

Nemoc z těžkých řetězců μ

Tichý M.^{1,5,6}, Maisnar V.^{4,6}, Stulík J.¹, Urban P.², Adam Z.³, Kadlčková E.², Vávrová J.⁵, Palička V.⁵, Jebavý L.^{1,4}, Kodet R.⁷, Hájek R.^{6,3}

¹Fakulta vojenského zdravotnictví UO, Hradec Králové

²Oddělení klinické biochemie, Baťova nemocnice, Zlín

³Interní hematologická klinika FN a LF MU, Brno-Bohunice

⁴II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie FN a LF UK Hradec Králové

⁵Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové

⁶Česká myelomová skupina

⁷Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FNM, Praha

SOUHRN

V předloženém sdělení referujeme o novém pozorování vzácného onemocnění nemoci z těžkých řetězců μ , které je neobvyklé jak klinicky, tak i laboratorně. 63letá nemocná postupně onemocněla karcinomem vulvy, Hodgkinovým lymfomem, nemocí z těžkých řetězců μ a akutní myeloidní leukémií. Monoklonální těžké řetězce μ byly prokázány v séru nemocné imunofixační elektroforézou na agaróze (HYDRAGEL 41F, SEBIA, Paris) a imunotypizací při kapilární elektroforéze na přístroji Capillarys 2 (SEBIA, Paris). Koncentrace paraproteinu tvořeného těžkými řetězci μ byla neobyčejně vysoká – 34,9 g/l. Molekulární hmotnost těžkých řetězců μ byla určena vysokorozlišovací dvojrozměrnou elektroforézou a byla 53 kD, což odpovídá dimerům těžkých řetězců μ . V moči nebyly monoklonální těžké, ani monoklonální lehké řetězce imunoglobulinů prokázány.

Klíčová slova: nemoc z těžkých řetězců μ , kapilární zónová elektroforéza, vysokorozlišovací dvojrozměrná elektroforéza.

SUMMARY

Tichý, M., Maisnar, V., Stulík, J., Urban, P., Adam, Z., Kadlčková, E., Vávrová, J., Palička, V., Jebavý, L., Kodet, R., Hájek, R.: μ -Heavy chain disease

We report the new case of μ -heavy chain disease. 63-year old female was successively ill of carcinoma vulvae, Hodgkin lymphoma, μ -heavy chain disease and acute myeloid leukemia. We determined monoclonal heavy chain μ in serum of the patient with method immunofixation electrophoresis on agarose (HYDRAGEL 41F, SEBIA, Paris) and with Capillarys Immunotyping (Capillarys 2, SEBIA, Paris). Concentration of μ -heavy chain in the patient was very high – 34.9 g/l. Molecular weight of heavy chain μ was determined by 2-dimensional gel electrophoresis and it was 53 kD. Monoclonal μ -heavy chains and light chains Ig were not determined in urine in our case of μ -heavy chain disease.

Key words: heavy chain disease μ , capillary zone electrophoresis, 2-dimensional gel electrophoresis.

Úvod

Nemoci z těžkých řetězců jsou onemocněním charakterizovaná proliferací jednoho klonu B-lymfocytů, které produkují strukturálně abnormální (nekompletní) těžké řetězce imunoglobulinů (Ig) bez asociace s lehkými řetězci [4, 8]. Nemoc z těžkých řetězců byla poprvé popsána Franklinem et al. v roce 1964 u nemocného lymfoproliferativním onemocněním s přítomností monoklonálních těžkých řetězců gama v séru a v moči. Postupně byly prokázány nemoci z těžkých řetězců α , γ , μ a δ . Nejčastější nemocí z těžkých řetězců je nemoc z těžkých řetězců α (tab. 1), zatímco nemoc z těžkých řetězců μ je vzácná (asi 35 pozorování) a pozorování nemoci z těžkých řetězců δ jsou ojedinělá [11].

Laboratorní diagnostika nemoci z těžkých řetězců je obvykle obtížná. Patologická bílkovina není při elektroforéze detekovatelná asi u 20 % pozorování nemocí z těžkých řetězců γ , asi u 50 % pozorování nemocí z těžkých řetězců α a až u 75 % pozorování nemocí z těžkých řetězců μ [8]. V souboru téměř 4000 paraproteinémií jsme prokázali nemoc z těžkých řetězců μ

jen jednou. Toto pozorování je výjimečné jak po stránce laboratorní, tak i po stránce klinické, proto o něm referujeme v předloženém sdělení.

Tab. 1. Heavy chain disease

	γ	α	μ
First observation	1964	1968	1970
Number of observations	> 100	> 400	> 35
Geographic occurrence	North America Europe	Mediterranean Middle East	North America Europe
Age (years)	≈ 62	often 10–30	middle age and older
Electrophoresis	small M-gradient (heterogenous)	M-gradient yes-no	normal elfo or hypogamaglob.
Bence Jones protein in urine	no	no	yes 13/21, 11 BJK, 2 BJJ
Bone lesions	exceptional	no	yes 6/15
Prognosis	no favourable	favourable	favourable for CLL = 1/3, otherwise no favourable

Popis pozorování, použité metody a výsledky

Nemocná 63letá žena měla multiplicitu nádorových onemocnění. V lednu 2001 onemocněla karcinomem vulvy a pro tuto diagnózu byla léčena kombinovanou chemoterapií a radioterapií. V prosinci 2001, na základě histologie uzliny exstirpované z krku nemocné byla stanovena diagnóza Hodgkinova lymfomu (varianta bohatá na lymfocyty). Byla zahájena systémová chemoterapie podle schématu CHOP. Po podání ve 4 cyklech nebyla prokázána chemosenzitivita onemocnění k danému typu léčby. Následně byly proto podány 3 cykly záchranné (salvage) chemoterapie ESHAP a poté v lednu 2003 vysokodávková chemoterapie BEAM s podporou autologní transplantace periferních kmenových buněk. Kontrolní vyšetření po autologní transplantaci potvrdila dosažení kompletní remise onemocnění.

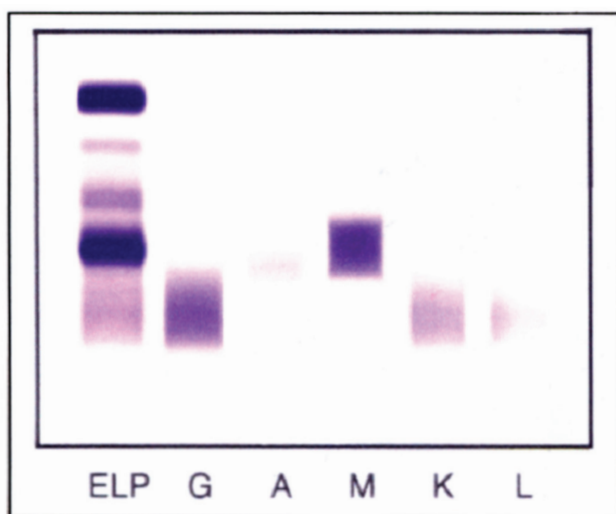


Fig. 1. Immunofixation electrophoresis on agarose (HYDRAGEL 4IF, SEBIA, Paris) on serum from patient with μ -heavy chain disease

V prosinci 2004 byl při elektroforéze bílkovin séra v oblasti β -globulinů poprvé zachycen atypický gradient a imunofixací (IF) byly v séru prokázány jen těžké řetězce μ , bez odezvy při IF s antiséry proti lehkým řetězcům Ig (obr. 1). V lednu 2005 byla nově stanovena diagnóza akutní myeloidní leukémie typu M2 podle FAB klasifikace. Vzhledem k souběhu akutní leukémie a postupně progredující lymfoproliferace byla nemocná

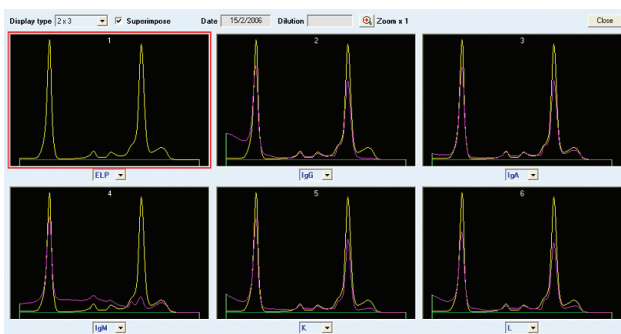


Fig. 2. Capillarys Immunotyping (Capillarys 2, SEBIA, Paris) of serum sample from patient with μ -heavy chain disease

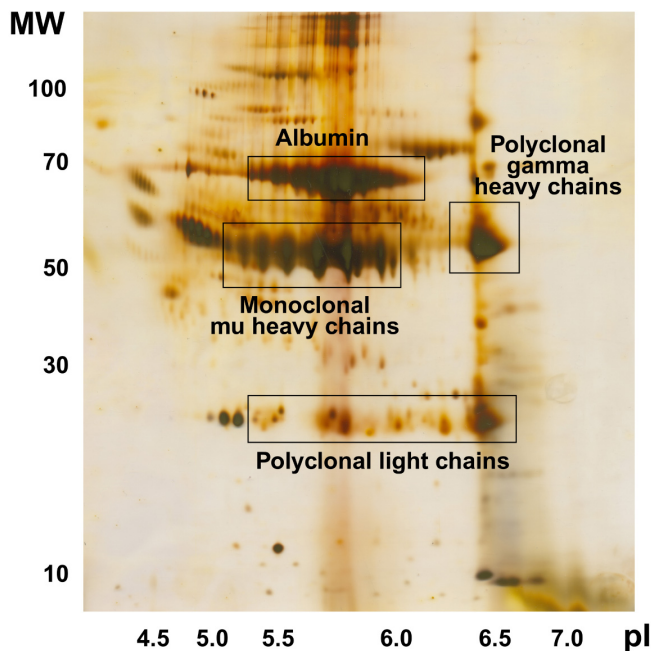


Fig. 3. Silver-stained two-dimensional gel electrophoresis of serum sample

Positions of both, monoclonal μ and polyclonal γ heavy chains are indicated.

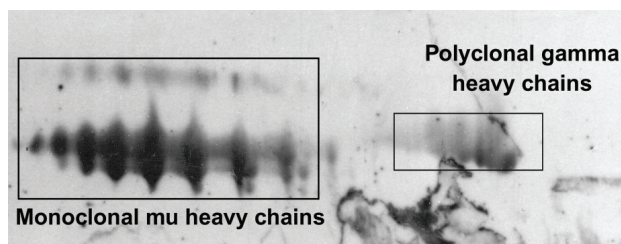


Fig. 4. Enlarged region of 2-DE immunoblot of serum sample with immunostained monoclonal and polyclonal γ heavy chains

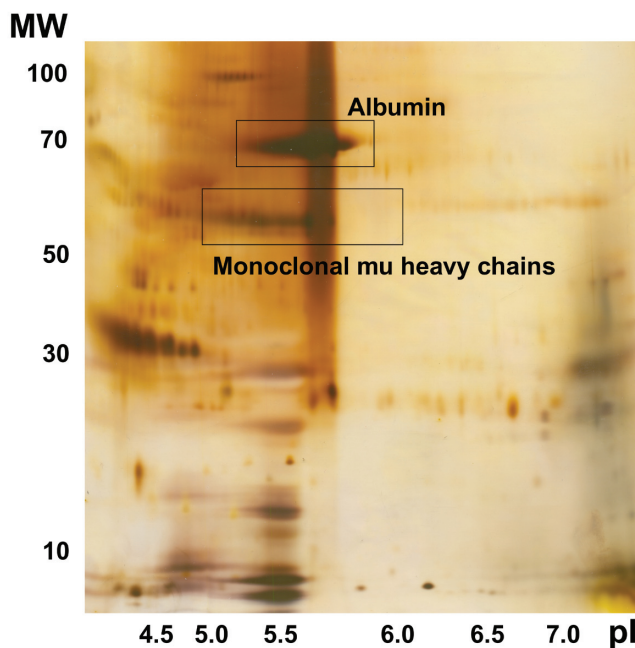


Fig. 5. Silver-stained two-dimensional gel electrophoresis of urine sample. The expected position of monoclonal μ -heavy chain is shown.

nadále léčena jen symptomaticky. V říjnu 2005 dochází k úmrtí, pitva nebyla provedena.

Průkaz monoklonálních těžkých řetězců μ byl potvrzen (obr. 2) i při imunotypizaci kapilární elektroforézou na přístroji Capillarys 2 (SEBIA, France), kdy vymizel vrchol s antisérem proti těžkým řetězcům μ , ale vrcholy při inkubaci s antisérem proti lehkým řetězcům κ a λ zůstaly zachovány.

Laboratorní výsledky: celková bílkovina séra byla 89,2 g/l. Při elektroforéze na agaróze (HYDRAGEL 4IF, SEBIA, France) i při kapilární elektroforéze (Capillarys 2, SEBIA, France) byl zjištěn výrazný M-gradient v oblasti β -globulinů. Při kvantifikaci paraproteinu z elektroforézy byla jeho koncentrace určena na 37,7 g/l. Ve frakci β -1 globulinů je ještě přítomen transferin (koncentrace stanovena 1,74 g/l) a ve frakci β -2 globulinů je C3 složka komplementu, v našem pozorování o koncentraci 0,81 g/l a C4 o koncentraci 0,25 g/l. Koncentrace paraproteinu v našem pozorování po odečtení těchto bílkovin byla 34,9 g/l. Bílkovina v moči byla negativní. Koncentrace polyklonálních Ig byly: IgG = 9,3 g/l a IgA = 0,65 g/l.

K další analýze bílkovin séra a moče nemocné byla využita vysokorozlišovací dvojrozměrná elektroforéza (2-DE) na SDS-PAGE (přístroj Protean II xi Multi Cell, izoelektrická fokuzace Multiphor II, Dry-Strip pH 3-10 Amersham Pharmacia Biotech) s následným imunoblottingem (Western blotting, Bio-Rad Trans blot apparatus). Tato metoda umožnila určit molekulovou hmotnost monoklonálních μ řetězců, která byla 53 kD (obr. 3, 4). Bílkovina v moči byla negativní, a ani při imunoblottingu moče nebyly prokázány monoklonální lehké, ani monoklonální těžké řetězce Ig (obr. 5).

Diskuse

Nejčastější nemocí z těžkých řetězců (HCD) je nemoc z těžkých řetězců α . V roce 1968 popsal Seligmann et al. [8] arabskou ženu s malabsorpčí rezultující z lymfoplazmatické infiltrace střev, u níž byly v séru prokázány monoklonální těžké řetězce α . Onemocnění obvykle začíná v druhé nebo třetí dekádě života, ale vyskytuje se i u starších jedinců (viz tab. 1). Obecně lze říci, že u tohoto onemocnění bývá nižší věk nemocných než u mnohočetného myelomu nebo u většiny lymfoproliferativních onemocnění. Pro nemocné je charakteristický difúzní abdominální lymfom a malabsorpční syndrom. Většina nemocných pochází nebo dlouhodobě žila v oblastech s vysokým výskytem střevních infekcí, ve špatných sociálně ekonomických poměrech a se špatnou hygienou.

V literatuře bylo popsáno zatím více než 100 pozorování nemoci z těžkých řetězců γ [3, 5, 9, 10]. Klinický obraz onemocnění je variabilní, od asymptomatických stavů až po rychle progredující malignity. Medián věku nemocných je asi 60 let. Obvykle jde o lymfoproliferativní onemocnění s hepatosplenomegalií a lymfadenopatií. U tohoto onemocnění bývají často popisována autoimunní onemocnění, jako jsou revmatoidní artritida, Sjögrenův syndrom, systémový lupus erythematodes, Hashimoto-

va thyreoitida a myasthenia gravis. Medián přežití nemocných je asi 12 měsíců. Asi u 50 % nemocných lze prokázat volné fragmenty těžkých řetězců γ v moči. Elektroforetický obraz bílkovin séra bývá neurčitý, s heterogenní zónou mezi α a β globuliny. Bence Jonesova bílkovina v moči bývá negativní.

Nemoc z těžkých řetězců μ (μ -HCD) je velmi vzácné onemocnění, zatím bylo popsáno méně než 40 pozorování [1, 2, 7, 12]. Většina nemocných má symptomy lymfoproliferativních malignit (chronické a lymfatické leukémie, non-Hodgkinova lymfomu, Waldenströmovy makroglobulinémie, mnohočetného myelomu). Bývá přítomna splenomegalie a hepatomegalie (tab. 2). Asi u 2/3 těchto nemocných je popisována přítomnost Bence Jonesovy bílkoviny v moči, především se jedná o monoklonální lehké řetězce Ig antigenního typu κ (tab. 3). Většina γ těžkých řetězců u γ -HCD jsou dimery, kdežto většina α a μ těžkých řetězců u HCD jsou polymery o různé velikosti. Základní jednotka monomerů je mezi 1/2 – 2/3 velikosti jejich normálních těžkých řetězců. U všech μ řetězců při HCD je popisována absence VH domény. Abnormálně krátké řetězce μ u HCD nejsou schopny se spojit s monoklonálními lehkými řetězci a ty jsou často u tohoto onemocnění vylučovány do moče jako Bence Jonesova bílkovina.

Tab. 2. Comparison of series 28 mHCD with our patient (clinical results)

	Series of 28 μ HCD [Wahner, Kyle]	Our patient
Age	15-80 year (median 57.5) 14 males, 14 females	63 years, female
Survival time	1 M-11 years (median 24 M)	10M
Bone lesions	6/15	no
Hepatomegaly	15/24	yes
Splenomegaly	21/22	yes

Tab. 3. Comparison of series 28 mHCD with our patient (laboratory results)

	Series of 28 μ HCD[Wahner, Kyle 1992]	Our patient
Concentration of μ HC	0.36-25 g/l	34.9 g/l
M-gradient	8x yes, 11x no	present (strong)
Urine	11x BJK, 2x BJL, 2x μ HC, 6x negat.	negat.
M.w. μ HC	26.5-158 kD	53 kD

U naší nemocné jsme neprokázali v moči ani monoklonální těžké řetězce μ , ani monoklonální lehké řetězce Ig. Námi popsané pozorování 63leté nemocné s μ -HCD je výjimečné jak po stránce laboratorní, tak i po stránce klinické. Pacientka měla multiplicitu nádorových onemocnění, postupně onemocněla karcinomem vulvy, Hodgkinovým lymfomem, nemocí z těžkých řetězců μ a akutní myeloidní leukémií. Pro analýzu paraproteinu tvořeného monoklonálními těžkými řetězci μ se jeví velmi vhodné použití elektroforetických metod.

Jsou to především kapilární elektroforéza s imunotypizací a vysokorozlišovací dvojrozměrná elektroforéza s následným imunoblottingem [1, 9]. Tato práce je první, která využila k analýze monoklonálních μ řetězců obě tyto elektroforetické techniky. Vysokorozlišovací dvojrozměrná elektroforéza nám umožnila určit molekulovou hmotnost μ těžkých řetězců, která byla 53 kD, což odpovídá dimerům. Práce Wahnera-Roedlera a Kylea [12] shrnuje data od 27 dobře dokumentovaných pozorování nemocných μ -HCD. V této práci byla molekulová hmotnost stanovena u 8 nemocných μ -HCD a kolísala mezi 26,5–158 kD. Molekulová hmotnost μ řetězců u naší nemocné odpovídá dimerům těžkých řetězců μ .

Bence Jonesova bílkovina v moči, především typu κ , je u μ -HCD poměrně častá, v práci Wahner-Roedlera a Kylea byla zjištěna u 13 pozorování z 22, které byly na tento parametr zkoumány. U naší nemocné byla bílkovina v moči negativní, a ani při vysokorozlišovací dvojrozměrné elektroforéze s následným imunoblottingem nebyly monoklonální těžké, ani monoklonální lehké řetězce Ig prokázány. Koncentrace paraproteinu u μ -HCD se pohybuje v citované publikaci u 10 pozorování mezi 0,36–14,7 g/l a jen v jednom pozorování je 25 g/l. Koncentrace monoklonálních těžkých řetězců μ u naší nemocné 34,9 g/l je nejvyšší dosud v literatuře popsána. V roce 2005 vyšly v časopise *Clinical Chemistry* dvě práce [5, 6], které využily k průkazu HCD kapilární elektroforézu. Práce Luraschiho et al. doporučuje CE ve spojitosti s imunotitrací k detekci a charakterizaci nízkých koncentrací volných těžkých řetězců v séru. Práce Mariëna et al. [6] upozorňuje na to, že některé HCD nejsou při CE detekovatelné a demonstruje tuto skutečnost na pozorování μ -HCD, kdy malý gradient monoklonálních těžkých řetězců μ byl skryt v oblasti α -2 globulinů.

Obtížná identifikace M-gradientů tvořených volnými monoklonálními těžkými řetězci při rutinní elektroforéze je popisována u více než 50 % pozorování [1]. Naše pozorování je tedy neobvyklé i mohutným M-gradientem v oblasti β -globulinů, který odrážel vysokou koncentraci volných μ řetězců. Imunotypizace při CE a IF na agaróze umožňují jednoznačně určit μ -HCD a nahrazují dříve používanou metodu imunoselektce [9].

Terapie u nemoci z těžkých řetězců μ není ustálena, ale většina nemocných je léčena podle protokolů pro B-CLL nebo pro mnohočetný myelom. Yanai et al. [13] popsali úspěšnou léčbu nemocné s μ -HCD fludarabin monofosfátem.

Závěr

Popsali jsme nové pozorování velmi vzácné monoklonální gamapatie μ -HCD. Pozorování je výjimečné jak po stránce klinické, tak i po stránce laboratorní. Pacientka onemocněla postupně těmito nádory: karcinomem vulvy, Hodgkinovým lymfomem, μ -HCD a akutní leukémií. Po stránce laboratorní byla u nemocné prokázána dosud nejvyšší koncentrace monoklonálních těžkých řetězců μ v séru s negativním nálezem bílkoviny (těž-

kých i lehkých řetězců Ig) v moči. Jde o první pozorování nemoci z těžkých řetězců μ , u kterého byla k analýze μ těžkých řetězců použita CE s imunotypizací a vysokorozlišovací dvojrozměrná elektroforéza s následujícím imunoblottingem.

Literatura

1. Forte, F. A., Prelli, F., Yount, W. J., Jerry, L. M., Kochwa, S., Franklin, E. C., Kunkel, H. G. Heavy chain disease of the μ (γ M) type: report of the first case. *J. Hematol.*, 1970, 36, p. 137–144.
2. Guglielmo, P., Granata, P., Di Raimondo, F., Lombardo, T., Giustolisi, R., Cacciola, E. „ μ “ heavy chain type „non secretory“ myeloma. *Scand. J. Haematol.*, 1982, 29, p. 36–40.
3. Ho, K. N., Jones, J., Li, K. C., Tsai, S. Y. Detection of heavy chain diseases in Hong Kong, 1984–1985. *Med. Lab. Sci.*, 1987, 44, p. 130–136.
4. Kyle, R. A. The monoclonal gammopathies. *Clin. Chem.*, 1994, 40/11 (B), p. 2154–2161.
5. Luraschi, P., Infusino, I., Zorzoli, I., Merlini, G., Fundaró, C., Franzini, C. Heavy chain disease can be detected by capillary zone electrophoresis. *Clin. Chem.*, 2005, 51, p. 247–249.
6. Mariën, G., Verhoef, G., Bossuyt, X. Detection of heavy chain disease by capillary zone electrophoresis. *Clin. Chem.*, 2005, 51, p. 1302–1303.
7. O'Reilly, D. St. J., Adjukevicz, A., Whicher, J. T. Biochemical findings in a case of μ -chain disease. *Clin. Chem.*, 1981, 27, p. 331–333.
8. Seligmann, M. *Heavy chain disease*. In Multiple myeloma and other paraproteinemias. Ed. Delamore, I.W. Edinburgh : Churchill Livingstone 1986, p. 263–285.
9. Tichý, M., Stulík, J., Ošanec, J., Škopek, P. Electrophoretic characterization of a γ -1-heavy chain disease. *Neoplasma*, 2000, 47, p. 118–121.
10. Tissot, J. C., Tridon, A., Ruivard, M., Layer, A., Henry, H., Philippe, P., Schneider, P. Electrophoretic analysis in a case of monoclonal γ chain disease. *Electrophoresis*, 1998, 19, p. 1771–1773.
11. Vilpo, J. A., Irljala, K., Viljanen, M. K., Klemi, P., Kouvonen, I., Rönnemaa, T. δ -heavy chain disease: a study of a case. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1980, 17, p. 584.
12. Wahner-Roedler, D. L., Kyle, R. A. μ -heavy chain disease: presentation as a benign monoclonal gammopathy. *Am. J. Hematol.*, 1992, 40, p. 56–60.
13. Yanai, M., Maeda, A., Watanabe, N., Sugimoto, N., Matsu-shita, A., Nagai, K., Oida, T., Takahashi, T. Successful treatment of μ -heavy chain disease with fludarabine monophosphate: a case report. *Int. J. Hematol.*, 2004, 79, p. 174–177.
14. Zetterberg, H., Nilsson-Ehle, H. False-negative result in the detection of an IgM monoclonal protein by capillary zone electrophoresis. *Clin. Chem.*, 2004, 50, p. 1878–1879.

Do redakce došlo 25. 1. 2007.

Adresa pro korespondenci:
Prof. RNDr. Miloš Tichý, CSc.
ÚKBD LF UK a FN Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: tichy@fnhk.cz