Wertigkeit der quantitativen β_2 -Mikroglobulin- und Paraprotein-Bestimmung im Serum von Patienten mit multiplem Myelom und Waldenströms Makroglobulinämie

P. C. Fink¹, F. Hittmann¹, I. Schedel²

¹ Abteilung Klinische Chemie I im Zentralklinikum im Zentrum Laboratoriumsmedizin der Medizinischen Hochschule

² Abteilung für Immunologie und Transfusionsmedizin im Zentrum Innere Medizin und Dermatologie der Medizinischen Hochschule Hannover

Zusammenfassung:

Serum β_2 -Mikroglobulin und Serum Paraproteine (SPPR) wurden bei 132 Patienten mit IgG-Myelom, 33 Patienten mit IgA-Myelom und 38 Patienten mit Waldenströms Makroglobulinämie (WM) mit einem kompetitiven Enzymimmunotest und einer kombinierten Anlage aus vollautomatischer Serumelektrophorese und ISC-Datensichtgerät Intercolor 8001 bestimmt.

Die ermittelten β_2 -Mikroglobulinkonzentrationen waren für Patienten mit IgG- oder IgA-Myelom und WM, verglichen zu gesunden Erwachsenen, signifikant ($p < 0,0005$) erhöht. Eine Korrelation zwischen Serum β_2 -Mikroglobulin und SPPR wurde weder bei den Patienten mit IgG- oder IgA-Myelom noch bei Patienten mit WM gefunden. Bei 40 Patienten mit Leberzirrhose und 10 Patienten mit chronischer Pyelonephritis wurden signifikant ($p < 0,025$, $p < 0,005$) erhöhte Mengen von β_2 -Mikroglobulin nachgewiesen. Die vorgelegten Ergebnisse lassen vermuten, daß β_2 -Mikroglobulin und SPPR die Krankheitsaktivität bei Patienten mit IgG- oder IgA-Myelom und WM beschreiben. β_2 -Mikroglobulin scheint zudem nützlich bei der Beurteilung der Nierenmanifestation dieser Grunderkrankungen zu sein. Die ebenfalls erhöhten Mengen von β_2 -Mikroglobulin bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Leberzirrhose und chronischer Pyelonephritis lassen β_2 -Mikroglobulin nicht als geeigneten Marker von lymphoproliferativen Erkrankungen erscheinen.

Schlüsselwörter:

β_2 -microglobulin – paraprotein – antibodydeficiencysyndrome – multiple myeloma – macroglobulinaemia Waldenström

Summary:

Serum β_2 -microglobulin and serum paraproteins (SPPR) were determined in 132 patients with IgG myeloma, 33 patients with IgA myeloma and, 38 patients with Waldenström's macroglobulinaemia (WM) using a competitive enzyme-immunoassay and a fully automated serum electrophoresis system connected on line via RS-232C to a microprocessor-based terminal which displayed the electropherogram.

The measured β_2 -microglobulin concentrations were significantly ($p < 0.0005$) increased for patients with IgG- or IgA-myeloma and WM compared to the control group of healthy adults. No correlation was found between serum β_2 -microglobulin and SPPR for the respective patient groups. For 40 patients with liver cirrhosis and 10 patients with chronic pyelonephritis significantly ($p < 0.025$, $p < 0.005$) increased amounts of β_2 -microglobulin were found respectively. The results suggest, that β_2 -microglobulin is a useful tool in order to evaluate the kidney manifestation of multiple myeloma or WM. The likewise increased amounts of β_2 -microglobulin in chronic inflammatory diseases e.g. liver cirrhosis and chronic pyelonephritis limit β_2 -microglobulin as an adequate marker for lymphoproliferative disorders.

Keywords:

β_2 -microglobulin – paraprotein – antibody deficiency syndrome – multiple myeloma – macroglobulinaemia Waldenström

Einleitung

Serum β_2 -Mikroglobulin und Paraproteine dienen bei Patienten mit multiplem Myelom (MM) und Waldenströms Makroglobulinämie (WM) zur Verlaufskontrolle (1, 2). Neben den beiden Parametern produzieren die Tumorzellen einen Plasmozytom-Faktor, der auf Monozy-

ten einwirkt (3, 4). Die von Monozyten vermittelte Suppression der polyklonalen Immunglobulinproduktion führt neben anderen Mechanismen zum Antikörpermangel. Der humorale Immundefekt zeigt sich klinisch durch interkurrente Infektionen der Atemwege und ableitenden Harnwege (5-7). Bei ca. 50% der Patienten stellen die infektiösen Komplikationen die Todesursache dar (8).

Serum β_2 -Mikroglobulin dient auch als labormedizinische Hilfestellung bei der prognostischen Bewertung von entzündlichen Leber- und Nierenerkrankungen (9–11).

Zweck dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob bei MM Patienten und WM Patienten mit und ohne Antikörpermangelsyndrom, die Serumkonzentrationen von β_2 -Mikroglobulin und von Paraproteinen als Ausdruck der Tumoraktivität korrelieren. Serum β_2 -Mikroglobulin wurde bei Patienten mit Leberzirrhose und bei Patienten mit chronischer Pyelonephritis zur Kontrolle mitbestimmt.

Material und Methoden

Blutproben

Blutproben wurden durch Venenpunktion von 119 Gesunden, von 132 Patienten mit MM und IgG-Paraproteinämie, von 33 Patienten mit MM und IgA-Paraproteinämie, von 38 Patienten mit MM, von 40 Patienten mit biotisch gesicherter Leberzirrhose und von 10 Patienten mit durch i.v.-Pyelogramm, Proteinurie $< 0,3$ g/l, Leukozyturie > 4 Zellen/Gesichtsfeld, gesicherter, chronischer Pyelonephritis, gewonnen. Für die gesunden Individuen war die Altersspanne: 22–42 Jahre, die Geschlechterverteilung: Männer/Frauen = 3/2. Dieser Personenkreis unterstand einer regelmäßigen ärztlich-medizinischen Kontrolle; das Hämogramm (Erythrozyten-, Leukozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit) sowie die Meßwerte für Aspartat-Aminotransferase, Alanin-Aminotransferase und γ -Glutamyltranspeptidase lagen im Referenzbereich. Hepatitis B-Antigen (HBs) und Anti-HBs-Antikörper waren in den Blutproben Gesunder nicht nachweisbar.

Nach Ablauf des Gerinnungsvorganges wurden die Proben für 20 min bei 20°C und $1900 \times g$ zentrifugiert. Alle Seren wurden bei -60°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Zur Überprüfung der Nierenfunktion wurden bei allen Blutproben die Bestimmung der Serumkreatinin- und Harnstoffkonzentrationen mit dem SMAC-System (Technicon) durchgeführt (12–14).

Bestimmung von β_2 -Mikroglobulin

Der Phadezym® β_2 -Mikrotest (Deutsche Pharmacia) wurde unter Verwendung des Mikro ELISA-Analysators, Modell EIA-PR 50 (Corning) in Polystyrenküvetten (EIA cuvette paks, Corning) durchgeführt. Für den kompetitiven Enzymimmunoassay wurden zum Konjugat (*Escherichia coli* β -Galactosidase markiertes β_2 -Mikroglobulin) (25 μl) verdünnte Serumproben (25 μl) (Verdünnungsmittel: $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0,067 mol/l, pH 7,5) und Sephadex®-Material (25 μl), das mit Anti- β_2 -Mikroglobulin beschichtet war, pipettiert. Nach vorsichtigem Durchmischen inkubierte der Reaktionsansatz für 60 min bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurde das Gemisch mit $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (500 μl) 4mal gewaschen, um in der Lösung verbliebenes, ungebundenes β_2 -Mikroglobulin zu entfernen. Nach Zugabe des Substrates (o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid, Sigma) (100 μl) wurde der Reaktionsansatz auf einem Rüttler gemischt und für 60 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Farbstoffbildung wurde mit Natriumcarbonat (0,4 mol/l; 500 μl) beendet. Die Intensität der Farbreaktion wurde durch Absorptionsphotometrie bei 405 nm gemessen. Die Konzentration von Serum β_2 -Mikroglobulin in der Probe verhielt sich umgekehrt proportional zum gebundenen Konjugat. Für jeden Versuchsansatz wurde eine Eichkurve mit β_2 -Mikroglobulin Standardlösungen (500,

200, 75, 25, 10 $\mu\text{g/l}$) angelegt sowie Präzisionskontrollen (Phadebas Richtigkeitskontrollserum: Chargen Nr.: 8949 E) mitgeführt. Die Extinktionswerte der Proben wurden mit denen der Eichgeraden verglichen und die Konzentrationen von β_2 -Mikroglobulin in mg/l angegeben.

Berechnung der Serum-Paraprotein-(SPPR)-Konzentration

Die Seren von Patienten mit MM und WM wurden mit dem vollautomatischen Mikroprozessor-gesteuerten Olympus-Hite-System (Olympus) fraktioniert (15). Die digitalisierten Kurvenwerte und die Relativprozentsätze wurden seriell über eine RS-232C-Schnittstelle am Olympus-Hite-System im on-line-Verfahren zum ISC-Datensichtgerät (Intecolor 8001) übertragen. Die aufgenommenen Werte wurden analogisiert, zum ursprünglichen Kurvenzug aufbereitet und waren als Elektropherogramm auf dem Bildschirm dargestellt, ebenso die Relativprozentsätze der jeweiligen Proteinfaktionen. Das Flächenstück unterhalb des monoklonalen Peaks, das dem polyklonalen Anteil der Gammaglobuline entsprach, wurde vom Flächenstück des monoklonalen Peaks mit einem Lichtgriffel abgegrenzt (Abb. 1). Nach Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im Serum mit der Biuret-Reaktion (16) wurde der Meßwert off-line in das ISC-Datensichtgerät eingegeben. Der monoklonale Peak wurde als relativer Anteil des Flächenintegrals der Gesamtfläche unter der Kurve mittels Planimetrie ermittelt und über die Beziehung

$$\frac{\text{Gesamtprotein (g/l)} \times \text{Flächenstück vom SPPR}}{\text{Gesamtfläche Kurvenzug}} = \text{SPPR}$$

g/l als SPPR-Konzentration angegeben (17).

Zur Abschätzung der Nachweisgrenze von SPPR wurde IgG-Paraprotein aus dem Serum eines Patienten mit IgG-Myelom isoliert. Eine grobe gamma-Globulinfraktion wurde nach 2maliger Fällung mit 50% Ammoniumsulfat erhalten (18). Das End-Präzipitat wurde in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, 0,1 mol/l, pH 7,4) (1/3 vom Serum-Ausgangsvolumen) gelöst und über die Nacht gegen 5 l PBS dialysiert. Der IgG-Peak wurde durch Elution mit PBS (Fließgeschwindigkeit 19 ml/h) von einer DEAE-Sephadex A50 Säule (2,6 $\times$ 46 cm, Bett-höhe 40 cm) (Deutsche Pharmacia) mit Hilfe eines Fraktionensammlers (LKB Ultrarac II 2070) erhalten (19, 20). Die Bestimmung des Proteingehaltes der Eluate erfolgte

Abb. 1: Quantitative Bestimmung des Serum-Paraproteins. Das Pherogramm auf dem ISC-Datensichtgerät sowie die Abgrenzung des Flächenstückes mit dem Lichtgriffel, das dem monoklonalen Peak entspricht, ist dargestellt

photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm (LKB, Uvicord S 2138, Absorptionsbereich: 0,1). Die Fraktionen des IgG-Peaks wurden in Minicon-B 15 Mikrokonzentratoren (Amicon) eingeeengt. Die Gesamtproteinkonzentration des Konzentrates wurde mit der Biuret-Reaktion bestimmt.

Die Reinheit der isolierten SPPR-Fractionen wurde immunoelektrophoretisch unter Verwendung von polyspezifischem Kaninchen-Antiserum gegen Human-Serum (Behringwerke) und monospezifischem Kaninchen-Antiserum gegen Human-IgG (γ -Kette) (Behringwerke) überprüft.

Anschließend wurden ein Normalserum und ein hypogammaglobulinämisches Serum mit SPPR-Verdünnungen (von 1/2 bis 1/20; Verdünnungsmittel: PBS) aufgestockt und die Wiederfindungsrate der in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit homogenen SPPR-Moleküle mit dem ISC-Datensichtgerät bestimmt.

Die Bestimmung der Immunglobulin-Klasse der Paraproteine wurde in der Abteilung für Immunologie und Transfusionsmedizin (Leiter Prof. Dr. H. Deicher) an der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Bestimmung von IgG, IgA, IgM mit der kinetischen Nephelometrie

Die Quantifizierung von IgG, IgA und IgM in Seren von Patienten mit MM und WM wurde mit dem Beckman Immunochemistry System (Analyzer 662401) unter Verwendung von monospezifischem Ziegen-Antikörper gegen humanes IgG, IgA, IgM (Beckman) durchgeführt (21).

Ein Antikörpermangel wurde, entsprechend den Osserman-Kriterien (6, 25), angenommen, wenn bei Patienten mit IgG- oder IgA-Myelom die Serum-IgM-Konzentration $<0,6$ g/l bei Patienten mit WM die Serum-IgG- und -IgA-Konzentrationen <8 g/l, $<0,9$ g/l waren.

Statistik

Die Auswertung der Meßwerte erfolgte unter Verwendung statistischer Methoden, die bei Büttner (22) und Haeckel (23, 24) beschrieben sind. Für die Bestimmung der Präzision der Ergebnisse in der Serie und von Tag zu Tag wurden Mittelwert ($\bar{x}$), Standardabweichung (1 s) und Variationskoeffizient (VK) berechnet. Zur Beurteilung der Signifikanz der Unterschiede von Testergebnissen wurde der Student's t-Test (Signifikanzniveau: $p < 0,05$) bei nicht gepaarten Daten durchgeführt. Als Maß für den Zusammenhang zweier Meßwerte wurde der Korrelationskoeffizient (r) (Signifikanzniveau für die Differenz des Korrelationskoeffizienten von Null 2 $p < 0,05$) berechnet sowie die lineare Regressionsanalyse durchgeführt.

Ergebnisse

β_2 -Mikroglobulin

Der Variationskoeffizient für die Präzision in der Serie betrug für das Kontrollserum 5,6% und für das Normalserum 4,2%. Für die Seren von Patienten mit MM und IgG-Paraproteinämie schwankten die Variationskoeffizienten zwischen 5,5% und 7,9%. Der Variationskoeffizient für die Präzision von Tag zu Tag erreichte für das Kontrollserum 7,5% und für das Normalserum 8,2%. Für die Seren von Patienten mit MM und IgG-Paraproteinämie lagen die Variationskoeffizienten zwischen 7,2% und 8,8% (Tab. 1).

Eine Übersicht der ermittelten β_2 -Mikroglobulinwerte für gesunde Erwachsene, Patienten mit MM, WM, Leberzirrhose und chronischer Pyelonephritis zeigt Abb. 2. Die Mittelwerte für β_2 -Mikroglobulin waren im Vergleich zu denen von 119 gesunden Erwachsenen ($\bar{x} = 1,437 \pm 0,396$ mg/l), bei 132 Patienten mit IgG-Myelom ($\bar{x} = 3,734 \pm 3,256$ mg/l), sowie bei 33 Patienten mit IgA-Myelom ($\bar{x} = 18,291 \pm 33,964$ mg/l) und bei 38 Patienten mit WM ($\bar{x} = 4,287 \pm 33,749$ mg/l) signifikant ($p < 0,0005$) erhöht. Auffällig war die große Spannweite (1,23–148 mg/l) der β_2 -Mikroglobulinwerte bei Patienten mit MM und IgA-Paraproteinämie. Verglichen mit

Tab. 1: Präzisionsdaten von β_2 -Mikroglobulin ermittelt mit dem β_2 -Mikroenzymimmunoassay

	Kontrollserum	Normalserum	pathologische Seren		
			A	B	C
$\bar{x}$	1,493	1,345	3,708	9,525	37,600
VK	5,6	4,2	7,9	6,8	5,5
n	10	10	10	10	10

Präzision von Tag zu Tag

	Kontrollserum	Normalserum	pathologische Seren		
			A	B	C
$\bar{x}$	1,567	1,373	3,343	9,725	35,700
VK	7,5	8,2	8,8	7,2	8,0
n	6	10	10	10	10

$\bar{x}$: Mittelwert in mg/l; VK: Variationskoeffizient in %; n: Anzahl der Bestimmungen bzw. Anzahl der Tage

Abb. 2: Bestimmung von β_2 -Mikroglobulin bei gesunden Erwachsenen und verschiedenen Patientengruppen mit dem β_2 -Mikroenzymimmunoassay. Mittelwerte (.....) und Standardabweichungen (—) sind angegeben

119 gesunden Erwachsenen, deren Serumkreatinin- und Harnstoffkonzentrationen im Referenzbereich (Kreatinin $< 115 \mu\text{mol/l}$, Harnstoff: 3,3–6,7 mmol/l) lagen, zeigten 22/132 Patienten mit IgG-Myelom, 13/33 Patienten mit IgA-Myelom und 4/38 Patienten mit WM erhöhte Serumkreatinin- (von 117 bis 1008 $\mu\text{mol/l}$) und Harnstoffkonzentrationen (von 6,9 bis 60,9 mmol/l).

Bei der Korrelation zwischen β_2 -Mikroglobulin und Serumkreatinin für die Patienten mit IgG- oder IgA-Myelom und WM ergaben sich Korrelationskoeffizienten von $r = 0,59$, $r = 0,95$, $r = 0,78$. Hohe β_2 -Mikroglobulinwerte wurden bei 2 Patienten mit IgG-Myelom ($> 19 \text{ mg/l}$) und bei 5 Patienten mit IgA-Myelom ($> 40 \text{ mg/l}$) gefunden, deren Serumkreatininkonzentrationen $> 400 \mu\text{mol/l}$ waren.

Im Vergleich zum Kontrollkollektiv wurden signifikant erhöhte Mittelwerte für β_2 -Mikroglobulin bei 40 Patienten mit Leberzirrhose ($\bar{x} = 2,13 \pm 1,5 \text{ mg/l}$; $p < 0,025$) und bei 10 Patienten mit chronischer Pyelonephritis ($\bar{x} = 6,37 \pm 2,86 \text{ mg/l}$; $p < 0,005$) gefunden. Bei 8/40 Patienten mit Leberzirrhose und 10/10 Patienten waren die Serumkreatinin- (117–1053 $\mu\text{mol/l}$) und Harnstoffkonzentrationen (6,8–13,4 mmol/l) ebenfalls erhöht. Bei den Patienten mit Leberzirrhose und chronischer Pyelonephritis betrugen die Korrelationen zwischen β_2 -Mikroglobulin und Serumkreatinin $r = 0,79$ und $r = 0,81$. Ein Patient mit Leberzirrhose und hohem β_2 -Mikroglobulin (9,32 mg/l) hatte ein erhöhtes Serumkreatinin (291 $\mu\text{mol/l}$).

Paraproteine

Die Variationskoeffizienten für die Präzision in der Serie von SPPR lagen bei den Patienten (A, B, C) mit MM und IgG-Paraproteinämie zwischen 0,5% und 1,85% (Tab. 2).

Tab. 2: Präzisionsdaten in der Serie für die Bestimmung von Serum Paraprotein bei drei Patienten (A, B, C) mit multiplen Myelom und IgG-Paraproteinämie mit dem ISC-Datensichtgerät

	Patienten		
	A	B	C
$\bar{x}$	3	33	48
VK	0,5	1,57	1,85
n	12	9	20

$\bar{x}$: Mittelwert in mg/l; VK: Variationskoeffizient in %; n: Anzahl der Serumelektropherogramme

Tab. 3: Wiederfindungsrate für IgG-Serum Paraprotein (SPPR) beim Normalserum (NS) und hypogammaglobulinämisches Serum (HS)

zugesetztes IgG-SPPR (g/l)	wiedergefundenes IgG-SPPR (g/l)		Wiederfindungsrate (%)	
	NS	HS	NS	HS
5,500	5,50	5,20	100,0	94,5
2,750	2,80	2,78	101,8	101,1
1,830	1,80	1,793	98,4	97,4
1,375	1,30	1,39	94,5	101,1
1,100	1,10	1,05	100,0	95,5
0,917	0,91	0,35	99,2	92,7
0,786	0,78	0,65	99,2	82,7
0,550	0,55	0,38	100,0	69,1
0,375	—	—	—	—

Der Variationskoeffizient für die Präzision von Tag zu Tag ($n = 10$) erreichte bei Patientenserum C 2,64%.

Bei den Aufstockversuchen mit immunoelektrophoretisch reinem IgG-SPPR (Abb. 3), dessen Gesamtproteinkonzentration 11 g/l betrug, wurde eine Wiederfindungsrate beim Normalserum (IgG: 15,0 g/l, IgA: 3,5 g/l, IgM: 2,1 g/l) von 98,4% bis 101,8% und beim hypogammaglobulinämischen Serum (IgG: 4,1 g/l, IgA: 0,3 g/l, IgM: 0,3 g/l) von 69,1% bis 101,1% ermittelt (Tab. 3). Unter den gegebenen Bedingungen war IgG-SPPR bis zu einer Konzentration von 0,55 g/l nachweisbar.

Eine Korrelation zwischen den Konzentrationen von β_2 -Mikroglobulin und SPPR wurde weder bei Patienten mit IgG- oder IgA-Myelom noch bei Patienten mit WM gefunden (Abb. 4–6).

Antikörpermangelsyndrom

Die Bestimmung von IgG, IgA und IgM zeigte bei 76/132 Patienten mit IgG-Myelom (Serum-IgM $< 0,6 \text{ g/l}$), bei 24/33 Patienten mit IgA-Myelom (Serum-IgM $< 0,6 \text{ g/l}$) sowie bei 26/38 Patienten mit WM (Serum-IgG $< 8,0 \text{ g/l}$, Serum-IgA $< 0,9 \text{ g/l}$) einen Antikörpermangel.

Abb. 3: Immunelektropherogramm von isolierten IgG-Paraprotein (a) nach Ammoniumsulfat-Präzipitation und DEAE-Sephadex A-50 Chromatographie, (b) polyspezifisches Kaninchenantiserum gegen Humanserum (c) monospezifisches Kaninchenantiserum gegen Human IgG

Abb. 4: Korrelation zwischen Serum IgG-Paraprotein (SPPR g/l) und β_2 -Mikroglobulin (mg/l) bei Patienten mit multiplen Myelom. Lineare Regressionsanalyse: Steigung = 0,041; Schnittpunkt = 2,903; $R = 0,267$; SPPR-Bereich (g/l) = 1–100; β_2 -Mikroglobulin-Bereich (mg/l) = 0,1–21; $n = 132$

Abb. 5: Korrelation zwischen Serum IgA-Paraprotein (SPPR g/l) und β_2 -Mikroglobulin (mg/l) bei Patienten mit multiplem Myelom. Lineare Regressionsanalyse: Steigung = 1,164; Schnittpunkt = 1,425; $R = 0,401$; SPPR-Bereich (g/l) = 1–49; β_2 -Mikroglobulin-Bereich (mg/l) = 1,23–148; $n = 33$

Abb. 6: Korrelation zwischen Serum IgM-Paraprotein (SPPR g/l) und β_2 -Mikroglobulin (mg/l) bei Patienten mit Morbus Waldenström. Lineare Regressionsanalyse: Steigung = 0,012; Schnittpunkt = 4,145; $R = 0,054$; SPPR-Bereich (g/l) = 1–77; β_2 -Mikroglobulin-Bereich (mg/l) = 1,075–16; $n = 38$

Diskussion

β_2 -Mikroglobulin ist ein Polypeptid mit der Molekülmasse von 11 800 Dalton (26). Es wurde erstmals aus dem Urin von Patienten mit tubulärer Proteinurie isoliert (26). In geringen Mengen kommt es im Urin, Plasma und Liquor cerebrospinalis gesunder Erwachsener vor (26). Als Bestandteil von Histokompatibilitätsantigenen (HLA) wurde β_2 -Mikroglobulin als kleinere Untereinheit an Zellmembranen von Leukozyten und anderen kernhaltigen Zellen gefunden (27). Sein struktureller Aufbau ähnelt weitgehend der CH_3 -Domäne der schweren γ_1 -Kette vom Immunglobulin G (28).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung von β_2 -Mikroglobulin mit einem kompetitiven Enzymimmunoassay durchgeführt. Dieses Verfahren hatte gegenüber dem bislang verwendeten β_2 -Mikroglobulin Radioimmunoassay (29, 30) den Vorteil, daß eine Strahlenexposition durch Radionuklide nicht stattfindet. Die Präzision der Bestimmung von β_2 -Mikroglobulin war in dem Bereich, der den Empfehlungen der klinischen Chemie für analytische Methoden entsprach (23, 31). In Überein-

stimmung mit anderen Autoren (1, 32, 33) zeigen die präsentierten Ergebnisse erhöhte β_2 -Mikroglobulinkonzentration für die Patienten mit IgG- oder IgA-Myelom verglichen mit gesunden Erwachsenen. Es wird vermutet, daß die erhöhte Menge von β_2 -Mikroglobulin die unkontrollierte Proliferation des differenzierenden B-Tumorzellklons, der abnorme Plasmazellen und Lymphozyten verschiedener Reifungsstadien umfaßt (34), reflektiert. Da β_2 -Mikroglobulin auf Lymphozytenmembranen von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie, einer B-Zell-Neoplasie, nachgewiesen und von Immunglobulin produzierenden Lymphozytenlinien in das Kulturmedium sezerniert wurde, erscheint diese Annahme als sehr wahrscheinlich (35–37).

Bei 16,6% (22/132) der Patienten mit IgG-Myelom und 40,6% (13/33) der Patienten mit IgA-Myelom wurden erhöhte Serumkreatinin- und Harnstoffkonzentrationen gleichzeitig mit einer erhöhten Menge von β_2 -Mikroglobulin beobachtet.

Da β_2 -Mikroglobulin physiologischerweise glomerulär filtriert, von den Tubuluszellen reabsorbiert und katabolisiert wird (26), wurden bei den Patienten mit Azotämie die erhöhte Serum- β_2 -Mikroglobulinkonzentration auf die verminderte renale Elimination bei Nierenmanifestation vom MM zurückgeführt (38, 39). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung bestätigt, daß 2 Patienten mit IgG-Myelom und 5 Patienten mit IgA-Myelom bei hohem Serumkreatinin ($> 400 \mu\text{mol/l}$) hohe β_2 -Mikroglobulinwerte ($> 19 \text{ mg/l}$, $> 40 \text{ mg/l}$) aufwiesen.

Bei Patienten mit WM wurde ebenfalls eine erhöhte Menge von Serum β_2 -Mikroglobulin gefunden. Da bei WM, ähnlich wie beim MM, ein maligner Klon von B-Lymphozyten zu Immunglobulin-sezernierenden Zellen differenziert und diese mit dem Progreß der Erkrankung im peripheren Blut erscheinen (40), ist es denkbar, daß erhöhtes β_2 -Mikroglobulin eine leukämische Reaktion begleitet.

Bei 10,5% (4/38) der Patienten mit WM lagen erhöhte Serumkreatininkonzentrationen vor, so daß eine renale Beteiligung an der β_2 -Mikroglobulin-Erhöhung zu berücksichtigen wäre.

Die Berechnung der SPPR-Konzentration wurde mit Hilfe einer kombinierten Anlage aus vollautomatischer Serumfraktionierung am Olympus-Hite-System und on-line Erfassung auf dem ISC-Datensichtgerät durchgeführt. Im Vergleich zur manuellen Planimetrie, die großen Fehlern unterworfen ist, bietet die aktuelle Methode die Möglichkeit einer raschen und zuverlässigen SPPR-Bestimmung. Trotz der guten Präzisionsdaten handelt es sich um eine approximative SPPR-Berechnung, da der Anteil von SPPR unterhalb der mit dem Lichtgriffel durchgeführten Abgrenzungslinie in den jeweiligen Proteinfractionen unbekannt ist (Abb. 1). Dies könnte einerseits zu einer Unterschätzung der tatsächlich vorhandenen Mengen an SPPR beitragen.

Andererseits könnte die Expertise des Untersuchers eine Rolle spielen, wenn auf dem Elektropherogramm jene Stelle mit dem Lichtgriffel markiert wird, an der sich der monoklonale Peak aus den Globulinfractionen heraushebt. Dieser Tatsache steht aber die bereits angeführte gute Präzision und die Wiederfindungsrate von reinem IgG-SPPR im Normalserum und hypogammaglobulinämischem Serum gegenüber. Bei der Beurteilung der Nachweisgrenze ist zu berücksichtigen, daß im vorliegenden Fall der Nachweis von SPPR bis zu 0,55 g/l gelang. In Abhängigkeit von der Form des monoklonalen Peaks ist

es vorstellbar, daß in günstigen Fällen die Nachweisgrenze sogar unter dem Wert von 0,55 g/l liegen kann.

Eine Korrelation zwischen den Konzentrationen von Serum β_2 -Mikroglobulin und SPPR wurde weder bei Patienten mit IgG- oder IgA-Myelom noch bei Patienten mit WM gefunden. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit Norfolk et al. (1), die β_2 -Mikroglobulin mit einem Radioimmunotest und SPPR mit manueller Planimetrie bestimmten. Eine Erklärung für das Fehlen einer Korrelation könnte sein, daß die Syntheserate von SPPR, die bei Tumorzellen in vitro als eine konstante Syntheseleistung von 2,5–35 pg/Tumorzelle/Tag aufgezeigt wurde (41, 42), unabhängig von der Synthese- und Sekretionsrate von β_2 -Mikroglobulin ist. Darüber hinaus könnten Veränderungen der renalen Elimination von β_2 -Mikroglobulin und unterschiedliche Abbauraten von SPPR, die bei IgG₁, IgG₂ und IgG₄ von der Serumkonzentration abhängig, bei IgG₃, IgA und IgM von der Serumkonzentration unabhängig sind, eine Rolle spielen (2, 43).

Bei Patienten mit MM, deren klinische Stadieneinteilung nach den Kriterien von Durie und Salmon (42) erfolgte, vermuteten Cassuto et al. (33) und Norfolk et al. (1) eine lineare Beziehung zwischen der Menge von β_2 -Mikroglobulin und der Größe der Tumormasse. Da jedoch in den Arbeiten Angaben über statistische Methoden fehlen, ist die Annahme einer Relation aus unserer Sicht unzureichend begründet.

Auch in der Arbeit von Vercelli et al. (32), die einen ähnlichen Vergleich anstellten, zeigt das Diagramm keine Korrelation zwischen β_2 -Mikroglobulin und Tumormasse. Die Frage, ob eine lineare Beziehung zwischen β_2 -Mikroglobulin und Tumormassen-Index (42, 44) besteht, ist zur Zeit ungelöst. Anhand von größeren Fallzahlen, wie sie in dieser Arbeit vorgelegt wurden, sollten zukünftig Untersuchungen mittels deskriptiver Statistik Aufschluß darüber geben.

Bei Patienten mit Leberzirrhose wurde im Vergleich zu gesunden Erwachsenen ein erhöhter Mittelwert für β_2 -Mikroglobulin gefunden. Ähnliche Beobachtungen wurden von Beorchia et al. bei Patienten mit Leberzirrhose sowie bei Patienten mit akuter viraler Hepatitis und chronisch aggressiver Hepatitis gemacht (9, 11). In Übereinstimmung mit dieser Autorengruppe wird vermutet, daß eine erhöhte Menge von β_2 -Mikroglobulin die Aktivierung phagozytierender und lymphoider Zellen im retikuloendothelialen System widerspiegelt. Als Stimulatoren für die gesteigerte Synthese- und Umsatzrate von β_2 -Mikroglobulin an HLA-Antigen-positiven Zellmembranen (45), dürften dabei Endotoxine gramnegativer Enterobakterien verantwortlich sein (21, 45, 46).

Patienten mit chronischer Pyelonephritis zeigten im Vergleich zu gesunden Erwachsenen erhöhte β_2 -Mikroglobulinkonzentrationen in Abhängigkeit von der Serumkreatininkonzentration. Diese Beobachtung könnte einerseits auf die eingeschränkte glomeruläre Filtrationsrate hindeuten, da Wibell et al. (10) ebenso eine β_2 -Mikroglobulinerhöhung bei anderen entzündlichen Nierenerkrankungen mit eingeschränkter Kreatinin-Clearance aufzeigten. Andererseits liegen Befunde im Tierexperiment und in klinischen Arbeiten vor, die eine Antigen-Persistenz bakterieller Zellwandbestandteile im pyelonephritisch veränderten sterilen Nierengewebe noch Monate nach der Infektion angeben (48).

Dabei könnte analog zu den mit *Escherichia coli* oder Lipopolysacchariden induzierten Pyelonephritiden im

Kaninchen (49, 50), die durch massive interstitielle Leukozyteninfiltrationen charakterisiert sind, die lokale Aktivierung von T- und B-Zellen zur Serum β_2 -Mikroglobulinerhöhung beitragen.

Schlußfolgernd ist zu erwähnen, daß β_2 -Mikroglobulin und SPPR die Krankheitsaktivität bei Patienten mit IgG- oder IgA-Myelom und WM beschreiben. β_2 -Mikroglobulin scheint zudem nützlich bei der Beurteilung der Nierenmanifestation dieser Grunderkrankungen zu sein. Es stellt einen „Marker“ mit geringer Spezifität für lymphoproliferative Erkrankungen dar, zumal erhöhte Mengen von β_2 -Mikroglobulin bei chronischen entzündlichen Erkrankungen wie z.B. Leberzirrhose und chronische Pyelonephritis nachgewiesen wurden. Serum β_2 -Mikroglobulinerhöhungen reflektieren vielmehr die unkontrollierte Proliferation lymphoider Zellen sowie deren Aktivierung bei chronischen entzündlichen Erkrankungen.

Danksagung:

Diese Arbeit wurde durch die Sachbeihilfe Fi 281/3-3 der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Schrifttum:

1. NORFOLK, D., CHILD, J. A., COOPER, E. H. KERRISH, S., MILFORD WARD, A.: Serum β_2 -microglobulin in myelomatosis: Potential value in stratifying and monitoring. *Br. J. Cancer* 39, 510–515 (1979).
2. SALMON, S. E.: Immunoglobulin synthesis and tumor kinetics of multiple myeloma. *Semin. Hematol* 10, 135–147 (1973).
3. BRODER, S., HUMPHREY, R., DURM, M., BLACKMANN, M., MEADE, B., GOLDMANN, C., STROBER, W., WALDMANN, T.: Impaired synthesis of polyclonal (non-paraprotein) immunoglobulins by circulating lymphocytes from patients with multiple myeloma: Role of suppressor cells. *N. Engl. J. Med.* 293, 887–892 (1975).
4. ZOLLA PAZNER, S.: Immunodeficiency induced by plasma cell tumors: Comparison of findings in human and murine hosts. In: *Progress In Myeloma, Biology of Myeloma*, M. Potter (ed.). Elsevier, North Holland, Biomedical Press, Amsterdam, pp. 171–184 (1980).
5. FAHEY, J. L., SCOGGINS, R., UTZ, J. P., SZWED, C. F.: Infection, antibody response and gamma globulin components in multiple myeloma and macroglobulinemia. *Amer. J. Med.* 35, 698–707 (1963).
6. SCHEDEL, I.: Intravenöse Immunglobulin-Substitution bei sekundärem Antikörpermangelssyndrom. *Diagnostik & Intensivtherapie* 7, 254–265 (1982).
7. MEYERS, B. R., HIRSCHMANN, S. Z., AXELROD, J. A.: Current patterns of infection in multiple myeloma. *Amer. J. Med.* 52, 87–92 (1972).
8. TWOMEY, J. J.: Infections complicating multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia. *Arch. Intern. Med.* 132, 562–565 (1973).
9. BEORCHIA, S., VINCENT, C., REVILLARD, J. P., TREPO, C.: Elevation of serum β_2 -microglobulin in liver diseases. *Clin. Chim. Acta* 109, 245–255 (1981).
10. WIBELL, L., EVRIN, P. E., BERGGARD, I.: Serum β_2 -microglobulin in renal diseases. *Nephron* 10, 320–331 (1973).
11. BEORCHIA, S., TREPO, C., VINCENT, C., REVILLARD, J. P., BRETTE, R.: Intérêt pronostique et pathogénique de l'élévation de la β_2 -microglobuline dans les hépatites aiguës et chroniques. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 6, 679–687 (1982).
12. JAFFE, M. Z.: Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* 10, 391–400 (1886).
13. CHASSON, A. L., GRADY, H. J., STANLEY, M. A.: Determination of creatinine by mean of automatic chemical analysis. *Tech. Bull. Regist. Med. Techn.* 30, 207–232 (1960).
14. MARSH, W. H., FINGERHUT, B., MILLER, H.: Automated and manual direct methods for the determination of blood urea. *Clin. Chem.* 11, 624–627 (1965).
15. FINK, P. C.: A fully automated serum electrophoresis system. *J. Clin. Chem. Biochem.* 19, 379–386 (1981).
16. WEICHELBAUM, L. T.: An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Am. J. Clin. Path.* 16, 40–49 (1946).
17. FINK, P. C., HITTMANN, F., SCHEDEL, I.: Determination of β_2 -microglobulin, myeloma protein and lipid A antibody in sera of patients with multiple myeloma. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 20, 652 (1982).
18. FINK, P. C., GALANOS, C.: Determination of anti-lipid A and Lipid A by enzyme immunoassay. *Immunobiol.* 158, 380–390 (1981).
19. FINK, P. C., SCHEDEL, I., DEICHER, H.: Estimation of IgG-antiglobulins in sera of patients with rheumatoid arthritis and chronic liver disorders. *Klin. Wschr.* 54, 601–606 (1976).
20. WEBB, A. J.: A 30-minute preparative method for isolation of IgG from human serum. *Vox Surg.* 23, 279–290 (1972).
21. FINK, P. C., SCHULTZE, K. D.: The polyethylene glycol precipitation technique and the particle counting immunoassay for detection of circulating immune complex-like material in liver cirrhosis and septicemia. *J. Lab. Clin. Med.* 99, 852–865 (1982).

22. OSSERMANN, E. F.: Plasma-cell myeloma. II Clinical aspects. *N. Engl. J. Med.* 261, 952-960 (1959).
23. BÜTTNER, J., BORTH, R., BROUGHTON, P. M. G., BOWYER, R. C.: Chemistry. International Federation of Clinical Chemistry. Quality control in clinical chemistry. Part 4. Internal Quality Control. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 535-541 (1980).
24. HAECKEL, R.: Qualitätssicherung im medizinischen Labor. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, pp. 1-237 (1975).
25. HAECKEL, R.: Empfehlungen zur Anwendung statistischer Methoden beim Vergleich klinisch-chemischer Analysenverfahren. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 20, 107-110 (1982).
26. BERGGARD, I., BEARN, A. G.: Isolation and properties of a low molecular weight β_2 -globulin occurring in human biological fluids. *J. Biol. Chem.* 243, 4095-4103 (1968).
27. PETERSON, P. A., PASK, LINDBLOM, J. B.: Highly purified papain-solubilized HL-A antigens contain β_2 -microglobulin (polypeptide chains, spleen-cell membranes, histocompatibility determinants). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71, 35-39 (1974).
28. PETERSON, P. A., CUNNINGHAM, B. A., BERGGARD, I., EDELMANN, G. M.: β_2 -microglobulin - a free immunoglobulin domain (light and heavy chain/amino-acid sequence). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69, 1697-1701 (1972).
29. SWANSON, R. A., TRACY, R. P., KATZMANN, J. A., WILSON, D. M., YOUNG, D. S.: β_2 -microglobulin determined by radioimmunoassay with monoclonal antibody. *Clin. Chem.* 28, 2033-2039 (1982).
30. EVRIN, P. E., WIBELL, L.: The serum levels and urinary excretion of β_2 -microglobulin in apparently healthy subjects. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, 69-74 (1972).
31. BÜTTNER, J., BORTH, R., BOUTWELL, J. H., BROUGHTON, P. M. G., BOWYER, R. C.: International Federation of Clinical Chemistry Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part 2. Assessment of analytical methods for routine use. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 78-88 (1980).
32. VERCELLI, D., COZZOLINO, F., BECUCCI, A., DI GUGLIELMO, R.: β_2 -microglobulin in monoclonal gammopathies. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 24, 85-88 (1982).
33. CASSUTO, J. P., KREBS, B. P., VIOT, G., DUJARDIN, P., MASSEYEFF, R.: β_2 -microglobulin, a tumour marker of lymphoproliferative disorders. *Lancet* 2, 108-109 (1978).
34. MELLSTEDT, H., HOLM, G., PETERSON, D., PEEST, D.: Idiotype-bearing lymphoid cells in plasma cell neoplasia. *Clinics in Haematology* 11, 65-86 (1982).
35. KIN, K., KASAHARA, T., ITOH, Y., SAKURABAYASHI, I., KAWAI, T., MORITA, M.: β_2 -microglobulin production by highly purified human T and B lymphocytes in cell culture stimulated with various mitogens. *Immunology* 36, 47-54 (1979).
36. POULIK, M. D., MOTWANI, N.: Demonstration of a β_2 -microglobulin on membrane of B lymphocytes. *Clin. Res.* XX, 795 (1972).
37. POULIK, M. D., BLOOM, A. D.: β_2 -microglobulin production and secretion by lymphocytes in culture. *J. Immunol.* 110, 1430-1433 (1973).
38. DEFPONZO, R. A., HUMPHREY, R. L., WRIGHT, J. P., COOKE, C. R.: Acute renal failure in multiple myeloma. *Medicine* 54, 209-223 (1975).
39. DURIE, B. G. M.: Staging and kinetics of multiple myeloma. *Clinics in Haematology* 11, 3-18 (1982).
40. PETERSON, D., MELLSTEDT, H., HOLM, G.: Characterization of the monoclonal blood and bone marrow B lymphocytes in Waldenström's macroglobulinaemia. *Scand. J. Immunol.* 11, 593-599 (1980).
41. ULLRICH, S., ZOLLA-PAZNER, S.: Immunoregulatory circuits in myeloma. *Clinics in Haematology* 11, 87-111 (1982).
42. DURIE, B. G. M., SALMON, S. E.: A clinical staging system for multiple myeloma. Correlations of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 36, 842-854 (1975).
43. SALMON, S. E., SAMAL, B. A., HAYES, D. M., HOSLEY, H., MILLER, S. P., SCHILLING, A.: Role of gammaglobulin for immunoprophylaxis in multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 277, 1336-1340 (1967).
44. FINK, P. C., SCHEDEL, I., SCHAAR, H.: Experiences with the calculation of tumour burden index in multiple myeloma. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 666 (1981).
45. KARLSSON, F. A., GROTH, T., SEGE, K., WIBELL, L., PETERSON, P. A.: Turnover in humans of β_2 -microglobulin: the constant chain of HLA-antigens. *Eur. J. Clin. Invest.* 10, 293-300 (1980).
46. FINK, P. C.: Lipopolysaccharide und Lipid A. II. Zelluläre Wirkungsweisen. *Med. Lab.* 34, 240-250 (1981).
47. FINK, P. C., LEHR, L., URBASCHEK, R. M., KOZAK, J.: Linulus amebocyte lysate test for endotoxemia: Investigations with a femtogram sensitive spectrophotometric assay. *Klin. Wochenschr.* 59, 213-218 (1981).
48. KLIPPEL, K. F.: Pyelonephritis: Anatomische und Pathologische Voraussetzungen. In: Pyelonephritis, Hahnenklee Symposium 1976, Hrsg. Kienitz, M., Knothe, H., Losse, H., Naumann, P., Schönfeld, H. Editiones Roche, Basel 33-38 (1976).
49. SMITH, J. W., ASKINS, M. J., MCCREARY, D.: Local immune response in experimental pyelonephritis in the rabbit. 1. Morphological and functional features of the lymphocytic infiltrate. *Immunology* 29, 1067-1076 (1975).
50. SMITH, J. W.: Local immune response in experimental pyelonephritis in the rabbit. II. Lymphocyte stimulation by lipopolysaccharide of infecting organism. *Immunology* 29, 1077-1085 (1975).

Korrespondenzadresse:

Priv.-Doz. Dr. Peter C. Fink
Kliniken der Freien Hansestadt Bremen
Zentralkrankenhaus St.-Jürgen-Straße
Institut für Laboratoriumsmedizin, Zentrallabor
D-2800 Bremen