

Hevylite – nová analytická metoda v diagnostice a hodnocení průběhu monoklonálních gamapatií

Ščudla V.¹, Pika T.¹, Heřmanová Z.²

¹ III. interní klinika LF UP a FN, Olomouc

² Oddělení klinické imunologie LF UP a FN, Olomouc

SOUHRN

Náplní sdělení je souhrnná informace o Hevylite (HLC – heavy/light chain) analytické metodě rozšiřující dosavadní možnosti diagnostiky, typizace a monitorování průběhu maligních monoklonálních gamapatií (MG) a dalších B-buněčných lymfoproliferativních stavů včetně primární systémové AL-amyloidózy, primární Waldenströmovy makroglobulinémie a potenciálně i ne Hodgkinských lymfomů. Jsou popsány východiska této nové techniky a metodické aspekty automatizované kvantitativní imunochemické analýzy využívající vysoce specifické, avidní, polyklonální ovčí HLC protilátky s významným potlačením zkřížené reaktivity, jejichž terčem jsou unikátní junkční epitopy umístěné mezi konstantními doménami těžkých (HC) a lehkých (LC) řetězců molekul imunoglobulinu (Ig). Použité HLC protilátky umožňují separátní rozpoznání a kvantifikaci lehkých řetězců κ a λ v rámci jednotlivých tříd imunoglobulinů, tedy IgG κ a IgG λ , IgA κ a IgA λ i IgM κ a IgM λ , včetně stanovení poměru dominantního a suprimovaného Ig, tj. poměr Ig κ/λ a tím i posouzení klonality hodnoceného procesu. Tato nová metoda poskytuje reproduktibilní výsledky i v případě nízké hodnoty monoklonálního imunoglobulinu (MIg) a volných lehkých řetězců v séru (sVLŘ), nebo i v situaci „překrytí“ M-proteinu např. transferinem, haptoglobinem nebo C3 složkou komplementu v rámci standardní elektroforézy bílkovin séra. K přednostem Hevylite metody patří skutečnost, že stanovení HLC Ig κ/λ poměru koriguje variabilitu katabolismu IgG i ostatních tříd MIg a změny hematokritu i plazmatického objemu. Jde o metodu citlivější, nežli je standardní gelová elektroforéza bílkovin séra s obdobnou, případně i vyšší senzitivitou, nežli je imunofixační elektroforéza séra s výhodou poskytnutí i kvantitativně vyjádřených výsledků měření. Vyšetření HLC rozšiřuje dosavadní možnosti nejen v oblasti diagnostiky, ale i ve sféře monitorování průběhu maligních MG s možností včasné detekce remise, relapsu či progresu nemoci a nepostrádá ani prognostický potenciál. Skutečné postavení Hevylite metody ovšem vyplyne teprve z výsledků dalších, prospektivních randomizovaných studií a ze zkušeností reálné klinické praxe.

Klíčová slova: HLC (heavy/light chain), Hevylite, imunochemická analýza, monoklonální gamapatie, mnohočetný myelom, AL-amyloidóza, primární Waldenströмова makroglobulinémie.

SUMMARY

Ščudla V., Pika T., Heřmanová Z.: Hevylite – the new analytic method in diagnostics and monitoring of monoclonal gammopathies

The aim of the presented study is to display a general information about the Hevylite (HLC – heavy/light chain) analytical method, spreading present possibilities of diagnostics, typization and course monitoring of malignant monoclonal gammopathies (MG) and other B-cell lymphoproliferative diseases including primary systemic AL-amyloidosis, primary Waldenström macroglobulinemia and potentially also non-Hodgkin lymphomas. The study describes the basis of this new method, methodical aspects of automatic quantitative immunochemical analysis using high specific, avid, polyclonal ovine HLC anti-bodies with substantial suppression of crossreactivity, and their targets are unique junction epitopes located between constant domains of heavy (HC) and light (LC) chains of immunoglobulin molecules (Ig). Used HLC anti-bodies allow separate recognition and quantification of light chains κ and λ within the separate immunoglobulin classes, then IgG κ and IgG λ , IgA κ and IgA λ also IgM κ and IgM λ , including assessment of relationship of dominant and suppressed Ig, i.e. Ig κ/λ ratio, thereby the clonality of assessed process examination. This new method provides reproducible results also in case of low levels of monoclonal immunoglobulin (MIg) and free light chains in serum (sFLC), or in condition of M-protein „overlap“ e.g. by transferrin, haptoglobin or C3 complement compound. The advantage of Hevylite method is that assessment of HLC Ig κ/λ ratio amends the catabolism variability of IgG and other MIg classes, and also the changes of haematocrit and plasmatic volume. The method is more sensitive than standard gel electrophoresis of serum protein with analogous, perhaps even higher sensitivity than serum immunofixation electrophoresis, with advantage of quantitative analytical representation of results. HLC assessment extends current possibilities not only in the field of diagnostics, but also in monitoring of malign MG with chance of the early detection of remission, relapse or progression of the disease and also has a prognostic potential. But the real status of Hevylite method will emerge from results of other prospective randomized trials and from real clinical practice experience.

Key words: HLC (heavy/light chain), Hevylite, immunochemical analysis, monoclonal gammopathy, multiple myeloma, AL-amyloidosis, primary Waldenström macroglobulinemia.

Úvod

Monoklonální gamapatie (MG) jsou stavy, vyznačující se maligní nebo potenciálně maligní monoklonální proliferací elementů B-buněčné linie, provázené produkcí

homogenního/monoklonálního proteinu (M-protein, M-komponenta, „paraprotein“), nebo jeho strukturálních komponent, tj. lehkých řetězců (LŘ) κ nebo λ a vzácně i těžkých řetězců molekuly imunoglobulinu (Ig) typu α , β , μ a δ [1, 2, 3, 4]. Z rozsáhlé analýzy souboru 1056

nemocných provedené na Mayo klinice v roce 2002 vyplynulo, že nejčastější MG je monoklonální gamopatie nejistého významu (MGNV, 59 %), vzácněji primární systémová AL-amyloidóza (12 %), zatímco ve skupině maligních MG jde především o mnohočetný myelom (MM) a jeho variantní formy (20 %), u ~ 3 % o zhoubné lymfoproliferativní stavy, tj. ne Hodgkinovy lymfomy (NHL), chronickou lymfatickou leukémií (CLL), primární Waldenströmovou makroglobulinémií (WM ~ 2 %) a solitární plazmocytem (1 %), zatímco velmi vzácné jsou „nemoci z depozice lehkých řetězců“ a „nemoci těžkých řetězců“ [5]. Rozlišení jednotlivých typů MG se opírá o standardní diagnostická kritéria, avšak v běžné klinické praxi dochází ke vzniku situací, vyžadujících další speciální diagnostické testy [1, 3, 6]. Náročnost této problematiky vyplývá rovněž z technických a interpretačních limitací standardně používaných metod detekce a kvantifikace monoklonálního imunoglobulinu (Mlg) i jeho strukturálních komponent (LŘ κ a λ), tj. standardní gelové elektroforézy bílkovin séra a moče (SPE), kapilární elektroforézy séra a imunofixační elektroforézy (IFE) [4, 7, 8, 9]. V posledních letech došlo k doplnění výše uvedených analytických metod o vysoce citlivou techniku automatizované imunochemické analýzy volných lehkých řetězců imunoglobulinu (VLŘ) v séru, využívající vysoce specifické detekční a avidní polyklonální protilátky proti vnitřnímu epitopu molekul LŘ κ a λ , umožňující kvantitativní stanovení i velmi nízkých koncentrací obou volných lehkých řetězců, např. souprava Freelite™ Binding Site [2, 7, 8, 10]. Neobyčejným přínosem této metodiky je možnost stanovení poměru κ/λ (index monoklonality), jehož předností je nezávislost na stavu renální clearance, variabilitě krevního objemu a schopnost zohlednění nádorově podmíněné suprese alternativního nemaligního VLŘ. Vysoká klinická upotřebitelnost analýzy sVLŘ v séru vychází ze dvou klíčových okolností: mnohem vyšší senzitivity a specifity oproti běžným elektroforetickým technikám a možnosti výpočtu poměru κ/λ jako měřitelného výrazu klonality přítomných změn [11]. Současné vyšetření séra s použitím SPE a analýzy sVLŘ včetně jejich poměru κ/λ zajišťuje diagnostice MG více nežli 99% přesnost a ve většině případů odstraňuje potřebu analýzy moče [12]. Neobyčejný přínos vyšetřování sVLŘ v séru je dokumentován skutečností, že přítomnost normálního poměru sVLŘ κ/λ je považována za klíčové kritérium „guidelines“ vypracovaných IMWG (International Myeloma Working Group) pro rozpoznání tzv. „stringent“ kompletní remise [13]. Z rozsáhlé srovnávací studie, provedené nedávno na Mayo klinice vyplynulo, že za jednoduchý a efektivní iniciační diagnostický screening, vedoucí ke snížení analytické senzitivity lze považovat u MG s velkou náloží nádorové tkáně, tj. u MM, WM a asymptomatické/doutnající formy MM pouze vyšetření SPE a sVLŘ v séru [14]. Vynechání IFE z diagnostického screeningového algoritmu naopak snižuje detekční senzitivitu u MGNV o 8 %, v případě POEMS syndromu o 23 %, u solitárního plazmocyтому o 4 % a u AL-amyloidózy o 1 % [14]. Dnes již jednoznačně ověřený přínos vyšetřování hladin sVLŘ v séru v diagnostice, sledování průběhu, hodnocení hloubky léčebné odezvy

a v odhadu prognózy nemoci, a to zejména u oligosekrečních forem plazmocelulárních dyskrasií, včetně AL-amyloidózy a nesekretorické formy MM, našel své vyjádření v recentních IMWG „guidelines“ věnovaných MM a dalším příbuzným stavům [15].

Předložené sdělení se zaměřilo na poskytnutí souhrnné informace o principu a potenciálním klinickém využití nové analytické metody Hevylite umožňující separátní stanovení koncentrace lehkých řetězců κ/λ v intaktní molekule IgG, IgA a IgM typu monoklonálního imunoglobulinu a jež si vytkla za cíl dosažení obdobného analytického přínosu u MG, jako je dnes již standardní vyšetřování hladin sVLŘ v séru [11, 16].

Charakteristika metody

Stěžejním východiskem zavedení nové Hevylite (HLC – heavy/light chain) analytické metody jsou významné technické limitace dosavadních analytických postupů využívaných k vyšetření Mlg v séru a v moči. Standardní elektroforéza bílkovin séra je jednoduché a levné, zcela běžně dostupné vyšetření, postrádající ovšem dostatečnou citlivost a přesnost, zejména v případě nízkých koncentrací Mlg (1–3 g/l), a v případě přítomnosti tzv. fenoménu překrytí. Jde zejména o vyšetření IgA typu M-proteinu, neboť jeho elektroforetická migrační pozice interferuje s haptoglobinem v oblasti α frakce a s transferinem i C3 složkou komplementu v oblasti β , zatímco v případě analýzy M-proteinu třídy IgM je na závadu sklon makroglobulinu k autoagregaci [17]. Přínosem imunofixační elektroforézy (IFE) je její vysoká citlivost v rozpoznání přítomnosti a v určení izotypu Mlg, ovšem závažným nedostatkem je nemožnost kvantitativního vyjádření podchycených změn [8, 11]. V současnosti již naprosto standardně využívané nefelometrické nebo turbidimetrické vyšetření sérových hladin sVLŘ se vyznačuje vysokou přesností i v případě jejich nízkých koncentrací s možností kvantitativního vyjádření ke stupni klonality procesu (index κ/λ) a s přirozeným zohledněním proměnlivosti renálního metabolismu sVLŘ a změn krevního objemu.

Stěžejním východiskem zavedení Hevylite techniky bylo zvládnutí přípravy specifických HLC polyklonálních protilátek (Hevylite imunoeseje), jejichž terčem jsou unikátní junkční epitopy mezi konstantními doménami těžkých (HC) a lehkých řetězců (LC) molekul imunoglobulinu (obr. 1). Získané HLC protilátky umožňují separátní rozpoznání a kvantifikaci κ a λ LŘ v rámci jednotlivých tříd Mlg, tedy IgG κ a IgG λ , IgA κ a IgA λ i IgM κ a IgM λ (obr. 2). V rámci vyšetření jedné imunoglobulinové třídy umožňuje např. kvantitativní separátní vyhodnocení imunoglobulinu IgG κ a IgG λ a navíc i stanovení poměru hladiny maligního, dominantně postiženého vs. nezhoubného suprimovaného Ig, obdobně jako v případě vyšetření indexu κ/λ sVLŘ s pomocí Freelite™ Binding Site metody [8, 11]. Klíčovým východiskem vypracování Hevylite analytické metody byla příprava vysoce specifických, avidních polyklonálních ovčích protilátek s výrazným, i když doposud ne zcela úplným potlačením zkřížené reaktivity [11]. Pomocí imunizačních,

adsorpčních a purifikačních technik bylo připraveno doposud 6 individuálních vysoce specifických a silně reaktivních IgG, IgA a IgM/HLC antisér vhodných pro nefelometrii a turbidimetrii, umožňujících rozpoznání a kvantifikaci jednotlivých LR v jednotlivých hlavních třídách MIg.

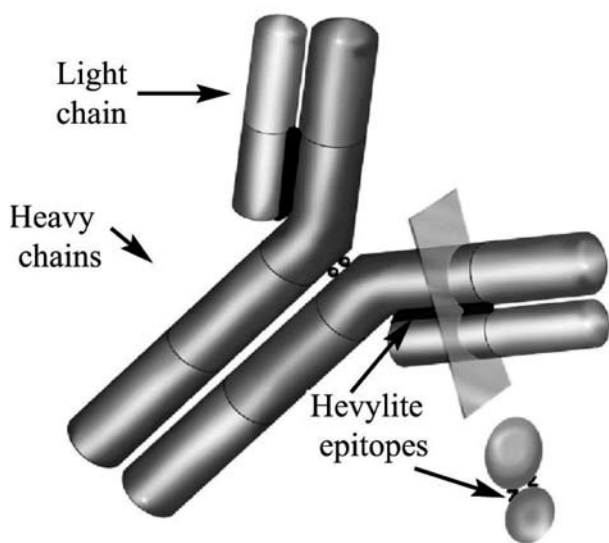


Fig. 1. Target epitopes (in black) for Hevylite antibodies are on the constant regions (CH1 and CL) between the heavy and light chains of immunoglobulin molecules (Courtesy of AR Bradwell and J Hobbs)

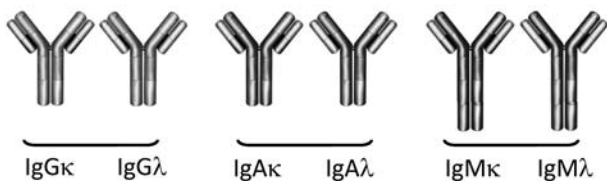


Fig. 2. Heavy chain/light chain pairs of IgG, IgA and IgM molecules showing the target epitopes for Hevylite immunoassays in black (Courtesy of AR Bradwell)

Koncentrace intaktního Ig a jejich HLC κ a λ „subsetů“ je za normálních okolností udržována v poměrně úzkém rozmezí. Na podkladě analýzy testovacího panelu dárců krve byla připravena pro potřeby praktického použití doporučená rozmezí normálních hodnot HLC imunoglobulinů včetně HLC poměrů (tab. 1). Provedené statistické šetření (Pearsonův korelační test) pro sumaci IgG, IgA a IgM κ a λ k celkové hladině IgA a IgM prokázalo vysokou spolehlivost (~ 0.9 , $p < 0,01$), ale nižší analytickou způsobilost v případě IgG typu M-proteinu nežli při použití SPE [8, 11, 17]. Je ale nasnadě, že ke zpřesnění v současnosti doporučených limitů je nutné provedení dalších analýz, zahrnujících jedince i v seniorském věku a nemocné s přítomností různých zánětlivých a autoimunních stavů. Z dosavadních studií vyplývá, že poměr HLC κ/λ se udržuje v rozmezí současných normálních limitů i v případě vyšetření jedinců se zvýšením hodnot polyklonálních imunoglobulinů [8].

Ověření v podmínkách klinické praxe

Již z biologické podstaty choroby se nemocní s MM vyznačují abnormální koncentrací HLC κ a HLC λ s na-

rušeným poměrem HLC κ/λ . Srovnání výsledků vyšetření HLC v souboru 18 nemocných s IgG typem MM v období diagnózy nemoci oproti sestavě 103 zdravých dárců krve prokázalo vysoce abnormální poměr HLC κ/λ , a tím tedy i vysokou citlivost pro monoklonální charakter neoplastického stavu, a to zřejmě nejen v důsledku vzestupu „tumorózních“, ale i suprese „netumorózních“ molekul HLC M-proteinu (obr. 3). V případě srovnání 33 nemocných s IgA typem MM se souborem 191 normálních sér dárců krve byla zjištěna odchylnost HLC κ/λ poměru u všech nemocných vyznačujících se pozitivitou při vyšetření s pomocí IFE (obr. 4). Důkladná analýza ukázala, že s výjimkou MIg třídy IgG byla Hevylite analýza IgA a IgM typu MIg stejně citlivá jako standardní SPE a srovnatelná u IgG, IgA a IgM typu MIg s výsledky při použití IFE [8, 11]. Potvrdilo se, že HLC analýza přináší u nemocných vyznačujících se pouhou pozitivitou IFE navíc i kvantitativně vyjádřené výsledky, přičemž stanovení poměru HLC κ/λ významně rozšířilo spektrum nalezených změn oproti pouhému stanovení výše MIg při použití standardní SPE, zřejmě i v důsledku zohlednění hloubky „imunoprese“ s poklesem „netumorózního“ Ig.

Table 1. Normal concentration range of HLC (heavy/light chain) immunoglobulins and HLC ratios in blood donors (IgG 103 samples; IgA 191 samples; IgM 118 samples) (Courtesy of AR Bradwell)

Immunoglobulin	Means and Ranges
IgG κ	7231 mg/L (3608–11655)
IgG λ	4203 mg/L (2023–9158)
IgG κ/λ Ratio	1.8 (1.15–2.70)
IgA κ	1280 mg/L (300–2440)
IgA λ	936 mg/L (312–2300)
IgA κ/λ Ratio	1.47 (0.479–3.26)
IgM κ	837.6 mg/L (267–1960)
IgM λ	563.5 mg/L (185–1320)
IgM κ/λ Ratio	1.6 (0.71–2.61)

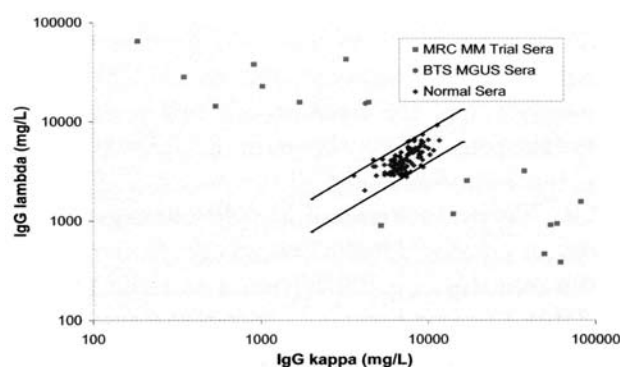


Fig. 3. IgG Hevylite tests on 103 blood donor sera (95% range) and 18 IgG multiple myeloma (MM) patients at disease presentation. Immunosuppression of the non-tumour HLC from hypercatabolism is apparent in high concentration samples One blood donor sample (BTS) had an IgG λ monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) confirmed by immunofixation electrophoresis (IFE). MRS-Medical Research Council (Courtesy of AR Bradwell).

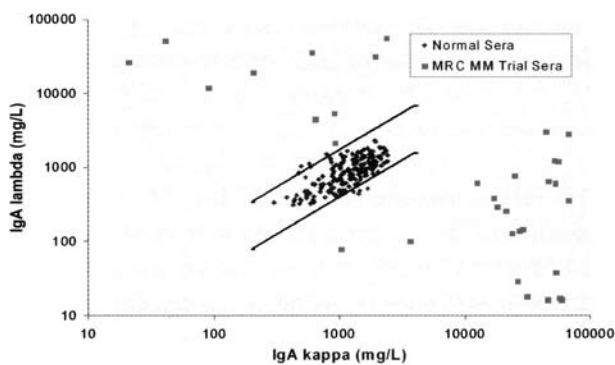


Fig. 4. IgA Hevylite tests on 191 blood donor normal sera (95% range) and 33 IgA multiple myeloma (MM) patients at disease presentation

All MM samples were abnormal by Hevylite while 6 of the samples could not be quantitated by serum protein electrophoresis (SPE) because of overlying protein bands (Courtesy of AR Bradwell).

Jde tedy o metodu, poskytující mnohem dynamičtější informaci, nežli standardně používaná SPE [17]. Jednoznačnou výhodou stanovení poměru HLC κ/λ je na rozdíl od elektroforetického stanovení výše M-proteinu okolnost, že dosažený výsledek není zkreslen změnou objemu krve a výše hematokritu, ani variabilitou katabolismu Mlg, způsobující až 30–50% kolísání Mlg bez vztahu k vlastní neoplastické produkci [18]. Je všeobecně známo, že výše IgG i IgA M-komponenty závisí v podstatné míře na stupni jejich degradace [19]. Bylo zjištěno, že neonatální Fc receptory pro IgG (FcRn) se váží na albumin a IgG imunoglobulin [20]. Heterodimerické molekuly FcRn ochraňují IgG imunoglobulin a albumin od proteolytické digesce a uplatňují se při jejich mnohonásobné recyklaci zpět na povrch buněk s jejich následným uvolněním do kolující krve. V případě vysoké koncentrace IgG imunoglobulinu v séru tak dochází k úplné saturaci FcRn, což způsobuje, že IgG vázaný na FcRn je recyklován, zatímco volný IgG bez vazby na FcRn je urychleně degradován. Podle závěrů některých studií je možno obdobné argumenty aplikovat do jisté míry i na imunoglobulin IgA [21]. Bylo zjištěno, že katabolický poločas imunoglobulinu IgG je v případě jeho normální koncentrace v séru ~ 21 dnů, zatímco v případě vysoké koncentrace má jeho frakce bez možnosti vazby na FcRn katabolický poločas pouze ~ 3 dny. Naopak při velmi nízké koncentraci IgG imunoglobulinu dosahuje katabolický poločas v důsledku vystupňované ochrany délkou několika týdnů [20, 22, 23, 24]. Vzhledem k tomu, že v případě Mlg třídy IgA a IgM není clearance úzce závislá na jejich koncentraci, je katabolický poločas IgA M-proteinu ~ 6 dnů, IgM ~ 5 dnů a IgD pouze 3 dny, z čehož vyplývá, že skutečná nálož nádorové masy je u těchto tříd Mlg ve vztahu k obdobné koncentraci u IgG typu relativně větší [19].

Z uvedeného vyplývá, že monitorování průběhu MM podle změn výšky M-komponenty v séru není dostatečně spolehlivé, neboť neodráží věrohodně změnu produkce Mlg s ohledem na rozsah a vlastnosti nádorové tkáně. Značně vysoká hodnota Mlg typu IgG v séru u MM způsobuje prostřednictvím plné saturace FcRn receptorů

a suprese normálních plazmatických buněk významný pokles polyklonálních IgG imunoglobulinů [25]. Nemocní s MM vyznačující se vysokou koncentrací M-proteinu, a tedy i vysokou náloží myelomové tkáně a rychlým počátečním poklesem koncentrace IgG monoklonálního imunoglobulinu po indukční terapii, mívají rychlý relaps nemoci a nepříznivou prognózu nemoci [26]. Již před více než 30 lety bylo zjištěno, že koncentrace Mlg v séru významně kolísá v závislosti na hodnotě hematokritu i objemu plazmy v krevním řečišti, přičemž oba vlivy ovlivňují koncentraci IgG, IgA a IgM M-proteinu protichůdně [18]. Ukázalo se, že podstatné zvýšení masy červených krvinek (hematokritu), např. po úspěšné léčbě, vede ke zvýšení koncentrace Mlg bez skutečné změny jeho množství, přičemž v důsledku rozdílné velikosti molekul je nutno vzít v potaz i jejich odlišné setrvávání ve vaskulárním kompartmentu (u IgM v 90 %, u IgG v 50 % a v případě sVLŘ pouze ve 20 %). U MG dochází vzhledem k osmotické aktivitě molekul Mlg rovněž ke změnám plazmatického objemu, kdy vysoká koncentrace Mlg objem plazmy podstatně zvyšuje [18, 27]. Dojde-li po léčbě k poklesu hladiny M-proteinu, poklesne i plazmatický objem a „vice-versa“. Pouhé sledování hladiny M-proteinu tedy podhodnocuje skutečné změny nádorové produkce, a není proto spolehlivým výrazem objemu nádorové masy. Reálné uplatnění těchto různorodých faktorů může vysvětlovat, proč hodnota Mlg v séru při diagnóze MM není vhodným prognostickým faktorem, zatímco hladina sVLŘ v séru i poměr sVLŘ κ/λ , stejně jako poměr Ig κ/λ (Hevylite metoda), se dobrým vztahem k prognóze nemocných s MM vyznačují [8, 28] – obrázek 5.

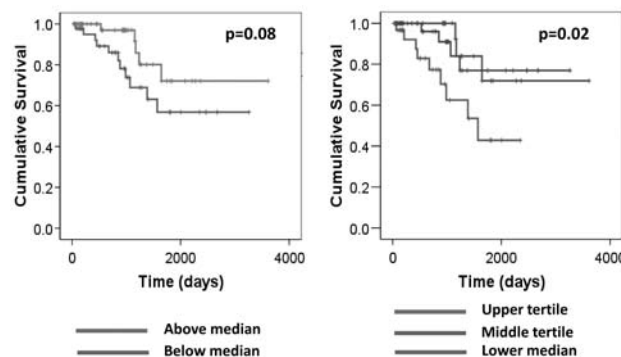


Fig. 5. Prognostic significance of HLC (heavy/light chain) ratio examination (Courtesy of J Hobbs)

Přínos pro klinickou praxi

Z dosavadních zkušeností s použitím Hevylite metody vyplývá, že stanovení poměru HLC κ/λ je mnohem přesnější než standardně používané analytické techniky, neboť je uchráněno od výše diskutovaných zkreslujících vlivů. Je z principu mnohem vhodnější pro sledování stavu a průběhu maligních monoklonálních gamapatií (MMG) než pouhé monitorování pohybu M-komponenty s pomocí standardní gelové elektroforézy bílkovin séra.

Mnohočetný myelom

Již první zkušenosti potvrdily, že všichni nemocní s MM, vyšetření při diagnóze nemoci se vyznačovali abnormální hodnotou HCL poměru (Ig κ /Ig λ), přičemž

u mnohých byla zjištěna imunoprese netumorálních HCL [11]. Sledování poměru HLC κ/λ u MM v průběhu léčby přináší informaci o stupni selektivního zániku myelomových plazmocytů ve srovnání s populací nemaligních plazmocelulárních forem, tedy zhodnocení stupně selektivní redukce nádorové populace jako výsledku efektivní léčby. Hevylite metoda má zřejmě potenciál poskytnutí pohotové a dynamické informace o stupni léčebné odezvy a je tedy nadějí i pro monitorování průběhu této zhoubné nemoci [8, 11]. Bylo zjištěno, že v případě nedosažení kompletní remise (KR) při léčbě IgG typu MM přetrvává stále abnormální poměr IgG κ/λ , a to dokonce i v případě negativy imunofixací analýzy. V případě nastupujícího relapsu MM dochází k vývinu patologické hodnoty IgG κ /IgG λ podstatně dříve než při použití pouhé IFE [11]. Z dosavadních zkušeností tedy vyplývá, že dlouhodobé monitorování změn HLC κ/λ má slibný potenciál k podchycení nejen úplné remise MM, ale i detekce neúplné léčebné odezvy a časné fáze relapsu onemocnění [29]. Oproti standardně používané SPE má stanovení HLC κ/λ vyšší citlivost s vyšším rozsahem naměřených hodnot, schopnost přesného rozpoznání neuspokojivé, nebo chybějící léčebné odezvy k chemoterapii a potenciál časnějšího rozpoznání relapsu či progresu nemoci než elektroforetické monitorování sérové hladiny M-komponenty v séru i výsledky IFE. Přínosem Hevylite metody je především vysoká citlivost při hodnocení relapsu i progresu nemoci v rámci oligosekreční formy MM provázené nízkou hodnotou M-proteinu přes jednoznačný nárůst myelomové tkáně dokumentované výrazným zmnožením myelomové populace v KD či průkazem extramedulární progresu nemoci.

Ukazuje se, že vyšetření HLC je schopno vyhodnotit změny Mlg detekovatelné doposud pouze pomocí IFE, přičemž nejslibněji vynívá podle očekávání stanovení HLC κ/λ poměru. V prvotních studiích bylo ale zaznamenáno, že přes pozitivitu SPE a IFE byly zjištěny normální výsledky při vyšetření VLŘ a HLC. V případě nízké hodnoty M-proteinu jde zřejmě o MGNV, případně o „low risk“ MM [11]. V příznivém světle vynívá i předběžné vyhodnocení prognostického významu vyšetřování poměru HLC κ/λ v séru, a to při použití mediánů ($p = 0,08$) i terciánů ($p = 0,02$) naměřených hodnot [11, 28] – viz obr. 5. Ve stejném souboru nemocných s MM bylo současně ověřeno, že koncentrace intaktního Mlg v séru vztah k celkovému přežití postrádala, a to při použití mediánu ($p = 0,89$) i terciánů ($p = 0,84$) naměřených hodnot [28].

AL-amyloidóza

Dosavadní zkušenosti nasvědčují, že vyšetřování HLC je účelné i u nemocných s primární systémovou AL-amyloidózou. V souboru 16 nemocných s IFE detekovanou přítomností Mlg typu IgA vykazovalo 14 vzorků abnormální poměr IgA κ /IgA λ (obr. 6). HLC analýza séra v souboru 50 nemocných s negativním výsledkem SPE a IFE odhalila pozitivitu u 24 jedinců, tedy ve 48 %, přičemž abnormální poměr HLC IgA κ/λ byl zjištěn v 26 %, IgG κ/λ ve 20 % a IgM κ/λ ve 2 %. Dosažené výsledky tedy nasvědčují vysoké citlivosti HLC techniky i u stavů

s velmi nízkou hladinou Mlg u AL-amyloidózy, což vytváří velmi dobré předpoklady pro využití Hevylite metody v monitorování léčebné odezvy i v případech s normálním nebo jen lehce abnormálním výsledkem vyšetření VLŘ v séru, tedy v situaci s velmi obtížným hodnocením průběhu nemoci a reakce na podanou léčbu [8].

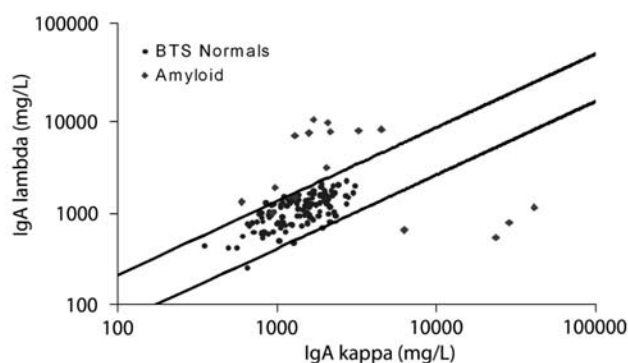


Fig. 6. IgA Hevylite tests on 118 unselected blood donor sera (95% range) and 16 AL-amyloidosis samples with IgA monoclonal proteins (14/16 had abnormal Hevylite ratios and all could be quantified) (Courtesy of AR Bradwell)

Zhoubné lymfoproliferativní stavy

Při analýze sér nemocných s ne Hodgkinskými lymfomy byla prokázána vyšší citlivost HLC metody než při použití standardní SPE (48% vs 18%), přičemž pozitivita HLC techniky byla zaznamenána u primární makroglobulinémie u všech vyšetřených nemocných, u difuzního B-buněčného lymfomu v 65 %, u lymfomu plášťové zóny v 63 % a v případě folikulárního lymfomu ve 29 % analyzovaných případů. Je nasnadě, že zjištění HLC positivity s odchylným indexem κ/λ již v jedné třídě Ig je dokladem monoklonality procesu [8]. HLC protilátky byly s úspěchem vyzkoušeny i při imunohistochemickém vyšetření lymfatických uzlin, kostní dřene a dalších tkání obsahujících B-lymfocyty a plazmocyty s tím, že namísto techniky dvojího barvení pomocí standardních monoklonálních protilátek byly použity HLC protilátky označené peroxidázou nebo fluorochromem. Je nasnadě, že získané výsledky jsou příslibem citlivého průkazu klonality u širokého spektra imunoproliferativních chorob. Z dosavadních předběžných výsledků vyplývá, že jsou nezbytné další upřesňující studie, které blíže osvětlí reálnou upotřebitelnost vyšetřování pomocí HLC techniky při monitorování průběhu a léčebné odezvy u nemocných s různými zhoubnými lymfoproliferativními stavy [8].

Závěr

Na podkladě dosavadních zkušeností lze tedy konstatovat, že Hevylite technika velmi nadějně rozšiřuje dosavadní možnosti typizace a monitorování průběhu maligních monoklonálních gamapatií i dalších B-buněčných proliferací, včetně primární systémové AL-amyloidózy a NHL. K jejím přednostem patří jednoduchá, rychlá a automatizovaná technika umožňující přesnou a reproduktibilní identifikaci, typizaci a kvantifikaci jednotlivých složek M-proteinu. Stanovení HLC Ig κ /Ig λ

poměru koriguje důsledky variability katabolického poločasu imunoglobulinu typu IgG i důsledky vlivu změn hematokritu a plazmatického objemu na měření sérových hladin M-proteinu. S výjimkou IgG jde o metodu citlivější, než je standardní SPE, avšak s obdobnou, popř. i vyšší citlivostí, než je IFE, navíc také s možností poskytovat kvantitativní výsledky. Jde o metodu, která je doplňkem SPE a vyšetření hladin sVLŘ s tím, že ji nelze považovat v současné reálné klinické praxi již za náhradu IFE, neboť IFE technika je nejen vysoce senzitivní, ale i vysoce flexibilní a umožňuje detekci biklonální gamapatie, IgD a IgE monoklonálního imunoglobulinu i řetězců α , γ a μ v případě nemoci těžkých řetězců [17]. Předností HLC metody je možnost kvantitativního vyhodnocení zastoupení jednotlivých nádorových klonů s citlivým vyhodnocením monoklonality procesu a s poskytnutím informace o depleci „nenádorové“ složky Ig. Zdá se, že vyšetření poměru $Ig\kappa/Ig\lambda$ přispívá v případě nízké hladiny Mlg – spolu s normálním výsledkem vyšetření hladin sVLŘ – k rozpoznání nemocných s nízkým stupněm klinického rizika a s příznivým prognostickým výhledem. Hevylite metodu lze s úspěchem použít i při monitorování průběhu MM a AL-amyloidózy, a to především u stavů s nízkou hodnotou M-komponenty. Sledování poměru $Ig\kappa/Ig\lambda$ je citlivým indikátorem vývoje MM včetně rozpoznání KR a zhodnocení minimální reziduální nemoci, ale i časného podchycení nástupu opětovného relapsu či progresu MM. Poskytuje reprodukovatelné výsledky i v případě „problematické“ standardní SPE s přítomností fenoménu „překrytí“ M-proteinu transferinem, haptoglobinem nebo C3 složkou komplementu a potenciálně i v odlišení rekurence původního paraproteinu od přítomnosti oligoklonálních proužků, objevujících se u některých nemocných po vysokodávkované chemoterapii s podporou autologní transplantace kmenových krvetvorných buněk [17]. Hevylite technika najde pro svou vysokou citlivost nejspíše uplatnění jako komplementární metoda k vyšetřování koncentrace sVLŘ v séru, zejména u neoplastických stavů s omezenou produkcí VLŘ. Zatímco zavedení vyšetřování sérových hladin sVLŘ (Freelite™) bylo v monitorování MM a některých dalších B-buněčných dyskrasií revolucí, rozšíření dosavadního souboru vyšetření MG o metodu Hevylite (HLC) přinese pravděpodobně další zvýšení dosavadní úrovně péče o tuto skupinu chorob. Je ale nasnadě, že o definitivním postavení této nové analytické metody ve vyšetřovacím algoritmu MG rozhodnou výsledky prospektivních randomizovaných studií i zkušenosti získané v rámci reálné klinické praxe.

Literatura

1. **Adam, Z., Krejčí, M., Hájek, R.** *Mnohočetný myelom a další plasmocelulární malignity*. In Adam, Z., Vorlíček, J., Vaníček, J. et al. *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004, s. 515–529.
2. **Engliš, M.** *Stanovení volných lehkých řetězců imunoglobulinů v séru v diagnostice a monitorování monoklonálních gamapatií*. Dostupné na: http://www.cskb.cz/vzdelavani/light_chain.htm
3. International Myeloma Working Group Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International myeloma working group. *Brit. J. Haematol.*, 2003, 121, p. 749–757.
4. **Tichý, M.** *Laboratorní analýza monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů)*. Český Těšín: FINIDR, 1997, 96 s. ISBN 80-902022-1-7.
5. **Malpas, J. S., Cavenagh, J. D.** *Clinical presentation, laboratory diagnosis, and indications for treatment*. In Malpas, J. S., Bergsagel, D. E., Kyle, R. A. et al. *Myeloma Biology and Management*. 3rd edit. Philadelphia: Saunders, 2004, p.159–173.
6. **Hájek, R., Adam, Z., Maisnar, V. et al.** Souhrn doporučení 2009 „Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu“. Doporučení České myelomové skupiny, Myelomové sekce České hematologické společnosti a Slovenské myelomové společnosti pro diagnostiku a léčbu mnohočetného myelomu. *Transfuzie Hematol. dnes*, 2009, 15, Suppl 2, p. 4–80.
7. **Bradwell, A. R., Carr-Smith, H. D., Mead, G. P. et al.** Highly sensitive automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin. Chemistry*, 2001, 47, p. 637–680.
8. **Bradwell, A. R.** *Analysis of immunoglobulin heavy chain/light chain pairs (Hevylite™)* In Bradwell, A. R. Serum free light chain analysis (plus Hevylite). 5th edit. Birmingham: The Binding Site Ltd., 2008, p. 275–295. ISBN 070-442-7028.
9. **Bradwell, A. R., Mead, G. P., Carr-Smith, H. D., Drayson, M. T.** Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet*, 2003, 361, p. 489–491.
10. **Študla, V., Schneiderka, P., Pika, T., Minařík, J., Bačovský, J., Farbiaková, V.** Klinický význam hodnocení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonálních gamapatií. *Klin. Biochem. Metab.*, 2008, 16, p. 76–83.
11. **Bradwell, A. R.** Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin κ/λ ratios. *Clin. Chemistry*, 2009, 55, p. 1646–1655.
12. **Jagannath, S.** Value of serum free light chain testing for the diagnosis and monitoring of monoclonal gammopathies in hematology. *Clin. Lymphoma & Myeloma*, 2007, 7, p. 518–523.
13. **Durie, B. G. M., Harousseau, J. L., Miguel, J. S. et al.** International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 2006, 20, p. 1467–1473.
14. **Katzmann, J. A., Kyle, R. A., Benson, J. et al.** Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin. Chemistry*, 2009, 55, p. 1517–1522.
15. **Dispenzieri, A., Kyle, R., Merlini, G. et al.** International Myeloma Working Group guidelines for serum free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*, 2009, 23, p. 215–224.
16. **Harding, S., Drayson, M., Lachmann, H. et al.** Novel nephelometric immunoassays for the sensitive detection of IgA monoclonal gammopathies in multiple myeloma and AL amyloidosis. *Haematologica*, 2008, 93, S1, Abstr. 668.
17. **Keren, D. F.** Heavy/light-chain analysis of monoclonal gammopathies. *Clin. Chem.*, 2009, 9, p. 1–3. doi:10.1371/clinchem.2009.132753.
18. **Alexanian, R.** Blood volume in monoclonal gammopathy. *Blood*, 1977, 49, p. 301–307.
19. **Salmon, S., Smith, B.** Immunoglobulin synthesis and total body tumor cell number in IgG multiple myeloma. *J. Clin. Invest.*, 1970, 49, p. 1114–1121.

20. **Anderson, C., Chandhury, C., Kim, J., Bronson, C., Wani, M., Mohanty, S.** Perspective-FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends in Immunol.*, 2006, 27, p. 343–348.
 21. **Wines, B. D., Hogarth, P. M.** IgA receptors in health and disease. *Tissue Antigens*, 2006, 68, p. 103–114.
 22. **Akilesh, S., Christianson, G., Roopenian, D., Shaw, A.** Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. *J. Immunol.*, 2007, 179, p. 4580–4588.
 23. **Chandhury, C., Brooks, C., Carter, D., Robinson, J., Anderson, C.** Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction. *Biochemistry*, 2006, 45, p. 4983–4990.
 24. **Kim, J., Hayton, W., Robinson, J., Anderson, C.** Kinetics of FcRn-mediated recycling of IgG and albumin in humans: pathophysiology and therapeutic mechanism – based model. *Clin. Immunol.*, 2007, 122, p. 146–155.
 25. **Wang, L., Young, D.** Suppression of polyclonal immunoglobulin production by M-proteins shows isotype specificity. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 2001, 31, p. 274–278.
 26. **Durie, D., Jacobson, J., Barlogie, B., Crowley, J.** Magnitude of response with myeloma frontline therapy does not predict outcome: importance of time to progression in Southwest oncology group chemotherapy trials. *J. Clin. Oncol.*, 2004, 22, p. 1857–1863.
 27. **Waldmann, T. A., Strober, W.** Metabolism of immunoglobulins. *Prog. Allergy*, 1969, 13, p. 1–110.
 28. **Hobbs, J.** Ann introduction to Hevylite™. In Sborník Pracovní konference Freelite-Hevylite. *Liblice*, 31. 5. až 1. 6. 2009.
 29. **Harding, S., Drayson, M., Hobbs, J., Mead, G., Bradwell, A.** Analysis of the involved IgG kappa/IgG lambda ratios may give a more sensitive measure of response to treatment in multiple myeloma. *Haematologica*, 2008, 93, S1, Abstr. 662.
- Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR-9500-3 a VVZ MSM 6198959205.
- Do redakce došlo 21. 1. 2010.

Adresa pro korespondenci:
Prof. MUDr. Vlastimil Ščudla, CSc.
3. interní klinika LF UP a FN Olomouc
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
e-mail: vlastimil.scudla@fnol.cz