

Laboratorieundersökningar vid multipelt myelom

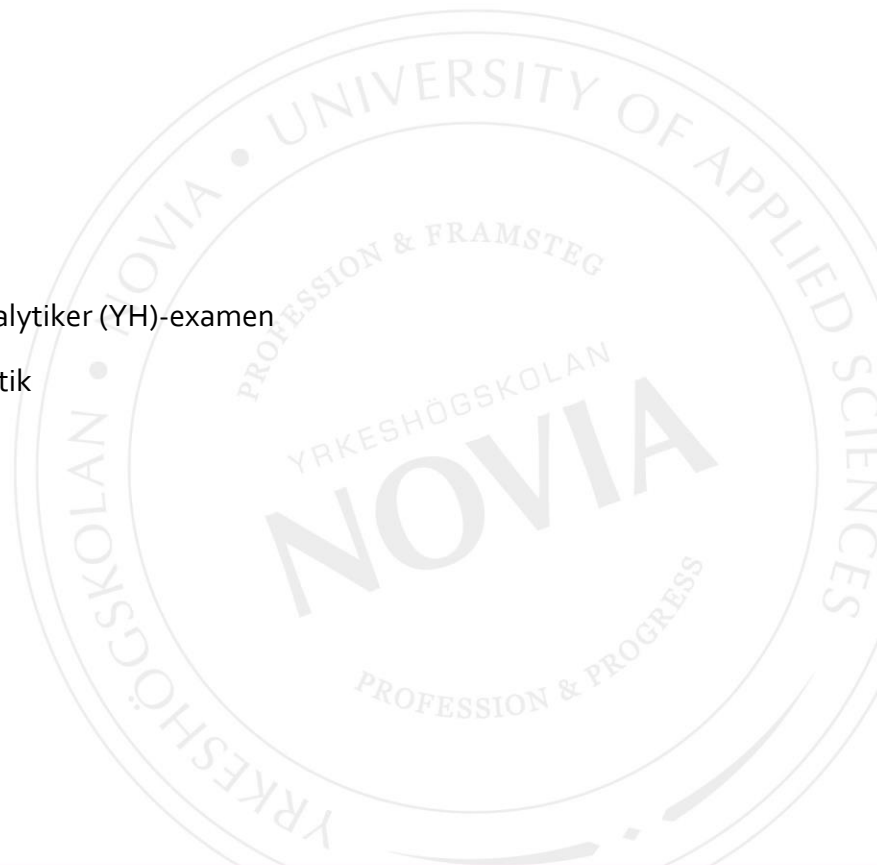
preanalytik, interferens och nya metoder

Kristian Lithen

Examensarbete för bioanalytiker (YH)-examen

Utbildningen för bioanalytik

Vasa 2019



EXAMENSARBETE

Författare: Kristian Lithen

Utbildning och ort: Bioanalytiker, Vasa

Handledare: Ulla Penttinen

Titel: Laboratorieundersökningar vid multipelt myelom: preanalytik, interferens och nya metoder

Datum: 4.11.19.

Sidantal: 32

Bilagor: 1

Abstrakt

Examensarbetets syfte är att sammanställa vilka laboratorieundersökningar som görs under sjukdomsförloppet vid multipelt myelom, utreda hur M-komponenten kan interferera med undersökningarna samt utforska vilka nya metoder utvecklas relaterade till sjukdomen. Metoden som använts är systematisk litteraturöversikt. Arbetet är baserat på vetenskapliga artiklar som sökts fram genom databaser. Sökningen begränsades till artiklar från 2015 och nyare.

Laboratorieundersökningarna presenteras indelade i olika steg: undersökningar som görs vid diagnostisering, undersökningar relaterade till M-komponenten och undersökningar för uppföljningen. International Myeloma Working Group är en arbetsgrupp som har utvecklat specifika krav som måste uppfyllas för att en MM diagnos ska kunna ställas. Utifrån dessa krav fastställs laboratorieundersökningarna som görs vid diagnos. M-komponenten som är karaktäristisk för MM förekommer inte i alla fall och är därför inte längre ett direkt krav på MM-diagnos. Den är fortfarande en viktig biomarkör vid diagnos och uppföljning av MM och analyseras främst genom elektrofores och immunfixation.

M-komponenten kan med sin närvaro i unika fall interferera med laboratorieprocessen. Analyser kan t.ex. inte genomföras eller resultatet blir felaktigt. Vanligaste orsaken till detta är att M-komponenten kan orsaka ökad grumlighet i plasma/serum. M-komponenten kan också ha affinitet för en reagens som används i analysmetoden.

Användningen av monoklonala antikroppar kan i vissa fall störa uppföljningen av M-komponenten vid proteinelektrofores. I arbetet presenteras några nya metoder för att skilja de två immunglobulinerna åt och således korrekt kunna följa upp sjukdomen. Övriga metoder som presenteras är nya biomarkörer som B-cell mognadsantigen (BCMA) och förhållande mellan antalet monocytter och lymfocyter, ett förhållande man får från fullständig blodbild. BCMA verkar vara en lovande biomarkör, däremot krävs det mer forskning innan man kan dra fasta slutsatser om leukocytförhållandena som biomarkörer eftersom olika resultat har rapporterats i artiklar.

Språk: svenska

Nyckelord: multipelt myelom, laboratorieundersökningar, M-komponent, interferens, daratumumab, BCMA

BACHELOR'S THESIS

Author: Kristian Lithen

Degree Programme: Bachelor of Health Care, Biomedical Laboratory Scientist, Vaasa

Supervisor: Ulla Penttinen

Title: Laboratory assays and multiple myeloma: preanalytics, interference and new methods

Date: 4.11.2019 Number of pages: 32

Appendices: 1

Abstract

The aim of this thesis is to put together which laboratory analysis are used during the course of the disease multiple myeloma (MM), examine how the M-protein can interfere with assays and explore what new methods are being developed related to the disease. The research method used is systematic literature overview. The thesis is based on scientific articles that have been found through databases. The search was limited to articles from the year 2015 and newer.

The laboratory assays are presented in different steps: assays used for diagnosis, assays related to the M-protein and assays used during follow-up. International Myeloma Working Group is a workgroup that have developed specific criteria for MM diagnosis. The assays used for diagnosis was based on these criteria. The M-protein that is characteristic for MM is not present in all cases of the disease and the M-protein is no longer directly a criterium for MM diagnosis. However, it is still an important biomarker for diagnosis and follow-up of MM and is analysed with electrophoresis and immunofixation assay methods.

The presence of M-protein can in unique cases interfere with the laboratory process. Assays might not be able to be completed or the result could be wrong. The most common reason for this is that M-protein can increase turbidity in plasma/serum. The M-protein can also have affinity for a reagent used in assays.

The use of monoclonal antibodies (mab) can in some cases interfere with the follow-up of MM during the assay protein electrophoresis. The thesis presents some new methods for differentiating the two immunoglobulins making correct follow-up of the disease possible. Other methods presented are new biomarkers such as B-cell maturation antigen (BCMA) and the ratio between the monocyte count and lymphocyte count, a ratio you get from the complete blood count. BCMA seems to be a promising biomarker but more research is needed before conclusions can be made about the leukocyte ratios as biomarkers because different results have been reported in articles.

Language: Swedish

Key words: multiple myeloma, laboratory assays, M-protein, interference, daratumumab, BCMA

Innehållsförteckning

1	Inledning.....	1
2	Syfte och frågeställningar.....	2
3	Teoretisk bakgrund.....	2
3.1	Multipelt myelom	2
3.1.1	Stadium och bedömning av riskstatus	4
3.1.2	Behandling.....	5
3.2	Monoklonal gammopati av oklar signifikans	7
3.3	Asymtomatiskt myelom.....	7
3.4	Lymfocyter.....	7
3.5	Immunglobuliner och M-komponent.....	9
4	Metod.....	10
4.1	Metasyntes som metod.....	11
4.2	Genomförande av litteratursökning	12
5	Resultat.....	12
5.1	Laboratorieundersökningar vid multipelt myelom	13
5.1.1	Diagnostisering och inledande analyser	14
5.1.2	Analys av protein och M-komponenten	15
5.1.3	Uppföljning av multipelt myelom	17
5.2	Preanalytik och analytisk interferens	17
5.2.1	Fördröjd benmärgsanalys	18
5.2.2	M-komponenten kan störa kemiska analyser	19
5.3	Nya metoder för uppföljning vid multipelt myelom.....	20
5.3.1	Terapeutiska monoklonala antikroppar och uppföljning av MM.....	21
5.3.2	Proteinseparation med anti-daratumumab antikroppar.....	21
5.3.3	Terapeutiska monoklonala antikroppar och masspektrometri.....	22
5.3.4	B-cell mognadsantigen som ny biomarkör vid uppföljning av MM	23
5.3.5	Leukocyter som biomarkörer för riskbedömning vid MM.....	24
6	Diskussion	26
7	Källförteckning.....	29

Bilaga

1 Inledning

Detta examensarbete behandlar cancersjukdomen multipelt myelom (MM) och laboratorieundersökningar som görs under sjukdomsförloppet. I arbetet redovisas vilka dessa laboratorieundersökningar är och vilken nytta de har vid diagnostik och uppföljning, samt hur de påverkas av t.ex. M-komponenten. Ett stort fokus har varit att sammanställa information om nya metoder som ska kunna användas vid uppföljningen av multipel myelom och bidra till riskbedömning vid diagnos och prognos.

MM har en lång historia som börjar 1844 med Sarah Newbury, en 39 årig kvinna med fatigue och skelettsmärter från flera frakturer. Detta är det första väldokumenterade fallet av MM. Det mest kända fallet från denna tisdperiod är Thomas Alexander McBean, en 45 årig handelsman. Han fick allvarliga bröstsmärter under en resa hösten 1845 och undersöktes av läkaren Dr William MacIntyre. Mcbean lämnade urinprov och det sändes till Henry Bence Jones som vid den tiden var en etablerad kemisk patolog. Jones studerade urinet noggrant och upptäckte det innehöll en typ av protein relaterat till mjuknandet av skelett. Bence Jones var den första som dokumenterade förekomsten av M-komponenten och att den spelar en viktig roll vid MM. Termen Bence Jones protein användes dock första gången år 1880, långt senare. Termen plasmacell användes första gången 1875 och då benmärgsaspirat utvecklades 1929 kunde fler MM diagnoser ställas. På 1930-talet kunde man med elektrofores separera proteiner till tre komponenter, alfa, beta och gamma och M-komponentens topp upptäcktes 1939. (Kyle & Rajkumar 2008, 2962-2964).

MM är en hematologisk cancersjukdom som drabbar blodets plasmaceller. Maligna plasmaceller vandrar in i benmärgen och prolifererar där okontrollerat. I Finland diagnostiseras 5 nya fall per 100 000 personer varje år. De insjuknade är vanligtvis äldre, medianåldern vid tidpunkt av diagnos är 66 år (Sinisalo & Laine, 2018). Ett kännetecken för multipelt myelom är M-komponenten, en monoklonal immunglobulin som produceras av de maligna plasmacellerna hos 97% av alla patienter.

De vanligaste symtomen vid MM är skelettsmärter och trötthet. Bensedbrytning förekommer hos många patienter och leder till smärter, benskörhet och även frakturer. Anemi är också vanligt förekommande och bidrar till trötthet (Rajkumar & Kumar 2016, 102). Andra symtom som förekommer är feber och infektioner, brist på normala immunglobuliner, blödningsbenägenhet p.g.a. trombocytopeni och törst och intorkning

p.g.a. hyperkalcemi. (Mellqvist, 2019). Skelettskador kan påvisas och följas upp med radiologiska undersökningar som lågdos helkropp CT (Rajkumar 2018, 1091).

Det finns en arbetsgrupp kallad International myeloma working group som publicerat bl.a. kriterier för MM diagnos och kriterier för stadieindelning av sjukdomsförloppet. En stor del av artiklar inom området baserar sina kriterier på arbetsgruppens kriterier.

2 Syfte och frågeställningar

Syftet med examensarbetet har varit att sammanställa vilka laboratorieundersökningar som görs under hela sjukdomsförloppet vid MM, samt vilka preanalytiska och analytiska problem som kan förekomma under laboratorieprocessen. Syftet har också varit att lyfta fram nya metoder som har utvecklats som ska kunna användas vid uppföljningen av MM. Examensarbetet utgår från följande två huvudfrågor:

- Vilka laboratorieundersökningar används vid multipelt myelom?
- Vilka nya metoder finns det vid uppföljningen av multipelt myelom?

3 Teoretisk bakgrund

Multipelt myelom (MM), även kallat myelomatos, är en hematologisk cancersjukdom där de plasmaproducerande B-lymfocyterna är maligna och infiltrerar benmärgen. Sjukdomar där en malign plasmacell producerar immunglobulin eller dess byggstenar, vilka påträffas i blod eller i urin kallas med ett gemensamt namn för gammopatier (Putkonen & Silvennoinen 2015, 403). Nästan alla patienter med MM har ett pre-malignt förstadium som benämns monoklonal gammopati av oklar signifikans alternativt på engelska gammopathy of undetermined significance (MGUS). Vissa patienter med MM går också igenom ett mellanstadium där sjukdomen är längre framskriden vilket kallas asymtomatiskt myelom, på engelska smoldering multiple myeloma (SMM) (Rajkumar 2018, 1091).

3.1 Multipelt myelom

Multipelt myelom är en typ av B-lymfocytneoplasi där plasmaceller muteras och omvandlas till en malign plasmacell som ackumulerar och prolifererar okontrollerat i benmärgen (Fairfield, Falank, Avery & Reagan 2016, 1). MM står för ca 1% av alla cancerfall och för 10% av alla hematologiska cancerfall (Rajkumar 2018, 1091). I Finland diagnostiseras 5 nya fall per 100 000 personer varje år. De insjuknade är vanligtvis äldre, medianåldern vid

tidpunkt av diagnos är 66 år (Sinisalo & Laine, 2018). Män drabbas aningen oftare än kvinnor, förhållandet är 1,4:1 (Putkonen & Silvennoinen 2015, 403). Mörkhyade personer har ungefär dubbelt så hög risk att drabbas jämfört med vita. Sjukdomen kännetecknas också av M-komponenten, en monoklonal antikropp som produceras av de maligna plasmacellerna och förekommer hos 97% av alla patienter. Tidigare var medianöverlevnaden hos MM-patienter 1–2 år, men är idag 7–8 år. Livskvaliteten är också bättre än tidigare (Michels & Petersen, 2017, 378).

International Myeloma Working Group (IMWG) har 2014 fastställt kriterier för diagnosen multipelt myelom. Kriterierna för multipelt myelom är att det ska förekomma $\geq 10\%$ klonala benmärgplasmaceller eller genom biopsi påvisat ben- eller extramedullär plasmacytom, samt åtminstone ett myelomdefinierande tillstånd. Till dessa tillstånd hör en eller flera slutorganskador som kan härledas från de maligna plasmacellerna och påvisning av maligna biomarkörer. Till organskadorna räknas CRAB systemet: hyperkalcemi, njurinsufficiens, anemi och en eller flera skelettlesioner eller skelettskador. Av de maligna biomarkörerna ska en eller flera av följande påvisas: förekomsten av klonala benmärgsplasmaceller är $\geq 60\%$, förhållandet mellan FLC ≥ 100 , förutsatt att FCL är ≥ 100 g/L eller minst en fokalskada av storleken >5 mm kan påvisas med MRI (Rajkumar et al. 2014, 541).

De vanligaste symtomen vid MM är skelettsmärter och trötthet. Bennedbrytning förekommer hos 80% av fallen och leder till smärter, benskörhet och även frakturer. Anemi förekommer vid ca 75% av fallen och bidrar till trötthet (Rajkumar & Kumar 2016, 102). Andra symtom som förekommer är feber och infektioner p.g.a. neutropeni eller brist på normala immunglobuliner, blödningsbenägenhet p.g.a. trombocytopeni samt törst och intorkning p.g.a. hyperkalcemi. De maligna plasmacellerna producerar cytokiner som gör att skelettet urkalkas (Mellqvist, 2019). Till skillnad från andra maligniteter som metastaserar och bryter ned skelettet så uppvisas ingen ny benbildning vid MM. Skelettskador kan påvisas och följas upp med radiologiska undersökningar t.ex. lågdos helkropp CT (Rajkumar 2018, 1091).

Vid MM producerar den maligna plasmacellen en monoklonal antikropp som kallas M-protein eller M-komponent och den är ett fundamentalt fynd vid sjukdomen. M-komponenten utsöndras hos 97% av alla patienter. Elektrofores av serumproteiner kan påvisa M-komponenten hos 82% av patienterna. Inkluderas serumimmunfixation och analys av fria lätta kedjor i serum och i dygnsurin kan M-komponenten påvisas hos 97% av

patienterna. Vid de resterande 3% av fallen utsöndras ingen M-komponent och den varianten av sjukdomen kallas asekretorisk MM (Rajkumar & Kumar 2016, 102).

Man vet inte orsakerna bakom MM, men det är dock känt att det förekommer många genetiska förändringar i den maligna plasmacellen. De flesta translokationerna har en brytningspunkt i genen för den tunga kedjan av immunglobulinen, vilket tyder på att genförändringen sker då B-lymfocyten ändrar från IgM produktion till någon annan immunglobulintyp (Schjesvold, 2019). Trots att MM klassas som en sjukdom förekommer egentligen ofta flera genetiskt olika maligna plasmaceller. Genom studier av benmärg med fluorescerande in situ-hybridisering (FISH) har man konstaterat att trisomier förekommer i 40% av de maligna plasmacellerna (trisomisk MM). I de flesta övriga fall handlar det om en translokation i locus som kodar för immunglobulinets tunga kedja på kromosom 14q32 (IgH translokerad MM). Endast en liten del av patienterna har en MM-variant där båda genmutationerna förekommer. Dessa translokationer anses vara primära avvikelser och etableras redan vid MGUS. Övriga genetiska förändringar kallas sekundära och uppstår under sjukdomsförloppet t.ex. gain(1q) och del(1p). Både primära och sekundära genetiska förändringar påverkar sjukdomsförloppet och sjukdomsprognosen (Rajkumar 2018, 1093).

Laboratoriska grundundersökningar vid MM är analys av blodbild, kalcium, kalium, natrium, kreatinin och sänka (Sinisalo & Laine 2018). Benmärgsprov görs för att bedöma cellerna morfologiskt, cytogenetiska undersökningar som görs är FISH för att påvisa kromosomförändringar. Serumproteinelektrofores görs för att detektera monoklonalt immunglobulin även kallad M-komponent. Proteinelektrofores på urin görs för att detektera fria lätta kappa- eller lambda-kedjor (Mellqvist 2019).

3.1.1 Stadium och bedömning av riskstatus

International Myeloma Working Group (IMWG) publicerade 2015 den senaste uppdateringen av stadieindelningssystemet vid MM International staging system (ISS) som nu kallas Revised international staging system (R-ISS). Den gamla ISS bestod tre stadier I, II och III, baserat på två enkla biomarkörer för bedömning av riskgruppen. Biomarkörerna var β 2-mikroglobulin och albumin. Kriterierna för ISS stadium I var β 2-mikroglobulin $<3,5$ mg/L och albumin $\geq 3,5$ g/dL. Kriterierna för ISS stadium III var β 2-mikroglobulin $\geq 5,5$ mg/L. Kriterierna för ISS stadium II är att fallet inte passar in i ISS stadierna I eller III. ISS är fortfarande en del av R-ISS men nya biomarkörer har lagts till (Palumbo et al. 2015, 2863-2864).

De nya kriterierna vid riskbedömning och stadieindelning av MM-patienter omfattar bedömning av kromosomförändringar med hjälp av interfase fluorescens in situ-hybridisation (iFISH) och analys av laktatdehydrogenasvärdet (LD) i serum/plasma. Högrisk kriterium är fynd av en eller flera av följande förändringar: del(17p), t(4;14) translokation och t(14;16) translokation. Kriteriet för standardrisk är avsaknad av högriskfynd. Kriteriet för hög risk vid analys av LD är att värdet är över referensvärdet och kriteriet för standardrisk är ett LD värde under referensvärdet. R-ISS utgörs av dessa kriterier samt den gamla ISS klassificeringen (Palumbo et al. 2015, 2864).

Kriterierna för R-ISS stadium I är standardrisk vid iFISH, normalt LD värde samt gamla ISS stadium I, d.v.s. β 2-mikroglobulin $<3,5$ mg/L och albumin $\geq 3,5$. Kriterierna för R-ISS stadium III är antingen högriskfynd vid iFISH eller högt LD värde samt gamla ISS stadium III, d.v.s. β 2-mikroglobulin $\geq 5,5$ mg/L. Kriterierna för R-ISS stadium II är att fallet inte passar in i R-ISS stadierna I eller III (Palumbo et al. 2015, 2864).

3.1.2 Behandling

Överlevnaden hos patienter med MM har förbättrats under de senaste 15 åren i och med introducering av nya läkemedel. Störst inverkan har varit utvecklandet av proteasomihämmare och immunmodulerande läkemedel, samt godkännandet av terapeutiska monoklonala antikroppar. (Michels & Petersen 2017, 378)

Behandling med stamceller används om det är möjligt. Vid autolog stamcellstransplantation tas patientens egna friska stamceller till vara och transplanteras sedan tillbaka efter behandling. Är patienten lämplig för autolog stamcellstransplantation får patienten 3–4 cykler med induktionsterapi och därefter skördas stamceller. Därefter kan patienten genomgå stamcellstransplantation eller om patienten har lågrisk MM och responsen på induktionsterapi varit bra, vänta med stamcellstransplantation tills patienten får skov. (Rajkumar 2018, 1096)

Det finns flera alternativ med olika läkemedelskombinationer som används som inledande behandling. Vilka läkemedel som används vid behandling bestäms från fall till fall utgående från sjukdomens stadium, plasmacellens genexpression och patientens tillstånd. (Michels & Petersen 2017, 378)

En kombination av bortezomib, lenalidomid och dexametason (VRd) klassas som standard inledande behandling av nydiagnostiserad MM. Vid njurinsufficiens bör lenalidomid bytas ut till talidomid. För patienter som inte klarar av en dosering med tre läkemedel p.g.a. hög

ålder, andra diagnoser eller dåligt allmäntillstånd kan en kombination av lenalidomid och låg dos av dexametason (Rd) användas. Patienter med denna behandling kräver ytterligare ett antikoagulant läkemedel i form av aspirin eller warfarin. Dessa behandlingar används oberoende om patienten är lämplig för autolog stamcellstransplantation eller ej (Rajkumar 2018, 1096).

Efter stamcellstransplantation eller efter 8–12 cykler av inledande behandling följer en ”underhållsbehandling”. Lenalidomid är standardläkemedlet för de flesta patienter under detta steg av behandlingen. För högriskpatienter kan bortezomib vara bättre, speciellt för patienter med del(17p) mutation. Det är inte ännu klart hur länge denna behandling ska fortgå (Rajkumar 2018, 1099).

Även om patienten fått remission uppkommer det skov vid de flesta fall av MM, d.v.s. maligna plasmaceller börjar igen proliferera. Remissionen vid MM blir kortare efter varje skov. Behandlingen vid skov är beroende på timing, responsen till tidigare behandling, skovets aggression och patientens allmäntillstånd. Autolog stamcellstransplantation ska övervägas om patienten inte tidigare genomgått en stamcellstransplantation eller om patienten hade en bra remission efter den första. En ny kombination av tre läkemedel kan ordineras innehållande minst två för patienten nya läkemedel. (Rajkumar 2018, 1101)

Terapeutiska monoklonala antikroppar används vanligen som behandling först vid ett andra skov. Daratumumab är en IgG kappa terapeutisk monoklonal antikropp som binder till CD38-positiva plasmaceller och inhiberar cellernas tillväxt. Som ensamt läkemedel ger daratumumab en respons hos ungefär 30% av patienterna. Tillsammans med lenalidomid och bortezomib har daratumumab en bättre respons och ger längre överlevnad. Vanliga bieffekter vid användning av daratumumab och olika kombinationer av andra läkemedel är trombocytopeni, anemi och neutropeni. (Durer et al. 2019, 7)

Elotuzumab är en monoklonal antikropp som binder till SLAMF7 (signaling lymphotic activation molecule F7). Till skillnad från daratumumab har inte elotuzumab som enda läkemedel visats ha effekt vid MM. Elotuzumab i kombination med lenalidomid och dexametason (EloRd) har visat sig ge längre överlevnad hos MM patienter än läkemedelskombinationen Rd (Durer et al. 2019, 7)

3.2 Monoklonal gammopati av oklar signifikans

Hos nästan alla patienter utvecklas MM över en längre tid och börjar med ett pre-malignt stadium som kallas monoklonal gammopati av oklar signifikans (MGUS). MGUS är ett asymtomatiskt tillstånd och kan diagnostiseras genom att undersöka mängden immunglobuliner i både blodet och i benmärgen. Endast små mängder borde förekomma. Vid MGUS ska andelen plasmaceller i benmärgen vara <10%. Inga symtom eller tecken på organskador ska förekomma. Inga av CRAB-kriterierna får heller uppfyllas. (Hong & Hoon Lee 2016, 821)

MGUS förekommer hos 3% av personer över 50 år ålder, risken att tillståndet utvecklas till MM är 1% per år. Ungefär 50% av patienter som diagnostiseras med MM har haft MGUS i över tio år innan de fått MM diagnos (Rajkumar 2018, 1091) Eftersom MGUS inte har några symtom och det inte görs någon MGUS/MM screening är det troligt att många fall förblir odiagnostiserade (Fairfield et al. 2016, 4). Sjukdomen upptäcks ofta av en slump och av nydiagnostiserade patienter med MM är det endast ungefär 10% som har MGUS i sin sjukdomshistoria (Rajkumar & Kumar 2016, 101).

3.3 Asymtomatiskt myelom

Asymtomatiskt myelom (SMM) är ett kliniskt mellanstadium mellan MGUS och MM. Vid SMM är förekomsten av M-komponenten i blod eller urin högre än vid MGUS. Halten monoklonalt immunglobulin i blodet ska vara $\geq 30\text{g/L}$ eller $\geq 500\text{mg/L}$ i samlad dygnsurin. Andelen plasmaceller i benmärgen ska vara 10–60%. Inga symtom eller andra MM-relaterade organskador förekommer vid SMM. (Fairfield et al. 2016, 4) Risken för att en SMM patient ska utveckla MM är 10% per år under fem år, därefter minskar risken till 3% per år de följande fem åren och minskar efter det ytterligare till endast 1,5% per år fortlöpande. (Rajkumar 2018, 1091-1092)

3.4 Lymfocyter

Lymfocyterna är en del av kroppens förvärvade immunförsvar. Lymfocyternas andel i blodet är ungefär 20–40% och förekommer i två huvudtyper, B- och T-lymfocyter. B-lymfocyterna mognar i benmärgen och cirkulerar i blodet tills de hittar ett antigen. B-lymfocyten har en B-lymfocytreceptor (BCR) som är ett immunglobulin bundet till cellmembranet. Lösliga antigener eller antigener på ytan av mikrober kan binda till receptorn och aktivera cellen. B-lymfocyten mognar till en B-minnescell eller en plasmacell som utsöndrar antikroppar. För

att antikroppar ska tillverkas mot proteinantigen behövs aktivering av T-cellen, medan vissa kolhydratantigen aktiverar tillverkningen av antikroppar utan T-cellens hjälp. (Hoffbrand & Moss 2016, 103). Aktiveringsprocessen leder till att långlivade plasmaceller söker sig till benmärgen och att B-minnesceller finns i blodet. Tillsammans kan T-minnescellen och B-minnescellen snabbt utveckla ett snabbt försvar mot ett nytt angrepp av samma antigen (Siitonen & Koistinen 2015, 28-29).

T-lymfocyterna mognar i thymus, de genomgår en selektion där T-lymfocyter som inte känner igen den egna kroppens celler förstörs. T-lymfocyterna mognar till T-hjälparceller och cytotoxiska T-mördarceller. T-cellerna har en antigenreceptor som kallas T-cellreceptor (TCR). T-cellerna aktiveras med hjälp av antigenpresenterande dendritcell. Den aktiverade T-cellen aktiverar motsvarande B-lymfocyt som börjar proliferera och producera antikroppar. Efteråt blir de aktiverade T-cellerna till T-minnesceller. T-mördarcellerna är cytotoxiska och förgör främmande antigen. De är effektiva vid virusinfektion. (Siitonen & Koistinen 2015, 29-30).

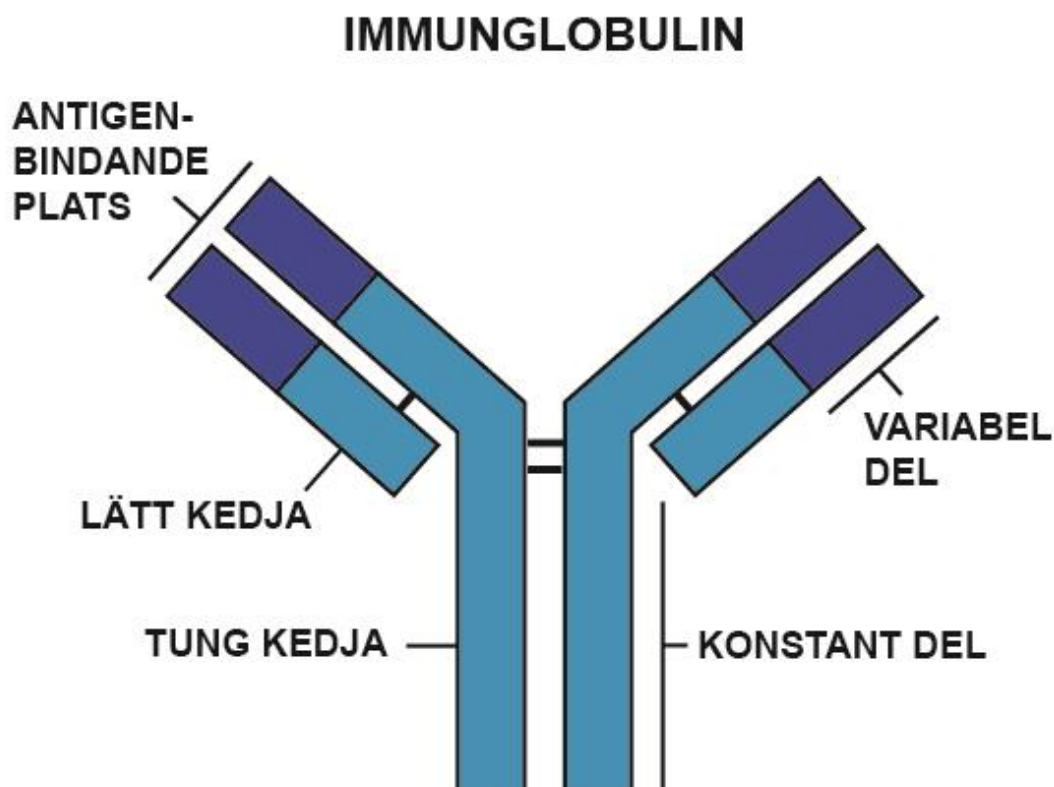
Natural killer cells, NK-celler, är en typ av T-mördarcell men den saknar TCR. De är stora celler med granula i cytoplasmat. Deras främsta uppgifter är att förgöra celler som inte visar kroppsegna antigen t.ex. virusinfekterade celler och maligna tumörceller. NK-celler känner även igen kroppens antikroppar och förgör antigen med bundna antikroppar (Hoffbrand & Moss 2016, 104, 106).

B- och T-lymfocyterna är morfologiskt lika, men de går att identifiera dem genom deras fenotyp, d.v.s. analys av cellernas ytmarkörer. Ytmarkörer är proteinmolekyler som finns i cellmembranet och namnges med förkortningen CD, som står för cluster of differentiation, samt ett nummer. Kännetecknande för den mogna B-lymfocyten är CD19, CD20 och CD22. Differentierade plasmaceller kännetecknas av CD38. T-cellerna känns igen på CD3, CD5, CD7 samt antingen CD4 eller CD8. T-hjälparceller är CD4 positiv medan T-mördarcellen är CD8 positiv (Hoffbrand & Moss 2016, 105). Med ytmarkörer känns också maligna plasmaceller igen. Karaktäristiskt är att den maligna plasmacellen saknar eller bara svagt visar den vanliga B-cellens CD19, CD20 och CD22 ytmarkörer (Putkonen & Silvennoinen 2015, 407). Den kännetecknas istället av CD 38, CD138 och CD45 (Hoffbrand & Moss 2016, 232). CD38 har den gemensamt med en normal plasmacell. CD138 används vid många laboratorieundersökningar för att identifiera cellen.

3.5 Immunglobuliner och M-komponent

Immunglobuliner, även kallade antikroppar, är proteiner som produceras av klonala plasmaceller, differentierade B-lymfocyter. Immunglobuliner är en del av det specifika immunförsvaret och hjälper till att skydda kroppen mot utomstående organismer. Deras uppgifter är att känna igen kroppsfrämmande material, antigener, som främmande proteiner, kolhydrater, cellmembran hos bakterier eller glykoproteinutskott hos virus, samt att sätta igång elimineringsmekanismer av dessa antigen, t.ex. genom att aktivera fagocytos (Delves Martin, Burton & Roitt 2017, 70).

Immunglobulinerna delas in i 5 klasser eller isotyper: immunglobulin G (IgG), IgA, IgM, IgD och IgE. Den vanligaste är IgG som utgör ca 80% av alla immunglobuliner i serum. Även en isotyp av ett immunglobulin kan ha underklasser, t.ex. IgG har underklasserna IgG₁, IgG₂, IgG₃ och IgG₄. Vid en ny respons mot en antigen produceras först IgM. Cellerna övergår senare till en kontinuerlig produktion av IgG. Samma cell kan byta produktion från IgM till IgG eller till IgA eller IgE (Delves et al. 2017, 70-72).



Figur 1. Schematisk bild över ett immunglobulin och dess beståndsdelar. Egen bild baserad på Delves et al. (2017, 70-71, 73).

Grundstrukturen är den samma hos alla immunglobuliner och illustreras ofta schematiskt likt bokstaven Y som i figur 1. De byggs upp av två typer av polypeptidkedjor, två tunga kedjor och två lätta kedjor. De tunga kedjorna har en molekylvikt på ca 55 kDa eller ca 70 kDa hos IgG, IgA och IgD respektive IgM och IgE. Dessa kedjor kallas gamma (γ) i IgG, alfa (α) i IgA, mu (μ) i IgM, delta (δ) i IgD och epsilon (ϵ) i IgE. De lätta kedjorna har en molekylvikt på ca 24 kDa och kallas kappa (κ) eller lambda (λ) (Delves et al. 2017, 71). De lätta kedjorna förekommer i alla klasser av immunglobuliner. Både de tunga och lätta kedjorna har konstanta delar och variabla delar. Den variabla delen är unik, har hög specificitet och är antigenbindande, medan den konstanta delen är likadan hos alla immunglobuliner av samma typ (Delves et al. 2017, 70).

En av de tydligaste biomarkörerna för att diagnostisera MM och dess förstadier är förekomsten av paraproteiner i serum och/eller urin. Paraproteiner (även M-protein, M-komponent) är monoklonala immunglobuliner eller dess komponenter, lätta kedjor och tunga kedjor. Vid MM är det maligna plasmaceller som utsöndrar M-komponenten (Perazella & Finkel, 2016). M-komponenten förekommer som IgG vid ca 50% av fallen och IgA vid 20%. Vid ca 20% av fallen förekommer endast lätta kedjor. Ovanligare är förekomsten av IgD (2% av fallen) och IgM (0,5% av fallen). M-komponenten kan inte alls detekteras hos ungefär 2–3% av patienter med MM (Rajkumar & Kumar 2016, 102). Immunglobulinens fria lätta kedjor är antingen av typen κ (kappa) eller λ (lambda). Plasmacellerna syntetiserar de fria lätta kedjorna och de har inte blivit ihopparade med tunga kedjor. Oftast ses en ökning av antingen kappa eller lambda varianten av de lätta kedjorna vid MM. Det normala förhållandet kappa:lambda är mellan 0,26-1,65, men förhållandet blir grovt förvrängt vid MM. Fria lätta kedjor i urin, Bence-Jones protein, förekommer vid 2/3 av fallen (Hoffbrand & Moss 2016, 232).

4 Metod

Metasyntes har använts som metod i detta examensarbete. Metasyntes är en forskningsmetod som används för att beskriva en systematisk litteratursammanställning vars syfte är att öka kunskapen inom ett visst ämne. Detta åstadkoms genom kvalitativ analys av data av flera liknande studier. Metasyntes är en anpassningsbar metod som kan lyfta fram patientperspektiv och vårdarperspektiv samt fungera som grund åt förbättringsarbeten och systemförändringar (Willman & Stotz 2017, 399).

4.1 Metasyntes som metod

Syftet med forskning baserat på kvalitativ dataanalys är att uppnå förståelse. Metasyntes som metod ger en helhetsbild av ett forskningsområde och utvärdera om det finns vetenskapligt stöd bakom en viss fråga. Det finns ingen standardiserad metod för hur en metasyntes utförs, men grunden är ett systematiskt sökande av studier. Frågeställningen är viktig att formulera på ett sätt så att den kan besvaras baserat på vetenskaplig litteratur. Frågeställningen definierar vad man ska söka svar på och således blir informationen som behövs för svaret mer specifik och avgränsande. En tydlig frågeställning gör det alltså lättare att söka relevant litteratur (Willman & Stotz 2017, 399-401).

För att utföra en lyckad litteratursökning är det viktigt att det finns en plan som innehåller sökord, indextermer, sökvägar, relevanta källor och tillgängliga resurser. Det är viktigt att sammanställa en relevant sökstrategi. Har man god förutsättning att hitta relevanta artiklar blir också rapporten mer relevant (Willman & Stotz 2017, 401-402).

Då artiklar väl ska väljas ut görs det baserat på en granskningsprocess. Kriterierna för om en artikel inkluderas eller inte bestäms utgående från frågeställningen. Granskningsprocessens första steg är att man avgränsar artiklar man funnit med en sökning baserat på olika kriterier, t.ex. publiceringsdatum och om fulltext av artikeln är tillgänglig. Därefter granskas artiklarna och deras relevans bedöms baserat på titel. Sedan sällas ytterligare artiklar bort baserat på artiklarnas abstrakt, och sist granskas en artikels kvalitetsvärde och klassificering. Artiklarnas relevans bedöms av frågeställningen (Willman & Stotz 2017, 402).

Klassificering av artiklar kan göras beroende på forskningsmetod. En klassificering gör det tydligare vilken typ av studier som ska analyseras. Man måste bedöma om forskningsmetoden som använts i en artikel leder till ett resultat som kan läggas samman den metasyntes man ämnar skriva. Metasyntesens vetenskapliga styrka är baserad på att artiklarna som används vid syntesen har vetenskaplig styrka. Granskningen av artiklars vetenskapliga kvalitet kan göras genom att använda en granskningsmall. Mallen kan bestå av ett antal kvalitetsfrågor t.ex. är artikelns syfte tydligt formulerat? Är analysen noggrann och skriven i detalj? Under granskningen kan artiklarnas kvalitet klassas som hög, medelhög eller låg. Det finns inget korrekt värde utan de är subjektiva till granskarna och metasyntesens syfte eller mål (Willman & Stotz 2017, 402-404).

För att en litteraturstudie ska vara trovärdig ska teman som beskrivs vara baserade på data. Vid granskning ska det vara möjligt att följa analysprocessen och se att resultatet och de

dragna slutsatserna är tillförlitliga. En litteraturstudie som är utförd på ett korrekt sätt ska tillåta läsaren bedöma trovärdigheten av resultatet. Metoden och hur analysen är utförd ska vara utförligt beskrivet så att analysen går att upprepa, litteraturstudien ska vara reproducerbar (Willman & Stotz 2017, 407-408).

4.2 Genomförande av litteratursökning

Databaser som användes för att hitta litteratur var Pubmed, Medline, Cinahl, Ebsco och Google Scholar. Sökningen begränsades till artiklar publicerade 2015 och senare för att få färskare studier samt endast artiklar med fulltext. Artiklarna söktes fram med sökord baserade på examensarbetets tema, syften och frågeställningar. Arbetets syfte är att från nya artiklar sammanställa en översikt över vilka laboratorieundersökningar som görs vid MM, samt vilka nya metoder det finns för uppföljningen och riskbedömningen av MM. Frågeställningar är vilka laboratorieundersökningar görs vid MM och vilka nya metoder finns vid uppföljningen av MM? Sökord som användes var "multiple myeloma" i kombination med "laboratory tests", "laboratory testing", "laboratory assay", "diagnosis", "diagnostics", "preanalytic", "preanalytical", "myeloma proteins", "paraproteins", "m components", "interference", "interfere", "sample storage" och "sample error". Sökorden användes i olika kombination under flera sökningar. Konsekvent användes "multiple myeloma" för att hitta artiklar med diagnostik, laboratorieundersökningar, biomarkörer osv relaterade till sjukdomen. Artiklar valdes sedan ut baserat på titlar som verkade vara relevanta. Artiklarna organiserades baserat på teman och därefter sållades en del texter bort på abstraktsnivå. Artiklarna lästes noggrant igenom för att säkerställa att innehållet var relevant utgående från frågeställningarna, om så ej var fallet sållades de bort. Slutliga antalet artiklar som togs med i arbetet blev 17 artiklar och finns sammanställda i Bilaga 1.

5 Resultat

Tack vare klart fastställda kriterier för MM diagnos kan väsentliga laboratorieundersökningar utgå från dem. Vid diagnostisering av MM är påvisandet av den karaktäristiska M-komponenten inte direkt ett krav trots att den förekommer hos de flesta patienter. Större fokus ligger på undersökningen av benmärgsbiopsi och aspirat för att påvisa maligna plasmaceller. Analyserna som används vid MM kan även råka ut för störningar på olika sätt på grund av M-komponenten. Behandlas en patient med monoklonala antikroppar kan även M-komponenten bli störd vid uppföljning med elektrofores och immunfixation.

5.1 Laboratorieundersökningar vid multipelt myelom

Laboratorieundersökningarna indelas i tre grupper, inledande och diagnostiserande undersökningar, analys av M-komponenten och undersökningar för uppföljning av sjukdomen. De diagnostiska laboratorieundersökningarna utgår främst från IMWGs kriterier för MM diagnos. Inledande undersökningar är övriga laboratorieundersökningar som görs då MM misstänks eller kring tidpunkten av diagnos. Analys av M-komponenten behandlar även andra proteinundersökningar. Många undersökningar som görs vid uppföljningen görs även tidigare under sjukdomsförloppet, men görs då i uppföljningssyfte och inte längre i diagnostiskt syfte. Laboratorieundersökningarna för de olika grupperna presenteras i tabell 1. De beskrivs även djupare i enskilda kapitel.

Kommunförbundet i Finland har utarbetat en nomenklatur som används vid presenterandet av laboratorieundersökningarna i detta examensarbete. Kodsamlingen från 2017 är avsedd att vara gemensam för läkare och den enhet som utför undersökningen. (Kommunförbundet 2017).

Tabell 1. Översikt över laboratorieundersökningar som görs under sjukdomsförloppet vid MM.

Laboratorieundersökningar vid multipelt myelom		
Inledande analyser och diagnostik	Analys av M-komponent	Uppföljning
B-TVK	S -Prot / P -Alb	S -B2Miglo
P -Na & P-K	S -Prot-Fr	P -LD
fP-Ca / S-Ca-Ion	S -ImmFix	S -Prot-Fr
P-Krea	P -IgG / P -IgA / P -IgM / S -IgD / S -IgE	S -ImmFix
S -Prot / P -Alb	S -IgLc-V	P -TT-INR
S -IgLc-V	dU-IgLcK / dU-IgLcL	P -APTT
B -La	U -Alb	
U-KemSeul	dU-Prot	
Benmärgsanalys		
MRI		

5.1.1 Diagnostisering och inledande analyser

Till CRAB-kriterierna hittas lätt motsvarande laboratorieundersökning. Från 2474 B-PVK+T eller 3696 B-TVK kan man undersöka Hb som påvisar anemi. Kalciumvärdet kan analyseras från fasteplasma, 4514 fP-Ca, eller joniserat kalcium, 3673 S -Ca-Ion. Njurarnas tillstånd kan undersökas antingen genom att analysera kreatinin, 4600 P -Krea, eller genom att räkna ut den estimerade globulära filtrationshastigheten, 4999 Pt-GFRe-CG.

MM karaktäriseras av okontrollerad proliferation av plasmaceller i benmärgen och därför är benmärgsbiopsi eller benmärgsaspirat viktigt för ställande av diagnos (Rajkumar et al. 2014, 541). Vid MM ska över 10% plasmaceller i benmärgen konstateras. Preparat från benmärgsbiopsi har visats innehålla mer celler än preparat av benmärgsaspirat. (Štifter et al. 2010, 4). I ett benmärgspreparat kan man med mikroskop räkna plasmacellerna. Benmärgspreparat kan färgas och analyseras med mikroskop. De kan färgas med Hematoxylin & Eosin (HE) eller färgas immunhistokemiskt. Maligna plasmaceller har ett specifikt antigen CD138. Man kan immunhistokemiskt behandla benmärgspreparat med antikroppar mot CD138 som sedan färgas. Plasmacellerna urskiljs sedan lätt tack vare färgningsmetoden (Wei & Juneja, 2003, 407).

Benmärgsaspirat eller -biopsi kan analyseras på olika sätt: cytogenetiskt, med flödes-sytometri, fluorescens in situ-hybridisation (FISH) och immunhistokemiskt. (Michels & Petersen 2017, 374). En metod, 13123 Bm-CD138ex, låter de maligna plasmacellerna reagera med anti-CD138 antikroppar med magneter. Magneterna aktiveras och allt som inte bundit till magneterna tvättas bort. Således lämnar endast plasmacellerna kvar och man kan ta dem tillvara. De kan sedan odlas och undersökas med FISH (TYKS laboratoriet 2019). Vid FISH undersökning av benmärgen borde man använda sonder designade för att hitta trisomier, IgH translokerad MM: t(11;14), t(4;14), t(14;16), t(6;14), t(14;20), och del(17p). Utgående från vilka gener som konstateras görs en individuell riskbedömning för patienten. (Rajkumar, 2018, 1093) Ett av kriterierna för att MM-diagnos är minst en skelettskada ≥ 5 mm vid MRI undersökning (Rajkumar et al. 2014, 541).

Skelettets nedbrytning kan följas upp med lågdos helkropp CT och vid behov av MRI och PET/CT (Gerecke et al. 2016, 473). Förhållandet mellan monoklonala och polyklonala FLC som är en av de maligna biomarkörerna vid MM diagnostisering presenteras i följande kapitel om protein- och M-komponentanalyser.

Utöver de kriterier som fastställts av IMWG finns det mycket mera som kan hjälpa att diagnostisera en patient med MM, reda ut vilken typ av MM det handlar om och hur prognosen för patienten ser ut. Grundlaboratorieundersökningar som rekommenderas vid inledande MM misstankar är fullständig blodbild 3696 B-TVK, elektrolyterna, natrium, 3622 P -Na, och kalium, 1999 P -K. (Michels & Petersen 2017, 374). Sänkan, 2203 B -La, är vanligen hög vid MM. Vid urinanalys är kemisk screening vanlig, 1881 U-KemSeul, och ger en bild av njurarnas funktion.

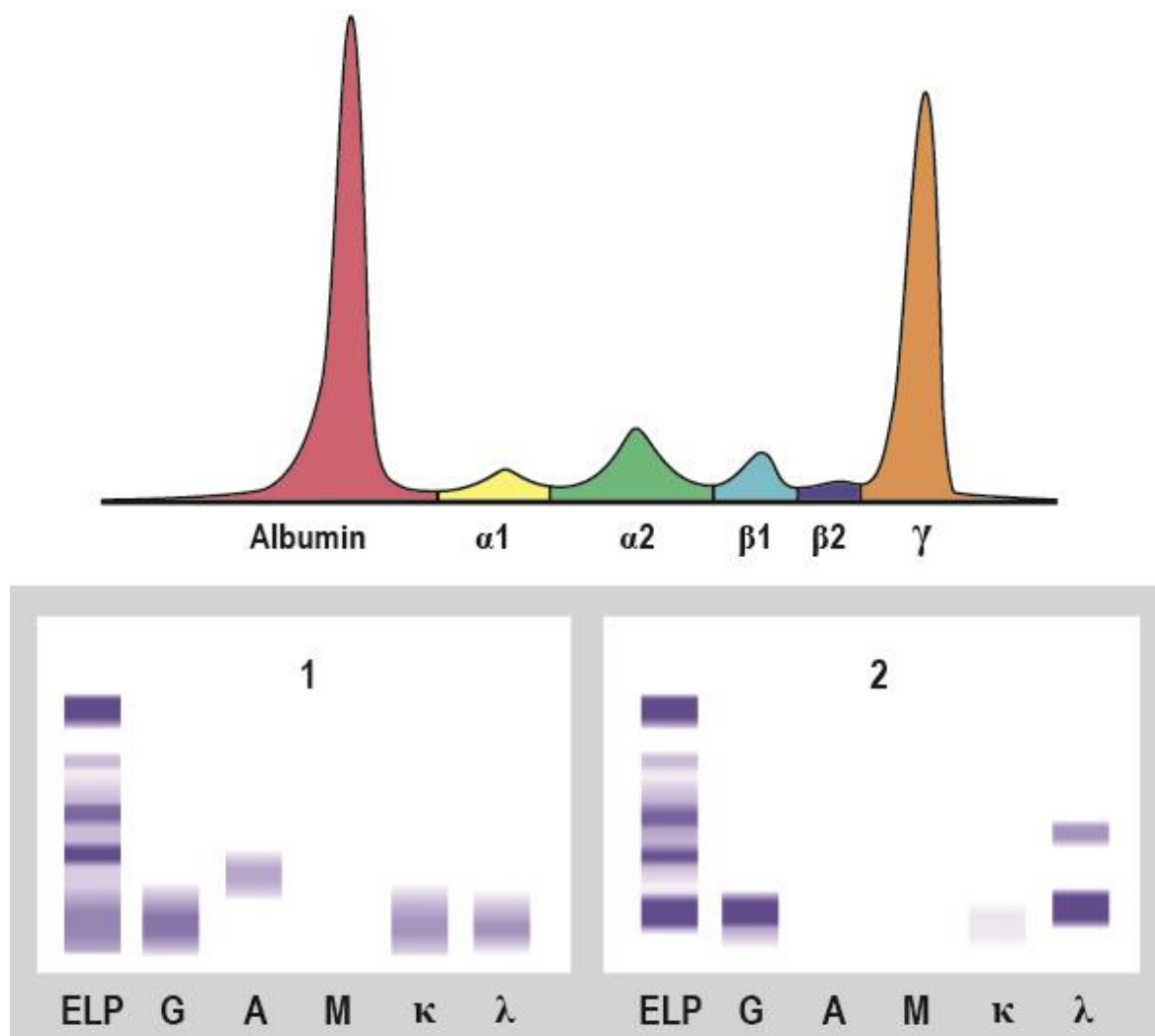
5.1.2 Analys av protein och M-komponenten

M-komponenten är typisk för MM. M-komponenten är en monoklonal immunglobulin och genom att analysera det får man mycket information. Vid MM misstankar kan mängden proteiner i blodet analyseras: 2516 S -Prot. Även albumin, 4586 P -Alb, kan analyseras vid MM misstankar (Michels & Petersen 2017, 375)

Elektrofores är en metod som används för att separera olika molekyler med olika laddningar. Serumelektrofores, även kallat proteinfraktion, 2522 S -Prot-Fr, används för att påvisa M-komponenten. Vid elektrofores skiljs proteinerna åt och syns efter färgning som band i gelen. (O'Connell, Horita & Kasvari 2005, 105) Om M-komponenten förekommer kompletteras serumelektrofores med immunfixationelektrofores, 3401 S -ImmFix. Med immunfixation vill man ta reda på vilken immunglobulin som produceras av de maligna plasmacellerna. Immunfixation är en elektroforesmetod som börjar med proteinfraktion och därefter får proteinerna binda antikroppar mot den tunga kedjan hos IgG, IgA, IgM, IgD och IgE, även antikroppar mot de lätta kedjorna, kappa och lambda, finns. Efter färgning syns band på de områden där antikropparna bundit till immunglobulinen och/eller till en av de lätta kedjorna (Rich et al., 2018, 918). Hur detta kan se ut illustreras i figur 2. Kvantitativ analys av immunglobulinerna är också möjligt. Det finns analyser för respektive immunglobulin; IgG (4828 P -IgG), IgA (4827 P -IgA), IgM (4829 P -IgM), IgD (1670 S -IgD) och IgE (1673 S -IgE). Monoklonal immunglobulin reagerar ofta onormalt vid immunkemisk analys och kan således ge felaktigt resultat. HUSLAB rekommenderar då proteinfraktion (HUSLAB, 2018).

Förhållandet mellan de två fria lätta kedjorna kappa och lambda, är en viktig undersökning vid diagnostiken av MM. 4949 S -IgLc-V är en undersökning som kvantitativt analyserar mängden kappa- och lambdakedjor samt räknar ut förhållandet mellan dem. Det är oftast endast bara en av de två fria lätta kedjorna som är monoklonal och om den förekommer i stora mängder förskjuts förhållande mellan den monoklonala och den vanliga, polyklonala,

drastiskt. För att analysen ska kunna användas som bas för diagnosen MM ska förhållandet fria lätta kedjor vara ≥ 100 och koncentrationen av den monoklonala fria lätta kedjan vara ≥ 100 mg/L. De fria lätta kedjorna går även att analysera ur samlat dygnsurin med undersökningarna 3832 dU-IgLcK och 3833 dU-IgLcL (Rajkumar et al. 2014, 541).



Figur 2. Övre: Proteinelektrofores som visar M-komponenten på gammaområdet. Egen schematisk illustration baserad på en bild av Caulton (2013).

Nedre: Proteinelektrofores och immunfixation av normalt serum (1) och serum från en patient med IgG lamda M-komponent (2). ELP står för elektrofores och bokstäverna representerar immunglobulintyperna samt de fria lätta kedjorna. Egen illustration baserat på en bild från en artikel av Bird (2012).

Protein i urin kan också undersökas, t.ex. 1029 U -Alb och 2513 dU-Prot, dessa undersökningar ger en bild av hur mycket proteiner som läcker ut med urinen. Screening av njurarna är viktigt eftersom njurinsufficiens kan förekomma vid MM. Man kan även undersöka M-komponenten ur urin, det är även vanligt med monoklonala fria lätta kedjor i urin, s.k. Bence Jones-protein. Det kan man undersöka med immunfixation av samlat

dygnsurin. Det finns även analyser som kvantitativt mäter mängden fria kappa- och lambdakedjor i samlad dygnsurin (Willrich & Katzmann 2016, 913).

5.1.3 Uppföljning av multipelt myelom

Vid uppföljning av MM görs en hel del av de tidigare nämnda undersökningarna. Blodbilden, kreatinin och kalcium ska undersökas för att följa med allmäntillståndet och påvisa anemi, försämrad njurfunktion och bennedbrytning, vilka är vanliga symtom vid MM. Benmärgsbiopsier eller benmärgsaspirat görs också för att följa upp de maligna plasmacellerna i benmärgen både hos patienter som gjort benmärgstransplantation och de som inte gjort det (Anderson et al. 2015, 1412). Det rekommenderas att proteinelektrofores och immunfixation av serum analyseras varje månad under behandling och med 3–4 månaders mellanrum efter behandling för att följa upp M-komponentens halt i blodet. Rekommendationen för proteinelektrofores och immunfixation av urin är att det analyseras minst en gång per 3–6 månader (Rajkumar 2018, 1093).

β 2-mikroglobulin, 1171 S -B2Miglo, kan analyseras som en biomarkör för MM och fungerar som bas för prognosen och för klassificeringen av sjukdomens stadium. β 2-mikroglobulinhalten höjs främst vid njurinsufficiens men även vid tumörer. Förutsättningen för att β 2-mikroglobulin ska fungera som en biomarkör för prognos av MM är att njurarna är friska (Michels & Petersen 2017, 378). Laktatdehydrogenas, LD eller LDH, 4526 P -LD kan göras vid diagnostisering men är viktigare vid uppföljning av sjukdomen och är en av undersökningarna som sjukdomens stadium och prognos kan baseras på. (Michels & Petersen 2017, 379).

Blödningsbenägenhet är ett symtom hos vissa patienter med MM och kan t.ex. bero på trombocytopeni antingen p.g.a. sjukdomen eller behandling. Vid uppföljningen av sjukdomen kan man även följa med blödningsbenägenheten genom att analysera tromboplastintiden 4520 P -TT-INR samt aktiverad partiell tromboplastintid 2783, P -APTT (Mellqvist, 2019).

5.2 Preanalytik och analytisk interferens

Laboratorieprocessen börjar med läkaren som efter fysisk eller mental utredning lägger in en remiss för ett blodprov och slutar med att resultatet från provet rapporteras och har tolkats. Laboratorieprocessen kan delas in i tre faser: preanalytiska faser, analytiska faser och postanalytiska faser. Den preanalytiska faser omfattar alla steg innan analys: beställning av

blodprover, provtagning, transport, centrifugering, biologiska faktorer som ålder och kön, samt faktorer som motion, fasta och rökning. Det är i den preanalytiska fasen som majoriteten av alla fel uppstår. (Lima-Oliveira, Volanski, Lippi, Picheth & Guidi 2017, 153)

M-komponenten karaktäriserar MM och är påvisbar vid 97–98% av alla fall. (Rajkumar & Kumar 2016, 102) Trots att M-komponenten är en bra och tydlig biomarkör kan den störa vid andra analyser t.ex. kemiska och immunologiska undersökningar. Behandlingar i form av monoklonala antikroppar är nu populära och nya läkemedel utvecklas. De monoklonala antikropparna kan dock detekteras i serum och störa uppföljningen av MM. Patientens övriga immunglobuliner stör vanligtvis inte p.g.a. att patienterna har supprimerat immunförsvar, antingen p.g.a. behandling eller brist på friska plasmaceller. (McCudden et al. 2016, 1099)

5.2.1 Fördröjd benmärgsanalys

Analyser av plasmacellens genexpression är en del av riskutvärderingen och prognosen av MM. Meißner et al. (2015, 1–2) har undersökt hur fördröjd analys av benmärgsaspirat på grund av transport påverkar genexpressionen hos plasmaceller jämfört med färska prov som genast analyserats. Plasmacellerna måste isoleras innan expressionsanalyser och därför kan man inte frysa benmärgen eller använda RNA stabilisatorreagenser. De prov som transporterats analyserades inom 24h och de interna proverna analyserades samma dag.

Genexpressionen hos plasmacellerna analyserades och jämfördes. Mer än en tredjedel av alla gener som analyserades hade påverkats hos de transporterade proven. T.ex. gener för proliferation hos plasmacellerna analyserades och de externa proven visade ett märkbart lägre proliferationsvärde än de interna proven. Prediktorer används vid riskbedömning av MM och de förutspår risker baserat på genexpression. Mellan externa och interna prover märktes ingen skillnad av de två undersökta prediktorerna för högrisk MM fall trots att 40% av generna var märkbart differentiellt uttryckta. (Meißner et al. 2015, 2,4)

Det är svårt att hitta en lösning till skadorna som benmärgsaspiraten utsätts för p.g.a. fördröjd analys. Nedkylning av plasmacellerna före isolering gav inte några märkbara effekter. Det rekommenderas att man utvecklar mindre laboratorier så att plasmacellerna i proven kan isoleras innan de skickas, eller att man helt enkelt accepterar att det förekommer felaktigheter vid riskuppskattning av prov som inte kan analyseras samma dag. (Meißner et al. 2015, 7)

5.2.2 M-komponenten kan störa kemiska analyser

Provrör innehållande gel används ofta för att få tillgång till plasma eller serum. Gelen på botten av röret fungerar vanligtvis som en separerande barriär mellan cellerna på botten och plasma/serum högst upp. Detta beror på att blodcellerna har högre densitet än gelen medan plasma/serum har lägre densitet än gelen. En rapport från Tyskland av Maire och Schüter (2017, 504) beskriver ett fall där gelen inte lyckades separera serum och blodcellerna utan de steg över båda lagren. Patienten var en 52-årig man med MM och sjukdomen antogs ligga bakom fenomenet. Patientens IgA koncentration var 76,5 g/L och totala koncentrationen protein var 140 g/L. Hyperproteinemin gjorde att serumet hade högre densitet än gelen och steg upp till ytan. Fenomenet kan påträffas vid långt skridna fall av MM, hos patienter som fått moderat kontrastmedel för radiologiska undersökningar och i dialyspatienter.

Det har konstaterats att M-komponenten på olika sätt kan störa vid flera olika biokemiska undersökningar av plasma eller serum. Den vanligaste störningen beror på högre turbiditet eller grumlighet. Vid denna typ av störning är vanligast att det förekommer en M-komponent av isotypen IgM, detta kan bero på dess förmåga att bilda polymerer. Felaktigt låg halt HDL, låga glukos- och låg paracetamolhalter kan vara exempel på hög turbiditet. M-komponenten kan reagera med kemikalier eller reagenser som används vid en analys eller störa vid immunanalyser där M-komponenten kan specifikt eller ospecifikt binda analyter. M-komponenten kan även binda enzymer, hormoner och lipoproteiner. Beroende på M-komponentens affinitet och epitopet det binder så kan funktionen på dessa ämnen förändras. (King & Florkowski 2010, 397-399).

En artikel av Platzer, Hebraud och Caussé (2017, 544-545) beskriver en fallstudie från Frankrike där natrium (N) och kalium (K) inte kan analyseras av en 88-årig kvinna med diagnosen MM. Kvinnan har hög proteinhalt i blodet och en M-komponent av isotypen IgG lambda. I studien samlades också elva prover av friska personer och elva prover av MM patienter med högt halt M-komponent. Proverna analyserades med direkt potentiometri (ISE), indirekt potentiometri (ISE) och ytterligare en gång med indirekt ISE efter ultrafiltrering. Samtliga prover kunde analyseras utan problem och med konsekventa resultat. Patienten genomgick plasmaferes för att filtrera bort en del plasmaproteiner och efter det kunde N och K analyseras utan problem. Enligt studien rekommenderas ultrafiltrering av prover före N och K analyser om det är frågan om en MM patient.

En fallstudie gjord av Wu, Yin, Teng, Zhang och Yang (2017, 32) uppmärksammar hur M-komponenten kan agera som anti-kropp och binda molekyler eller reagenser i analyser. Orsakerna bakom att en 63-årig man hade extremt förlängd APTT undersöktes. Patienten sökte hjälp för kronisk vattnig diarré. Från tidigare hade patienten diabetes mellitus och vid läkarundersökning visades även att han var undernärd och hade lindrig anemi, men han visade inga tecken på blödningar, inte heller tecken på blod i diarrén. Patienten hade en M-komponent av typen IgM kappa och diagnostiserades efter utvärdering av benmärgsbiopsi ha MGUS. Hypotesen var att patientens IgM kappa M-komponent hade affinitet för fosfolipider och att den fungerade som anticardiolipin-antikropp. M-komponenten störde analysen genom att in vitro binda till cardiolipin, ett substitut för trombocytens fosfolipider. För att undersöka hypotesen renades patientens IgM kappa M-komponent. M-komponentens affinitet för cardiolipin utreddes genom ett anti-cardiolipin analyskit och affiniteten konstaterades vara positiv. Analys av koagulationsfaktorernas aktivitet utfördes med tre olika prover, en kontroll med normalt plasma, patientens prov, och ett prov med normal plasma blandat med patientens renade IgM kappa M-komponent. Aktiviteten i kontrollprovet var normalt medan aktiviteten i patientens och det blandade provet klart visade låg aktivitet. Studien visar att svaret från APTT analysen sannolikt är falskt positivt. IgM kappa M-komponenten visade ha affinitet för cardiolipin som används som reagens i analysen. Genom att binda till cardiolipin störde IgM kappa M-komponenten koagulationsanalyserna och gav felaktiga indikation för blödningsbenägenhet.

5.3 Nya metoder för uppföljning vid multipelt myelom

Vid behandling av MM med monoklonala antikroppar kan det uppstå problem vid uppföljningen av M-komponenten med traditionella metoder som elektrofores och immunfixation. Det blir problem i de fall då M-komponenten och den monoklonala antikroppen har samma isotyp och således inte går att skiljas åt. Nya metoder för att komma runt detta utvecklas. Då det gäller utvecklandet av nya biomarkörer för prognos och uppföljning av MM jämförs de nya markörerna ofta med de etablerade biomarkörerna β 2-mikroglobulin, albumin och LD. Dessa biomarkörer är inkluderade i stadieindelningen som baseras på R-ISS, utformad av IMWG.

5.3.1 Terapeutiska monoklonala antikroppar och uppföljning av MM

Nya läkemedel utvecklas hela tiden och monoklonala antikroppar som läkemedel blir mer vanligt. Det finns i dagens läge i huvudsak två läkemedel av denna typ som används vid MM: Daratumumab och Elotuzumab. Dessa läkemedel används ofta efter skov och i kombination med andra läkemedel (Durer et al. 2019, 7).

Dessa läkemedel är monoklonala antikroppar, d.v.s. det samma som M-komponenten. Påvisning av M-komponenten med serumelektrofores är en del av uppföljningen av sjukdomen och monoklonala antikroppar i terapeutiskt syfte kan störa prognosen. Ett av IMWG:s kriterier för fullständig respons är att det krävs ett negativt resultat vid immunfixation av serum och urin (Durie et al. 2006, 1470). I dessa fall är risken för falska positiva svar ett allvarligt problem.

I en undersökning gjord av Tang et al. (2018, 122-125) analyserades serum av 22 patienter som genomgått eller genomgår behandling med daratumumab eller elotuzumab. De kunde detektera de terapeutiska antikropparna hos 90% av alla patienter genom vanlig serumelektrofores och immunfixation. De terapeutiska antikropparna kunde detekteras med serumelektrofores genom att de inte migrerade på samma sätt som M-komponenten. I de fall där de två olika typerna av monoklonala antikropparna migrerade lika långt kunde deras isotyper skiljas åt genom immunfixation. De problematiska fallen är då patientens M-komponent och den terapeutiska antikroppen migrerar lika långt i gelen och har samma isotyp, då kan de varken skiljas åt med serumelektrofores eller immunfixation. Det betyder att det är teoretiskt omöjligt att bedöma om en patient har fullständig respons med dessa metoder. Snabbast påvisades terapeutiska antikroppar sju dagar efter påbörjad medicinering. Daratumumab kunde påvisas upp till elva dagar efter avslutad medicinering medan elotuzumab kunde påvisas ännu 70 dagar efter avslutad medicinering.

5.3.2 Proteinseparation med anti-daratumumab antikroppar.

Daratumumab är en antikropp av isotypen IgG kappa. Har en MM-patient en M-komponent av samma isotyp är det omöjligt att skilja M-komponenten från Daratumumab genom vanlig serumelektrofores och immunfixation (McCudden et al. 2016, 1095). Förekomsten av M-komponent av isotypen IgG är vanligast så sannolikheten är stor att daratumumab ställer till problem då halten av patientens M-komponent gått ned och det är dags att utreda fullständig respons (Rajkumar & Kumar 2016, 102). Det rekommenderade schemat för dosering av daratumumab leder till en daratumumabkoncentration runt 0,915 g/L. Detta betyder att

daratumumab är detekterbart vid serumelektrofores och immunfixation och kan misstolkas som M-komponenter (McCudden et al., 2016, 1096).

För att undvika förvirring och falska positiva resultat utvecklas en metod för att särskilja M-komponenten från daratumumab i serum, en daratumumabspecifik immunfixations reflexanalys (DIRA). Utvecklingen av metoden beskrivs i en artikel av McCudden et al. (2016, 1095–1104). Vid DIRA används en mus anti-daratumumab antikropp som läggs till i serum. Anti-daratumumab antikroppen binder daratumumab och gör att dess migration vid immunfixation förändras och kan skiljas från patientens IgG kappa M-komponent, de syns som två olika band i gelen. Analysen ska främst användas då låg uppmätt halt IgG kappa M-komponent (≤ 5 g/L) har detekterats och patienten kan uppnå fullständig respons. Sensitiviteten för DIRA är runt 0,2 g/L. Anti-daratumumab-antikroppen binder till daratumumab och skiftar migrationen. Syns två band i gelen är det ena bandet daratumumab som skiftat och det andra är patientens M-komponent. I detta fall fortsätts medicinering och uppföljning av sjukdomen. Syns bara ett band är det daratumumab som har skiftat och patienten visar avsaknad av M-komponent. Följande steg kan då tas för att patientens respons ska kunna klassas som fullständig.

DIRA metoden är specifik för daratumumab. Nya terapeutiska monoklonala antikroppar utvecklas hela tiden och varje terapeutisk monoklonal antikropp man vill undersöka med liknande metoder kräver dock sin egen anti-idiotypiska antikropp. Detta kan i framtiden bli dyrt och mycket jobb för ett laboratorium (Tang et al. 2018, 127-128).

5.3.3 Terapeutiska monoklonala antikroppar och masspektrometri

Skiljer man proteinerna åt med immunfixation krävs det att det finns utvecklat en unik anti-terapeutisk antikropp för varje monoklonal antikropp som används i terapeutiskt syfte. Det finns således behov av en universell metod och masspektrometri kunde vara en lösning (Mills et al. 2018, 671)

Ett alternativ för att detektera M-komponenten och terapeutiska monoklonala antikroppar är en metod baserad på matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight masspektrometri (MALDI-TOF MS). Metoden har visat sig att vara bra på att detektera M-komponenten och dess isotyp med korrelation till immunfixation. En studie gjord av Moore, Cho och Thoren (2019, 91) utvärderade hur bra MALDI-TOF MS är på att skilja på daratumumab och M-komponent. I studien analyserades 31 patienter med monoklonal gammopati vars M-komponent var av isotypen IgG kappa. MALDI-TOF-MS analysen

kunde skilja på daratumumab och M-komponenten hos 84% av patienterna medan immunfixation kunde skilja proteinerna åt hos bara 45% av patienterna. MALDI-TOF MS är således mer specifik än immunfixation.

Innan analys renades immunglobulinerna från serum. Det gjordes med kulor försedda med antikroppar mot IgG, IgA, IgM tunga kedjor eller kappa och lambda lätta kedjor. Material som inte bundit slängs bort och kulorna tvättas. Antikropparna elueras från kulorna och antikropparnas lätta och tunga kedjor separeras. Därefter ska de renade proven ännu blandas med en matrix för att sedan pipetteras på en MALDI-platta och torka. Genom upprepade mätningar av en positiv kontroll bestämdes m/z värdet för daratumumabs lätta kappa kedja. Med m/z värdet kunde man identifiera daratumumab i patientprover och således skilja det från M-komponenten. (Moore et al. 2019, 92)

En annan masspektrometrimetod är användningen av liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF MS) har visats vara mer specifik och lyckats skilja mellan terapeutiska antikroppar och M-komponenter i 100% av analyserade prover. I jämförelse med MALDI-TOF MS har denna metod fler steg och analysen tar längre tid. En LC-QTOF MS analysator är även väldigt dyr och kräver hög expertis för att kunna användas (Moore et al., 2019, 93).

Masspektrometri har flera fördelar över traditionell serumelektrofores och kan komma att ersätta den och immunfixation i framtiden. Med mer sensitiva tekniker är det troligt att fler monoklonala antikroppar kommer att kunna detekteras med MALDI-TOF MS som tidigare inte var möjliga att hitta med immunfixation. För framtiden är det viktigt för MALDI-TOF-MS att man bygger upp ett bibliotek med massan för olika terapeutiska monoklonala antikroppar eftersom det är viktigt att känna till massan hos den monoklonala antikroppen man analyserar samt att man vet M-komponentens massa (Moore et al. 2019, 94).

5.3.4 B-cell mognadsantigen som ny biomarkör vid uppföljning av MM

Ett forskarteam har identifierat en ny oberoende biomarkör för uppföljning av MM som korrekt ska förutspå riskstadiet och överlevnaden hos patienter. Ghermezi et al (2017, 786–787) rapporterar om ett serumprotein, B-cell mognadsantigen (BCMA) som även kan detekteras i patienter med asekretorisk MM. Proteinet som föreslås som potentiell ny biomarkör, BCMA, hör till tumörnekrosfaktorerna (TNF). BCMA förekommer på cellmembranet på maligna B-lymfocyter och binder en B-lymfocytaktiverande faktor som spelar en viktig roll vid tillväxten och överlevnaden av maligna plasmaceller. Vid

undersökningar av BCMA som potentiell biomarkör användes serum från 243 MM patienter. För att bestämma halten BCMA i serum användes en enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA). Resultaten jämfördes med motsvarande patients resultat från proportionen plasmaceller i benmärgen och ändringar vid serumelektrofores under sjukdomsförloppet. Hos patienter med asekretorisk MM jämfördes BCMA med plasmaceller i benmärgen samt fynd från PET/CT skanningar.

Undersökningen visade att det finns hög korrelation mellan BCMA och procenten plasmaceller i benmärg. Halten BCMA visade sig också vara högre hos MM patienter än friska individer. Patienter med SMM visades också ha lägre halt BCMA än patienter med MM diagnos. Överlevnaden kunde även kopplas till proteinet. Patienter med lägre halt BCMA överlevde längre än patienter med högre halt (Ghermezi et al. 2017, 791). BCMA har en halveringstid på 24–36 timmar i blodet vilket är mycket snabbare än immunglobuliner, halveringstiden för IgG är 21 dagar. Således kan man snabbare bedöma hur en patient reagerar på olika behandlingar. BCMA visades också vara en effektiv metod för att följa upp patienter med asekretorisk MM som annars främst blivit tvungna att utsättas för upprepade benmärgsaspirat och benmärgsbiopsier samt radiologiska undersökningar (Ghermezi et al. 2017, 793).

I dagsläget används β 2-mikroglobulin och albumin vid uppföljningen av MM. β 2-mikroglobulin begränsas dock av försämrad njurfunktion eftersom det inte kan avlägsnas ur kroppen. Att följa med ändringen av koncentrationen av M-komponenten i elektrofores är även en bra markör för att bedöma sjukdomsförloppet (Ghermezi et al. 2017, 785). Metoden kan dock inte implementeras med patienter som har asekretorisk MM. BCMA kan vara ett bra alternativ till dessa metoder eftersom det inte är beroende på njurarnas funktion eller på utsöndringen av en M-komponent. Biomarkören ger MM-patienten viktig information om diagnos, prognos och uppföljning av sjukdomen (Ghermezi et al. 2017, 793).

5.3.5 Leukocyter som biomarkörer för riskbedömning vid MM

Tian et al. (2018, 1–2, 4) undersökte värdet för förhållandet mellan totala antalet lymfocyter (ALC) och monocyter (AMC) hos 285 MM patienter som nyligen blivit diagnostiserade för att se om det finns ett samband mellan värdet och prognos. Vid studien analyserades fullständig blodbild och andra diagnostiska laboratorieprover som kreatinin, kalcium och även β 2-mikroglobulin och LD. Alla patienter behandlades med nya läkemedel och genomgick autolog stamcellstransplantation förutsatt de kunde. Totala antalet lymfocyter

efter stamcellstransplantation spelar roll vid bedömning av prognos. Förhållandet totala antalet lymfocyter till totala antalet monocyter (LMR) kan anses som ett värde för styrkan av immunsystemet jämt mot immundysfunktion p.g.a. tumör. Studien visade att patienter med $LMR \leq 4,2$ hade hög halt LD, kreatinin, kalcium och $\beta 2$ -mikroglobulin och ett högre antal återfall, d.v.s. en sämre prognos, än patienter med $LMR > 4,2$. En stor fördel för analys av LMR är att det är billigt eftersom det kan räknas ut från den fullständiga blod bilden som ofta görs oberoende. LMR är ett simpelt index som reflekterar patientens immunförsvar och fungerar som en markör för prognosen för MM-patienter som fått behandling med nya läkemedel. (Tian et al. 2018, 5-6)

En liknande studie av Solmaz et al. (2018) undersökte trombocyt till lymfocyt värdet (PLR) hos 186 nyligen diagnostiserade MM patienter. Även neutrofila till lymfocyter (NLR) och monocyter till lymfocyter (MLR) undersöktes. MLR i denna studie är det inverterade värdet av LMR som undersöktes i den tidigare beskrivna studien. Syftet var att undersöka vilken roll dessa värden kan ha för överlevnaden av MM innan behandling inleds. Av patienternas prover analyserades fullständig blod bild, kalcium, laktatdehydrogenas, albumin, $\beta 2$ -mikroglobulin, sänka och C-reaktivt protein. Som kriterium för låg- och högriskpatienter användes ISS kriterier. PLR, NLR och MLR jämfördes mot dessa för att se om samband fanns.

Det fanns ingen betydelsefull skillnad i överlevnad mellan högt och lågt NLR eller MLR. Överlevnaden var dock längre hos patienter med högre PLR värde än lågt värde. I andra studier har högt PLR rapporterats som ett tecken på dålig prognos i både hematologiska och icke-hematologiska sjukdomar. Hos MM patienter har det visats vara tvärtom, lågt antal trombocyter eller lågt PLR är ett tecken på dålig prognos. I studien misstänks att lågt deltagande är orsaken till att NLR och MLR inte visade betydelse på överlevnaden hos MM patienter. Studien drar slutsatsen att PLR är en betydelsefull biomarkör för bedömningen av prognos och överlevnaden hos nydiagnostiserade MM-patienter. Det finns dock ännu oklarheter i PLR, NLR och MLR som biomarkörer (Solmaz et al. 2018).

6 Diskussion

Detta examensarbete har sammanställt laboratorieundersökningar som används vid MM och hur M-komponenten kan interferera vid analyser samt presenterat nya metoder för att följa med sjukdomsförloppet vid MM. Frågeställningarna var vilka laboratorieundersökningar används vid MM och vilka nya metoder finns det vid uppföljningen av multipelt myelom. Examensarbetet har också behandlat en del laboratorieundersökningar ur preanalytiskt perspektiv samt hur de påverkas av interferens från M-komponenten.

Examensarbetet har baserat sig på artiklar som hittas genom systematisk sökning i databaserna Pubmed, Medline, Cinahl, Ebsco och Google Scholar. Artiklar irrelevanta till ämnet och frågeställningarna har sållats bort och slutligen togs 17 vetenskapliga artiklar med i examensarbetet. Dessa artiklar finns sammanställda i Bilaga 1.

Trots att IMWG har sammanställt tydliga kriterier för diagnos finns det många olika laboratorieundersökningar som kan användas vid diagnostik och uppföljning av MM utöver de kriterier som ställts. Sammanställningen av laboratorieundersökningar är således inte så självklar. Att undersöka förekomsten av M-komponent är inte direkt ett kriterium för diagnos för MM trots att den är relativt enkel att undersöka och så starkt förknippas med sjukdomen. Vid MM-misstankar kan det vara väldigt bra att undersöka förekomsten av en M-komponent i ett tidigt skede. β 2-mikroglobulin är främst en undersökning som används vid uppföljning men är samtidigt bra att undersöka det redan vid diagnos för att ha ett utgångsvärde, på så sätt kan en läkare följa med utvecklingen av sjukdomen baserat på biomarkören.

M-komponenten kan störa olika analyser på olika sätt. I studien av Platzer et al. (2017) där det rapporterades att natrium och kalium inte gick att analysera var fallet väldigt konstigt eftersom andra MM patienters plasma även analyserades och där uppstod inga problem. Även fallet med gelen ovanför serum visar att M-komponenten kan ställa till oväntade problem. M-komponentens förmåga att i unika fall binda till antigen i olika analyser är ett intressant fenomen och även det är väldigt ovanligt. I fall där M-komponenten binder till reagens gäller det att fundera om resultatet kan stämma. Att köra om provet kommer ge samma resultat och på så sätt kan svaret verka trovärdigt. Det är svårt för laboratoriepersonalen att inse att det kan röra sig om interferens om man inte på förhand vet att det rör sig om prov från en MM-patient. En lösning, förutsatt att man inte ska analysera proteiner eller andra ämnen som kan påverkas, är att man gör som Platzer et al. rekommenderade, nämligen ultrafiltrera serum/plasma för att få bort de störande M-komponenterna.

Det utvecklas ständigt nya behandlingar för MM och många moderna läkemedel är av typen terapeutiska monoklonala antikroppar. Detta ger upphov till ett intressant problem där man vill undersöka M-komponenten, även den en antikropp, men kan bli störd av läkemedlet. Detta blir endast ett problem om patientens M-komponent är av samma isotyp som läkemedlet. Daratumumab som är av isotypen IgG kappa går alltså inte att skilja åt hos en patient med IgG kappa M-komponent. Av de olika metoderna som presenterats verkar MALDI-TOF MS lovande förutsatt att laboratoriet har tillgång till en sådan masspektrometer. Enda förutsättningen är att man känner till massan för läkemedlets antikroppar och patientens M-komponent. En LC-QTOF MS visades ha högre specificitet och lyckades skilja mellan terapeutiska antikroppar och M-komponenten i samtliga fall men masspektrometers dyra pris gör den tyvärr inte så attraktiv då laboratorier helt enkelt inte har råd att skaffa en. Immunfixation med antikroppar mot monoklonala läkemedel fungerar bra och är pålitligt men kräver för varje ny terapeutisk monoklonal antikropp en anti-antikropp. Detta leder till mer forskning där denna anti-antikropp måste utvecklas vilket i slutändan leder till större utgifter.

BCMA verkar vara en lovande biomarkör för prognos och riskbedömning vid MM. Metoden baseras på att man analyserar mängden B-celldignadsantigen i blodet. Biomarkörens korta halveringstid i kroppen samt att den inte är beroende av njurarnas funktion gör att analys av BCMA verkar vara en attraktiv metod. Metoderna baserade på förhållandet mellan leukocyter, monocyty:lymfocyt eller inverterat, samt trombocyt-lymfocytförhållandet verkar bra ur en ekonomisk synvinkel. Vore det möjligt att räkna ut ett värde som ger pålitlig och betydelsefull information om riskbedömning och överlevnad ur en analys som kan göras från fullständiga blodbilden skulle det vara bra. Forskningen har dock inte riktigt visat konsekventa resultat trots att konsensus verkar vara att metoden är pålitlig. Inom detta område krävs definitivt mer forskning med större deltagande innan generella slutsatser kan dras.

Denna studie har bidragit till en större förståelse för sjukdomsförloppet vid MM och laboratorieundersökningarna som används i samband med MM. M-komponenten spelar en viktig roll i de fall den förekommer. Som en av de första biomarkörerna är den ett tydligt tecken på en gammopati och är viktig att studera från diagnos till remission samt som uppföljning för att upptäcka om patienten fått återfall. Ett unikt problem uppstår då MM-patienter behandlas med monoklonala antikroppar och isotypen på läkemedlet och M-komponenten är den samma. Immunglobulinerna går inte att skilja på via traditionella metoder som elektrofores och immunfixation. Det har varit väldigt intressant att fördjupa sig

i hur forskare har försökt lösa detta problem på väldigt olika sätt. MALDI-TOF MS metoden är intressant och verkar lovande. Som förslag på vidare forskning rekommenderas att man sammanställer ett bibliotek över kurvorna för de olika läkemedel som används. Förhållandet mellan leukocytvärden är även ett intressant koncept för en biomarkör eftersom det är så simpelt då värdena fås från den fullständiga blodbilden. Frågan är hur tillförlitligt det kan vara och även här rekommenderas mer forskning med större antal deltagande.

7 Källförteckning

Anderson, K. C., Alsina, M., Atanackovic, D., Biermann, J. S., Chandler, J. C., Costello, C., Djulbegovic, B., Fung, H. C., Gasparetto, C., Godby, K., Hofmeister, C., Holmberg, L., Holstein, S., Huff, C. A., Kassim, A., Krishnan, A. Y., Kumar, S. K., Liedtke, M., Lunning, M., Raje, N., Singhal, S., Smith, C., Somio, G., Stockerl-Goldstein, K., Treon, S. P., Weber, D., Yahalom, J., Shead, D. A., Kumar, R., 2015. Multiple Myeloma, Version 2.2016: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 13(11), s. 1398-1435.

Bird, J. M., 2012. Investigating an incidental finding of a paraprotein. *BMJ*.

Caulton, S., 2013. *File:Serum protein electrophoresis normal and paraprotein.png*. [Online]

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=26930167> [Hämtat: 28.10.2019]

Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R. & Roitt, I. M., 2017. *Roitt's Essential Immunology*. 13:de red. Chichester: Wiley Blackwell.

Durer, C., Durer, S., Lee, S., Chakraborty, R., Malik, M. N., Rafae, A., Zar, M. A., Kamal, A., Rosko, N., Samaras, C., Valent, J., Chaulagain, C., Anwer, F., 2019. Treatment of relapsed multiple myeloma: Evidence-based recommendations. *Blood Reviews*, Volym In press.

Durie, B. G. M., Harousseau, J-L., Miguel, J.S., Blade, J., Barlogie, B., Anderson, K., Gertz, M., Dimopoulos, M., Westin, J., Sonneveld, P., Ludwig, H., Gahrton, G., Beksac, M., Crowley, J., Belch, A., Boccadaro, M., Turesson, I., Joshua, D., Vesole, D., Kyle, R., Alexanian, R., Tricot, G., Attal, M., Merlini, G., Powels, R., Richardson, P., Shimizu, K., Tosi, P., Morgan, G., Rajkumar, S. V., 2006. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 20(9), s. 1467–1473.

Fairfield, H., Falank, C., Avery, L. & Reagan, M. R., 2016. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1364(1), s. 32-51.

Gerecke, C., Fuhrmann, S., Striffler, S., Schmidt-Hieber, M., Einsele, H., Knop, S., 2016. The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma. *Deutsches Ärzteblatt International*, 113(27-28), s. 470-476.

Ghermezi, M., Li, M., Vardanyan, S., Harutyunyan, N. M., Gottlieb, J., Berenson, A., Spektor, T. M., Andreu-Vieyra, C., Petraki, S., Sanchez, E., Udd, K., Wang, C. S., Swift, R. A., Chen, H., Berenson, J. R., 2017. Serum B-cell maturation antigen: a novel biomarker to predict outcomes for multiple myeloma patients. *Haematologica*, 102(4), s. 785-795.

Hoffbrand, A. V. & Moss, P. A. H., 2016. *Essential haematology*. 7th ed. red. Chichester: Wiley-Blackwell.

- Hong, J. & Hoon Lee, J., 2016. Recent advances in multiple myeloma: a Korean perspective. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 31(5), s. 820-834.
- HUSLAB, 2018. *HUSLAB - tutkimusohjekirja*. [Online] <https://huslab.fi/ohjekirja/4828.html> [Hämtat: 24.9.2019]
- King, R. I. & Florkowski, C. M., 2010. How paraproteins can affect laboratory assays: spurious results and biological effects. *Pathology*, 42(5), s. 397-401.
- Kommunförbundet, 2017. *Nomenklatur för laboratorieundersökningar*. [Online] <https://www.kommunforbundet.fi/social-och-halsovard/informationshantering/nomenklaturer-och-klassifikationer/nomenklatur-laboratorieundersokningar> [Hämtat: 16.10.2019]
- Kyle, R. A. & Rajkumar, S. V., 2008. Multiple Myeloma. *Blood*, 111(6), s. 2962-2972.
- Lima-Oliveira, G., Volanski, W., Lippi, G., Picheth, G., Guidi, G. C., 2017. Pre-analytical phase management: a review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 77(3), s. 153-163.
- Maire, B. & Schlüter, K., 2017. A Problem with the Separating Gel in a Blood Sample Tube in a Patient with Multiple Myeloma. *Deutsches Ärzteblatt International*, 114(29-30), s. 507.
- McCudden, C., Axel, A. E., Slaets, D., Dejoie, T., Clemens, P. L., Frans, S., Bald, J., Plesner, T., Jacobs, J. F.M., van de Donk, N. W. C. J., Moreau, P., Schechter, J. M., Ahmadi, T., Sasser, A. K., 2016. Monitoring multiple myeloma patients treated with daratumumab: teasing out monoclonal antibody interference. *Clin Chem Lab Med*, 54(6), s. 1095-1104.
- Meißner, T., Seckinger, A., Hemminki, K., Bertsch, U., Foersti, A., Haenel, M., Duering, J., Salwender, H., Goldschmidt, H., Gareth, J. M., Hose, D., Weinhold, N., 2015. Profound impact of sample processing delay on gene expression of multiple myeloma plasma cells. *BMC Medical Genomics*, 8(85), s. 1-8.
- Mellqvist, U-H., 2019. *Myelom (multipelt myelom, myelomatos)*. [Online] <https://www.internetmedicin.se/page.aspx?id=691> [Hämtat: 4.9.2019]
- Michels, T. C. & Petersen, K. E., 2017. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *American Family Physician*, 95(6), s. 373-383.
- Mills, J. R., Kohlhagen, M. C., Willrich, M. A. V., Kourelis, T., Dispenzieri, A., Murray, D. L., 2018. A universal solution for eliminating false positives in myeloma due to therapeutic monoclonal antibody interference. *Blood*, 132(6), s. 670-672.
- Moore, L. M., Cho, S. & Thoren, K. L., 2019. MALDI-TOF mass spectrometry distinguishes daratumumab from M-proteins. *Clinica Chimica Acta*, 492(May 2019), s. 91-94.

- O'Connell, T. X., Horita, T. J. & Kasvari, B., 2005. Understanding and Interpreting Serum Protein Electrophoresis. *American Family Physician*, 71(1), s. 105-112.
- Palumbo, A., Avet-Loiseau, H., Oliva, S., Lokhorst, H. M., Goldschmidt, H., Rosinol, L., Richardson, P., Caltagirone, S., Lahuerta, J. J., Facon, T., Brinchen, S., Gay, F., Attal, M., Passera, R., Spencer, A., Offidani, M., Kumar, S., Musto, P., Lonial, S., Petrucci, M. T., Orłowski, R. Z., Zamagni, E., Morgan, G., Dimopoulos, M. A., Durie, B. G., Anderson, K. C., Sonneveld, P., San Miguel, J., Cavo, M., Rajkumar, S. V., Moreau, P., 2015. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *Journal of Clinical Oncology*, 33(26), s. 2863-2869.
- Perazella, M. A. & Finkel, K. W., 2016. Paraprotein-Related Kidney Disease: Attack of the Killer M Proteins.. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 11(12), s. 2256–2259.
- Platzer, V., Hebraud, B. & Caussé, E., 2017. Alternative process for quantifying Na⁺ and K⁺ electrolytes in plasma with high paraprotein concentration using an automated analyzer. *Clinical Biochemistry*, 50(9), s. 544-545.
- Putkonen, M. & Silvennoinen, R., 2015. Multippeli myelooma ja muut gammapatiat. i: K. Porkka, R. Lassila, K. Remes & E. Savolainen, red. *Veritaudit*. Helsinki: Duodecim.
- Rajkumar, S. V., 2018. Multiple Myeloma: 2018 update on Diagnosis, Risk-stratification. *American journal of hematology*, 93(8), s. 1091–1110.
- Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M. V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastritis, E., Richardson, P., Landgren, O., Paiva, B., Dispenzieri, A., Weiss, B., LeLeu, X., Zweegman, S., Lonial, S., Rosinol, L., Zamagni, E., Jagannath, S., Sezer, O., Kristinsson S. Y., Caers, J., Usmani, S. Z., Lahuera, J. J., Johnsen, H.E., Beksac, M., Cavo, M., Goldschmidt H., Terpos, E., Kyle, R. A., Anderson, K. C., Durie, B. G., Miguel, J. F., 2014. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*, 15(12), s. 538-548.
- Rajkumar, S. V. & Kumar, S., 2016. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc.*, 91(1), s. 101–119.
- Rich, R., Fleisher, T., Shearer, W., Schroeder, H., Frew, A., Weyand, C., 2018. *Clinical Immunology: Principles and Practice*. 5th Edition red. u.o.:Elsevier.
- Schjesvold, F. H., 2019. *Årsaker til myelomatose*. [Online] <http://oncolex.no/Myelomatose/Bakgrunn/Aarsaker> [Hämtat: 17.10.2019]
- Siitonen, T. & Koistinen, P., 2015. Verisolujen tuotanto ja sen säätely. i: K. Porkka, R. Lassila, K. Remes & E. Savolainen, red. *Veritaudit*. Helsinki: Duodecim.
- Sinisalo, M. & Laine, O., 2018. *Myelooma*. [Online] <https://www.terveysportti.fi/apps/ltk/ykt00388> [Hämtat: 4.9.2019]

- Solmaz, S., Uzun, O., Acar, C., Sevindik, O. G., Piskin, O., Ozsan, H. G., Demirkan, F., Undar, B., Alacacioglu, A., Ozcan, M. A., Alacacioglu, I., 2018. *Journal of Laboratory Physicians*, 10(4), s. 363-369.
- Štifter, S., Babarović, E., Valković, T., Seili-Bekafigo, I., Štemberger, C., Načinović, A., Lučin, K., Jonjić, N., 2010. Combined evaluation of bone marrow aspirate and biopsy is superior in the prognosis of multiple myeloma. *Diagnostic Pathology*, 5(30), s. 1-7.
- Tang, F., Malek, E., Math, S., Schmotzer, C. L., Beck, R. C., 2018. Interference of Therapeutic Monoclonal Antibodies With Routine Serum Protein Electrophoresis and Immunofixation in Patients With Myeloma: Frequency and Duration of Detection of Daratumumab and Elotuzumab. *American Journal of Clinical Pathology*, 150(2), s. 121-129.
- Tian, Y., Zhang, Y., Zhu, W-Q., Chen, X-L., Zhou, H-B., Chen, W-M., 2018. Peripheral Blood Lymphocyte-to-Monocyte Ratio as a Useful Prognostic Factor in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *BioMed Research International*, Volym 2018, s. 1-8.
- TYKS, 2019. *CD138-solujen eristys luuydinäytteestä*. [Online] <http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/index.php?test=13123> [Hämtat: 3.10.2019].
- Wei, A. & Juneja, S., 2003. Bone marrow immunohistology of plasma cell neoplasms. *Journal of Clinical Pathology*, 56(6), s. 406-411.
- Willman, A. & Stoltz, P., 2017. Metasyntes. i: M. Henricson, red. *Vetenskaplig teori och metod: Från idé till examination inom omvårdnad*. 2:1 red. Lund: Studentlitteratur.
- Willrich, M. A. & Katzmann, J. A., 2016. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54(6), s. 907-919.
- Wu, X-Y., Yin, Y-F., Teng, J-L., Zhang, L-W.,; Yang, C-D., 2017. IgMk paraprotein from gammopathy patient can bind to cardiolipin and interfere with coagulation assay: a case report. *BMC Immunology*, 18(1), s. 32.

Vetenskapliga artiklar i litteraturstudien.

- Anderson, K. C., Alsina, M., Atanackovic, D., Biermann, J. S., Chandler, J. C., Costello, C., Djulbegovic, B., Fung, H. C., Gasparetto, C., Godby, K., Hofmeister, C., Holmberg, L., Holstein, S., Huff, C. A., Kassim, A., Krishnan, A. Y., Kumar, S. K., Liedtke, M., Lunning, M., Raje, N., Singhal, S., Smith, C., Somio, G., Stockerl-Goldstein, K., Treon, S. P., Weber, D., Yahalom, J., Shad, D. A., Kumar, R., 2015. Multiple Myeloma, Version 2.2016: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 13(11), s. 1398-1435.
- Gerecke, C., Fuhrmann, S., Striffler, S., Schmidt-Hieber, M., Einsele, H., Knop, S., 2016. The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma. *Deutsches Ärzteblatt International*, 113(27-28), s. 470-476.
- Ghermezi, M., Li, M., Vardanyan, S., Harutyunyan, N. M., Gottlieb, J., Berenson, A., Spektor, T. M., Andreu-Vieyra, C., Petraki, S., Sanchez, E., Udd, K., Wang, C. S., Swift, R. A., Chen, H., Berenson, J. R., 2017. Serum B-cell maturation antigen: a novel biomarker to predict outcomes for multiple myeloma patients. *Haematologica*, 102(4), s. 785-795.
- Maire, B. & Schlüter, K., 2017. A Problem with the Separating Gel in a Blood Sample Tube in a Patient with Multiple Myeloma. *Deutsches Ärzteblatt International*, 114(29-30), s. 507.
- McCudden, C., Axel, A. E., Slaets, D., Dejoie, T., Clemens, P. L., Frans, S., Bald, J., Plesner, T., Jacobs, J. F.M., van de Donk, N. W. C. J., Moreau, P., Schechter, J. M., Ahmadi, T., Sasser, A. K., 2016. Monitoring multiple myeloma patients treated with daratumumab: teasing out monoclonal antibody interference. *Clin Chem Lab Med*, 54(6), s. 1095-1104.
- Meißner, T., Seckinger, A., Hemminki, K., Bertsch, U., Foersti, A., Haenel, M., Duering, J., Salwender, H., Goldschmidt, H., Gareth, J. M., Hose, D., Weinhold, N., 2015. Profound impact of sample processing delay on gene expression of multiple myeloma plasma cells. *BMC Medical Genomics*, 8(85), s. 1-8.
- Michels, T. C. & Petersen, K. E., 2017. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *American Family Physician*, 95(6), s. 373-383.
- Mills, J. R., Kohlhagen, M. C., Willrich, M. A. V., Kourelis, T., Dispenzieri, A., Murray, D. L., 2018. A universal solution for eliminating false positives in myeloma due to therapeutic monoclonal antibody interference. *Blood*, 132(6), s. 670-672.
- Moore, L. M., Cho, S. & Thoren, K. L., 2019. MALDI-TOF mass spectrometry distinguishes daratumumab from M-proteins. *Clinica Chimica Acta*, 492(May 2019), s. 91-94.
- Platzer, V., Hebraud, B. & Caussé, E., 2017. Alternative process for quantifying Na⁺ and K⁺ electrolytes in plasma with high paraprotein concentration using an automated analyzer. *Clinical Biochemistry*, 50(9), s. 544-545.

Rajkumar, S. V., 2018. Multiple Myeloma: 2018 update on Diagnosis, Risk-stratification. *American journal of hematology*, 93(8), s. 981–1114.

Rajkumar, S. V. & Kumar, S., 2016. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc.*, 91(1), s. 101–119.

Solmaz, S., Uzun, O., Acar, C., Sevindik, O. G., Piskin, O., Ozsan, H. G., Demirkan, F., Undar, B., Alacacioglu, A., Ozcan, M. A., Alacacioglu, I., 2018. Is the platelet-to-lymphocyte ratio a new prognostic marker in multiple myeloma?. *Journal of Laboratory Physicians*, 10(4), s. 363-369.

Tang, F., Malek, E., Math, S., Schmotzer, C. L., Beck, R. C., 2018. Interference of Therapeutic Monoclonal Antibodies With Routine Serum Protein Electrophoresis and Immunofixation in Patients With Myeloma: Frequency and Duration of Detection of Daratumumab and Elotuzumab. *American Journal of Clinical Pathology*, 150(2), s. 121-129.

Tian, Y., Zhang, Y., Zhu, W-Q., Chen, X-L., Zhou, H-B., Chen, W-M., 2018. Peripheral Blood Lymphocyte-to-Monocyte Ratio as a Useful Prognostic Factor in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *BioMed Research International*, Volym 2018, s. 1-8.

Willrich, M. A. & Katzmann, J. A., 2016. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54(6), s. 907-919.

Wu, X-Y., Yin, Y-F., Teng, J-L., Zhang, L-W.,; Yang, C-D., 2017. IgMk paraprotein from gammopathy patient can bind to cardiolipin and interfere with coagulation assay: a case report. *BMC Immunology*, 18(1), s. 32.