπληνομεγαλίας ($p=0,014$) και με τις τιμές μονοκλωνικής sFLC πάνω από τη διάμεση τιμή ($p=0,046$).

«IgG-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» παρουσίαζαν οι 24 από τους 70 ασθενείς και η παρουσία της συσχετίστηκε με τιμές του λόγου των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων πάνω από τη διάμεση τιμή ($p=0,037$).

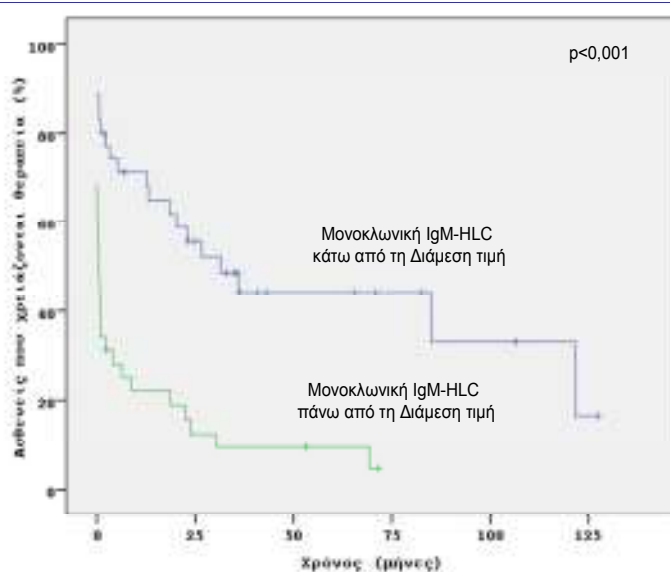
«IgA-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» παρουσίαζαν οι 28 από τους 70 ασθενείς και η παρουσία της δεν συσχετίστηκε με κάποιο από τους παράγοντες νόσου.

«Ανοσοπάρεση της Ίδιας Ig Τάξης» παρουσίαζαν οι 27 από τους 70 και συσχετίστηκε με τη στάδιο νόσου κατά WM-IPSS ($p=0,01$) και με χαμηλές τιμές λευκωματίνης ορού ($p=0,022$).

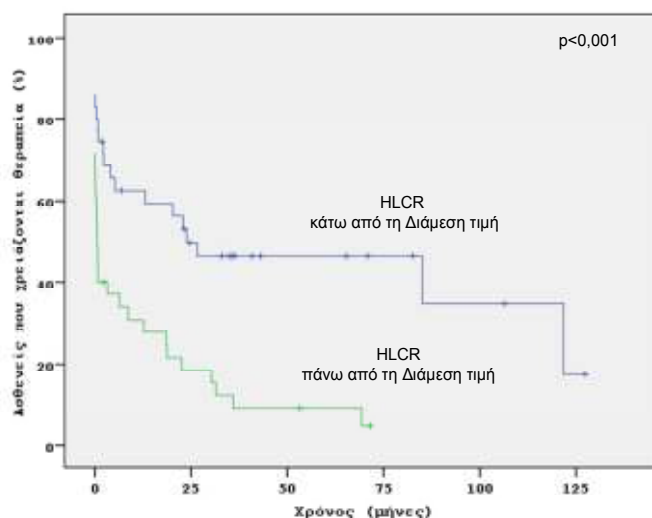
Συσχέτιση των HLC με το Χρόνο Έναρξης Θεραπείας

Η «υψηλή» τιμή HLC και ο «υψηλός» λόγος HLCR συσχετίστηκε με το χρόνο έναρξης θεραπείας ($p<0,001$) (Σχήμα 2, 3). Συσχέτιση με το χρόνο έναρξης θεραπείας βρέθηκε και για τις υψηλές τιμές IgM με την κλασσική μέθοδο νεφελομετρίας ($p<0,001$). Η παρουσία «Συστηματικής Υπογαμμασφαιριναιμίας» και «Ανοσοπάρεσης της Ίδιας Ig Τάξης» δεν συσχετίστηκαν με το χρόνο έναρξης θεραπείας.

Σχήμα 2
Συσχέτιση της
μονοκλωνικής IgM-HLC με
το ΧΕΘ



Σχήμα 3
Συσχέτιση του HLCR με το
ΧΕΘ

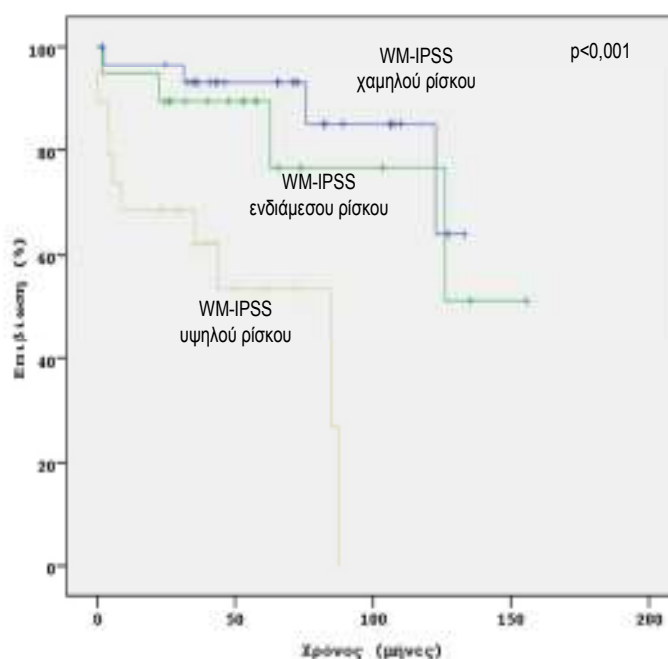


Συσχέτιση των HLC με την Συνολική Επιβίωση

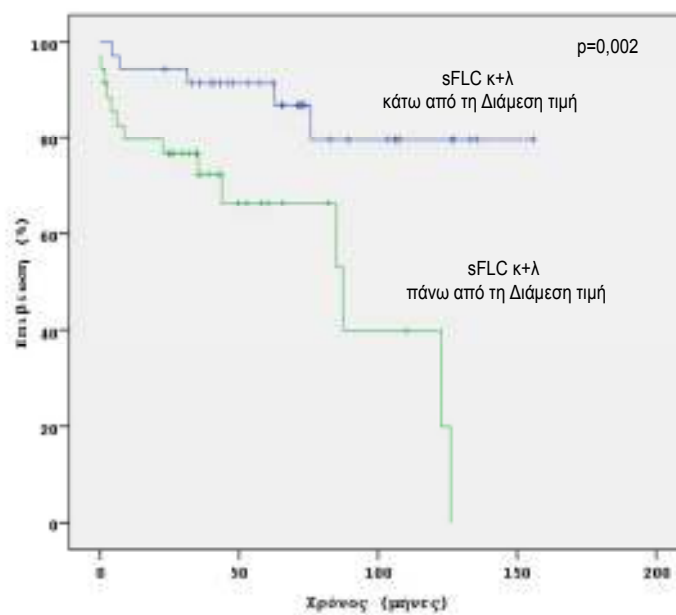
Ως προς την συνολική επιβίωση παρουσίασαν προγνωστική σημασία το στάδιο WM-IPSS ($p<0,001$) (Σχ. 4), οι τιμές της β_2 -μικροσφαιρίνης πάνω από 3,5mg/L ($p<0,001$) και οι παθολογικές τιμές της γαλακτικής αφυδρογονάσης ($p=0,001$). Επίσης οι τιμές των μονοκλωνικών ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων πάνω από το διάμεσο ($p=0,003$) και του αθροίσματος κ+λ ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων ($p=0,002$) (Σχήμα 5). Αντιθέτως οι τιμές HLC και ο λόγος τους, η «Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» και η «Ανοσοπάρεση της Ίδιας Ig Τάξης» δεν συσχετίστηκαν με την συνολική επιβίωση.

Στην πολυπαραγοντική ανάλυση η β_2 -μικροσφαιρίνη και οι παθολογικές τιμές της γαλακτικής αφυδρογονάσης διατήρησαν την σημαντικότητά τους ως προς την συνολική επιβίωση.

Σχήμα 4
Συσχέτιση του σταδίου
WM-IPSS με την ΣΕ



Σχήμα 5
Συσχέτιση του
αθροίσματος sFLC κ+λ με
την ΣΕ



Πίνακας 3 : Σύνοψη των Συσχετίσεων της Ανοσοσφαιρίνης στη Μακροσφαιριναιμία του Waldenström στη Διάγνωση

	μονοκλωνική HLC	HLCR	SH	ISC
Συσχέτιση με παράγοντες νόσου	BM > 50% λευκωματίνη	BM > 50% WM-IPSS Hgb σπληνομεγαλίας sFLC	sFLCR	λευκωματίνη WM-IPSS
Συσχέτιση με χρόνο έναρξης θεραπείας	√	√	-	-
Συσχέτιση με συνολική επιβίωση	-	-	-	-

HLC/HLCR: αμιγώς μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη και λόγος μονοκλωνικής/πολυκλωνικής της ίδιας τάξης, SH:

Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία, ISC: Ανοσοπάρεση της Ίδιας Τάξης

√: συσχετίζεται, -: δεν συσχετίζεται

Συσχέτιση των HLC με τους Βιολογικούς Παράγοντες Νόσου

A. Ο διαλυτός-Syndecan-1 στη Μακροσφαιριναιμία του Waldenström στη Διάγνωση

Τα επίπεδα του s-Syndecan-1 στους ασθενείς με WM διακυμανθήκαν από 16,5 έως 170 ng/mL με διάμεση τιμή 85 ng/mL, ενώ στους φυσιολογικούς μάρτυρες από 5,4 έως 86 ng/mL με διάμεση τιμή 36 ng/mL.

Οι τιμές του s-Syndecan-1 πάνω από το διάμεσο δεν συσχετίστηκαν με παράγοντες νόσου. Επίσης δεν συσχετίστηκαν με το χρόνο προς έναρξη θεραπείας ούτε και με την συνολική επιβίωση.

Τα επίπεδα του s-Syndecan-1 σαν συνεχής μεταβλητή δεν συσχετίστηκαν με τις τιμές μονοκλωνικής HLC αλλά ούτε και με το λόγο HLCR.

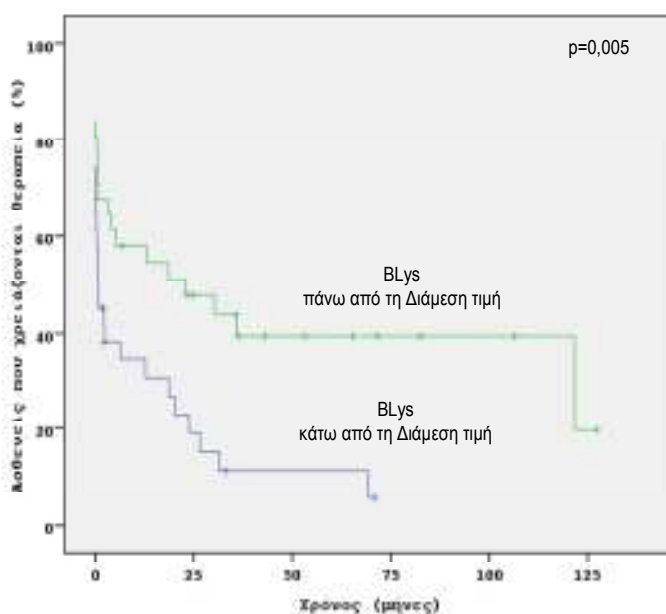
B. Ο BLys στη Μακροσφαιριναιμία του Waldenström στη Διάγνωση

Τα επίπεδα του BLys στους ασθενείς με WM διακυμανθήκαν από 10 έως 3225 pg/mL με διάμεση τιμή 430 pg/mL, ενώ στους φυσιολογικούς μάρτυρες από 62 έως 381 pg/mL με διάμεση τιμή 204 pg/mL.

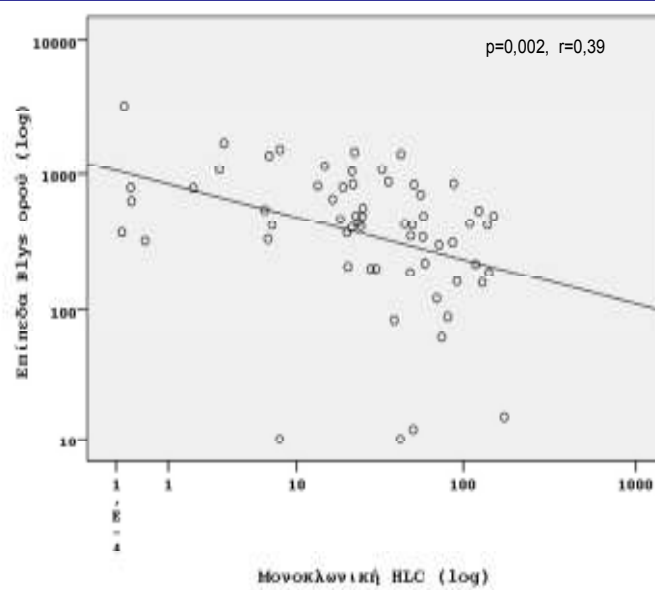
Οι τιμές του BLys πάνω από το διάμεση τιμή συσχετίστηκαν με τις τιμές των μονοκλωνικών ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων πάνω από το διάμεσο ($p=0,037$), του αθροίσματος κ+λ ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων πάνω από το διάμεσο ($p=0,037$) και του λόγου των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων πάνω από το διάμεσο ($p=0,021$). Επίσης συσχετίστηκαν με παράταση του χρόνου έναρξης θεραπείας ($p=0,005$) (Σχήμα 6), αλλά όχι με την συνολική επιβίωση.

Τα επίπεδα του BLys σαν συνεχής μεταβλητή συσχετίστηκαν με τις τιμές μονοκλωνικής HLC ($p=0,002$, $r=0,39$) (Σχήμα 7), αλλά όχι με το λόγο HLCR.

Σχήμα 6
Συσχέτιση του BLys με το
ΧΕΘ



Σχήμα 7
Συσχέτιση του BLys με τη
μονοκλωνική HLC



Γ. Ο TGF-β1 στη Μακροσφαιριναιμία του Waldenström στη Διάγνωση

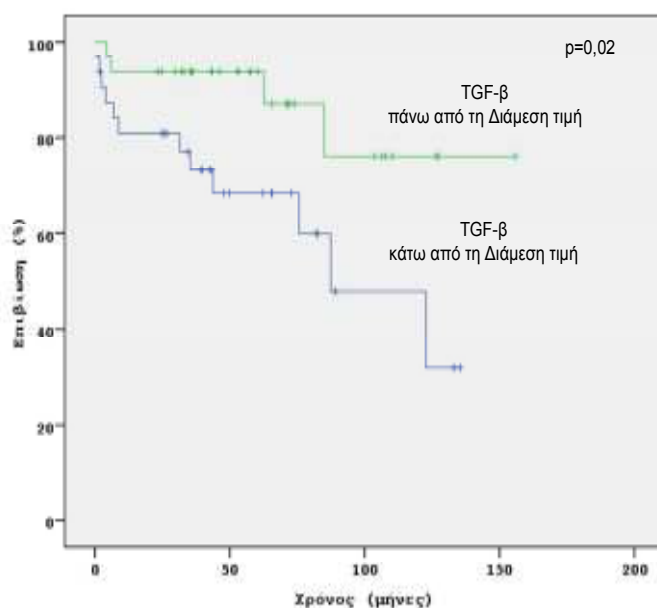
Τα επίπεδα του TGF-β1 στους ασθενείς με WM διακυμανθήκαν από 1665 έως 615000 pg/mL με διάμεση τιμή 33965 pg/mL, ενώ στους φυσιολογικούς μάρτυρες από 30000 έως 90000 pg/mL με διάμεση τιμή 57000 pg/mL.

Οι τιμές του TGF-β1 πάνω από το διάμεσο συσχετίστηκαν με τις τιμές αιμοπεταλίων μικρότερο από $100 \times 10^9/L$ ($p=0,013$).

Οι τιμές του TGF-β1 πάνω από το διάμεσο δεν συσχετίστηκαν με το χρόνο προς έναρξη θεραπείας, αλλά υπήρξε συσχέτιση με μεγαλύτερη συνολική επιβίωση ($p=0,02$) (Σχήμα 8).

Τα επίπεδα του TGF-β1 σαν συνεχής μεταβλητή δεν συσχετίστηκαν με τις τιμές HLC ούτε και με το λόγο HLCR.

Σχήμα 8
Συσχέτιση του TGF-β1 με
τη ΣΕ



Πίνακας 4 : Κυτταροκίνες στο ορό ασθενών με WM στη διάγνωση και σύνοψη συσχετίσεων

	διαλυτός-Syndecan-1	BLys	TGF-β1
Από τους 70 ασθενείς μετρήθηκε στον ορό στους	23	62	64
Διάμεση τιμή	85 ng/mL	430 pg/mL	33965 pg/mL
Εύρος	16,5 - 170 ng/mL	10 - 3225 pg/mL	1665 – 615000 pg/mL
Συσχέτιση με HLC/HLCR	-	√	-
Συσχέτιση με παράγοντες νόσου	-	sFLC/sFLCR	PLTs
Συσχέτιση με χρόνο έναρξης θεραπείας	-	√	-
Συσχέτιση με συνολική επιβίωση	-	-	√

√: συσχετίζεται, -: δεν συσχετίζεται

Κεφάλαιο 5. Η Χρόνια Λεμφογενής Λευχαιμία

5.1. Εισαγωγή

Η Χρόνια Λεμφογενής Λευχαιμία (ΧΛΛ) αποτελεί την συχνότερη λευχαιμία στους ενήλικες στον δυτικό κόσμο. Η επίπτωση της νόσου είναι 2-6 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα ανά έτος, ενώ για τις ηλικίες άνω των 65 ετών αυξάνεται σε 13/100.000/έτος. Η παθογένεια της νόσου δεν έχει διασαφηνιστεί. Φαίνεται ότι ο νεοπλασματικός πληθυσμός έχει αυξημένη έκφραση του αποπτωτικού παράγοντα B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) και αυξημένο δείκτη πολλαπλασιασμού όπως φαίνεται από την παρουσία ενεργών κέντρων [Swerdlow και συν, 2008]. Πρόκειται για B λεμφοκύτταρα που δεν είναι γνωστό σε πιο στάδιο της εξέλιξής τους υφίστανται νεοπλασματική εξαλλαγή, αλλά η παρουσία μετάλλαξης της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης δείχνει ότι έχουν εκτεθεί σε επαφή με αντιγονικό ερεθισμό.

Η διάγνωση βασίζεται στην μορφολογία των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό επίχρισμα τα οποία είναι μικρά ώριμα λεμφοκύτταρα και στον ανοσοφαινότυπο περιφερικού αίματος. Στον επιλεγμένο πληθυσμό των B λεμφοκυττάρων με τη χρήση του δείκτη επιφανείας CD19 ελέγχεται η συνέκφραση 5 δεικτών επιφανείας και προκύπτει το Matutes score [Matutes και συν, 1994]. Η διάγνωση απαιτεί την παρουσία τουλάχιστον $5 \times 10^9/L$ μονοκλωνικών λεμφοκυττάρων, η δε τυπική ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από έκφραση:

1. CD5 θετικότητας
2. CD23 θετικότητας
3. FMC-7 αρνητική ή ασθενής έκφραση
4. CD79b αρνητική ή ασθενής έκφραση
5. ελαφρά αλυσίδα ανοσοσφαιρίνης επιφανείας ασθενής έκφραση.

Για την σταδιοποίηση της νόσου χρησιμοποιούνται τα συστήματα RAI και Binet. Το σύστημα RAI έχει 5 στάδια [Rai και συν, 1975] :

Στάδιο 0: παρουσία λεμφοκυττάρωσης

Στάδιο 1: παρουσία λεμφαδενοπάθειας

Στάδιο 2: παρουσία σπληνομεγαλίας ή ηπατομεγαλίας

Στάδιο 3: αιμοσφαιρίνη μικρότερη από 11,0 g/dL

Στάδιο 4: αριθμός αιμοπεταλίων μικρότερος από $100 \times 10^9/L$

Στο σύστημα Binet εκτιμάται η παρουσία λεμφαδενοπάθειας στην τραχηλική, μασχαλιαία και βουβωνική περιοχή καθώς και η παρουσία σπληνομεγαλίας και ηπατομεγαλίας και κατατάσσει τους ασθενείς σε 3 στάδια [Binet και συν, 1981] :

Στάδιο A: εμπλοκή 0-2 λεμφαδενικών περιοχών

Στάδιο B: εμπλοκή 3-5 λεμφαδενικών περιοχών

Στάδιο C: αιμοσφαιρίνη μικρότερη από 10,0 g/dL ή αριθμός αιμοπεταλίων μικρότερος από $100 \times 10^9/L$

Οι ασθενείς κατατάσσονται σε ομάδες χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού ρίσκου ανάλογα με τους παράγοντες.

1. **Ομάδα χαμηλού ρίσκου:** **RAI 0** και **Binet A** με διάμεση επιβίωση τα 10 έτη
2. **Ομάδα ενδιάμεσου ρίσκου:** **RAI 1, 2** και **Binet B** με διάμεση επιβίωση 5-7 έτη
3. **Ομάδα υψηλού ρίσκου:** **RAI 3, 4** και **Binet C** με διάμεση επιβίωση τα 5 έτη.

Μια πλειάδα άλλων παραγόντων έχουν συσχετιστεί με την πρόγνωση της νόσου. Η μεγάλη ηλικία, το αρρεν φύλο, ο υψηλός αριθμός λεμφοκυττάρων, η παρουσία άτυπων λεμφοκυττάρων, ο διάχυτος τύπος διήθησης του μυελού των οστών, η υψηλές τιμές της LDH και της β_2 -μικροσφαιρίνης ορού και η χαμηλή λευκωματίνη. Με τη χρήση μοριακών τεχνικών αναγνωρίζονται δύο υποκατηγορίες νόσου. Η μία χαρακτηρίζεται από παρουσία σωματικών υπερμεταλλάξεων του γόνου της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης και συσχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση και ηπιότερη κλινική πορεία, ενώ η δεύτερη κατηγορία από απουσία υπερμεταλλάξεων και συχνή έκφραση παραγόντων με αρνητική πρόγνωση όπως το αντιγόνο ενεργοποίησης CD38 και η πρωτεΐνη τυροσινική κινάση ή ZAP-70.

Σε κυτταρογενετική ανάλυση με FISH η συχνότερη ανωμαλία είναι η έλλειψη του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 13 στην περιοχή 13q14 που ανευρίσκεται στο 50% των περιπτώσεων και συσχετίζεται με καλή πρόγνωση, ενώ οι ελλείψεις των 17p13.1, 11q23 και 6q και η τρισωμία 12 με χειρότερη πρόγνωση.

Περισσότερο από τα δύο τρίτα των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί στη διάγνωση και ένας μεγάλος αριθμός παραμένει ασυμπτωματικός για μήνες ή και χρόνια. Οι υπόλοιποι παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος εκδηλώσεων όπως η λεμφαδενοπάθεια, η σπληνομεγαλία, η ανεπάρκεια του μυελού των οστών και η Β συμπτωματολογία, η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία και θρομβοπενία και η ανάπτυξη λοιμώξεων.

Το 30-35% των ασθενών παρουσιάζουν υπογαμμασφαιριναιμία, κυρίως της IgG, ενώ το 10% διάχυτη υπεργαμμασφαιριναιμία. Πρόσφατες μελέτες [Pratt και συν, 2010; Yegin και συν 2010] έδειξαν ότι η αύξηση των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων ορού αποτελεί τον πιο συχνό είδος παραπρωτεΐναιμίας στην ΧΛΛ και συναντάται σε ποσοστό 40%, ενώ η παρουσία παθολογικού λόγου ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων συσχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα προόδου της νόσου [Morabito και συν, 2011]. Επιπλέον η πολυκλωνική αύξηση των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων ορού συσχετίστηκε με την συντομότερο χρόνο έναρξης θεραπείας [Maurer και συν, 2011].

5.2. Η Χρόνια Λεμφογενής Λευχαιμία στη Διάγνωση

5.2.1. Ασθενείς

Μελετήθηκε σειρά 69 ασθενών με νεοδιάγνωση Χρόνιας Λεμφογενούς Λευχαιμίας. Το φύλο ήταν άρρεν στους 42 και θήλυ στους 27. Η διάμεση ηλικία ήταν 63 έτη (εύρος 37-87 έτη). Η σταδιοποίηση σύμφωνα με το διεθνές σύστημα RAI ήταν 36% σε στάδιο 0, 35% σε στάδιο I, 18% σε II, 6,5% σε III και 4,5% σε IV. Σύμφωνα με το σύστημα Binet οι ασθενείς σε στάδιο 1 ήταν 65 %, σε στάδιο 2 ήταν 26 % και σε 3 το 9%. Λεμφαδενοπάθεια εβρέθη στο 58%, σπληνομεγαλία στο 21%, αυξημένη LDH στο 19% και εκτεταμένη διήθηση μυελού (>50%) στο 40%.

Με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής περιφερικού αίματος ή ανοσοιστοχημείας δειγμάτων βιοψίας μυελού των οστών η ανοσοσφαιρίνη επιφανείας ήταν κ στους 54 ασθενείς και λ στους 15.

Τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών ορού προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της κλασσικής νεφελομετρίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ανοσοσφαιρινών. Τα επίπεδα της IgG διακυμανθήκαν από 3,85 έως 22 gr/L με διάμεση τιμή 10,1 gr/L, της IgA διακυμανθήκαν από 0,35 έως 4,84 gr/L με διάμεση τιμή 1,63 gr/L και για της IgM από 0,03 έως 2,46 gr/L με διάμεση τιμή 0,53 gr/L.

Οι κάππα ελεύθερες ελαφρές αλυσίδες ορού με τη χρήση της μεθόδου Freelite™ διακυμάνθηκαν από 2,54 έως 196 mg/L με διάμεσο 16,6 mg/L και οι λάμδα από 5 έως 121mg/L με διάμεσο 14,3 mg/L

Ο λόγος των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων ορού (sFLCR) υπολογίστηκε με την ανοσοσφαιρίνη επιφανείας ως αριθμητής και διακυμάνθηκε από 0,37 έως 9,16 με διάμεση τιμή 1,36.

Κατά την διάρκεια της παρακολούθησης των ασθενών οι 31/69 (45%) χρειάστηκε να λάβουν θεραπεία σύμφωνα με τα διεθνή κριτήρια έναρξης θεραπείας για την ΧΛΛ. Η επιλογή της θεραπείας έγινε βάση των διεθνών οδηγιών. Οι υπόλοιποι 38/69 (55%) παρέμειναν ασυμπτωματικοί. Η διάμεση παρακολούθηση ήταν 62 μήνες (εύρος 5-157 μήνες).

Πίνακας 1 : Χαρακτηριστικά ασθενών με Χρόνια Λεμφογενή Λευχαιμία

Αριθμός ασθενών		69
Διάμεση ηλικία		63 έτη (εύρος 37-87)
Φύλο Α/Θ		42/27
Ανοσοσφαιρίνη επιφανείας	κ	54/69
	λ	15/69
Στάδιο νόσου κατά RAI	0	36%
	I	35%
	II	18%
	III	6,5%
	IV	4,5%
Στάδιο νόσου κατά Binet	A	65%,
	B	26%
	C	19%
Παθολογική LDH		19%
Εκτεταμένη διήθηση του μυελού των οστών από λεμφοκύτταρα (≥50%)		40%
Λεμφαδενοπάθεια		58%
Σπληνομεγαλία		21%
Συμπτωματικοί		55%
Διάμεση Παρακολούθηση		62 μήνες (εύρος 5-157)

5.2.2. Μεθοδολογία

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των HLC πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της νεφελομετρίας με τη χρήση Dade Behring BN II Nephelometer στα εργαστήρια της Binding Site, στο Birmingham, Ενωμένο Βασίλειο καθώς και στο Τμήμα Ανοσολογίας του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών. Χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα από πρόβατα (Hevylite™, Binding Site, U.K.).

Ο λόγος HLCR υπολογίστηκε με βάση την έκφραση ανοσοσφαιρίνης επιφανείας. Στους ασθενείς που εξέφραζαν κ ανοσοσφαιρίνη επιφανείας ο λόγος HLCR υπολογίστηκε με τις τιμές των κάππα ως αριθμητής δηλαδή ως IgGκ/IgGλ (IgG-HLCR), IgAκ/IgAλ (IgA-HLCR) και IgMκ/IgMλ (IgM-HLCR). Στους ασθενείς που εξέφραζαν λ ανοσοσφαιρίνη επιφανείας ο λόγος HLCR υπολογίστηκε με τις τιμές των λάμδα ως αριθμητής δηλαδή ως IgGλ/IgGκ (IgG-HLCR), IgAλ/IgAκ (IgA-HLCR) και IgMλ/IgMκ (IgM-HLCR).

«Μη-φυσιολογικός λόγος HLCR» ορίστηκε κάθε τιμή άνω και κάτω του εύρους 95% στους φυσιολογικούς μάρτυρες.

Τα αποτελέσματα ήταν αναπαραγωγίσιμα.

Η μελέτη ήταν αναδρομική και χρησιμοποιήθηκαν οροί ασθενών με ΧΛΛ οι οποίοι είχαν αποθηκευτεί στους -80°C κατά τη διάγνωση του νοσήματός. Παράλληλα έγιναν μετρήσεις και σε 130 υγιείς δότες αίματος οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σαν τιμές έλεγχου.

Πίνακας 2 : Τιμές HLC και HLCR σε Υγιείς Δότες Αίματος

	Διάμεση τιμή	Εύρος 95%
IgGκ (gr/L)	6,85	4,03 - 9,78
IgGλ (gr/L)	3,81	1,97 - 5,71
IgAκ (gr/L)	1,19	0,48 - 2,82
IgAλ (gr/L)	0,98	0,36 - 1,98
IgMκ (g/L)	0,63	0,29 – 1,82
IgMλ (g/L)	0,49	0,17 - 0,94
IgGκ/IgGλ	1,87	0,98 - 2,75
IgGλ/IgGκ	0,54	0,37 - 0,89
IgAκ/gAλ	1,27	0,8 - 2,04
IgAλ/IgAκ	0,79	0,49 – 1,25
IgMκ/IgMλ	1,59	0,96 – 2,30
IgMλ/IgMκ	0,63	0,43 – 1,04

Τα επίπεδα της IgG και το άθροισμα IgGκ+IgGλ μικρότερα από 7 gr/L, η IgA και το άθροισμα IgAκ+IgAλ μικρότερα από 0,7 gr/L και η IgM και το άθροισμα IgMκ+IgMλ μικρότερα από 0,5 gr/L ορίστηκαν ως «χαμηλές τιμές».

«Υψηλός» λόγος HLC ορίστηκε ως κάθε τιμή άνω του διαμέσου.

Οι τιμές HLC και ο λόγος τους συσχετίστηκαν με παράγοντες νόσου όπως τα στάδια RAI και Binet, την παρουσία λεμφαδενοπάθειας, σπληνομεγαλίας και εκτεταμένης διήθησης μυελού (>50%) από λεμφοκύτταρα και τα υψηλά επίπεδα της LDH. Έγινε συσχέτιση με τον χρόνο έναρξης θεραπείας και την συνολική επιβίωση και με τα επίπεδα βιολογικών παραγόντων όπως τα επίπεδα των κυτταροκινών διαλυτός-Syndecan-1, BLys και TGF-β.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα «Statistical Package for the Social Sciences» (SPSS) v15.0. Τα όρια των λόγων και η προγνωστική σημασία του λόγου των HLCR έγινε με την μονοπαραγοντική Cox regression ανάλυση. Η μέθοδος Kaplan Meier χρησιμοποιήθηκε για την σχηματική απεικόνιση των καμπύλων επιβίωσης και ενάρξεως θεραπείας. Οι μεταβλητές προς μελέτη συγκρίθηκαν με τη μέθοδο του χ τετραγώνου (χ^2).

Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν μετά από ενημέρωση και έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών, ενώ η χρήση των βιολογικών δειγμάτων εκκρίθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών σύμφωνα με τις επιταγές της επιτροπής ηθικής και δεοντολογίας.

5.2.3. Αποτελέσματα

Ανάλυση των Ορών Ασθενών με ΧΛΛ στη Διάγνωση της Νόσου

Στους ασθενείς με κ έκφραση ανοσοσφαιρίνης επιφανείας τα επίπεδα της IgGκ-HLC διακυμανθήκαν από 2,64 έως 14,3 gr/L με διάμεση τιμή 8,01 gr/L, της IgΑκ-HLC από 0,29 έως 3,71 gr/L με διάμεση τιμή 1,03 gr/L και της IgMκ-HLC από 0,08 έως 3,49 gr/L με διάμεση τιμή 0,41 gr/L. Στους ίδιους ασθενείς οι IgΓλ-HLC από 1,4 έως 9,6 gr/L με διάμεση τιμή 3,44 gr/L, της IgΑλ-HLC από 0,62 έως 3,73gr/L με διάμεση τιμή 0,88 gr/L και της IgΜλ-HLC από 0,04 έως 0,56 gr/L με διάμεση τιμή 0,2 gr/L. Επίσης ο λόγος IgG-HLCR διακυμάνθηκε από 0,97 έως 4,24 με διάμεση τιμή 2,13, ο IgA-HLCR από 0,24 έως 2,32 με διάμεση τιμή 0,84 και ο IgM-HLCR από 0,58 έως 24,21 με διάμεση τιμή 1,89.

Στους ασθενείς με λ έκφραση ανοσοσφαιρίνης επιφανείας τα επίπεδα της IgΓλ-HLC διακυμανθήκαν από 2,5 έως 15,8 gr/L με διάμεση τιμή 3,22 gr/L, της IgΑλ-HLC από 0,42 έως 2,15 gr/L με διάμεση τιμή 0,92 gr/L και της IgΜλ-HLC από 0,07 έως 0,98 gr/L με διάμεση τιμή 0,22 gr/L. Στους ίδιους ασθενείς οι IgGκ-HLC διακυμανθήκαν από 3,14 έως 10,9 gr/L με διάμεση τιμή 7,03 gr/L, της IgΑκ-HLC από 0,39 έως 3,14 gr/L με διάμεση τιμή 1,27 gr/L και της IgMκ-HLC από 0,11 έως 0,88 gr/L με διάμεση τιμή 0,26 gr/L. Επίσης ο λόγος IgG-HLCR διακυμάνθηκε από 0,32 έως 5,03 με διάμεση τιμή 0,48, ο IgA-HLCR από 0,65 έως 1,45 με διάμεση τιμή 0,9 και ο IgM-HLCR από 0,5 έως 7,20 με διάμεση τιμή 0,63.

Τα άθροισμα IgGκ+IgΓλ διακυμάνθηκε από 4,6 έως 23,37 gr/L με διάμεση τιμή 11,22 gr/L, των IgΑκ+IgΑλ από 0,68 έως 7,44 gr/L με διάμεση τιμή 2,15 gr/L και των IgMκ+IgΜλ από 0,11 έως 3,68 gr/L με διάμεση τιμή 0,60 gr/L.

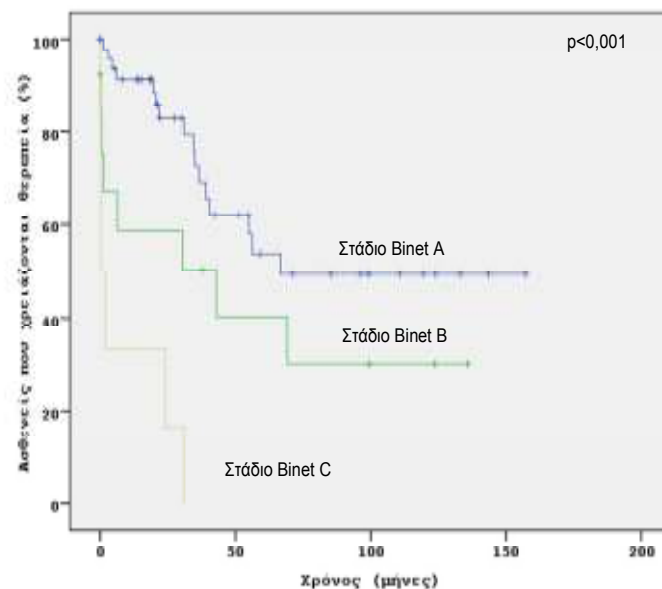
Συσχέτιση των HLC με Παράγοντες Νόσου

Ούτε οι τιμές HLC ούτε ο λόγος HLCR συσχετίστηκαν με παράγοντες νόσου.

Συσχέτιση με το Χρόνο Έναρξης Θεραπείας και την Συνολική Επιβίωση

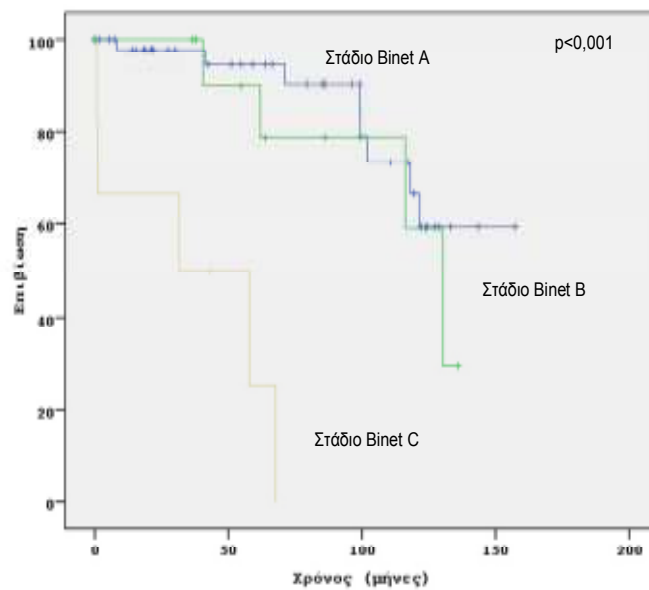
Παράγοντες που συσχετίστηκαν με το χρόνο έναρξης θεραπείας ήταν τα στάδια RAI ($p<0,001$) και Binet ($p<0,001$) (Σχήμα 1), η παρουσία σπληνομεγαλίας ($p=0,009$) και το άθροισμα sFLC κ+λ πάνω από 60 mg/L ($p=0,001$). Οι χαμηλές τιμές των IgG, IgA και IgM και οι χαμηλές τιμές των αθροισμάτων IgGκ+IgGλ, IgAκ+IgAλ και IgMκ+IgMλ δεν συσχετίστηκαν με το χρόνο έναρξης θεραπείας.

Σχήμα 1
Συσχέτιση του σταδίου
Binet με το ΧΕΘ



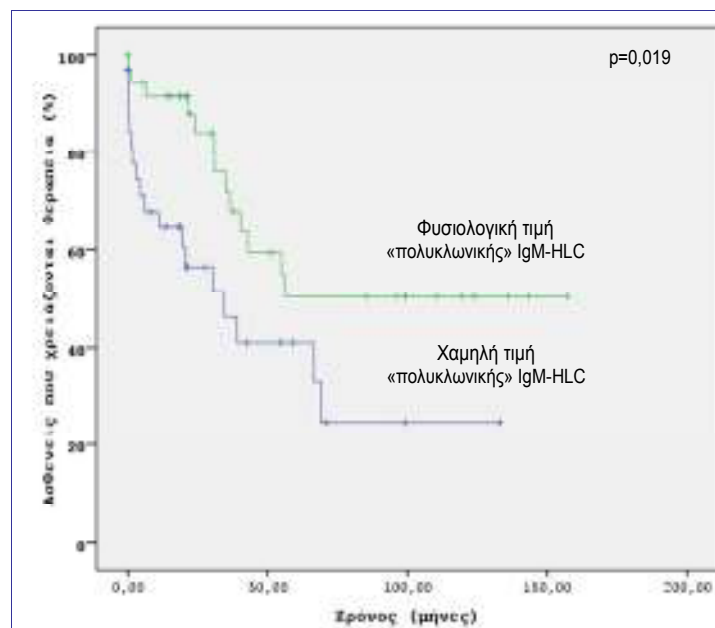
Ως προς την συνολική επιβίωση παρουσίασαν προγνωστική σημασία τα στάδια RAI ($p<0,001$) και Binet ($p<0,001$) (Σχήμα 2), η παρουσία παθολογικής LDH ($p=0,002$) και το άθροισμα sFLC κ+λ πάνω από 60 mg/L ($p=0,001$). Οι χαμηλές τιμές της IgG, της IgA και της IgM και των αθροισμάτων IgGκ+IgGλ και IgAκ+IgAλ δεν συσχετίστηκαν με την συνολική επιβίωση. Οι ασθενείς που είχαν χαμηλές τιμές IgMκ+IgMλ (28 ασθενείς από τους 69) είχαν μικρότερη συνολική επιβίωση από τους υπόλοιπους ($p=0,016$).

Σχήμα 2
Συσχέτιση του σταδίου
Binet με την ΣΕ

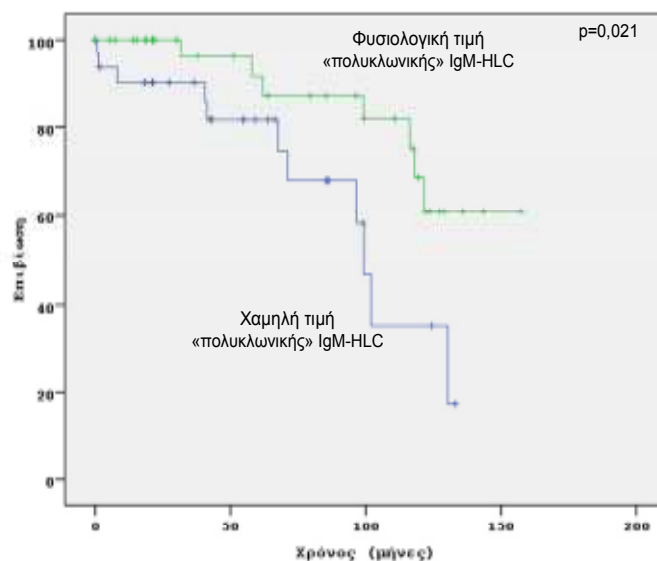


Στους ασθενείς με χαμηλή «πολυκλωνική» IgM-HLC (33 ασθενείς από τους 69), δηλαδή σε αυτούς με έκφραση κ ανοσοσφαιρίνης επιφανείας επίπεδα IgMλ μικρότερα από 0,17g/L και σε αυτούς με έκφραση λ ανοσοσφαιρίνης επιφανείας επίπεδα IgMκ μικρότερα από 0,29 g/L, βρέθηκε ότι είχαν μικρότερο χρόνο προς έναρξη θεραπείας και μικρότερη συνολική επιβίωση από τους υπόλοιπους ($p=0,019$ και $p=0,021$ αντίστοιχα) (Σχήμα 3, 4). Αντίθετα η χαμηλή «πολυκλωνική» IgG-HLC και IgA-HLC δεν συσχετίστηκαν με την συνολική επιβίωση και το χρόνο έναρξης θεραπείας.

Σχήμα 3
Συσχέτιση της
«πολυκλωνικής» IgM-HLC
με το ΧΕΘ



Σχήμα 4
Συσχέτιση της
«πολυκλωνικής» IgM-HLC
με την ΣΕ



Τα επίπεδα των λόγων IgG-HLCR, IgA-HLCR και IgM-HLCR πάνω από το διάμεσο δεν συσχετίστηκαν με το χρόνο έναρξης θεραπείας και την συνολική επιβίωση.

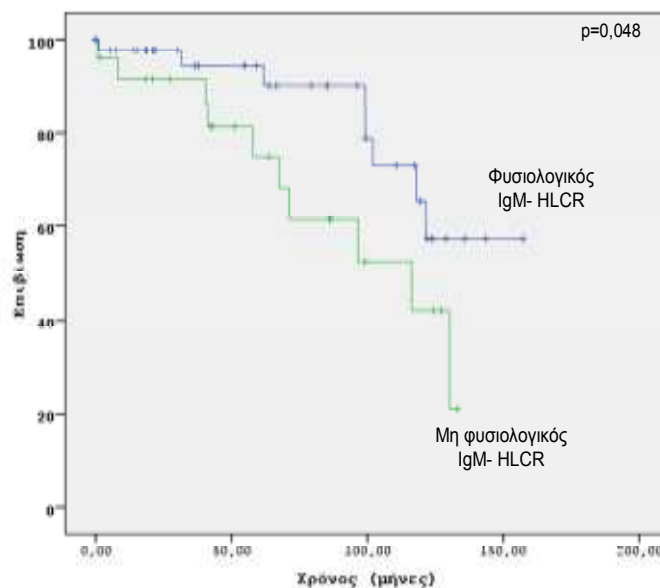
«Μη φυσιολογικός λόγος IgG-HLCR» βρέθηκε στους 12/69 (18%) ασθενείς, «μη φυσιολογικός λόγος IgA-HLCR» στους 20/69 (30%) και «μη φυσιολογικός λόγος IgM-HLCR» στους 24/69 (35%).

Η παρουσία «μη φυσιολογικού λόγου IgM-HLCR» συσχετίστηκε με την συνολική επιβίωση ($p=0,048$) (Σχήμα 5).

Σε 6/24 (25%) ασθενείς με «μη φυσιολογικό λόγο IgM-HLCR» συνυπήρχε «μη φυσιολογικός λόγος IgG-HLCR» ή «μη φυσιολογικός λόγος IgA-HLCR».

Στην πολυπαραγοντική ανάλυση το στάδιο RAI και το άθροισμα sFLC $\kappa+\lambda > 60$ mg/L διατήρησαν την σημαντικότητά τους ως προς την συνολική επιβίωση.

Σχήμα 5
Συσχέτιση του IgM-HLCR
με την ΣΕ



Πίνακας 3 : Σύνοψη των Συσχετίσεων της Ανοσοσφαιρίνης στη Χρόνια Λεμφογενή Λευχαιμία στη Διάγνωση

	«Μονοκλωνική» HLC	HLCR	SH	«Πολυκλωνική» HLC
Συσχέτιση με παράγοντες νόσου	-	-	-	-
Συσχέτιση με χρόνο έναρξης θεραπείας	-	-	-	√«πολυκλωνική» IgM-HLC
Συσχέτιση με συνολική επιβίωση	-	√«μη φυσιολογικός» IgM-HLCR	√IgMκ+IgMλ	√«πολυκλωνική» IgM-HLC

HLC/HLCR: αμιγώς μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη και λόγος μονοκλωνικής/πολυκλωνικής της ίδιας τάξης, SH:

Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία,

√: συσχετίζεται, -: δεν συσχετίζεται, √IgMκ+IgMλ : μόνο στην περίπτωση του αθροίσματος IgMκ+IgMλ, √«παθολογικός»IgM-HLCR :

μόνο στην περίπτωση του μη φυσιολογικού λόγου IgM-HLCR,

√«πολυκλωνική»IgM-HLC : μόνο στην περίπτωση της πολυκλωνικής IgM- HLC

Συσχέτιση των HLC με τους Βιολογικούς Παράγοντες Νόσου

A. Ο διαλυτός-Syndecan-1 στη Χρόνια Λεμφογενή Λευχαιμία στη Διάγνωση

Τα επίπεδα του s-Syndecan-1 στους ασθενείς με ΧΛΛ διακυμανθήκαν από 17 έως 400 ng/mL με διάμεση τιμή 53 pg/mL, ενώ στους φυσιολογικούς μάρτυρες από 5,4 έως 86 ng/mL με διάμεση τιμή 36 ng/mL.

Οι τιμές του s-Syndecan-1 πάνω από τη διάμεση τιμή συσχετίστηκαν με χαμηλές τιμές IgA ($p=0,032$) αλλά όχι με τους υπόλοιπους παράγοντες νόσου ούτε με το χρόνο προς έναρξη θεραπείας και την συνολική επιβίωση.

Επίσης οι τιμές του s-Syndecan-1 σαν συνεχής μεταβλητή δεν συσχετίστηκαν με τις τιμές HLC ούτε με το λόγο HLCR.

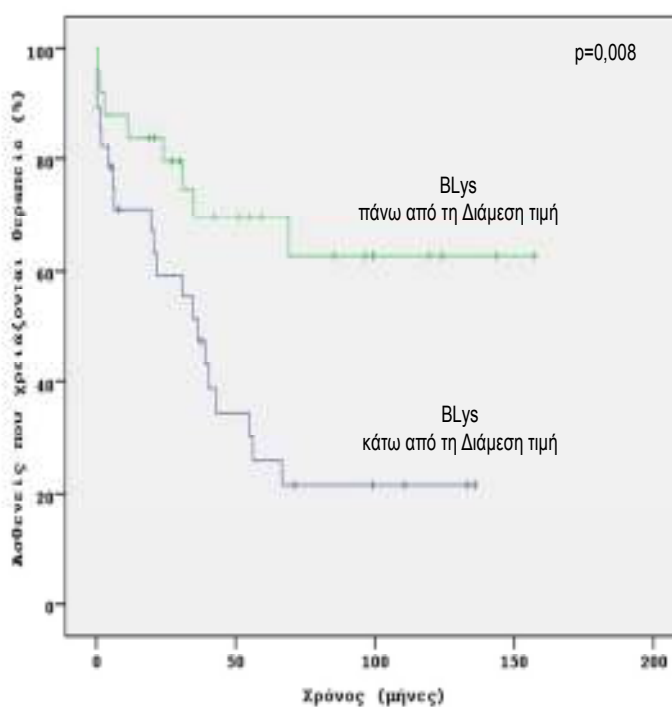
B. Ο BLys στη Χρόνια Λεμφογενή Λευχαιμία στη Διάγνωση

Τα επίπεδα του BLys στους ασθενείς με ΧΛΛ διακυμανθήκαν από 10 έως 230 pg/mL με διάμεση τιμή 62 pg/mL, ενώ στους φυσιολογικούς μάρτυρες από 62 έως 381 pg/mL με διάμεση τιμή 204 pg/mL.

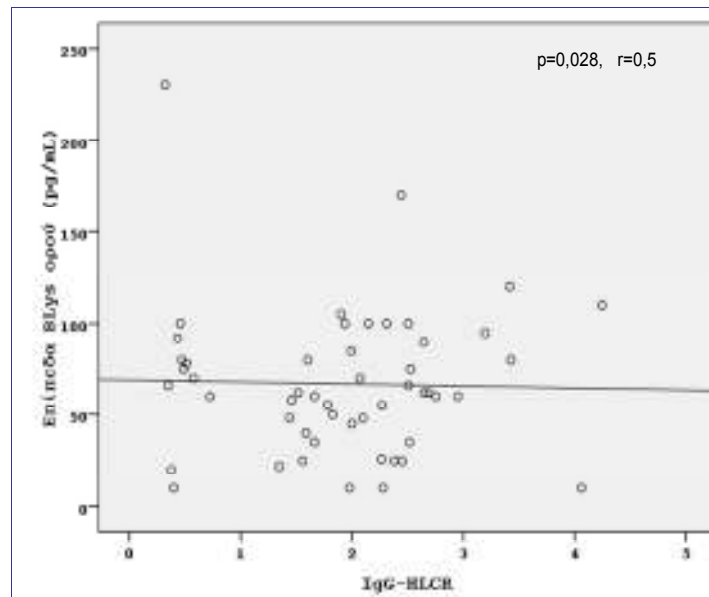
Οι τιμές του BLys πάνω από τη διάμεση τιμή συσχετίστηκαν με την παρουσία εκτεταμένη διήθησης μυελού ($p=0,048$), με τα χαμηλές τιμές IgA ($p=0,042$) και με την αύξηση του χρόνου προς έναρξη θεραπείας ($p=0,008$) (Σχήμα 6), αλλά δεν συσχετίστηκαν με την συνολική επιβίωση.

Επίσης οι τιμές του BLys σαν συνεχής μεταβλητή δεν συσχετίστηκαν με τις τιμές HLC αλλά συσχετίστηκαν με το λόγο IgG-HLCR ($p=0,028$, $r=0,5$) (Σχήμα 7).

Σχήμα 6
Συσχέτιση του BLys με το
ΧΕΘ



Σχήμα 6
Συσχέτιση του BLys με το
λόγο IgG-HLCR



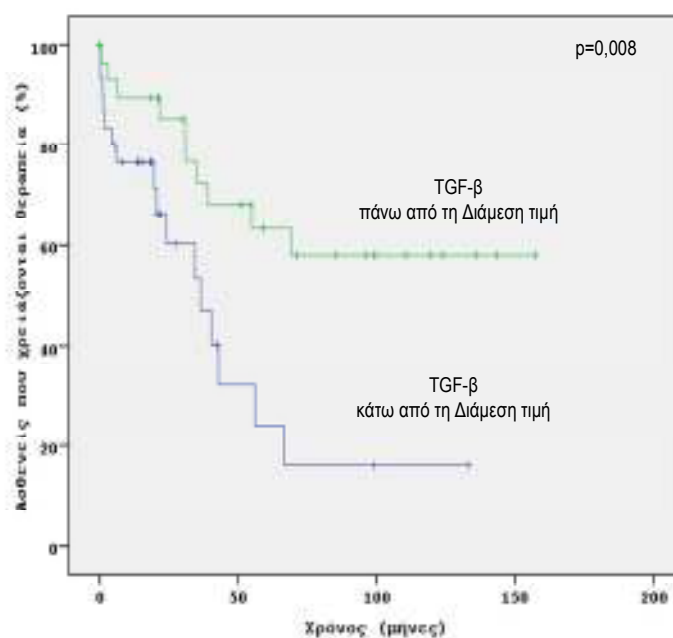
Γ. Ο TGF-β1 στη Χρόνια Λεμφογενή Λευχαιμία στη Διάγνωση

Τα επίπεδα του TGF-β1 στους ασθενείς με ΧΛΛ διακυμανθήκαν από 0 έως 42970 pg/mL με διάμεση τιμή 13982,5 pg/mL, ενώ στους φυσιολογικούς μάρτυρες από 30000 έως 90000 pg/mL με διάμεση τιμή 57000 pg/mL.

Οι τιμές του TGF-β1 πάνω τη διάμεση τιμή δε συσχετίστηκαν με τους παράγοντες νόσου. Συσχετίστηκαν με παράταση του χρόνου προς έναρξη θεραπείας ($p=0,008$) (Σχήμα 8), αλλά όχι με την συνολική επιβίωση.

Τα επίπεδα του TGF-β1 σαν συνεχής μεταβλητή δεν συσχετίστηκαν με τις τιμές HLC ούτε με το λόγο HLCR.

Σχήμα 8
Συσχέτιση του TGF-β1 με
το ΧΕΘ



Πίνακας 4 : Κυτταροκίνες στο ορό ασθενών με ΧΛΛ στη διάγνωση και σύνοψη συσχετίσεων

	διαλυτός-Syndecan-1	BLys	TGF-β1
Από τους 69 ασθενείς μετρήθηκε στον ορό στους	53	53	60
Διάμεση τιμή	53 ng/mL	62 pg/mL	13982,5 pg/mL
Εύρος	17 - 400 ng/mL	10 - 230 pg/mL	0 - 42970 pg/mL
Συσχέτιση με HLC/HLCR	-	√	-
Συσχέτιση με παράγοντες νόσου	«IgA-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία»	«IgA-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» BM >50%	-
Συσχέτιση με χρόνο έναρξης θεραπείας	-	√	√
Συσχέτιση με συνολική επιβίωση	-	-	-

√: συσχετίζεται, -: δεν συσχετίζεται

Κεφάλαιο 6. Το Λέμφωμα Οριακής Ζώνης

6.1. Εισαγωγή

Το Λέμφωμα Οριακής Ζώνης (ΛΟΖ) συμπεριλαμβάνεται στα Β-λεμφώματα χαμηλής κακοήθειας. Ανάλογα με τα εμπλεκόμενες περιοχές διαχωρίζεται σε σπληνικό λέμφωμα οριακής ζώνης (SMZL), σε λεμφαδενικό λέμφωμα οριακής ζώνης (NMZL) και σε εξωλεμφαδενικό λέμφωμα οριακής ζώνης του λεμφικού ιστού συσχετιζόμενου με τους βλεννογόνους (MALT).

Ο νεοπλασματικός πληθυσμός και στις τρεις υποκατηγορίες εκφράζει δείκτες Β-Λεμφοκυττάρων όπως CD19 και CD20 αλλά είναι χαρακτηριστικά αρνητικός ως προς τους δείκτες CD5, CD23, CD10 και CD25.

Το σπληνικό λέμφωμα οριακής ζώνης (SMZL) απαρτίζει το 0,9% των Β-μη Hodgkin λεμφωμάτων. Εκδηλώνεται κλινικά με εκσεσημασμένη σπληνομεγαλία χωρίς λεμφαδενοπάθεια, με παγκυτταροπενία ή λεμφοκυττάρωση και Β συμπτωματολογία. Διήθηση του μυελού ανευρίσκεται στο 80-90% των περιπτώσεων. Η διάγνωση τίθεται με βιοψία μυελού ή σπληνεκτομή. Στην ιστολογική εξέταση του σπληνός μια κεντρική ζώνη από μικρά, στρογγυλά Β-λεμφοκύτταρα αντικαθιστούν τα βλαστικά κέντρα του λευκού πολφού, ενώ περιβάλλονται από μία ζώνη από κύτταρα ενδιάμεσου μεγέθους με ωχρο πρωτόπλασμα. Ο ερυθρός πολφός είναι επίσης διηθημένος από μεσαίου και μικρού μεγέθους κύτταρα. Χαρακτηριστικό μορφολογικό εύρημα είναι η παρουσία κυτταροπλασματικών προσεκβολών δίκην πλήκτρων τυμπάνου [Swerdlow και συν, 2008]. Η νόσος έχει συσχετιστεί με λοίμωξη από τον ιό της Ηπατίτιδας C. Η ιταλική ομάδα Fondazione Italiana Linfomi συσχέτισε τρεις παράγοντες νόσου ως προς την συνολική επιβίωση, την παρουσία αιμοσφαιρίνης μικρότερης από 12 g/dL, την παθολογική τιμή LDH και τιμές λευκωματίνης ορού μικρότερη από 3,5 g/dL. Οι ασθενείς κατατάσσονται σε ομάδες χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού ρίσκου ανάλογα με τους παράγοντες [Arcaini και συν, 2006] :

1. **Ομάδα χαμηλού ρίσκου:** 0 παράγοντες με 5 έτη επιβίωση 88%
2. **Ομάδα ενδιάμεσου ρίσκου:** 1 παράγοντας με 5 έτη επιβίωση 73%
3. **Ομάδα υψηλού ρίσκου:** 2 ή 3 παράγοντες με 5 έτη επιβίωση 50%

Το λεμφαδενικό λέμφωμα οριακής ζώνης (NMZL) αντιπροσωπεύει το 2% των B-μη Hodgkin λεμφωμάτων. Εκδηλώνεται κλινικά με ασυμπτωματική εντοπισμένη ή γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια ενώ B συμπτωματολογία ανευρίσκεται στο 10% των περιπτώσεων. Ο μυελός των οστών ανευρίσκεται διηθημένος στο 60%. Η διάγνωση τίθεται με βιοψία λεμφαδένα όπου ανευρίσκεται διήθηση της οριακής ζώνης του λεμφαδένα και των διαστημάτων μεταξύ των βλαστικών κέντρων από μονοκυτταροειδή λεμφοκύτταρα [Swerdlow και συν, 2008].

Το εξωλεμφαδενικό λέμφωμα οριακής ζώνης του λεμφικού ιστού συσχετιζόμενου με τους βλεννογόνους (MALT) εκπροσωπεί το 7% των B-μη Hodgkin λεμφωμάτων. Εμφανίζονται σε περιοχές όπου δεν υπάρχει οργανωμένος λεμφικός ιστός αλλά δημιουργείται επίκτητα εξαιτίας χρόνιου αντιγονικού ερεθισμού ή χρόνιας φλεγμονής όπως λοίμωξη από Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, ιό της Ηπατίτιδας C, Χλαμύδια, Καμπυλοβακτηρίδιο ή *Borrelia Burgdorferi*. Νεοπλασματική εξαλλαγή αυτού του ιστού οδηγεί στη ανάπτυξη του MALT. Η κλινική εκδήλωση εξαρτάται από την εμπλεκόμενη περιοχή, η οποία αφορά τον γαστρεντερικό σωλήνα περίπου στο 50%, και σε μικρότερα ποσοστά τους σιελογόνους αδένες, το δέρμα, τους οφθαλμούς, τους πνεύμονες (BALT) και τον θυρεοειδή αδένα. Διήθηση του μυελού ανευρίσκεται στο 2-20% και αφορά κυρίως περιπτώσεις BALT ή οφθαλμών. Η διάγνωση τίθεται με βιοψία [Swerdlow και συν, 2008]. Η νόσος έχει συσχετιστεί με την μετάθεση t(11;18)(q21;q21) και με άλλες κυτταρογενετικές ανωμαλίες όπως t(1;14)(p22;q32), t(14;18)(q32;q21), t(3;14)(p14.1;q32) και τρισωμίες 2 και 18.

Η σταδιοποίηση γίνεται με το κλασικό σύστημα Ann–Arbor ή με το σύστημα Blackledge για τα MALT γαστρεντερικού σωλήνα (ΓΕΣ) ως [Blackledge και συν, 1979]:

1. **Στάδιο I:** εντόπιση στο ΓΕΣ χωρίς διήθηση ορογόνου χιτώνα
2. **Στάδιο II:** διήθηση επιχώριων **II1** ή απομακρυσμένων λεμφαδένων **II2**
3. **Στάδιο III:** διήθηση ορογόνου χιτώνα και συμμετοχή παρακείμενων οργάνων ή ιστών
4. **Στάδιο IV :**πολλαπλές εξωλεμφαδενικές εντοπίσεις ή συμμετοχή υπερδιαφραγματικών λεμφαδένων

Αναφέρεται ότι το 30% των ΛΟΖ έχουν παραπρωτεΐναιμία.

6.2. Το Λεμφώματος Οριακής Ζώνης στη Διάγνωση

6.2.1 Ασθενείς

Μελετήθηκε σειρά 24 ασθενών με νεοδιάγνωση Λεμφώματος Οριακής Ζώνης εκ των οποίων τα 16 ήταν SMZL και υπόλοιπα 8 MALT. Το φύλο ήταν άρρεν στους 13 και θήλυ στους 11. Η διάμεση ηλικία ήταν 69 έτη (εύρος 52-77 έτη). Η σταδιοποίηση σύμφωνα με το διεθνές σύστημα Fondazione Italiana Linfomi για τα SMZL ήταν 50% σε χαμηλό στάδιο, 25% σε ενδιάμεσο και 25% σε υψηλό. Λεμφαδενοπάθεια εβρέθη στο 42%, σπληνομεγαλία στο 62%, ηπατομεγαλία στο 21% και αυξημένη LDH στο 21%. Ο μυελός των οστών ήταν διηθημένος από κύτταρα της νόσου μόνο στους ασθενείς με SMZL, ενώ εκτεταμένη διήθηση μυελού (>50%) βρέθηκε στο 50%.

Με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής περιφερικού αίματος ή ανοσοιστοχημείας δειγμάτων βιοψίας η ανοσοσφαιρίνη επιφανείας ήταν κ στους 18 ασθενείς και λ στους 6.

Τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών ορού προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της κλασσικής νεφελομετρίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ανοσοσφαιρινών. Τα επίπεδα της IgG διακυμανθήκαν από 2,73 έως 22 gr/L με διάμεση τιμή 9,11 gr/L, της IgA διακυμανθήκαν από 0,30 έως 3,88 gr/L με διάμεση τιμή 1,74 gr/L και για της IgM από 0,17 έως 26,20 gr/L με διάμεση τιμή 0,59 gr/L.

Οι κάππα ελεύθερες ελαφρές αλυσίδες ορού με τη χρήση της μεθόδου Freelite™ διακυμανθήκαν από 11,7 έως 64,6 mg/L με διάμεσο 22,1 mg/L και οι λάμδα από 7,26 έως 47,30 mg/L με διάμεσο 17,20 mg/L.

Ο λόγος των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων ορού (sFLCR) υπολογίστηκε με την ανοσοσφαιρίνη επιφανείας ως αριθμητής και διακυμανθήκε από 0,25 έως 5 με διάμεση τιμή 1,34.

Κατά την διάρκεια της παρακολούθησης των ασθενών οι 22/24 (92%) χρειάστηκε να λάβουν θεραπεία. Η επιλογή της θεραπείας έγινε βάση των διεθνών οδηγιών. Η διάμεση παρακολούθηση ήταν 33 μήνες (εύρος 13-173 μήνες).

Πίνακας 1 : Χαρακτηριστικά ασθενών με Λέμφωμα Οριακής Ζώνης

Αριθμός ασθενών	24
Υποκατηγορίες	SMZL MALT
Διάμεση ηλικία	69 έτη (εύρος 52-77)
Φύλο Α/Θ	13/11
Ανοσοσφαιρίνη επιφανείας	κ λ
Στάδιο νόσου των SMZL κατά Fondazione Italiana Linfomi	
Χαμηλού	50%
Ενδιάμεσου	25%
Υψηλού	25%
Παθολογική LDH	21%
Εκτεταμένη διήθηση του μυελού των οστών από λεμφοκύτταρα (≥50%)	50%
Λεμφαδενοπάθεια	42%
Σπληνομεγαλία	62%
Ηπατομεγαλία	21%
Συμπτωματικοί	92%
Διάμεση Παρακολούθηση	33 μήνες (εύρος 13-173)

6.2.2. Μεθοδολογία

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των HLC πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της νεφελομετρίας με τη χρήση Dade Behring BN II Nephelometer στα εργαστήρια της Binding Site, στο Birmingham, Ενωμένο Βασίλειο καθώς και στο Τμήμα Ανοσολογίας του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών. Χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα από πρόβατα (Hevylite™, Binding Site, U.K.).

Ο λόγος HLCR υπολογίστηκε με βάση την έκφραση ανοσοσφαιρίνης επιφανείας. Στους ασθενείς που εξέφραζαν κ ανοσοσφαιρίνη επιφανείας ο λόγος HLC υπολογίστηκε με τις τιμές των κάππα ως αριθμητής δηλαδή ως IgGκ/IgGλ (IgG-HLCR), IgAκ/IgAλ (IgA-HLCR) και IgMκ/IgMλ (IgM-HLCR). Στους ασθενείς που εξέφραζαν λ ανοσοσφαιρίνη επιφανείας ο λόγος HLCR υπολογίστηκε με τις τιμές των λάμδα ως αριθμητής δηλαδή ως IgGλ/IgGκ (IgG-HLCR), IgAλ/IgAκ (IgA-HLCR) και IgMλ/IgMκ (IgM-HLCR).

«Μη φυσιολογικός λόγος HLCR» ορίστηκε κάθε τιμή άνω και κάτω του εύρους 95% στους φυσιολογικούς μάρτυρες.

Τα αποτελέσματα ήταν αναπαραγωγίσιμα.

Η μελέτη ήταν αναδρομική και χρησιμοποιήθηκαν οροί ασθενών με Λέμφωμα Οριακής Ζώνης οι οποίοι είχαν αποθηκευτεί στους -80°C στη διάγνωση της νόσου. Παράλληλα έγιναν μετρήσεις και σε 130 υγιείς δότες αίματος οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σαν τιμές έλεγχου.

Πίνακας 2 : Τιμές HLC και HLCR σε Υγιείς Δότες Αίματος

	Διάμεση τιμή	Εύρος 95%
IgGκ (gr/L)	6,85	4,03 - 9,78
IgGλ (gr/L)	3,81	1,97 - 5,71
IgAκ (gr/L)	1,19	0,48 - 2,82
IgAλ (gr/L)	0,98	0,36 - 1,98
IgMκ (g/L)	0,63	0,29 – 1,82
IgMλ (g/L)	0,49	0,17 - 0,94
IgGκ/IgGλ	1,87	0,98 - 2,75
IgGλ/IgGκ	0,54	0,37 - 0,89
IgAκ/gAλ	1,27	0,8 - 2,04
IgAλ/IgAκ	0,79	0,49 - 1,25
IgMκ/IgMλ	1,59	0,96 – 2,30
IgMλ /IgMκ	0,63	0,43 – 1,04

Τα επίπεδα της IgG και το άθροισμα IgGκ+IgGλ μικρότερα από 7 gr/L, η IgA και το άθροισμα IgAκ+IgAλ μικρότερα από 0,7 gr/L και η IgM και το άθροισμα IgMκ+IgMλ μικρότερα από 0,5 gr/L ορίστηκαν ως «χαμηλές τιμές».

«Υψηλός» λόγος HLC ορίστηκε ως κάθε τιμή άνω του διαμέσου.

Οι τιμές HLC και ο λόγος τους συσχετίστηκαν με παράγοντες νόσου όπως την παρουσία λεμφαδενοπάθειας, σπληνομεγαλίας και εκτεταμένης διήθησης μυελού (>50%) από λεμφοκύτταρα και των υψηλών επιπέδων LDH. Έγινε συσχέτιση και με τα επίπεδα βιολογικών παραγόντων όπως τα επίπεδα των κυτταροκινών διαλυτός-Syndecan-1, BLys και TGF-β.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα «Statistical Package for the Social Sciences» (SPSS) v 15.0. Τα όρια των λόγων και η προγνωστική σημασία του λόγου των HLC έγινε με την μονοπαραγοντική Cox regression ανάλυση. Η μέθοδος Kaplan Meier χρησιμοποιήθηκε για την σχηματική απεικόνιση των καμπυλών επιβίωσης και ενάρξεως θεραπείας. Οι μεταβλητές προς μελέτη συγκρίθηκαν με τη μέθοδο του χ τετραγώνου (χ^2).

Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν μετά τη ενημέρωση και την έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών, ενώ η χρήση των βιολογικών δειγμάτων εκκρίθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο του Λαϊκού Νοσοκομείου σύμφωνα με τις επιταγές της επιτροπής ηθικής και δεοντολογίας.

6.2.3. Αποτελέσματα

Ανάλυση των Ορών Ασθενών με MZL στη Διάγνωση της Νόσου

Στους ασθενείς με κ έκφραση ανοσοσφαιρίνης επιφανείας τα επίπεδα της IgGκ-HLC διακυμανθήκαν από 3,41 έως 15,6 gr/L με διάμεση τιμή 6,65 gr/L, της IgAκ-HLC από 0,37 έως 2,45 gr/L με διάμεση τιμή 1,00 gr/L και της IgMκ-HLC από 0,13 έως 1,85 gr/L με διάμεση τιμή 0,37gr/L. Στους ίδιους ασθενείς οι IgGλ-HLC από 1,57 έως 7,64 gr/L με διάμεση τιμή 2,78 gr/L, της IgAλ-HLC από 0,32 έως 1,80 gr/L με διάμεση τιμή 0,90 gr/L και της IgMλ-HLC από 0,05 έως 1,54 gr/L με διάμεση τιμή 0,19 gr/L.

Επίσης ο λόγος IgG-HLCR διακυμάνθηκε από 1,09 έως 3,5 με διάμεση τιμή 2,15, ο IgA-HLCR από 0,53 έως 1,64 με διάμεση τιμή 1,12 και ο IgM-HLCR από 0,50 έως 25 με διάμεση τιμή 2,14.

Στους ασθενείς με λ έκφραση ανοσοσφαιρίνης επιφανείας τα επίπεδα της IgGλ-HLC διακυμανθήκαν από 1,62 έως 4,89 gr/L με διάμεση τιμή 2,59 gr/L, της IgAλ-HLC από 0,48 έως 1,59 gr/L με διάμεση τιμή 0,55 gr/L και της IgMλ-HLC από 0,18 έως 1,03 gr/L με διάμεση τιμή 0,45 gr/L. Στους ίδιους ασθενείς οι IgGκ-HLC διακυμανθήκαν από 3,13 έως 9,01 gr/L με διάμεση τιμή 5,68 gr/L, της IgAκ-HLC από 0,59 έως 2,39 gr/L με διάμεση τιμή 0,97 gr/L και της IgMκ-HLC από 0,11 έως 3,34 gr/L με διάμεση τιμή 0,31 gr/L.

Επίσης ο λόγος IgG-HLCR διακυμάνθηκε από 0,24 έως 0,60 με διάμεση τιμή 0,42, ο IgA-HLCR από 0,32 έως 0,90 με διάμεση τιμή 0,87 και ο IgM-HLCR από 0,24 έως 6,40 με διάμεση τιμή 0,69.

Τα άθροισμα IgGκ+IgGλ διακυμάνθηκαν από 5,21 έως 23,24 gr/L με διάμεση τιμή 9,55 gr/L, των IgAκ+IgAλ από 0,72 έως 4,21 gr/L με διάμεση τιμή 1,84 gr/L και των IgMκ+IgMλ από 0,17 έως 4,14 gr/L με διάμεση τιμή 0,57 gr/L.

Συσχέτιση των HLC με Παράγοντες Νόσου

Οι τιμές HLC δεν συσχετίστηκαν με παράγοντες νόσου. Μονό οι λόγοι IgG – HLCR και IgA-HLCR πάνω από το διάμεσο συσχετίστηκαν με την εκτεταμένη διήθηση μυελού των οστών ($p=0,034$ και για τις δύο).

Συσχέτιση με το Χρόνο Έναρξης Θεραπείας

Τα χαμηλές τιμές των IgG, IgA και IgM και των αθροισμάτων IgGκ+IgGλ, IgAκ+IgAλ και IgMκ+IgMλ δεν συσχετίστηκαν με το χρόνο έναρξης θεραπείας. Επιπλέον η χαμηλή «πολυκλωνική» HLC δεν συσχετίστηκαν με το χρόνο έναρξης θεραπείας.

Τα επίπεδα των λόγων IgG-HLCR, IgA-HLCR και IgM-HLCR πάνω από το διάμεσο δεν συσχετίστηκαν με το χρόνο έναρξης θεραπείας.

«Μη φυσιολογικός λόγος IgG-HLCR» βρέθηκε στους 4/24 (16,7%) ασθενείς, «μη φυσιολογικός λόγος IgA-HLCR» στους 3/24 (12,5%) και «μη φυσιολογικός λόγος IgM-HLCR» στους 13/24 (54%). Η παρουσία «μη φυσιολογικού λόγου HLCR» δεν συσχετίστηκε το χρόνο έναρξης θεραπείας. Σε 6/13 (46%) ασθενείς με «μη φυσιολογικό λόγο IgM-HLCR» συνυπήρχε «μη φυσιολογικός λόγος IgG-HLCR» ή «μη φυσιολογικός λόγος IgA-HLCR».

Οι παράγοντες δεν συσχετίστηκαν με την συνολική επιβίωση.

Πίνακας 3 : Σύνοψη των Συσχετίσεων της Ανοσοσφαιρίνης στο Λέμφωμα Οριακής Ζώνης στη Διάγνωση

	«Μονοκλωνική» HLC	HLCR	SH	«Πολυκλωνική» HLC
Συσχέτιση με παράγοντες νόσου	-	BM > 50%	-	-
Συσχέτιση με χρόνο έναρξης θεραπείας	-	-	-	-

HLC/HLCR: αμιγώς μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη και λόγος μονοκλωνικής/πολυκλωνικής της ίδιας τάξης,

SH: Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία, -: δεν συσχετίζεται

Συσχέτιση των HLC με τους Βιολογικούς Παράγοντες Νόσου

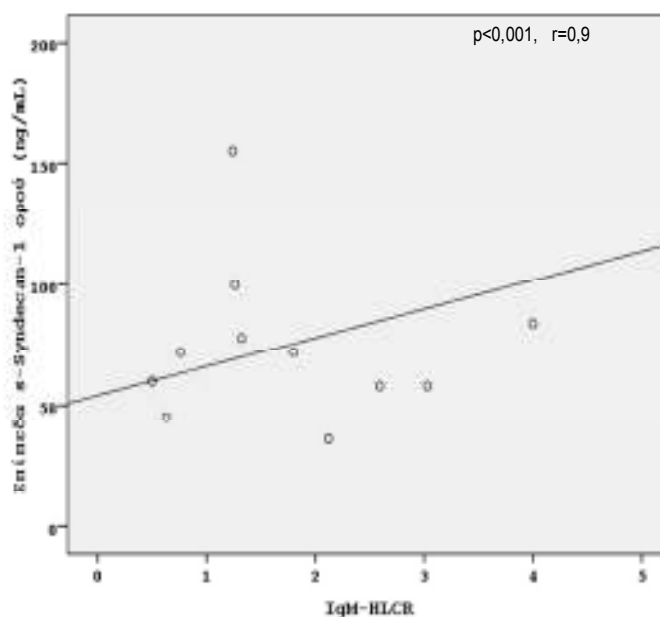
A. Ο διαλυτός-Syndecan-1 στο Λέμφωμα Οριακής Ζώνης στη Διάγνωση

Τα επίπεδα του s-Syndecan-1 στους ασθενείς με Λέμφωμα Οριακής Ζώνης διακυμανθήκαν από 36 έως 360 ng/mL με διάμεση τιμή 72 ng/mL, ενώ στους φυσιολογικούς μάρτυρες από 5,4 έως 86 ng/mL με διάμεση τιμή 36 ng/mL.

Οι τιμές του s-Syndecan-1 πάνω από το διάμεσο δεν συσχετίστηκαν με τους παράγοντες νόσου ούτε με το χρόνο έναρξης θεραπείας.

Επίσης τα επίπεδα του s-Syndecan-1 σαν συνεχής μεταβλητή δεν συσχετίστηκαν με τις τιμές HLC αλλά συσχετίστηκαν με το λόγο IgM-HLCR ($p < 0,001$, $r = 0,9$) (Σχήμα 1).

Σχήμα 1
Συσχέτιση του s-Syndecan-1
με το λόγο IgM-HLCR



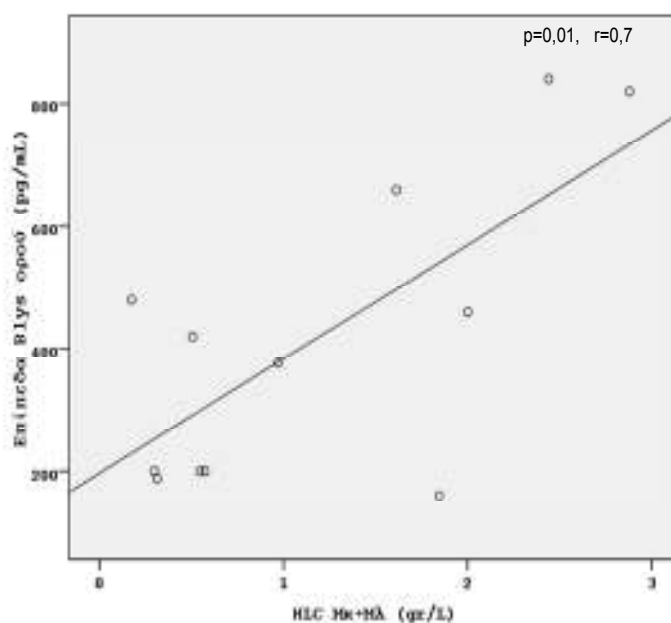
Β. Ο BLys στο Λέμφωμα Οριακής Ζώνης στη Διάγνωση

Τα επίπεδα του BLys στους ασθενείς με Λέμφωμα Οριακής Ζώνης διακυμανθήκαν από 160 έως 840 pg/mL με διάμεση τιμή 398 pg/mL, ενώ στους φυσιολογικούς μάρτυρες από 62 έως 381 pg/mL με διάμεση τιμή 204 pg/mL.

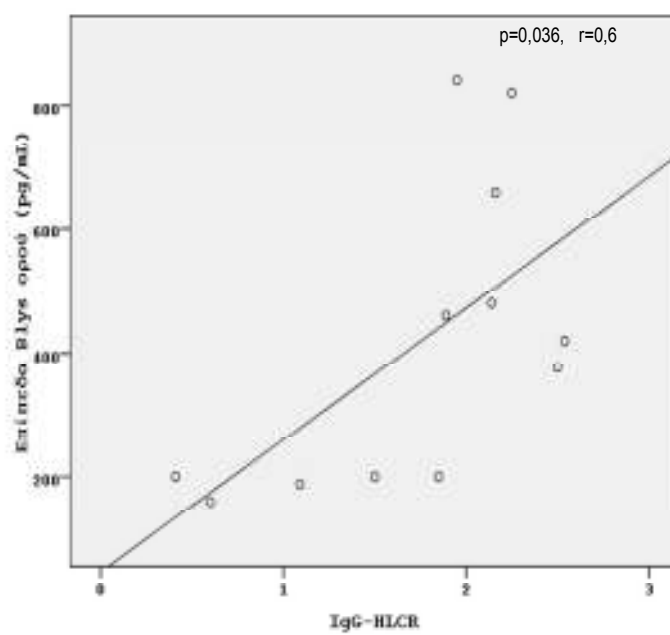
Οι τιμές του BLys πάνω από τη διάμεση τιμή δεν συσχετίστηκαν παράγοντες νόσου ούτε με το χρόνο έναρξης θεραπείας.

Επίσης τα επίπεδα του BLys σαν συνεχής μεταβλητή συσχετίστηκαν με τις HLC τιμές IgMκ+IgMλ ($p=0,01$, $r=0,7$) και με το λόγο IgG-HLCR ($p=0,036$, $r=0,6$) (Σχήμα 2, 3).

Σχήμα 2
Συσχέτιση του BLys με το
άθροισμα HLC IgMκ+IgMλ



Σχήμα 3
Συσχέτιση του BLys με το
λόγο IgG-HLCR



Γ. Ο TGF-β1 στο Λέμφωμα Οριακής Ζώνης στη Διάγνωση

Τα επίπεδα του TGF-β1 στους ασθενείς με Λέμφωμα Οριακής Ζώνης διακυμανθήκαν από 4500 έως 90000 pg/mL με διάμεση τιμή 45000 pg/mL, ενώ στους φυσιολογικούς μάρτυρες από 30000 έως 90000 pg/mL με διάμεση τιμή 57000 pg/mL.

Οι τιμές του TGF-β1 πάνω από τη διάμεση τιμή δεν συσχετίστηκαν με παράγοντες νόσου ούτε με το χρόνο προς έναρξη θεραπείας.

Επίσης σαν συνεχής μεταβλητή δεν συσχετίστηκαν με τις τιμές HLC ούτε και με το λόγο HLCR.

Πίνακας 4 : Κυτταροκίνες στο ορό ασθενών με Λέμφωμα Οριακής Ζώνης στην διάγνωση και σύνοψη συσχετίσεων

	διαλυτός-Syndecan-1	BLys	TGF-β1
Από τους 24 ασθενείς μετρήθηκε στον ορό στους	12	12	12
Διάμεση τιμή	72 ng/mL	398 pg/mL	45000 pg/mL
Εύρος	36 - 360 ng/mL	160 - 840 pg/mL	4500 - 90000 pg/mL
Συσχέτιση με HLC/HLCR	√	√	-
Συσχέτιση με παράγοντες νόσου	-	-	-
Συσχέτιση με χρόνο έναρξης θεραπείας	-	-	-
Συσχέτιση με συνολική επιβίωση	-	-	-

√: συσχετίζεται, -: δεν συσχετίζεται

Κεφάλαιο 7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1. Εισαγωγή

Στην παρούσα διατριβή εκτιμήθηκε η κλινική χρήση της νέας μεθόδου προσδιορισμού της Ig με την μέθοδο Henvylite™ σε ασθενείς με ΠΜ, ΜW, ΧΛΛ και ΛΟΖ. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται ποσοτικά η «αμιγώς μονοκλωνική Ig» και η πολυκλωνική Ig της ίδιας τάξης και υπολογίζεται ο λόγος μονοκλωνική/πολυκλωνική Ig (HLCR). Επιπλέον προσπερνιόνται οι περιορισμοί των άλλων μεθόδων κατά τον προσδιορισμό της Ig, όπως η προσμέτρηση άλλων πρωτεϊνών (τρανσφερρίνη, β-λιποπρωτεΐνη), η μέτρηση πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων Ig και ο συνυπολογισμός της πολυκλωνικής Ig στην ολική Ig.

Έγινε ακόμα προσπάθεια ανεύρεσης σχέσης μεταξύ Ig και βιολογικών παραγόντων που προάγουν ή αναστέλλουν την παραγωγή της, όπως οι κυτταροκίνες διαλυτός-Syndecan-1, BLys και TGF-β1.

7.2. Πολλαπλούν Μυέλωμα στη Διάγνωση

Η μέθοδος προσδιορισμού της Ig με Henvylite™ αναπτύχθηκε από τον AR Bradwell το 2008. Σε παγκόσμιο επίπεδο η ομάδα μας και η ομάδα των Ludwig και Avet-Loiseau είναι οι πρώτες που εφάρμοσαν την μέθοδο αυτή σε ασθενείς με ΠΜ στη διάγνωση. Τα άρθρα δε [Koulieris και συν, 2012] και λίγους μήνες αργότερα των [Ludwig και συν, 2012] αποτελούν τις πρώτες πλήρεις δημοσιεύσεις, όπου αναφέρεται η προγνωστική αξία του λόγου HLCR ως προς την συνολική επιβίωση.

Στο ΠΜ ο προσδιορισμός της μονοκλωνικής παράπρωτεϊνης (HLC) με τη μέθοδο αυτή συσχετίστηκε με την μέτρηση της ολικής Ig με κλασσική νεφελομετρία. Επιπλέον η μονοκλωνική HLC συσχετίστηκε με παράγοντες ενεργότητας νόσου και φορτίου αυτής όπως τα στάδια νόσου κατά D-S, την παρουσία αναιμίας, την εκτεταμένη διήθηση μυελού από πλασματοκύτταρα και το λόγο sFLCR. Ο λόγος HLCR συσχετίστηκε με τους ίδιους παράγοντες και επιπλέον με τις αυξημένες τιμές της β_2 -μικροσφαιρίνης. Η μονοκλωνική HLC και ο λόγος HLCR συσχετίστηκαν με το χρόνο έναρξης θεραπείας και ο HLCR επιπλέον με τη συνολική επιβίωση. Έτσι οι ασθενείς με τιμές λόγου HLCR στην διάγνωση άνω της διάμεσης τιμής έχουν χειρότερη συνολική επιβίωση από τους υπόλοιπους. Ο λόγος υπολογίζεται ως μονοκλωνική/πολυκλωνική Ig. Δύο διαφορετικοί ασθενείς με ίδια επίπεδα μονοκλωνικής HLC αλλά με διαφορετικά επίπεδα πολυκλωνικής Ig της ίδιας τάξης έχουν και διαφορετικό λόγο HLCR και έτσι διαφορετική συνολική επιβίωση, αναδεικνύοντας της συμμετοχή της σύνθεσης της πολυκλωνικής Ig στην παθογένεια της νόσου.

Μελετήθηκε ακόμα ο ρόλος της «πολυκλωνικής Υπογαμμασφαιριναιμίας» στην συμπεριφορά της νόσου. Η «Ανοσοπάρεση της Ig της Ίδιας Τάξης» σχετίστηκε με το χρόνο έναρξης θεραπείας. Η «IgM-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμίας» σχετίστηκε με το χρόνο έναρξης θεραπείας και με την συνολική επιβίωση. Στη δημοσίευση των [Perosa και συν, 2009], αναφέρεται ότι στην διάγνωση του ΠΜ οι τιμές IgM ορού κάτω από 0,32 g/L αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα ως προς τη συνολική επιβίωση, ενώ όταν συνδυαστεί με τα επίπεδα των β_2 μικροσφαιρίνη-

ελευθέρων βαριών αλυσίδων HLA τύπου I (FHC) διαχωρίζει 3 προγνωστικές ομάδες ως προς τη συνολική επιβίωση. Το cut off που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη αυτή είναι μια πολύ χαμηλή τιμή IgM, ενώ τα δικά μας ευρήματα επιβεβαιώνουν αυτά των Perosa και συν, στο ίδιο cut off, αλλά και σε cut off 0,5 g/L, το οποίο αποτελεί το διεθνώς αποδεκτό όριο χαμηλής IgM ορού.

Άλλοι παράγοντες προγνωστικοί ως προς τη συνολική επιβίωση ήταν, όπως αναμενόταν [Kyrtsionis και συν, 2009], τα εκτεταμένα στάδια νόσου [Durie και συν, 1975; Greipp και συν, 2005], η παρουσία αναιμίας και θρομβοπενίας [Cavo και συν, 1989], η παρουσία χαμηλών τιμών λευκωματίνης ορού [Simomsson και συν, 1988; Blade και συν, 1989], οι υψηλές τιμές κρεατινίνης [Kyle και συν 2003; Eleutherakis-Papaiakonou και συν, 2007] και β₂-μικροσφαιρίνης ορού [Cassuto και συν, 1978; Norfolk και συν, 1980] η παρουσία υπερασβεστιαϊμίας [Durie και συν, 1975] και εκτεταμένης διήθηση του μυελού των οστών από πλασματοκύτταρα, η εκτεταμένη οστική νόσος [Durie και συν, 1975] και ο υψηλός λόγος των ελεύθερων ελαφρών αλυσίδων [Kyrtsionis και συν, 2007; Snozek και συν 2008]. Αντιθέτως τα επίπεδα των IgG, IgA, οι τιμές της μονοκλωνικής HLC, η «IgG- και η IgA- Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» και η «Ανοσοπάρεση της Ίδιας Ig Τάξης» δεν συσχετίστηκαν με την συνολική επιβίωση. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση το στάδιο κατά ISS, οι τιμές των αιμοπεταλίων και η παρουσία υπερασβεστιαϊμίας διατήρησαν την σημαντικότητά τους.

Στη μελέτη των [Ludwig και συν, 2012] συμπεριλήφθηκαν 156 ασθενείς, που ήταν ενταγμένοι σε θεραπευτικά πρωτόκολλα, με χαρακτηριστικά και διάμεση παρακολούθηση παρόμοια με την σειρά μας. Βρέθηκε ότι οι ασθενείς με ακραίως παθολογικές τιμές λόγου HLCR (κάτω του 0,022 ή άνω του 45) είχαν χειρότερη συνολική επιβίωση από τους υπόλοιπους. Σε αντίθεση εμείς χρησιμοποιήσαμε σαν cut off τη διάμεση τιμή των λόγων HLCR και όχι τις ακραίες τιμές αυτού. Επιπλέον οι Ludwig και συν, επιβεβαίωσαν την προγνωστική αξία των υψηλών τιμών της β₂-μικροσφαιρίνης αλλά όχι του λόγου sFLCR ούτε των τιμών της λευκωματίνης ορού.

Άλλη μελέτη, από τους [Bradwell και συν, 2012] ανέδειξε την προγνωστική αξία των HLC και του λόγου HLCR σε ασθενείς με ΠΜ ως προς το χρόνο ελεύθερης νόσου. Συμπεριλήφθηκαν 399 ασθενείς, ενταγμένοι στη Γαλλική

μελέτη 2005-01MM. Βρέθηκε όπως και στη μελέτη μας συσχέτιση των τιμών της μονοκλωνικής HLC με την ολική Ig. Οι ασθενείς με τιμές λόγου HLCR άνω της διάμεσης τιμής είχαν μικρότερο χρόνο ελεύθερης νόσου από τους υπόλοιπους αλλά όχι χειρότερη συνολική επιβίωση. Επιπλέον επιβεβαίωσε ότι η παρουσία «Ανοσοπάρεσης της Ίδιας Ig Τάξης» σχετίζεται με μικρότερο χρόνο ελεύθερης νόσου, αλλά δεν βρέθηκε το ίδιο για την παρουσία «IgM-Συστηματικής Υπογαμμασφαιριναιμίας».

Οι [Katzmann και συν, 2013] μελέτησαν τον ρόλο των HLC και του λόγου HLCR σε ασθενείς με MGUS στην διάγνωση ως προς την εξέλιξη/μετατροπή του νοσήματος σε ΠΜ ή παρόμοια νόσο. Συμπεριλήφθηκαν 999 ασθενείς. Βρέθηκε ότι η παρουσίας «Ανοσοπάρεσης της Ίδιας Ig Τάξης» αποτελεί μαζί με το ύψος της παραπρωτεΐνης, το λόγο sFLCR και την τάξη της Ig προγνωστικό παράγοντα ως προς τη ταχύτερη εξέλιξη της νόσου.

Σύμφωνα με τα παραπάνω επιβεβαιώνεται ο ρόλος της παραπρωτεΐνης στη συμπεριφορά του ΠΜ. Οι Durie και Salmon είχαν συμπεριλάβει στο σύστημα σταδιοποίησης του ΠΜ το ύψος της παραπρωτεΐνης, αναγνωρίζοντας προ 30 ετίας το σημαντικό της ρόλο. Αργότερα όμως εγκαταλείφθηκε και πλέον δεν αποτελεί μέρος του συστήματος σταδιοποίησης ISS.

Βιολογικοί Παράγοντες Νόσου – Μικροπεριβάλλον στο ΠΜ στη Διάγνωση

Ο διαλυτός-Syndecan-1 ενέχεται στην διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων ενώ οι υψηλές τιμές του στο ΠΜ στη διάγνωση έχουν συσχετιστεί με χειρότερη συνολική επιβίωση [Kyrtsolis και συν, 2004].

Οι τιμές του s-Syndecan-1 πάνω από τη διάμεση τιμή συσχετίστηκαν με παράγοντες νόσου όπως τα στάδια D-S και ISS, τη λευκωματίνη ορού και την εκτεταμένη διήθηση μυελού από πλασματοκύτταρα δείχνοντας ενεργό συμμετοχή στην παθογένεια της νόσου. Επιπλέον αποτελούν δυσμενή προγνωστικό παράγοντα ως προς τον χρόνο έναρξης θεραπείας και την συνολική επιβίωση. Οι τιμές του s-Syndecan-1 ορού σαν συνεχής μεταβλητή δεν συσχετίστηκαν με την μονοκλωνική HLC και τον λόγο HLCR και δεν φαίνεται να εμπλέκεται στον μηχανισμό παραγωγής Ig από τα πλασματοκύτταρα.

Ο BLys εμπλέκεται στην διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων και πλασματοκυττάρων και στην παραγωγή των Igs. Οι υψηλές τιμές του στο ΠΜ

στη διάγνωση έχουν συσχετιστεί με αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα και με χειρότερη συνολική επιβίωση [Fragoudaki και συν, 2012].

Οι τιμές του BLys πάνω από τη διάμεση τιμή συσχετίστηκαν μόνο με την παρουσία οστικής νόσου και με την υπερασβεστιαμία. Αυτό το εύρημα μπορεί να οφείλεται στο ότι ο BLys αποτελεί συνδέτη (ligand) του TNF- α , ο οποίος διασπά τον αναστολέα του NF- κ B με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του. Ο τελευταίος, μεταξύ άλλων, προάγει τη μεταγραφή γονιδίων σχετιζόμενων με μόρια προσκόλλησης των κυττάρων στο μικροπεριβάλλον και με την ενεργοποίηση των μακροφάγων/οστεοκλαστών [Lam και συν, 2000]. Ως προς τον ρόλο του στην παραγωγή και σύνθεση των αντισωμάτων βρήκαμε ότι οι τιμών του BLys σαν συνεχής μεταβλητή συσχετίζονται με τον λόγο HLCR. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να σημαίνει συμμετοχή στην παραγωγή των πολυκλωνικών αντισωμάτων.

Ο TGF- β 1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T και B λεμφοκυττάρων και την σύνθεση άλλων κυτταροκινών. Οι υψηλές τιμές του στο ΠΜ στη διάγνωση έχουν συσχετιστεί με χαμηλά επίπεδα πολυκλωνικών Ig ανεξαρτήτως τάξης [Kyrtsolis και συν, 1998] και με ίνωση μυελού λόγω ενεργοποίησης των ινοβλαστών.

Οι τιμές του TGF- β 1 πάνω από τη διάμεση τιμή σχετίστηκαν με παράγοντες νόσου όπως τα στάδια D-S, την εκτεταμένη διήθηση μυελού από πλασματοκύτταρα, την αναιμία και την β_2 -μικροσφαιρίνη και επιβεβαιώθηκε η συσχέτισή του με την παρουσία θρομβοπενίας [Kyrtsolis και συν, 1998], καθώς ο TGF- β 1 ανευρίσκεται στα α -κοκκία των αιμοπεταλίων. Ακόμη αποτελούν ευμενή προγνωστικό παράγοντα ως προς το χρόνο έναρξης θεραπείας και την συνολική επιβίωση. Έτσι οι ασθενείς με τιμές άνω της διάμεσης τιμής έχουν παράταση του χρόνου έναρξης θεραπείας αλλά και μεγαλύτερη συνολική επιβίωση. Ως προς την παραγωγή των Igs συσχετίστηκε με την παρουσία «IgA-Συστηματικής Υπογαμμασφαιριναιμίας», με τις τιμές του λόγου των sFLCR πάνω από τη διάμεση τιμή και σαν συνεχής μεταβλητή με τα επίπεδα της μονοκλωνικής HLC γεγονός που δείχνει την πιθανή συμμετοχή του στην παραγωγή τόσο των μονοκλωνικών όσο και των πολυκλωνικών Igs.

7.3. Πολλαπλούν Μυέλωμα στην πορεία

Μελετήσαμε την κλινική χρήση της νέας μεθόδου προσδιορισμού της Ig με την μέθοδο Henvylite™ σε ασθενείς με ΠΜ όχι μόνο στη διάγνωση αλλά και κατά την πορεία της νόσου. Ο βαθμός της ύφεσης στην ανταπόκριση αντικατοπτρίζει τη μείωση του φορτίου νόσου και σχετίζεται με τον χρόνο ελεύθερης νόσου και τη συνολική επιβίωση [Blade και συν, 1998]. Σκοπός ήταν να διερευνηθεί εάν η επίτευξη «φυσιολογικού λόγου HLCR» στην ύφεση προσφέρει πλεονέκτημα ως προς το χρόνο ελεύθερης νόσου.

Εκτιμήθηκε το είδος της ανταπόκρισης και βρέθηκε ότι οι ασθενείς σε sCR είχαν το μεγαλύτερο χρόνο ελεύθερης νόσου.

Στην πρόσφατη μελέτη των [Karoor και συν, 2012] διερευνήθηκε ο ρόλος της επίτευξης sCR και παρατεταμένης sCR (για περισσότερους από 6 μήνες), στην ανταπόκρισης σε ασθενείς με ΠΜ, που υποβλήθηκαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Βρέθηκε ότι οι ασθενείς σε sCR είχαν μεγαλύτερη επιβίωση από αυτούς σε CR και επίσης ότι αυτοί σε παρατεταμένη sCR είχαν τη μεγαλύτερη επιβίωση από όλους.

Βρήκαμε ότι στο 23% των ασθενών σε sCR ανιχνεύεται «μη-φυσιολογικός λόγος HLCR», ο οποίος οφείλεται σε μειωμένη πολυκλωνική Ig της ίδιας τάξης με την παραπρωτεΐνη. Έτσι παρόλο που οι ασθενείς βρίσκονται στην καλύτερη δυνατή ύφεση φαίνεται ότι υπάρχει αναστολή της σύνθεσης των πολυκλωνικών Ig. Στους ασθενείς σε CR+nCR ανιχνεύτηκε και προσδιορίστηκε ποσοτικά μονοκλωνική HLC στο 35% των περιπτώσεων. Παρόλο που στην nCR ανιχνεύεται παραπρωτεΐνη με ανοσοκαθήλωση, δεν μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με τον κλασσικό ποσοτικό προσδιορισμό των Ig, κάτι το οποίο γίνεται με τη νέα αυτή μέθοδο.

Η επίτευξη «φυσιολογικού λόγου HLCR» στην ύφεση συσχετίστηκε με μεγαλύτερο χρόνο ελεύθερης νόσου.

Οι [Ludwig και συν, 2012] μελέτησαν την κλινική προσφορά του λόγου HLCR στην πρώτη ύφεση. Βρέθηκε ότι το 25% των ασθενείς σε CR είχαν «μη-φυσιολογικός λόγος HLCR» και ότι η επίτευξη «φυσιολογικού λόγου HLCR» προσφέρει πλεονέκτημα επιβίωσης όταν η ανταπόκριση είναι PR ή καλύτερη.

Οι [Bradwell και συν, 2012] μελέτησαν το ρόλο των HLC και του λόγου HLCR σε ασθενείς με ΠΜ ως προς την χρόνο ελεύθερης νόσου. Οι ασθενείς με τιμές

λόγου HLCR άνω της διάμεσης τιμής είχαν μικρότερο χρόνο ελεύθερης νόσου από τους υπόλοιπους και αυτό οφείλεται κυρίως στην παρουσία «Ανοσοπάρεσης της Ίδιας Ig Τάξης».

Σύμφωνα με τα παραπάνω φαίνεται ότι τόσο η εξάλειψη του κλωνικού πληθυσμού των πλασματοκυττάρων όσο και η σύνθεση των πολυκλωνικών φυσιολογικών Ig συσχετίζονται με την παράταση του χρόνου ελεύθερης νόσου.

7.4. Μακροσφαιριναιμία του Waldenström στη Διάγνωση

Εκτιμήθηκε η κλινική χρήση του προσδιορισμού της Ig με Hevylite™ σε ασθενείς με WM στη διάγνωση, ένα νόσημα που εξ' ορισμού χαρακτηρίζεται από IgM παραπρωτεΐναιμία ανεξαρτήτως συγκέντρωσης [Pangalis και συν 2003]. Σε παγκόσμιο επίπεδο υπάρχουν δύο δημοσιεύσεις πάνω στο θέμα αυτό. Αυτή των [Leleu και συν, 2011], που αποτελεί περίληψη των εργασιών του 6^{ου} Workshop πάνω στη Μακροσφαιριναιμία του Waldenström και των [Kyrtsionis και συν, 2012], που είναι η μοναδική δημοσιευμένη μελέτη σε αυτό το αντικείμενο, μέχρι στιγμής.

Ο προσδιορισμός της μονοκλωνικής IgM-HLC με τη μέθοδο αυτή συσχετίστηκε με τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής Ig. Η μονοκλωνική IgM-HLC συσχετίστηκε με παράγοντες ενεργότητας νόσου και φορτίου αυτής όπως την εκτεταμένη διήθηση μυελού από λεμφοπλασματοκύτταρα και η χαμηλή λευκωματίνη ορού, ενώ ο λόγος HLCR επιπλέον με το στάδιο νόσου κατά WM-IPSS, με την αναιμία, με την παρουσία σπληνομεγαλίας και με τις υψηλές τιμές sFLC. Τόσο η μονοκλωνική IgM-HLC όσο και ο λόγος HLCR συσχετίστηκαν με το χρόνο έναρξης θεραπείας. Έτσι οι ασθενείς με τιμές άνω της διάμεσης τιμής έχουν βραχύτερο χρόνο προς έναρξη θεραπείας από τους υπόλοιπους [Koulieris και συν, 2010; Kyrtsionis και συν, 2012].

Μελετήθηκε ο ρόλος της «Υπογαμμασφαιριναιμίας» στην MW. Βρέθηκε ότι η παρουσία «IgA και IgG-Συστηματικής Υπογαμμασφαιριναιμίας» σχετίστηκε μόνο με τις τιμές του λόγου sFLCR, ενώ η «Ανοσοπάρεσης της Ίδιας Ig Τάξης» με τη χαμηλή λευκωματίνη ορού και με το στάδιο νόσου κατά WM-IPSS. Σε αντίθεση με τα ευρήματα στο ΠΜ δεν σχετίστηκαν με το χρόνο έναρξης θεραπείας ούτε και με την συνολική επιβίωση.

Προγνωστικοί παράγοντες ως προς την συνολική επιβίωση ήταν τα εκτεταμένα στάδια νόσου [Morel και συν, 2009], οι υψηλές τιμές της β₂-μικροσφαιρίνης [Dimopoulos και συν, 2004] και οι παθολογικές τιμές της γαλακτικής αφυδρογονάσης [Kastritis και συν, 2010].

Οι τιμές των μονοκλωνικών sFLC πάνω από τη διάμεση τιμή σχετίστηκαν με το χρόνο έναρξης θεραπείας [Itzykson και συν, 2008], και με την συνολική επιβίωση [Maltezas και συν, 2010; Kyrtsionis και συν 2012]. Το άθροισμα των

μονοκλωνικών συν πολυκλωνικών sFLC πάνω από τη διάμεση τιμή σχετίστηκαν με το χρόνο έναρξης θεραπείας και με τη συνολική επιβίωση [Kyrtsolis και συν 2012]. Αντιθέτως τα επίπεδα των IgG, IgA, οι τιμές της μονοκλωνικής IgM-HLC, η «IgG- και η IgA- Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» και η «Ανοσοπάρεση της Ίδιας Ig Τάξης» δεν συσχετίστηκαν με την συνολική επιβίωση. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση μόνο οι υψηλές τιμές της β₂-μικροσφαιρίνης και οι παθολογικές τιμές της γαλακτικής αφυδρογονάσης διατήρησαν την σημαντικότητά τους.

Οι [Morel και συν, 2009] συμπεριέλαβαν την παραπρωτεΐνη ως έναν από τους παράγοντες κινδύνου στο σύστημα σταδιοποίησης τους. Στην παρούσα όμως μελέτη φαίνεται ότι και sFLC και ο λόγος τους διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο νόσημα αυτό. Η συσχέτιση των sFLC με το λόγο HLCR, με την παρουσία «IgG- και η IgA- Συστηματικής Υπογαμμασφαιριναιμίας» και με την συνολική επιβίωση ίσως να δείχνει ότι ο νεοπλασματικός κλώνος παράγει sFLC και μέσω δράσης κυτταροκινών να αλληλεπιδρά με τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα επηρεάζοντας την σύνθεση πολυκλωνικών Igs.

Βιολογικοί Παράγοντες Νόσου – Μικροπεριβάλλον στη WM στη Διάγνωση

Οι διάμεσες τιμές του διαλυτού-Syndecan-1 στην WM και στο ΠΜ ήταν παρόμοιες (85 vs. 75 ng/mL), γεγονός που δείχνει την ίδια παραγωγή και έκκριση στα δύο νοσήματα. Στην WM όμως ο s-Syndecan-1 δεν σχετίστηκε με κάποιον από τους παράγοντες νόσου αλλά ούτε και με το χρόνο έναρξης θεραπείας και τη συνολική επιβίωση. Τα ευρήματα αυτά δεν ταυτίζονται με τα αποτελέσματα στο ΠΜ, όπου έχει ενεργό συμμετοχή στην παθογένεια της νόσου, υποδεικνύοντας και διαφορετικούς εμπλεκόμενους μοριακούς μηχανισμούς στα δύο αυτά νοσήματα. Επίσης έχει περιγραφεί ότι η αυξημένη έκφραση του Syndecan-1 στον νεοπλασματικό πληθυσμό ασθενών με WM σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή μονοκλωνικής IgM [Kyrtsolis και συν, 2011], κάτι το οποίο δεν επιβεβαιώθηκε για τη διαλυτή μορφή του.

Και στην περίπτωση BLys οι διάμεσες τιμές στην WM και στο ΠΜ ήταν παρόμοιες (430 vs. 299 pg/mL), γεγονός που δείχνει και εδώ την ίδια παραγωγή και έκκριση στα δύο νοσήματα. Έχει περιγραφεί ότι η αυξημένα

επίπεδα του BLys στην WM σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή μονοκλωνικής IgM.

Βρέθηκε ότι οι τιμές του BLys πάνω από τη διάμεση τιμή σχετίζονται με τις τιμές των sFLC και τον λόγο sFLCR πάνω από τη διάμεση τιμή, καθώς και σαν συνεχής μεταβλητή με την μονοκλωνική IgM-HLC. Από αυτό φαίνεται να συμμετέχει στην παραγωγή των μονοκλωνικών και των πολυκλωνικών Igs. Στην WM τα λεμφοπλασματοκύτταρα μπορούν να παράγουν IgM και FLC. Ωστόσο δεν έχει διασαφηνιστεί ο ρόλος των πλασματοκυττάρων που ανευρίσκονται ανάμεσα στα λεμφοπλασματοκύτταρα και φαίνονται στα μυελογράμματα και στις βιοψίες μυελού. Πρόκειται για αντιδραστικά κύτταρα ή συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου. Ίσως το παραπάνω εύρημα να προτείνει πιθανή συμμετοχή στην παραγωγή την FLC, μέσω του BLys διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στο νόσημα αυτό.

Ο BLys αποτελεί και ευμενή προγνωστικό παράγοντα, προσφέροντας παράταση του χρόνου έναρξης θεραπείας, κάτι που δεν επιβεβαιώθηκε στο ΠΜ.

Στην περίπτωση του TGF-β1 οι διάμεσες τιμές στην WM και στο ΠΜ ήταν παρόμοιες (33965 vs. 36430 pg/mL), γεγονός που δείχνει και εδώ την ίδια παραγωγή και έκκριση στα δύο νοσήματα. Στην διεθνή βιβλιογραφία δεν έχει περιγραφεί ο ρόλος του στην WM. Στην παρούσα μελέτη, όπως και στο ΠΜ, οι τιμές του TGF-β1 πάνω από τη διάμεση τιμή σχετίστηκαν με την παρουσία θρομβοπενίας [Kyrtsolis και συν, 1998] και αποτελούν ευμενή προγνωστικό παράγοντα ως προς τη συνολική επιβίωση. Ως προς την παραγωγή των Igs δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση σε αντίθεση με το ΠΜ.

Συμπερασματικά φαίνεται ένας κοινός μηχανισμός δράσης του TGF-β1 στο ΠΜ και την WM.

7.5. Χρόνια Λεμφογενής Λευχαιμία στη Διάγνωση

Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι στην ΧΛΛ ανευρίσκονται αυξημένα επίπεδα sFLC περίπου στο 40% των ασθενών [Martin και συν 2007]. Η παρουσία δε παθολογικού λόγου sFLCR έχει συσχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα για πρόοδο της νόσου [Morabito και συν, 2011], ενώ η πολυκλωνική αύξηση των sFLC ορού έχει συσχετίστηκε με συντομότερο χρόνο έναρξης θεραπείας [Maurer και συν, 2011]. Το 30% περίπου των ασθενών παρουσιάζουν υπογαμμασφαιριναιμία. Οι παραπάνω αναφορές στη βιβλιογραφία καθώς και τα ευρήματα σχετικά με τον προγνωστικό ρόλο της «IgM συστηματική υπογαμμασφαιριναιμία» στο ΠΜ μας οδήγησαν στη μελέτη του νοσήματος αυτού.

Στη ΧΛΛ, σε αντίθεση με τα ευρήματα στο ΠΜ και την WM, δεν βρέθηκε συσχέτιση των HLC και του λόγου HLCR με τους παράγοντες νόσου. Ως προς τον χρόνο έναρξης θεραπείας προγνωστικοί παράγοντες ήταν τα στάδια RAI και Binet, η παρουσία σπληνομεγαλίας και το άθροισμα sFLC κ+λ πάνω από 60 mg/L.

Οι παράγοντες που συσχετίστηκαν με τη συνολική επιβίωση ήταν τα στάδια RAI [Rai και συν, 1975] και Binet [Binet και συν 1981], η παρουσία παθολογικής LDH [Shen και συν, 2007; Mozaheb και συν, 2012] και το άθροισμα sFLC κ+λ πάνω από 60 mg/L. Όπως περιγράφηκε στο ΠΜ η «IgM-Συστηματική Υπογαμμασφαιριναιμία» σχετίστηκε με το χρόνο έναρξης θεραπείας και με τη συνολική επιβίωση. Στην ΧΛΛ οι ασθενείς με χαμηλές τιμές του αθροίσματος IgMκ+IgMλ είχαν μικρότερη συνολική επιβίωση από τους υπόλοιπους. Επιπλέον αυτοί με χαμηλή «πολυκλωνική» IgM-HLC είχαν επίσης μικρότερο χρόνο προς έναρξη θεραπείας και μικρότερη συνολική επιβίωση από τους υπόλοιπους.

Στο ένα τρίτο των ασθενών βρέθηκε «μη φυσιολογικός λόγος IgM-HLCR» και η παρουσία του σχετίστηκε επίσης με χειρότερη συνολική επιβίωση. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση το στάδιο RAI και το άθροισμα sFLC κ+λ > 60 mg/L διατήρησαν την σημαντικότητά τους ως προς την συνολική επιβίωση.

Στο 25% των ασθενών με «μη φυσιολογικό λόγο IgM-HLCR» συνυπήρχε «μη φυσιολογικός λόγος IgG-HLCR» ή «μη φυσιολογικός λόγος IgA-HLCR», που

μπορεί να υποδεικνύει πιθανή συνύπαρξη πολλαπλών ολιγοκλώνων μέσα στον νεοπλασματικό πληθυσμό.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν τις σημαντικές κλινικές και βιολογικές πληροφορίες που προσφέρουν οι Igs είτε σαν sFLC είτε σαν αμιγής Ig. Στην διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχει ανάλογη μελέτη για την εφαρμογή της μεθόδου Henvylite™ σε ασθενείς με ΧΛΛ.

Βιολογικοί Παράγοντες Νόσου – Μικροπεριβάλλον στη ΧΛΛ

στη Διάγνωση

Οι διάμεσες τιμές του s-Syndecan-1 ήταν χαμηλότερες από αυτές στο ΠΜ και την WM (75 vs. 85 vs. 53 ng/mL), γεγονός που δείχνει χαμηλότερη παραγωγή σε σύγκριση με τα άλλα δύο νοσήματα. Ο s-Syndecan-1 σχετίστηκε μόνο με τις χαμηλές τιμές IgA, γεγονός που δείχνει συμμετοχή του στην παραγωγή των Ig στο νόσημα αυτό.

Και για τον BLys οι διάμεσες τιμές ήταν χαμηλότερες από αυτές στο ΠΜ και την WM (299 vs. 430 vs. 62 pg/mL), που δείχνει χαμηλότερη παραγωγή σε σύγκριση με τα άλλα δύο νοσήματα. Έχει περιγραφεί ότι τα επίπεδα του BLys στην ΧΛΛ είναι χαμηλότερα σε σχέση με άλλα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα καθώς και ότι αυτά σχετίζονται με πρόοδο νόσου [Lagneaux και συν, 1995]. Βρέθηκε συσχέτιση με την παρουσία «IgA υπογαμμασφαιριναιμίας» και «μη φυσιολογικού λόγου IgG-HLCR», δείχνοντας συμμετοχή στην σύνθεση των Igs. Επιπλέον όπως και στην WM βρέθηκε συσχέτιση με την εκτεταμένη διήθηση μυελού από λεμφοκύτταρα και με παράταση του χρόνου έναρξης θεραπείας, υποδεικνύοντας παρόμοιο μηχανισμό δράσης στα δύο αυτά νοσήματα.

Στην περίπτωση του TGF-β1 οι διάμεση τιμή ήταν επίσης χαμηλότερη από ότι στο ΠΜ και την WM (36430 vs. 33965 vs. 13982,5 pg/mL), δείχνοντας χαμηλότερη παραγωγή σε σύγκριση με τα άλλα δύο νοσήματα. Οι τιμές του TGF-β1 πάνω από τη διάμεση τιμή αποτελούν ευμενή προγνωστικό παράγοντα ως προς το χρόνο έναρξης θεραπείας, εύρημα που έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα στο ΠΜ και την WM, δείχνοντας παρόμοιο μηχανισμό δράσης και στα τρία νοσήματα.

7.6. Λέμφωμα Οριακής Ζώνης στη Διάγνωση

Βασιζόμενοι στα ευρήματα στη ΧΛΛ, μελετήσαμε και ασθενείς με Λέμφωμα Οριακής Ζώνης στη διάγνωση.

Βρέθηκε ότι οι λόγοι IgG-HLCR και IgA-HLCR σχετίζονται με την εκτεταμένη διήθηση μυελού από λεμφοκύτταρα, εύρημα όπως στο ΠΜ και τη WM.

Στους μισούς ασθενείς βρέθηκε «μη φυσιολογικός λόγος IgM-HLCR», ενώ στο 46% εξ αυτών συνυπήρχε «μη φυσιολογικός λόγος IgG-HLCR» ή «μη φυσιολογικός λόγος IgA-HLCR». Στο ΠΜ [Keats και συν, 2012] και στη ΧΛΛ [Pangalis και συν, 1988] έχει αναφερθεί η παρουσία πολλαπλών ολιγοκλώνων μέσα στον νεοπλασματικό πληθυσμό. Δεν έχει όμως περιγραφεί κάτι τέτοιο για το ΛΟΖ. Η εύρεση «μη φυσιολογικών λόγων HLCR» διαφορετικών τάξεων Ig στον ίδιο ασθενή ίσως να υποδεικνύει ύπαρξη πολλαπλών ολιγοκλώνων μέσα στο νεοπλασματικό πληθυσμό.

Βιολογικοί Παράγοντες Νόσου – Μικροπεριβάλλον στο Λέμφωμα Οριακής Ζώνης στη Διάγνωση

Οι διάμεσες τιμές του s-Syndecan-1 ήταν παρόμοιες με το ΠΜ και τη WM (75 vs. 85 vs. 72 ng/mL), γεγονός που δείχνει την ίδια παραγωγή και έκκριση στα νοσήματα αυτά. Εδώ ο s-Syndecan-1 σχετίστηκε με το λόγο IgM-HLCR, που δείχνει όπως και στη ΧΛΛ συμμετοχή στην παραγωγή των Igs.

Για τον BLys οι διάμεσες τιμές ήταν παρόμοιες με το ΠΜ και τη WM (299 vs. 430 vs. 398 pg/mL), που δείχνει ίδια παραγωγή σε σύγκριση με τα άλλα δύο νοσήματα. Βρέθηκε συσχέτιση με τις τιμές IgMκ+IgMλ και το λόγο IgG-HLCR, δείχνοντας συμμετοχή στην σύνθεση των Igs.

Στην περίπτωση του TGF-β1 οι διάμεση τιμή ήταν επίσης παρόμοια με αυτές στο ΠΜ και τη WM (36430 vs. 33965 vs. 45000 pg/mL), δείχνοντας όμοια παραγωγή σε σύγκριση με τα άλλα δύο νοσήματα. Στην παρούσα μελέτη ο TGF-β1 δεν σχετίστηκε με κάποιον παράγοντα νόσου. Βέβαια αποτελεί μια μικρή σειρά ασθενών και τα αποτελέσματά μας είναι ενδεικτικά για αυτό το νόσημα.

Κεφάλαιο 8. Συμπεράσματα - Περίληψη

Οι ανοσοσφαιρίνες παράγονται από τελικά διαφοροποιημένα Β Λεμφοκύτταρα και συμμετέχουν στην πρωτογενή και δευτερογενή ανοσολογική απάντηση. Οι Πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες και τα Β-Λεμφοϋπερλαστικά νοσήματα αποτελούν πρότυπα νοσήματα, όπου έχουμε παραγωγή μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών, ενώ σε πολλά από αυτά ανευρίσκονται μειωμένα επίπεδα πολυκλωνικών αντισωμάτων.

Μελετήθηκαν ασθενείς με Πολλαπλούν Μυέλωμα στη διάγνωση και την πορεία, με Μακροσφαιριναιμία του Waldenström στη διάγνωση, με Χρόνια Λεμφογενή Λευχαιμία και με Λέμφωμα Οριακής Ζώνης επίσης στη διάγνωση. Σκοπός ήταν να διερευνηθεί αν οι παραγόμενες ανοσοσφαιρινών αντικατοπτρίζουν στοιχεία της παθογένειας και της κλινικής συμπεριφοράς των νοσημάτων αυτών. Ο προσδιορισμός των IgS πραγματοποιήθηκε με κλασική νεφελομετρία καθώς και με τις νέες μεθόδους Henvylite™.

Βρέθηκε σε όλα τα νοσήματα συσχέτιση των HLC και του λόγου HLCR με παράγοντες νόσου, ενώ σε πολλά από αυτά φαίνεται να έχουν και προγνωστική αξία.

Παράλληλα μελετήθηκαν οι κυτταροκίνες διαλυτός-Syndecan-1, BLys και TGF-β1 σε σχέση με το ρόλο τους στα παραπάνω νοσήματα και την παραγωγή των ανοσοσφαιρινών. Βρήκαμε ότι όλοι οι παραπάνω βιολογικοί παράγοντες σχετίστηκαν σε διαφορετικά νοσήματα με διαφορετικούς παράγοντες νόσου και με την παραγωγή τόσο των μονοκλωνικών όσο και των πολυκλωνικών IgS.

Προτείνεται ο προσδιορισμός των ανοσοσφαιρινών με νέες μεθόδους, καθώς προσφέρουν χρήσιμες πληροφορίες ως προς την συμπεριφορά των νοσημάτων αυτών.

Πινάκας: Συμβολή των Επιπέδων των HLC και HLCR στις Πλασματοκυτταρικές Δυσκρασίες και στα Β-Λεμφοϋπερπλαστικά Νοσήματα					
	Διάγνωση	Σταδιοποίηση	Παρακολούθηση	Ανταπόκριση στη θεραπεία	Πρόγνωση
MGUS	√	-	?	-	√
ΠΜ αμιγούς Ig	√	√ ^{D-S}	√	√	√
MW	√	√ ^{WM-IPSS}	√	√	√
ΧΛΛ	-	-	-	-	√
B-NHL	-	-	-	-	-

MGUS: Μονοκλωνική Γαμμοπάθεια Αδιευκρίνιστης Σημασίας, ΠΜ: Πολλαπλούν Μυέλωμα,

MW: Μακροσφαιριναιμία του Waldenström, ΧΛΛ: Χρόνια Λεμφογενής Λευχαιμία,

B-NHL: Β Μη-Hodgkin Λέμφωμα, Ig: ανοσοσφαιρίνη, HLC/HLCR: αμιγώς μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη και λόγος
μονοκλωνικής/πολυκλωνικής της ίδιας τάξης

√:χρήσιμο, -: μη χρήσιμο, ?: άγνωστο, √^{D-S}: σταδιοποίηση Durie και Salmon

√^{WM-IPSS} σταδιοποίηση WM-IPSS

Κεφάλαιο 9. Αγγλική Περίληψη

The immunoglobulins are produced by terminally differentiated B Lymphocytes and participate in the primary and secondary immune response. Plasma cell dyscrasias and B-Lymphoproliferative disorders are main diseases where a monoclonal immunoglobulin may be found. In many of these entities we find reduced levels of polyclonal antibodies.

In the present thesis we studied patients with Multiple Myeloma at diagnosis and during follow up, others with Waldenström's Macroglobulinemia at diagnosis, as well as patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and Marginal Zone Lymphoma. The aim was to investigate the impact of the produced immunoglobulins in the pathogenesis and clinical behavior of the aforementioned diseases. The levels of the Igs were measured with classical nephelometry as well as with the new HevyliteTM method, that determines the monoclonal Ig (HLC) and the polyclonal Ig of the same class and allows the calculation of the ratio of monoclonal/polyclonal of the same class (HLCR).

In all the diseases studied we found that HLC and the ratio HLCR were correlated with disease parameters and in some of them they also provide prognostic information.

Furthermore we studied the cytokines soluble-Syndecan-1, BLys and TGF- β 1 in relation to the above mentioned diseases and to the production of immunoglobulins. We found them to correlate with disease parameters reflecting tumour burden and with the production of monoclonal and polyclonal Igs.

Our results are highly suggestive that these cytokines and the determination of immunoglobulins with these new methods provide useful information for clinical, biological and prognostic purposes.

Κεφάλαιο 10. Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Alexanian R. Blood volume in monoclonal gammopathy. Blood.1977;49:301-307
- Arcaini L, Lazzarino M, Colombo N, Burcheri S, Boveri E, Paulli M. Splenic marginal zone lymphoma: a prognostic model for clinical use. Blood.2006;107(12):4643-4649
- Attalman M, Levinson SS. Understanding and Identifying Monoclonal Gammopathies. Clin Chem. 2000;46:1230-1238
- Bende RJ. B-cell biology and the development of mature B cell lymphomas. PhD Thesis. Faculty of Medicine Amsterdam; 2010
- Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. Cell 1991;67(6):1121-1129
- Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. Oncogene 2001;20(40):5611-5622
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguaen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer 1981;48:198-206
- Blade J, Rozman C, Cervantes F, Revertes JC, Montserrat E. A new prognostic system for multiple myeloma based on easily available parameters. Br J Haematol 1989;72(4):507-511
- Blade J, Samson D, Reece D, Apperlay J, Björkstrand B, Gahrton G, Gertz M, Giralt S, Jagannath S, Vesole D. Criteria for evaluation disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and hemopoietic stem cell transplantation. Myeloma subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. Br J Haematol 1998; 102(5): 1115-1123
- Blackledge G, Bush H, Dodge OG. A study of gastro-intestinal lymphoma. J Clin Oncol 1979;5:209-219
- Bradwell AR. Serum Free Light Chain Analysis (Plus Hevylite) (6th edition). The Binding Site Ltd, Birmingham, UK; 2010:10-17

Bradwell AR. Serum Free Light Chain Analysis (Plus Hevylite) (6th edition). The Binding Site Ltd, Birmingham, UK; 2010:18-35

Bradwell AR. Serum Free Light Chain Analysis (Plus Hevylite) (6th edition). The Binding Site Ltd, Birmingham, UK; 2010:301-318

Bradwell AR, Harding SJ, Fourrier NJ, Wallis G, Drayson M, Hugh D. Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurements of individual immunoglobulin κ/λ ratios. Clin Chem 2009;55:1646-1655

Bradwell AR, Harding SJ, Fourrier NJ, Mathiot C, Attal M, Moreau P, Harousseau JL, Avet-Loiseau H. Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig κ /Ig λ ratios in multiple myeloma patients. Leukemia 2013;1:202-207

Cassuto JP, Krebs BP, Viot G, Dujardin P, Masseyeff R. Beta 2microglobulin, a tumour marker of lymphoproliferative disorders. The Lancet 1978;312(8096):950-957

Cavo M, Galleni P, Zuffa E, Baccarani M, Gobbi M, Tura S. Prognostic variables and clinical staging in multiple myeloma. Blood 1989;74:1774-1780

Cols M, Barra CM, He B, Puga I, Xu W, Chiu A, Tam W, Knowles DM, Dillon SR, Leonard JP, Furman RR, Chen K, Cerutti A. Stromal endothelial cells establish bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. J Immun 2012;12:6071-6083

Dang CV. c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. Mol Cell Biol 1999;19(1):1-11

Decoteau J, Knaus P, Yankellev H, Reis M, Lowsky R, Lodish H, Kadin M. Loss of functional cell surface transforming growth factor β (TGF- β) type 1 receptors correlates with insensitivity to TGF- β in chronic lymphocytic leukemia. 1997;94:5877-5881

Dhodapkar MV, Abe E, Theus A, Lacy M, Landford JK, Barlogie B, Sanderson RD. Syndecan-1 is a multi-functional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor survival growth and bone differentiation. Blood 1998;91:2679-2688

Dimopoulos MA, Gika D, Zervas K, Kyrtsionis M, Symeonidis A, Anagnostopoulos A, Bourantas K, Matsouka C, Pangalis GA. The international staging system for multiple myeloma is applicable in

symptomatic Waldenström's macroglobulinemia. *Leuk Lymphom* 2004;45:1809-1813

Dimopoulos MA, Kyle RA, Anagnostopoulos A, Treon SP. Diagnosis and management of Waldenström's macroglobulinemia. *J Clin Oncol* 2005;23:1564-1577

Du M-Q. MALT Lymphoma: Recent Advances in Aetiology and Molecular Genetics. *J Clin Exp Hematopathol* 2007;47(2): 31-42

Durie B, Salmon E. 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

Eleuterakis-Papaiakovou V, Bamias A, Gika D, Simeonidis A, Pouli A, Anagnostopoulos A, Michali E, Economopoulos T, Zervas K, Dimopoulos MA. Renal failure in multiple myeloma: incidence, correlations and prognostic significance. *Leuk Lymphoma* 2007;48:337-341

Elsawa S, Novak A, Grote D, Ziesmer S, Witzig T, Kyle R, Dillon S, Harder B, Gross J, Ansell S. B-lymphocyte stimulator (BLys) stimulates immunoglobulin production and malignant B-cell growth in Waldenström's macroglobulinemia. *Blood* 2006;107:2882-2888

Facon T, Brouillard M, Duhamel A, Morel P, Simon M, Jouet JP, Bauters F, Fenaux P. Prognostic factors in Waldenström's macroglobulinemia: a report of 167 cases. *J Clin Oncol* 1993;11:1553-1558

Ferrer G, Hodgson K, Abrisqueta P, Pons A, Jansa S, Gel B, Filella X, Colomer D, Pereira A, Montserrat E, Moreno C. BAFF and APRIL in chronic lymphocytic leukemia: Clinico-biological correlates and prognostic significance. 2009 ASH Annual meeting Abstract 1235

Fragioudaki M, Boula M, Tsirakis G, Psarakis F, Spanoudakis M, Papadakis IS, Pappa CA, Alexandrakis MG. B cell-activating factor: its clinical significance in multiple myeloma patients. *Ann Hematol* 2012;91:1413-1418

Fragioudaki M, Tsirakis G, Pappa CA, Aristeidou I, Tsioutis C, Alegakis A, Kyriakou DS, Stathopoulos EN, Alexandrakis MG. Serum BAFF levels are related to angiogenesis and prognosis in patients with multiple myeloma. *Leuk Res* 2012;36:1004-1008

Garcia-Sanz R, Montoto S, Torrequebrada A, deCoca AG, Petit J, Sureda A, Rodriguez-Garcia JA, Masso P, Perez-Aliaga A, Monteagudo MD,

Navarro I, Moreno G, Toledo C, Alonso A, Besses C, Besalduch J, Jarque I, Salama P, Rivas JA, Navarro B, Blade J, Miguel JF. Waldenström's macroglobulinemia: presenting features and outcome in a series with 217 cases. *Br J Hematol* 2001;15:575-582

Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J.Exp.Med* 1993;177:999-1008

Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. International staging system for myeloma. *J Clin Oncol* 2005;20:3412-3420

Habel M-E, Emond JP. Monoclonal IgM gammopathy: Drastic bias between nephelometry and electrophoresis peak measurement. *Clinic Biochemistry* 2008 Abstract 117

Harding SJ, Mead GP, Bradwell AR, Berard AM. Serum free light chain immunoassay as an adjunct to serum protein electrophoresis and immunofixation electrophoresis in the detection of multiple myeloma and other B-cell malignancies. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(3):302-304

Itzykson R, Le Garff-Tavernier M, Katsahian S, Diemert MC, Musset L, Leblond V. Serum free light chain elevation is associated with a shorter time to treatment in Waldenström's macroglobulinemia. *EHA, Hematologica* 2008;93(s1):793-794

Janeway C. Immunobiology, 5th edition. The Immune System in Health and Disease. Garland Publishing, New York, USA; 2001

Kapoor P, Gertz M, Dispenzieri A, Lacy M, Dingli D, Hayman S, Buadi F, Russell S, Lin Y, Witzig T, Lust J, Zeldenrust S, Greipp P, Kyle R, Rajkumar V, Kumar S. Importance of achieving sustained stringent complete response (sCR) following autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *ASH Annual meeting 2012 Abstract* 1998

Kastritis E, Kyrtsolis MC, Hadjiharissi E, Symeonidis A, Michalis E, Repoussis P, Tsatalas C, Michael M, Sioni A, Kartasis Z, Stefanoudaki E, Voulgarelis M, Delimpasi S, Gavriatopoulou M, Koulteris E, Gika D, Zomas A, Roussou P, Anagnostopoulos N, Economopoulos T, Terpos E, Zervas K,

Dimopoulos AM. Validation of the international scoring system (IPSS) for Waldenström's macroglobulinemia (WM) and the importance of serum lactate dehydrogenase (LDH). *Leuk Res* 2010;34:1340-1343.

Katzmann JA, Clark R, Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Melton LJ 3rd, Benson JT, Colby CL, Dispenzieri A, Landgren O, Kumar S, Bradwell AR, Cerhan JR, Rajkumar SV. Suppression of the uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. *Leukemia* 2013;27(1):208-212

Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, van Wien S, Blackburn PR, Baker AS, Dispenzieri A, Kumar S, Rajkumar SV, Carpten JD, Barrett M, Fonseca R, Stewart AK, Bergsagel PL. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* 2012;120(5):1067-1076

Keren DF. Heavy/Light-Chain Analysis of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009;55:1606–1608

Kern C, Cornuel JF, Billard C, Tang R, Rouillard D, Stenou V, Defrance T, Ajchenbaum-Cymbalista F, Simonin PY, Feldblum S, Kolb JP. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* 2004;103:679-688

Kim J, Hayton W, Robinson J, Anderson C. Kinetics of FcRn-mediated recycling of IgG and albumin in humans: Pathophysiology and therapeutic implications using a simplified mechanism-based model. *Clin Immunol* 2007;122:146-155

Koulieris E, Kyrtsonis MC, Maltezas D, Tzenou T, Mirbahai L, Mead G, Panayiotidis P, Bradwell AR, Harding S. Quantification of serum IgM kappa and IgM lambda in Patients with Waldenström's Macroglobulinemia. IWMM-6 SESSION-12 2010 : 96-97- YOUNG INVESTIGATOR AWARD

Koulieris E, Panayiotidis P, Harding SJ, Kafasi N, Maltezas D, Bartzis V, Tzenou T, Dimou M, Georgiou G, Mirbahai L, Bradwell AR, Kyrtsonis MC. Ratio of involved/uninvolved immunoglobulin quantification by Hevylite™ assay: clinical and prognostic impact in multiple myeloma. *Experim Hematol and Oncology* 2012;1:9-18

Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1999;341(20):1520-1529

Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009;23:3-9

Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proceedings* 2003;78(1):21-33

Kyrtsonis MC, Repa C, Dedoussis G, Mouzaki A, Simeonidis A, Stamatelou M, Maniatis A. Serum transforming growth factor β -1 is related to the degree of immunoparesis in patients with multiple myeloma. *Medical Oncology* 1998;15:124-128

Kyrtsonis MC, Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Siakantaris M, Kontopidou FN, Dimopoulou M, Boussiotis V, Gribabis A, Konstantopoulos K, Vaiopoulos GA, Fessas P, Kittas C, Pangalis GA. Waldenström's macroglobulinemia: clinical course and prognostic factors in 60 patients. Experience from a single hematology unit. *Ann Hematol* 2001;80:722-727

Kyrtsonis MC, Vassilakopoulos TP, Siakantaris M, Kokoris SI, Gribabis DA, Dimopoulou MN, Angelopoulou MK, Pangalis GA. Serum syndecan-1, basic fibroblast growth factor and osteoprotegerin in myeloma patients at diagnosis and during the course of the disease. *Eur J Haematol* 2004;72(4):252-258

Kyrtsonis MC, Vassilakopoulos TP, Kafasi N, Sachanas S, Tzenou T, Papadogiannis A, Galanis Z, Kalpadakis C, Dimou M, Kyriakou E, Angelopoulou MK, Dimopoulou NM, Siakantaris MP, Dimitriadou EM, Kokoris SI, Panayiotidis P, Pangalis GA. Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007;137(3):240-243

Kyrtsonis MC, Maltezas D, Tzenou TK, Koulteris E, Bradwell AR. Staging systems and prognostic factors as a guide to therapeutic decisions in multiple myeloma. *Semin Hematol* 2009;46:110-117

Kyrtsonis MC, Tzenou T, Koulteris E, Papanikolaou X, Maltezas D, Stavropoulos N, Bartzis V, Dimou M, Georgiou G, Vassilakopoulos T, Angelopoulou M, Beris P, Panayiotidis P. Impact of the magnitude of fall of serum soluble SYNDECAN-1 (S-SYND-1) levels at Plateau Phase, after treatment with Bortezomib or Lenalidomide in relapsed/refractory Multiple Myeloma (MM). *EHA 2010:abstract 932*

Kyrtsonis MC, Levidou G, Korkolopoulou P, Koulrieris E, Bartzis V, Maltezas D, Pangalis GA, Kalpadakis C, Dimou M, Georgiou G, Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Salpeas V, Tsaftaris P, Patsouris E, Panayiotidis P, Tzenou TK. CD 138 expression helps distinguishing Waldenström's macroglobulinemia (WM) from splenic marginal zone lymphoma (SMZL). Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2011;11(1):99-102

Kyrtsonis MC, Koulrieris E, Maltezas D, Tzenou TK, Harding SJ, Kastiris E, Kafassi N, Bartzis V, Efthymiou A, Bitsanis K, Gavriatopoulou M, Terpos E, Kalpadakis C, Angelopoulou MK, Vassilakopoulos TP, Bradwell AR, Beris Ph, Pangalis GA, Panayiotidis P, Dimopoulos MA. Prognostic contribution of the new immunoglobulin(Ig) biomarkers (Freelite™ and Hevylite™) in Waldenström's macroglobulinemia (WM). American J Medicine and Medical Science 2012;2(6):136-143

Lagneaux L, Delforge A, Bron D, Bosmans E, Stryckmans P. Comparative analysis of cytokines release by bone marrow stromal cells from normal donors and B cell chronic lymphocytic leukemia patients. Leuk and Lymph 1995;17(1,2) 127-133

Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagasa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. The journal of clinical investigation 2000;106:1481-1488

Landgren O. Risk factors in Waldenström's macroglobulinemia/ Lymphoplasmacytic lymphoma. IWWM-7 Session 2

Leleu X, Koulrieris E, Maltezas D, Itzykson R, Xie W, Manier S, Dulery R, Boyle E, Gauthier J, Poulain S, Tatiana T, Panayiotidis P, Bradwell AR, Harding S, Leblond V, Kyrtsonis MC, Ghobrial IM. Novel M-component based biomarkers in Waldenström's macroglobulinemia. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2011;11(1):164-167

Lin P, Medeiros J. Lymphoplasmacytic lymphoma/ Waldenström's macroglobulinemia. An evolving concept. Adv Anat Pathol 2005;12:246-255
Lindhout E, Koopman G, Pals ST, de Groot C. Triple check for antigen specificity of B cells during germinal centre reactions. Immunol. Today 1997;18:573-577

Litman GW, Rast JP, Shambloott MJ, Haire RN, Hulst M, Roess W et al. Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Mol. Biol. Evol* 1993;10(1):60–72

Liu YJ, Malisan F, de Bouteiller O, Guret C, Lebecque ., Banchereau J, Mills FC, Max EE, Martinez-Valdez H. Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity* 1996;4:241-250

Lovell R, Dunn JA, Begum G, Barth NJ, Plant T, Moss PA, Drayson MT, Pratt G: Working party on leukemia in adults of the national cancer research institute haematological oncology clinical studies group. Soluble syndecan-1 levels at diagnosis is an independent prognostic factor in multiple myeloma and the extent of the fall from diagnosis to plateau predicts for overall survival. *Br J Hamatol* 2005;130(4):542-548

Ludwig H, Milosavljevic D, Zojer N, Faint JM, Bradwell AR, Hübl W, Harding SJ. Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients. *Leukemia* 2012;27(1):213-219

MacLennan ICM. Germinal centers. *Annu.Rev.Immunol* 1994;12 :117-139

Martin W, Martin W, Abraham R, Shanafelt T, Clark RJ, Bone N, Geyer SM, Katzmman JA, Bradwell A, Kay NE, Witzig TE. Serum free light chains- a new biomarker for patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Transl Res* 2007;149(4):231-235

Maltezas D, Tzenou T, Kafassi N, Koulteris E, Vassiliki Bartzis V, Maria Dimou M, Efthymiou A, Georgiou G, Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Tsaftaridis P, Panayiotidis P, Beris P, Kyrtsonis MC. Clinical Impact of Increased Serum Free Light Chains (sFLCs) or Their Ratio (FLCR) on WM at Diagnosis and During Disease Course. *IWMM-6 SESSION-12* 2010:105-106-
YOUNG INVESTIGATOR AWARD

Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T, Honjo T. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med* 1998;188:2151-2162

Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The immunological profile of the B-cell disorders and proposal for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994;8(10):1640-1645

Maurer MJ, Cerhan JR, Katzmman JA, Link BK, Allmer C, Zent CS, Call TG, Rabe KG, Hanson CA, Kay NE, Slager SL, Witzig TE, Shanafelt TD. Monoclonal and polyclonal serum free light chains and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;118(10):2821-2826

Merlini G, Stone MJ. Dangerous small B-cell 3 clones. *Blood* 2006;108:2520

Morabito F, De Filippi R, Laurenti L, Zirlik K, Recchia AG, Gentile M, Morelli E, Vigna E, Gigliotti V, Calemma R, Amoroso B, Neri A, Cutrona G, Ferrarini M, Molica S, Del Poeta G, Tripodo C, Pinto A. The cumulative amount of serum-free light chain is a strong prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;118(24):6353-6361

Morel P, Duhamel A, Gobbi P, Dimopoulos MA, Dhodapkar MV, McCoy J, Crowley J, Ocio EM, Garcia-Sanz R, Treon SP, Leblond V, Kyle RA, Barlogie B, Merlini G. International prognostic scoring system for Waldenström's macroglobulinemia. *Blood* 2009;113(18):4163-4170

Mozaheb Z, Hasanzadeh VazarAbadi MH, Aghaee MA. Chronic lymphocytic leukemia and prognostic factors. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(7):3009-3013

Nemazee DA, Burki K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 1989;337:562-566

Novak AJ, Bram RJ, Kay N, Jelinek DJ. Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* 2002;100:2973-2979

Norfolk D, Child JA, Cooper EH, Kerruish S, Ward AM. Serum beta 2 microglobulin in myelomatosis: Potential value in stratification and monitoring. *Br J Cancer* 1980;42(4):510-515

Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML, Morra E, Pangalis GA, San Miguel JF, Branagan AR, Dimopoulos MA. Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: Consensus panel recommendations from the second international workshop on Waldenström's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003;30:110-115

Owen RG, Kyle RA, Stone MJ, Rawstron AC, Leblond V, Merlini G, Garcia-Sanz R, Ocio EM, Morra E, Morel P, Anderson KC, Patterson CJ, Munchi NC, Tedeschi A, Joshua DE, Kastritis E, Terpos E, Ghobrial IM, Leleu X, Gertz MA, Ansell SM, Morice WG, Kimbly E, Treon SP. Response assessment in Waldenström's macroglobulinemia: update from the VIth international workshop. *Br J Haematol* 2013;160(2):171-176

Pangalis GA, Moutsopoulos HM, Papadopoulos NM, Costello R, Kokkinou S, Fessas P. Monoclonal and oligoclonal immunoglobulins in the serum of patients with B chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 1988;80(1):23-27

Pangalis GA, Kyrtsolis MC, Kontopidou FN, Siakantaris MP, Dimopoulou MN, Vassilakopoulos TP, Tzenou TK, Kokoris S, Dimitriadou E, Kalpadakis C, Tsalimalma K, Tsaftaridis P, Panayiotidis P, Angelopoulou MK. Differential diagnosis of Waldenström's macroglobulinemia and other B-cell disorders. *Clin Lymphoma* 2005;5:235-240

Perosa F, Minoia C, Favoino E, Prete M, Dammacco F. Staging multiple myeloma patients with active disease using serum levels of beta2m-free HLA class I heavy chain together with IgM or platelet count. *Blood cells Mol Dis.* 2009;42(1):71-76

Pier GB, Lyczak JB, Wetzler LM. Immunology, Infection and Immunity. ASM Press, Washington DC, USA; 2004

Pratt G, Harding SJ, Holder R, Fegan C, Pepper C, Oscier D, Gardiner A, Bradwell AR, Mead G. Abnormal serum free light chain ratios are associated with poor survival and may reflect biological subgroups in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2009;141:217-222

Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, PASTERNAK BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46(2):219-234

Ravetch J, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001;19(1):275–290

Rus H, Cudrici C, Niculescu F. The role of the complement system in innate immunity. *Immunol Res* 2005;33(2):103–112

Schnebelen A, Sweat K, Marshall J, Bornhorst J. Alleviation of IgM monoclonal protein interference in nephelometric assays by sample treatment

with reducing agent in a chaotropic salt solution. Am J Clin Pathol
2012;137:26-28

Schwartz RS. Jumping genes and the immunoglobulin gene system. N
Engl J Med 1995;333:42-44

Seidel C, Sundan A, Hjorth M, Turesson I, Dahl IM, Abildgaard N,
Waage A, Borset M. Serum syndecan-1: a new independent prognostic
marker in multiple myeloma. Blood 2000;95:388-392

Shen QD, Xu W, Yu H, Li L, Zhang SJ, Li JY. Prognostic significance of
lactate dehydrogenase and beta2-microglobulin in chronic lymphocytic
leukemia. Zhongguo 2007;15(6):1305-1308

Simonsson B, Kallander CF, Brenning G, Killander A, Gronowitz JS,
Bergstrom R. Biochemical markers in multiple myeloma: a multivariable
analysis. J Haematol 1988;69:46-53

Snozek CL, Katzmann JA, Kyle RA, Dispenzieri A, Larson DR,
Therneau TM, Melton LJ 3rd, Kumar S, Greipp PR, Clark RJ, Rajkumar SV.
Prognostic value of the serum free light ratio in newly diagnosed myeloma:
proposed incorporation into the international staging system. Leukemia
2008;10:1933-1937

Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri S, Stein H, Thiele J,
Vardiman JW. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma.
WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon
IARC Press 2008:180

Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri S, Stein H, Thiele J,
Vardiman JW. Splenic marginal zone lymphoma. WHO classification of
tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon IARC Press 2008:185-
187

Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri S, Stein H, Thiele J,
Vardiman JW. Lymphoplasmacytic lymphoma. WHO classification of tumours
of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon IARC Press 2008:194

Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri S, Stein H, Thiele J,
Vardiman JW. Plasma cell myeloma. WHO classification of tumours of
haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon IARC Press 2008:202

Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri S, Stein H, Thiele J,
Vardiman JW. Extranodal marginal zone lymphoma of the mucosa associated

lymphoid tissue (MALT lymphoma). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon IARC Press 2008:214-217

Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. Nodal marginal zone lymphoma. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon IARC Press 2008:218-219

Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, Sheehy P, Manning RJ, Patterson CJ, Tripsas C, Arcaini L, Pinkus GS, Rodig SJ, Sohani AR, Harris NL, Laramie JM, Skifter DA, Lincoln SE, Hunter ZR. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. N Engl J Med 2012;367(9):826-833

Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Thomas S, Nussenzweig MC, Wardemann H. A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. J.Exp.Med 2006;203:393-400

van Zelm, MC, van der Burg M, de Ridder D, Barendregt BH, de Haas EF, Reinders MJ, Lankester AC, Revesz T, Staal FJ, van Dongen JJ. Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression. J Immunol 2005; 175(9):5912-5922

Williams ME, Whitefield M, Swerdlow SH. Analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitors p18 and p19 in the Mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. Ann Oncol 1997;8;Suppl 2:71-73

Wolowiec D, Dybko J, Wrobel T, Urbaniak-Kujda D, Tomaszewska-Toporska B, Kapelko-Slowik K, Potoczek S, Kulczkowski K. Circulating sCD138 and some angiogenesis-involved cytokines help to anticipate the disease progression of early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. Mediators Inflamm 2006;3:42394

Yegin ZA, Ozkurt ZN, Yağci M. Free light chain: a novel predictor of adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. Eur J Haematol 2010;84(5):406-411

Zhou ZH, Zhang L, Pan QY, Huang BH, Zheng D, Liu JR, Li J, Luo SK. BAFF level in bone marrow and expression of BAFF receptor on B cell in multiple myeloma patients. Zhongguo Shi 2012;20(5):1131-1134