

Úskalí interpretace výsledků společné analýzy hladin volných lehkých řetězců a elektroforézy séra

Pika T.¹, Lochman P.², Minařík J.¹, Bačovský J.¹, Ščudla V.¹

¹III. interní klinika – nefrologická, revmatologická, endokrinologická, Lékařská fakulta UP a Fakultní nemocnice Olomouc

²Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc

SOUHRN

Cíl: Cílem sdělení je připomenout možná úskalí paralelního hodnocení výsledků elektroforézy séra a sérových hladin volných lehkých řetězců (VLŘ) imunoglobulinu. Stanovení sérových hladin VLŘ se v posledních letech stalo nedílnou součástí algoritmu vyšetření využívaných v diagnostice a monitorování nemocných s monoklonální gamapatií. Zkušenosti mnoha pracovišť a následně publikovaná doporučení napomáhají vhodné indikaci vyšetření a interpretaci nálezů, avšak v každodenní praxi se často setkáváme s výsledky diskrepantními či atypickými, což si vyžaduje obezřetnou interpretaci, ověření stanovení a úzkou spolupráci zúčastněných odborníků.

Klíčová slova: monoklonální gamapatie, mnohočetný myelom, MGUS, volné lehké řetězce imunoglobulinu, elektroforéza séra.

SUMMARY

Pika T., Lochman P., Minařík J., Bačovský J., Ščudla V.: The pitfalls of the interpretation of the results of common analysis of serum free light chains and serum electrophoresis

Aim: The aim of the presented paper is to remind of possible pitfalls of parallel assessment of serum electrophoresis and serum free light chain levels (FLC) of the immunoglobulins. Evaluation of serum levels of FLC has become an inherent part of the algorithm in the diagnostics and monitoring of patients with monoclonal gammopathy. Experience from several departments followed by published recommendations help to determine appropriate indication and interpretation of the results. Everyday practice, however, brings also dissimilar or atypical results that need a careful interpretation, verification of the results and close cooperation of participating specialists.

Key words: monoclonal gammopathy, multiple myeloma, MGUS, free light chain, serum electrophoresis.

Úvod

Charakteristickým znakem monoklonálních gamapatií (MG) je přítomnost molekul monoklonálního imunoglobulinu (paraproteinu, M-proteinu) nebo jejich fragmentů (lehkých, těžkých řetězců), detekovatelných v séru a/nebo v moči [1, 2]. Základní soubor vyšetření umožňující detekci a typizaci monoklonálního imunoglobulinu v séru představuje elektroforéza (gelová, kapilární zónová) dovolující kvantifikaci a imunofixační elektroforéza (IFE), která představuje kvalitativní metodu umožňující typizaci M-proteinu [3, 4]. Stanovení volných lehkých řetězců imunoglobulinu v séru (systém FreeLite™) se v posledních letech stalo zcela běžně dostupné a je nyní rutinně využíváno nejen při diagnostice a sledování nemocných s mnohočetným myelomem (MM) a monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS), ale i dalších, méně obvyklých typů monoklonálních gamapatií (AL amyloidóza, nemoc z depozice lehkých řetězců) [5, 6]. Stanovení se provádí nefelometricky nebo turbidimetricky a využívá vysoce specifických protilátek proti vnitřním epitopům volných lehkých řetězců κ a λ . Vyšetření umožňuje jejich přesnou kvantifikaci a stanovení vzájemného poměru koncentrací κ/λ – tedy indexu klonality lehkých řetězců, a tím i klonality přítomné plazmocytární populace [5, 6, 7]. Doporučení recentně publikovaná

International Myeloma Working Group (IMWG) napomáhají správné aplikaci a interpretaci této metody, přičemž tato doporučení byla inkorporována do řady národních guidelines včetně doporučení publikovaných Českou myelomovou skupinou [8, 9]. Je známo, že sérové hladiny volných lehkých řetězců a hladiny kompletních molekul monoklonálního imunoglobulinu (kromě IgM izotypu) spolu nekorelují a jsou považovány za vzájemně nezávislé parametry, ale zároveň oba parametry vyjadřují sekreční potenciál monoklonální plazmocelulární populace. V aktivní fázi MG lze tedy předpokládat pozitivitu obou parametrů, avšak v klinické praxi se často setkáváme s rozdílnými výsledky. Předložené sdělení má za cíl alespoň zčásti tyto diskrepantní stavy vysvětlit.

Buněčná příčina – charakteristiky plazmocytární buňky

Produkce volných lehkých řetězců plazmocytů je velmi variabilní. Je známo, že během syntézy molekul imunoglobulinu, produkce volných lehkých řetězců až o 40 % přesahuje syntézu řetězců těžkých a umožňuje vhodnou kombinaci vazebných míst pro antigenní determinanty, přičemž samotné hladiny VLŘ korelují se stupněm infiltrace kostní dřeně mnohem

těsněji, nežli hladiny monoklonálního imunoglobulinu [10, 11, 12, 13]. Zřejmě i z tohoto důvodu nacházíme u jedinců s MGUS patologické hladiny VLŘ a indexu κ/λ v 65-78% resp. v 28-50%, přičemž nemocní s patologií indexu κ/λ vykazují vyšší riziko transformace v některou z maligních forem MG [14, 15]. V případě mnohočetného myelomu již procentuální výskyt patologie VLŘ dosahuje 95% [15, 16, 17]. Při studiu buněčných populací u monoklonálních gamapatií, zejména pak u mnohočetného myelomu, dokumentují některé práce přítomnost plazmocytárních populací s omezenou mírou syntézy lehkých řetězců, přičemž během syntézy kompletních molekul imunoglobulinu dochází k jejich plnému vyvázání [18]. Stejně tak je známa skutečnost, že ačkoliv je u MM přítomna monoklonální plazmocytární populace, ve skutečnosti se jedná o více populací, které se vzájemně liší (exprese CD znaků, cytogenetické změny, změny expresního profilu) a rovněž vykazují různou citlivost k podávané chemoterapii. Výsledná selekce nádorového klonu může mít za následek i změnu vlastního sekrečního potenciálu, což se nejčastěji projevuje změnou k převažující produkci volných lehkých řetězců – tzv. „Bence-Jones escape“ fenomén [19]. Tento typ změny je častější u IgA typu MM, nacházíme jej po proběhlé biologické terapii a bývá spojen se sekundárními cytogenetickými změnami [20, 21].

Další, méně častou a obtížně identifikovatelnou příčinou diskrepancí, může být rovněž i změna proteinové struktury lehkých řetězců během jejich syntézy se ztrátou vazebných epitopů pro detekční polyklonální protilátky či zkrácení molekul LŘ s jejich urychlenou filtrací do moči (v tomto případě však bývá často pozitivní imunofixační vyšetření moči) [22].

Analyticko-laboratorní problematika

Průběh a výsledek samotné reakce analytických protilátek a antigenu při nefelometrickém či turbidimetrickém vyšetření může být ovlivněn řadou činitelů. Pomineme-li otázky technicko-instrumentální (užití vhodných analytických činidel) a preanalytické (odběr a příprava vzorku), zůstávají vlivy analytické jako jsou nespecifické interference během analýzy nebo množství přítomného antigenu ve vyšetřovaném vzorku, které je jedním z velmi důležitých faktorů u imunochemických reakcí. Pro optimální průběh analytické reakce je nutné mít k dispozici dostatečné množství protilátky vzhledem ke koncentraci antigenu k dosažení optimálního průběhu reakce v oblasti přebytku protilátek charakterizujícího množství vzniklého precipitátu v závislosti na množství antigenu. V případě velkého nadbytku antigenu a naopak malého množství analytické protilátky, může však docházet k zpětné dekompozici vzniklého precipitátu, což může vést k výslednému podhodnocení skutečných hladin (tzv. „Hook efekt“). Dodatečným větším naředěním analyzovaného vzorku lze dosáhnout pravdivých hodnot u vzorků s nejasnými či neodpovídajícími výsledky (zejména v případě positivity ELFO/IFIX pro lehké řetězce imunoglobulinu). V současnosti však moderní analyzá-

tory disponují možností detekce nadbytku antigenu v reakční směsi a atypické případy jsou tak schopny ve většině případů automaticky zhodnotit [23, 24, 25].

Další možnou příčinou podhodnocení skutečných hladin volných lehkých řetězců je i možnost jisté „slepoty“ polyklonální protilátky. Výrobce detekčních protilátek při jejich výrobě využil pečlivě vybrané antigeny a postupnými vysycovacími reakcemi byly připraveny vysoce specifické polyklonální protilátky proti vnitřním epitopům lehkých řetězců s cílem postihnout co nejvíce možných konformací antigenních determinant. Nicméně je možné, že během neoplastické evoluce plazmocytů a selekci nádorového klonu dojde k unikátní změně bílkovinné sekvence vazebných míst lehkých řetězců, jež nebudou danými protilátkami rozpoznány [22].

Rozdílný biologický poločas volných lehkých řetězců a kompletních molekul monoklonálního imunoglobulinu

Je známo, že metabolický poločas molekul MIG v séru je oproti molekulám VLŘ mnohem delší. V případě IgA izotypu tento čas představuje přibližně 6 dní a v případě IgG dokonce 20 dní, zatímco poločas molekul VLŘ kappa činí 2-4 hodiny a v případě VLŘ lambda 3-6 hodin (dimerická forma) [12]. Logicky tedy v podmínkách probíhající chemoterapie, zejména pak intenzifikovaných režimů, představují právě hladiny VLŘ mnohem dynamičtější parametr schopný mnohem pružněji reagovat na změnu masы nádorové populace [16]. Proto možné diskrepance mezi stanoveními MIG a VLŘ při probíhající terapii mohou být způsobeny poklesem či normalizací hladin VLŘ a perzistencí jisté kvantity M-proteinu právě z důvodu delšího metabolického poločasu molekul MIG. Některé práce uvádějí možnost využití právě časného poklesu hladin VLŘ pro předpověď úspěšné chemoterapie, avšak většinou nepředikují délku trvání léčebné odpovědi či další vývoj onemocnění [26]. Naopak rychlý iniciální pokles hladin VLŘ během chemoterapie je brán jako nepříznivý prognostický ukazatel, předpovídající brzký relaps/resistenci nemoci [27].

Při sledování nemocných v době remise onemocnění může naopak nárůst v hladinách VLŘ či změna hodnoty indexu κ/λ znamenat počínající relaps onemocnění. Je známo, že část nemocných může relabovat formou „Bence-Jones escape“ fenoménu bez nárůstu (kompletní forma) či pouze s mírným nárůstem M-komponenty (parciální forma) [28]. Proto pro sledování nemocných v době remise onemocnění má být využíváno i stanovení VLŘ v séru k podchycení tohoto typu relapsu/progrese.

Remise choroby a atypické elektroforetické/imunofixační nálezy

Dosažení kompletní remise u mnohočetného myelomu zejména po vysokodávkované chemoterapii s využitím autologního štěpu bývá často spojeno

s následnou s mohutnou cytokinovou bouří při restituci kostní dřeně a zejména pak imunitního systému jedince. Aktivací proliferace a vyžívání B-lymfocytů antigenními stimuly za podpory cytokinových působků dochází rovněž k překotné syntéze a sekreci polyklonálních imunoglobulinů. Občas lze tyto imunoglobuliny detekovat a často i kvantifikovat v séru jako heterogenní frakce imitující mono/oligoklonální proužky. Tyto atypické nálezy v naprosté většině vykazují jiný izotyp imunoglobulinu, než kterým bylo charakterizováno původní onemocnění. Tyto nálezy jsou přechodné a většinou vymizí do 6 až 12 měsíců po proběhlé terapii a jsou všeobecně brány jako ukazatel „robustní“ remise onemocnění [29, 30, 31]. V současné době s nástupem velmi účinné biologické terapie bývá výskyt atypických imunofixačních nálezů v době remise velmi častý [32]. Je známo, že asi v 72 % případů bývá přítomnost heterogenních mono/oligoklonálních proužků spojena s abnormálním κ/λ indexem [33]. I proto je nutné při pravidelném sledování parametrů při péči o nemocné brát v potaz obě metody a výsledky obezřetně interpretovat.

Závěr

Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu se stalo nezbytnou součástí laboratorních vyšetření využívaných v každodenní péči o nemocné s MG. Samotná aplikace a využití metody je velmi dobře zpracována v publikovaných doporučeních, nicméně samotná interpretace výsledků bývá někdy obtížná, vyžadující dokonalou spolupráci klinických pracovníků (hematologů, nefrologů) a laboratorních specialistů. Stejně tak v případě obtížného stanovení či získání neočekávaných výsledků je nasnadě požádat o kontrolní analýzu kolegy z jiného, výše erudovaného pracoviště.

Literatura:

- Kyle, R. A., Rajkumar, S. V. Multiple myeloma. *Blood*, 2009; 111: 2962-2972.
- Špička, I. et al. *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. Galén 2005, Praha, s. 39-60.
- Tichý, M. *Laboratorní analýza monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů)*. Český Těšín: FINIDR s. r. o., 1997, ISBN 80-902022-1-7.
- Tichý, M., Maisnar, V. Laboratorní průkaz monoklonálních imunoglobulinů. *Vnitř Lék.*, 2006; 52: 41-45.
- Bradwell, A. R. Serum free light chain measurements move to center stage. *Clin. Chem.*, 2005, 51, 5, p. 805-807.
- 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. Chem.*, 2001; 47: 673-680.
- 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, 37, 2, p. 76-83.
- Dispenzieri, A., Kyle, R. A., Merlini, G. et al. International myeloma working group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*, 2009, 23: 215-224.
- Česká myelomová skupina. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. *Trans Hemat. dnes*, 2009; 15: 3-80.
- Hammerton, K., Cooper, D. A., Duckett, M., Penny, R. Biosynthesis of immunoglobulin in human immunoproliferative diseases: I. kinetics of synthesis and secretion of immunoglobulin and protein by bone marrow cells in myeloma. *J. Immunol.*, 1978; 121: 409-417.
- Hannam-Harris, A. C., Gordon, J., Smith, J. L. Immunoglobulin synthesis by neoplastic B lymphocytes: free light chain synthesis as a marker of B cell differentiation. *J. Immunol.*, 1980; 125: 2177-2181.
- Bradwell, A. R. Serum free light chain analysis (4th edition). *The Binding Site Ltd.*, Birmingham, UK 2006; ISBN: 0704425297, p. 12-28.
- Mead, G. P., Reid, S. D., Augustson, B. M., Drayson, M. T., Bradwell, A. R., Child, J. A. Correlation of serum free light chains and bone marrow plasma cell infiltration in multiple myeloma. *Blood*, 2004; 104: 4865.
- Rajkumar, S. V., Kyle, R. A., Therneau, T. M. et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 2005; 106: 812-817.
- Pika, T., Minařík, J., Zemanová, M. et al. Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u mnohočetného myelomu a monoklonální gamapatie nejistého významu. *Klin. Biochem. Metab.*, 2008; 16: 102-105.
- Mead, G. P., Carr-Smith, H. D., Drayson, M. T. et al. Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. *Brit. J. Haematol.*, 2004; 126: 348-54.
- Snozok, C. L. H., Katzmann, J. A., Kyle, R. A. et al. Prognostic value of the serum free light chain ratio in newly diagnosed myeloma: proposed incorporation into the international staging system. *Leukemia*, 2008; 22: 1933-1937.
- Ayliffe, M. J., Davies, F. E., de Castro, D., Morgan, G. J. Demonstration of changes in plasma cell subsets in multiple myeloma. *Haematologica*, 2007; 92: 1135-1138.
- Hobbs, J. R. Growth rates and responses to treatment in human myelomatosis. *Brit. J. Haematol.*, 1969; 16: 607-618.
- Kühnemund, A., Liebisch, P., Bauchmüller, K. et al. Light-chain escape-multiple myeloma – an escape phenomenon from plateau phase: report of the largest patients series using LC-monitoring. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, 2009; 135: 477-84.
- Mead, G., Hobbs, J., Sharp, K., Harding, S., Drayson, M. Incidence of light chain escape in myeloma patients at relapse. *Brit. J. Haematol.*, 2008; 141 (Suppl. 1): 35.
- Bradwell, A. R. AL amyloidosis. In: Bradwell AR. *Serum free light chain analysis. 6th edition*, The Binding site group Ltd., UK 2010; ISBN: 9780704427969, p 130-147.
- Bradwell, A. R. Implementation and interpretation of free light chain assays. In: Bradwell AR. *Serum free light chain analysis. 6th edition*, The Binding site group Ltd., UK 2010; ISBN: 9780704427969, p 231-238.
- Clark, R. J., Lockington, K. S., Tostrud, L. J., Katzmann, J. A. Incidence of antigen excess in serum free light chain assays. *Clin. Chem.*, 2007, 53: C145a.
- Daval, S., Tridon, A., Mazon, N., Ristori, J. M., Evrard, B. Risk of antigen excess in serum free light chain measurement. *Clin. Chem.*, 2007; 53: 1985-6

26. **Dispenzieri, A., Zhang, L., Katzmann, J. A. et al.** Appraisal of immunoglobulin free light chain as a marker of response. *Blood*, 2008; 111: 4908-4915.
27. **Van Rhee, F., Bolejack, V., Hollmig, K. et al.** High serum-free light chain levels and their rapid reduction in response to therapy define an aggressive multiple myeloma subtype with poor prognosis. *Blood*, 2007; 110: 827-832.
28. **Bradwell, A. R.** Free light chain escape. In: Bradwell AR. *Serum free light chain analysis. 6th edition*, The Binding site group Ltd., UK 2010; ISBN: 9780704427969, p 104-105.
29. **Hall, S. L., Tate, J., Gill, D. et al.** Significance of abnormal protein bands in patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Clin. Biochem. Rev.*, 2009; 30: 113-118.
30. **De Larrea, C. F., Tovar, N., Cibeira, M. T. et al.** Emergence of oligoclonal bands in patients with multiple myeloma in complete remission after induction chemotherapy: association with the use of novel agents. *Haematologica*, 2011; 96: 171-173.
31. **Maisnar, V., Tichý, M., Smolej, L. et al.** Isotype class switching after transplantation in multiple myeloma. *Neoplasma*, 2007; 54: 225-228.
32. **Mark, T., Jayabalan, D., Coleman, M. et al.** Atypical serum immunofixation patterns frequently emerge in immunomodulatory therapy and are associated with a high degree of response in multiple myeloma. *Brit. J. Haematol.*, 2008; 143: 654-660.
33. **De Larrea, C. F., Cibeira, M. T., Elena, M. et al.** Abnormal serum free light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission has strong association with the presence of oligoclonal bands: implication for stringent complete remission definition. *Blood*, 2009; 114: 4954-4956.

Tato práce vznikla s podporou grantu IGA ČR NT 12451/5.

Do redakce došlo 12. 1. 2012

*Adresa pro korespondenci
MUDr. Tomáš Píka
III. interní klinika- NRE, Fakultní nemocnice Olomouc
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
Email: tomas.pika@seznam.cz*