

VÝZNAM HODNOCENÍ SÉROVÝCH HLADIN VOLNÝCH LEHKÝCH ŘETĚZCŮ IMUNOGLOBULINŮ U MONOKLONÁLNÍCH GAMAPATIÍ

MUDr. Elena Šumná¹, RNDr. Ludmila Nováčková², doc. MUDr. Arnošt Martínek, CSc.²,
prof. MUDr. Vlastimil Ščudla, CSc.³

¹1. hematologická ambulance, Ostrava Vítkovice,

²2. biochemická laboratoř a interní klinika FNsP, Ostrava Poruba,

³III. interní klinika, LF UP a FN, Olomouc

V předloženém sdělení je podán souhrn informací o nejdůležitějších laboratorních metodách používaných k průkazu a kvantifikaci monoklonálních imunoglobulinů a jejich strukturních komponent v séru a v moči. Nově zavedené automatizované imunochemické metody umožňují s vysokou senzitivitou a specifikou kvantitativní hodnocení hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinů v séru (s-VLŘ). Vyšetřování koncentrace VLŘ v séru, poměru kappa/lambda a jejich změn, významně rozšiřují současné spektrum standardních ukazatelů používaných v diagnostice a hodnocení výsledků léčby u jednotlivých typů monoklonálních gamapatií.

Klíčová slova: monoklonální gamapatie, volné lehké řetězce imunoglobulinů, automatizovaná imunochemická analýza, diagnostika, léčba.

SIGNIFICANCE OF THE EVALUATION OF SERUM LEVELS OF IMMUNOGLOBULINS FREE LIGHT CHAINS IN MONOCLONAL GAMMOPATHIES

There is a presentation of the most important laboratory methods used for the evidence and quantification of monoclonal immunoglobulins and their structure components in serum and urine. The new applicated automated immunochemical methods allow to evaluate with high sensitivity and specificity the quantitative values of free light chains of immunoglobulins in serum (s-FLC). The estimation of s-FLC concentration, ratio kappa/lambda and their changing allows us significantly to extend the current spectrum of regularly used methods in diagnostics and assessment of results of the treatment of individual types of monoclonal gammopathies.

Key words: monoclonal gammopathy, free light immunoglobulin chains, automated immunochemical analysis, diagnostics, treatment.

Interní Med. 2006; 11: 502–504

Úvod

Monoklonální gamapatie (MG) tvoří skupinu chorob, které charakterizuje proliferace klonu vzniklého patologickou transformací z B-lymfocytů se syntézou a sekrecí chemicky i fyzikálně homogenního monoklonálního imunoglobulinu (MIG „paraprotein“) nebo jeho strukturních komponent lehkých řetězců (LŘ) kappa či lambda, ojediněle i těžkých řetězců nebo ještě menších fragmentů imunoglobulinové molekuly. LŘ vzhledem k nízké molekulové hmotnosti mohou být vylučovány močí jako Bence-Jonesova (B-J) bílkovina (2,3–5,7). MIG je u každého nemocného specifickým „unikátem“, jeho individualita je určena diferencemi v sekvenci aminokyselin ve variabilní oblasti jak lehkých, tak těžkých řetězců. Ke změnám může docházet ve všech částech původní imunoglobulinové molekuly, nejčastěji ve variabilních částech lehkých i těžkých řetězců. Denní syntéza se u jednotlivce pohybuje v relativně širokém rozsahu 2,5–35 pg/den/buňku. Změna koncentrace MIG v séru může být u daného jedince v určité míře indikátorem počtu produkujících nádorových buněk, případně jejich změn při léčbě (7, 14).

Mezi prvními popsal v roce 1847 chemické vlastnosti paraproteinu v moči charakteristické pro mnohočetný myelom dr. Henry Bence Jones. V roce

1939 Longsworth popsal při elektroforéze krevních bílkovin nemocných s myelomem úzký vysoký pík.

Grabar a Williams v roce 1953 použili imunoelektroforézu a v roce 1956 objevili Korngold a Lipari souvislost mezi Bence Jonesovou bílkovinou a sérovými proteiny. Na jejich počest byly označeny kappa (κ-Korngold) a lambda (λ-Lapiri) (16).

Tabulka 1. Klasifikace monoklonálních gamapatií (9)

1. maligní monoklonální gamapatie (MMG)

- A) Mnohočetný myelom IgG (59 %), IgA (21 %), IgD (1 %), IgE, biklonální typ
- B) Variantní formy myelomu:
 - asymptomatický („smoldering“ doutnající, latentní myelom)
 - plazmocelulární leukémie
 - nesekreční myelom (NMM – 3 %)
 - Bence-Jonesův (B-J typ myelomu – 15 %)
 - solitární plazmocytom
 - extramedulární plazmocytom
 - osteosklerotický myelom
- C) Maligní lymfoproliferativní choroby:
 - Waldenströмова makroglobulinémie
 - maligní lymfomy (NHL)
 - chronická lymfatická leukémie (CLL)
- D) Nemoc těžkých řetězců (α, γ, μ)
- E) Amyloidóza – primární amyloidóza (AL)
- F) Paraproteinémie u jiných maligních tumorů.

2. monoklonální gamapatie nejistého významu (-MGNV), dříve benigní monoklonální gamapatie

Tabulka 2. Nejdůležitější laboratorní metody používané k průkazu a kvantifikaci monoklonálních imunoglobulinů.

- elektroforéza sérových bílkovin na agarózovém gelu, na acetátcelulozových nosičích nebo systém kapilární elektroforézy
- imunofixační elektroforéza séra
- imunofixační elektroforéza moči (citlivá metoda pro průkaz B-J proteinu a exkrece monoklonálního imunoglobulinu)
- imunturbidimetrie a imunonefelometrie (sérum, moč) (umožňuje kvantitativní stanovení jednotlivých tříd polyklonálních imunoglobulinů a kvantitativní stanovení lehkých řetězců v séru i v moči (12, 16)).

Stanovení volných lehkých řetězců v séru je možné za pomoci nové, velmi citlivé metody imunochemické analýzy volných lehkých řetězců imunoglobulinu (VLŘ), využívající specifickou detekční protilátku, např. souprava Freelite System Binding Site použitelná pro běžné proteinové analyzátoři. Vhodným výběrem antigenů a postupnými vysocovacími operacemi byla Bradwellem v roce 2000 připravena unikátní vysoce avidní protilátka proti vnitřnímu epitopu molekul lehkého řetězce, umožňující kvantitativní, vysoce specifické stanovení velmi nízkých koncentrací volných lehkých řetězců (již od 2 mg/l) s využitím nefelometrické nebo turbidimetrické techniky (4, 5). Exkluzivní vazba na vnitřní epitop

molekul lehkých řetězců, který je v celkové molekule nepřístupný, vylučuje zkříženou reaktivitu s lehkými řetězci vázanými v molekule intaktního imunoglobulinu. Dokáže tedy spolehlivě odlišit skutečně volné VLŘ. Tato nová imunochemická metoda je výrazně citlivější než standardní elektroforéza (100x), imunofixační postupy (20x) i kapilární elektroforéza, protože tyto analytické postupy nezachycují asi 30–40 % patologických koncentrací monoklonálních s-VLŘ (5, 7, 14).

Náplní sdělení je stručná informace o možnostech praktického využití této nové laboratorní metody již zavedené v mnoha biochemických laboratořích, a to v diagnostice, léčbě a monitorování průběhu některých monoklonálních gamapatií.

Volné lehké řetězce v krvi patří mezi tzv. volné filtrovatelné plazmatické bílkoviny a jejich koncentrace v plazmě a v glomerulárním ultrafiltrátu se téměř neliší. Při zvýšení koncentrace VLŘ v krvi nedochází ke zvýšení jejich renální exkrece, pokud není překročena jejich maximální tubulární resorpce. Při intenzivní resorpci lehkých řetězců začíná vážnout jejich degradace v cytosolu tubulárních buněk, které postupně zanikají. Filtrát proniká do intersticia, tam vyvolává sterilní zánět, který vede k zániku nefronu a postupnému snižování filtrační plochy v ledvinách s retencí lehkých řetězců v plazmě a poklesu jejich koncentrace v moči. Fyziologicky je denně plazmatickými buňkami a buňkami lymfatických uzlin secernováno asi 500 mg volných lehkých řetězců (5, 7, 14). Vzhledem k jejich rychlé exkreci ledvinami a distribuci v intravaskulárním i extravaskulárním prostoru je koncentrace volných lehkých řetězců v plazmě asi 20 mg/l. Syntéza VLŘ je přibližně o 40 % vyšší než syntéza těžkých řetězců. Volných lehkých řetězců typu kappa je produkováno přibližně dvakrát více než volných lehkých řetězců typu lambda. Index κ/λ volných lehkých řetězců v plazmě je 0,6 (0,26–1,65). Řetězce lambda tvoří v plazmě diméry a jejich ledvinová exkrece je třikrát pomalejší než exkrece monomerních kappa řetězců, proto i přes nižší stupeň syntézy obsahuje normální sérum vyšší hladiny VLŘ typu lambda. Index volných řetězců v séru odpovídá poměru, v jakém jsou syntetizovány. Výpočet indexu κ/λ je přínosnou doplňující informací monoklonality, tj. poměru neoplastické/myelomové/populace k suprimované populaci normálních plazmatických buněk. Normální hodnoty koncentrací sérových VLŘ imunoglobulinů u zdravých dospělých jsou pro kappa 7,3 mg/l (3,3–19,4), lambda 12,7 (5,7–26,3) mg/l (5, 6, 7). Při interpretaci vyšetřených nálezů vycházíme ze skutečnosti, že hladiny sérových VLŘ jsou vyjádřením rozsahu produkční masy v celém organismu (u MM počtu myelomových buněk). Oba typy VLŘ se mohou rovněž zvyšovat při imunopatologických stavech, které provází syntéza polyklonálních

imunoglobulinů. Je nutné podotknout, že v těchto případech nedochází ke změně indexu κ/λ . Z toho vyplývá, že stanovení indexu κ/λ napomáhá při stavech s patologicky zvýšenými hodnotami VLŘ v séru k rozlišení vzestupu polyklonálního od monoklonálního stavu (5, 7, 14). Je známo, že hodnoty obou typů VLŘ v séru (kappa i lambda) se neliší v závislosti na pohlaví, zatímco v případě věku nad 70 let se hladiny v séru mírně zvyšují, a to úměrně s „věkově“ podmíněným poklesem glomerulární filtrace, ale index κ/λ se nemění (7, 14). Index κ/λ se rovněž nemění u biklonální formy MG vyznačující se proporcionální syntézou VLŘ kappa a lambda. Rozmezí hodnot VLŘ i indexu κ/λ v moči je širší než v séru, proto je v klinické praxi daleko výhodnější vyšetřování hladin VLŘ v séru než v moči (14).

Význam stanovení s-VLŘ pro sledování průběhu a léčby u mnohočetného myelomu

Biologický poločas s-VLŘ je asi 4 hod. Monomerní typ kappa je odstraňován během 2–4 hodin, dimerický typ lambda je katabolizován v průběhu 3–6 hodin. Vyskytují-li se velké komplexní polymery, jsou odstraňovány ještě pomaleji (5, 7, 14). Proto předpokládáme, že při zachovalé glomerulární filtraci se pokles syntézy s-VLŘ projeví podstatně rychleji, než dojde ke změnám v koncentracích intaktních, kompletních MIG s mnohem delším biologickým poločasem.

Jednoznačné indikace ke sledování hladin s-VLŘ jsou variantní formy MM, které se vyznačují chybějící nebo omezenou tvorbou MIG (nesekreční a oligosekreční typ MM), nebo izolovaná produkce pouze strukturálních komponent MIG například Bence-Jonesův typ MM a MM kombinovaný s AL-amyloidózou (8).

U MM s intaktním MIG je stanovení s-VLŘ v některých situacích pravděpodobně lepším indikátorem průběhu onemocnění a efektu léčby než změny MIG, hlavně ve třídě IgG. Pokles koncentrace MIG při léčbě je pomalý a opožděný, neboť katabolický proces IgG je 21 dnů (5, 14). V remisi onemocnění upozorňuje vzestup hladiny s-VLŘ na počínající relaps choroby, protože k vzestupu s-VLŘ dochází podstatně dříve než k vzestupu MIG, případně exkreci B-J bílkoviny v moči, je-li současně přítomná.

U Bence-Jonesova („light chain“) mnohočetného myelomu je možno s použitím elektroforézy s vyšší rozlišovací schopností prokázat atypickou zónu monoklonálního LŘ jen asi u 50 % nemocných, protože migrační heterogenní zóna může být umístěna v oblasti β a globulinů, kde bývá překryta zónami jiných bílkovin. Použitím metody imunofixace lze prokázat s-VLŘ v 65–70 %. Analýza moče pomocí

imunofixace je vhodným vyšetřením u B-J typu MM. V současnosti je však metodou volby se 100 % průkazem s-VLŘ kvantitativní imunochemická analýza a index κ/λ . Výhodou automatizované imunochemické analýzy oproti imunofixační metodě je vyšší citlivost a schopnost kvantitativního vyjádření zjištěných hladin s-VLŘ. U pacientů s nízkou produkcí hladin s-VLŘ a dobrou funkcí ledvin nemusí být VLŘ v moči vůbec zachytitelné. Bylo dokázáno, že změna hladiny s-VLŘ je časnějším a citlivějším indikátorem léčebné odpovědi než hodnocení VLŘ v moči, proto se od analýzy moče v současnosti do jisté míry ustupuje (4, 5, 7, 14).

Vyšetřování s-VLŘ využíváme nejen pro diagnostiku a monitorování léčebné odpovědi, ale i průběhu nemoci. Stanovení hladin s-VLŘ upřesňuje rozpoznání remise nemoci (kompletní remise je provázena obvykle normalizací hladin a indexu κ/λ), délky trvání stabilní („plateau“) fáze (stabilita hladin s-VLŘ a indexu κ/λ) i včasné zachycení progresu nebo relapsu onemocnění (vzestup hladin s-VLŘ, vychýlení indexu κ/λ). K uvedeným změnám dochází mnohem dříve nežli k nárůstu plazmocytů v kostní dřeni, situace však vyžaduje průběžné sledování sérových hladin VLŘ.

Nesekreторický mnohočetný myelom (NMM) se vyskytuje vzácně (1–2 %) a vyznačuje se dle konvenční klasifikace nepřítomností MIG, s-LŘ nebo LŘ v moči při vyšetření pomocí elektroforetických a imunofixačních postupů. Citlivější metody – imunohistochemické vyšetření plazmocytů v kostní dřeni a izoelektrická fokuzace mohou stopovou produkcí MIG v 80–90 % případů prokázat, takže „pravý“ NMM je ve skutečnosti velmi vzácný. Jen 10–15 % NMM je skutečně neprodukcující, nikoliv pouze neschopných přenosu sekrečních produktů do krve. Velkým přínosem pro diagnostiku a monitorování průběhu léčby u NMM je použití automatizované imunochemické kvantitativní metody, prokazující přítomnost monoklonálních s-VLŘ nebo patologického indexu κ/λ u význačné části nemocných (až v 82 %) (14, 15). Je jisté, že monitorování hladin s-VLŘ a indexu κ/λ je výhodnějším ukazatelem celkové aktivity choroby a změn rozsahu celotělové nádorové masy včetně extramedulární než časté opakované vyšetření rtg, MRI, CT nebo pohybu zastoupení plazmocytů v kostní dřeni. Při podezření na NMM je vyšetření hladin s-VLŘ výše uvedenou metodou a výpočet indexu κ/λ metodou volby, přičemž negativní výsledek by se měl vždy doplnit imunohistochemickou analýzou plazmocytů kostní dřene k rozpoznání, případně vyloučení NMM (5, 7).

Primární systémová AL-amyloidóza s negativním výsledkem imunofixační elektroforézy séra má v 86–98 % prokazatelné abnormální hladiny s VLŘ (1, 8, 15).

Solitární myelom představuje jen 3–5 % plazmocelulárních neoplázií, u kterých bývá v 50 % prokázán MIG. Kostní i extramedulární forma bývá prováděna v době diagnostiky zvýšením hladin s-VLŘ, které po lokální léčbě významně klesají. Pokud po lokální léčbě (radioterapii) k poklesu nedochází, je třeba pomyslet na přítomnost nádorové tkáně i v jiné lokalizaci.

Waldenströмова makroglobulinemie má v 97 % zvýšené hladiny s-VLŘ nebo patologický index κ/λ . Stejně jako u ostatních maligních MG je možno monitorovat hladiny s-VLŘ ke sledování efektu léčby, remise, progresu onemocnění nebo relapsu choroby. Rovněž u této choroby hladiny s-VLŘ odrážejí rozsah nádorové masy (4, 5, 14).

U nehodgkinských lymfomů B-typu (NHL-B) bývá MIG prokázán standardní elektroforézou séra u 10–15 % nemocných, u B-CLL až u 35 %, ale v koncentracích mnohem nižších nežli u MM (14). Rovněž se prokázalo, že kvantitativní imunochemická metoda stanovení s-VLŘ je citlivější ve srovnání s konvenčními vyšetřovacími metodami. Přínos monitorování

s-VLŘ pro zhodnocení reziduální choroby a prognózy nemoci není v současnosti k dispozici (7).

U monoklonální gamapatie nejasného významu (MGNV) nemá 75 % nemocných patologické hodnoty hladin s-VLŘ nebo indexu κ/λ a má přitom v elektroforeogramu séra atypickou zónu kompletního intaktního imunoglobulinu. Proto nelze kvantitativní imunochemickou metodu stanovení s-VLŘ použít jako screening MG, ale jako součást v úvodu uvedených vyšetření. Ročně přechází 1 % jedinců s MGNV v některý ze stavů maligního spektra MG, po 5 letech 6 %, po 10 letech 15–16 %, po 20 letech 31–33 % (5, 7, 14). Potřeby klinické praxe proto vyžadují stanovení rizikových ukazatelů, předvídajících progresi již v iniciální fázi choroby. Počáteční výška hodnot MIG a příslušnost ke třídě IgM, IgA a exkrece VLŘ močí patří k významným předpovědním ukazatelům maligní transformace (9, 10). Jelikož množství LŘ v moči (B-J bílkovina) závisí na stavu renálních funkcí, klade se větší pozornost na otázku hodnocení hladin s-VLŘ jako potenciálně vhodného ukazatele progresu. Prokázalo se, že 50 % nemocných s MGNV má

zvýšené s-VLŘ a 60 % jedinců má patologický index κ/λ (11, 13, 15).

Závěr

Z uvedených informací vyplývá, že stanovení s-VLŘ pomocí automatizované imunochemické analýzy je významnou metodou každodenní klinické praxe, která rozšiřuje současnou paletu zavedených vyšetřovacích metod prováděných při diagnostice, sledování průběhu a monitorování léčby u jednotlivých typů MG. Předložená metoda umožňuje významně včasější a přesnější hodnocení současného stavu a vývoje choroby s možností včasného ovlivnění léčby event. změny zavedené terapie. Její skutečný přínos v klinické praxi však umožní teprve zhodnocení v delším časovém odstupu.

MUDr. Elena Šumná

Hematologická ambulance, Vítkovická nemocnice, a. s.
Zalužanského 1192/15
703 84 Ostrava-Vítkovice
e-mail: elen.sumna@centrum.cz

Literatura

1. Abraham RS, Bergen RH, Naylor S et al. Characterisation of free Immunoglobulin Light Chains (LC) by Mass spectrometry in Light Chain-Associated (AL) Amyloidosis. *Blood* 2001; 98: 3722.
2. Adam Z, Hájek R, Mayer J, Ščudla V. et al. Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie I. vydání Brno, LF MU, 1999; 367 s.
3. Adam Z, Česká myelomová skupina. Doporučení pro diagnostiku a léčbu mnohočetného myelomu. *Trans Hemat* dnes 2003; 9 (suppl): 3–33.
4. Bradwell AR, Mead GP Carr-Smith HD Serum free light Chain analysis 3rd Edition Birmingham, The Binding Site Ltd. 2005: 292 p.
5. Bradwell AR Carr-Smith HD, Mead GP, Drayson MT. Serum free light Chain immunoassays and their clinical application. *Clin.applied Immunol Rev* 2002; 3: 17–33.
6. Drayson MT, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith HD Bradwell AR, Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood* 2001; 97: 2900–2902.
7. Engliš M. Stanovení volných lehkých řetězců imunoglobulinů v séru v diagnostice a monitorování monoklonálních gamapatií. <http://www.cscb.cz/vzdelavani/light-chain.htm>
8. Katzmán JA, Clark RJ, Abraham RS et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: Relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem* 2002; 48: 1437–1444.
9. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. A long-term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *New Eng J Med* 2002; 346: 546–569.
10. Kyle RA, Greipp PR. „Idiopathic“ Bence Jones Proteinuria. *New Eng J.Med* 1982; 346: 564–569.
11. Lachmann HJ, Gallimore R, Gilmore JD et al. Outcome in systemic free immunoglobulin light chains following chemotherapy. *Brit J Haematol* 2003. 122: 78–84.
12. Masopust J. Klinická biochemie požadování a hodnocení biochemických vyšetření II. část UK, 1998: 540–544.
13. Rajkumar SV Kyle RA, Therneau TM et al. Presence of Monoclonal Free Light Chains in Serum Predicts Risk of Progression in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *Blood* 2003; 102: 3481.
14. Ščudla V, Vytřasová M, Minařík J. et al. Klinický význam hodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinů u monoklonálních gamapatií, *Trans Hemat* dnes 2005, 2 47–53.
15. Ščudla V, Minařík J, Schneiderka P, et al. Význam sérových hladin monoklonálních volných lehkých řetězců imunoglobulinu v diagnostice a hodnocení aktivity mnohočetného myelomu a vybraných monoklonálních gamapatií. *Vnitř. Lék* 2005; 51: 1249–1257.
16. Špička Ivan et al. Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie Praha, Galén, 2005; 11–107.