

## Suprese alternativního páru imunoglobulinu koreluje s mírou rizikovosti MGUS výrazněji nežli suprese hladin polyklonálních imunoglobulinů – dílčí výsledky vyšetření HevyLite™ u MGUS

Pika T. <sup>1</sup>, Lochman P. <sup>2</sup>, Klincová M. <sup>3</sup>, Maisnar V. <sup>4</sup>, Tichý M. <sup>5</sup>, Zapletalová J. <sup>6</sup>, Sandecká V. <sup>7</sup>, Ščudla V. <sup>1</sup>, Hájek R. <sup>3,7</sup>

<sup>1</sup>III. interní klinika – nefrologická, revmatologická, endokrinologická, LF UP a FN Olomouc

<sup>2</sup>Oddělení klinické biochemie, FN Olomouc

<sup>3</sup>Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, Oddělení klinické hematologie, FN Brno Bohunice

<sup>4</sup>II. interní klinika – oddělení klinické hematologie, FN Hradec Králové

<sup>5</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky, FN Hradec Králové

<sup>6</sup>Ústav lékařské biofyziky a statistiky, LF UP Olomouc

<sup>7</sup>Interní hematologická klinika, LF MU a FN Brno Bohunice

### SOUHRN

**Úvod:** Monoklonální gamapatie nejistého významu (MGUS) je bezpříznakový a potenciálně maligní stav charakterizovaný nezhoubnou klonální proliferací plazmatických buněk secernujících monoklonální imunoglobulin (MIG, M-protein) detekovatelný v séru a/nebo v moči při absenci zhoubného lymfoproliferativního stavu. Je známo, že část jedinců s MGUS transformuje v některou z maligních forem monoklonálních gamapatií. Mezi známé faktory určující míru rizika progresu patří zejména kvantita, typ M-proteinu a poměr volných lehkých řetězců imunoglobulinu (VLŘ) umožňující účelnou stratifikaci jedinců s MGUS. Někteří autoři pokládají i za možný faktor progresu přítomnou supresi hladin polyklonálních imunoglobulinů.

**Cíl:** Cílem studie bylo provedení pilotní analýzy hladin párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu (HLC) v souboru jedinců s MGUS a porovnání výsledků s hladinami M-proteinu vyšetřených gelovou elektroforézou. Dále pak provedení porovnání hladin polyklonálních imunoglobulinů a hladin alternativního páru HLC s cílem ověření stupně imunitní parézy v závislosti na rizikovosti MGUS.

**Metody:** Analyzovaná sestava zahrnovala 148 vzorků sér od jedinců s MGUS (102 IgG, 28 IgA, 18 IgM typu), kteří byli v závislosti na hladinách, typu M-proteinu a hodnotě indexu VLŘ stratifikováni do 4 rizikových skupin (nízké, nízké-střední, vysoké-střední a vysoké riziko transformace). Pro stanovení hladin VLŘ, hladin polyklonálních imunoglobulinů a hladin HLC bylo využito platformy turbidimetru SPA Plus. Statistická analýza byla provedena pomocí Spearmanovy korelační analýzy a Mann-Whitneyeho U testu s Bonferroniho korekcí.

**Výsledky:** Při porovnání hladin HLC byla v souboru IgG MGUS zjištěna silná korelace s hladinami M-proteinu jak v případě IgG $\kappa$  ( $r = 0,698$ ,  $p < 0,0001$ ), tak v případě IgG $\lambda$  ( $r = 0,847$ ,  $p < 0,0001$ ), součet obou párů izotypu IgG velmi silně koreloval s celkovými hladinami IgG v séru ( $r = 0,893$ ,  $p < 0,0001$ ). Obdobné výsledky byly získány u MGUS s IgA izotypem MIG. V případě izotypového páru IgA $\kappa$  byla zjištěna středně silná korelace s hladinami M-proteinu ( $r = 0,601$ ,  $p = 0,018$ ), v případě IgA $\lambda$  pak silná korelace ( $r = 0,733$ ,  $p = 0,004$ ), přičemž součet obou HLC párů vykazoval velmi silnou korelaci s hladinami celkového IgA ( $r = 0,941$ ,  $p < 0,0001$ ). Při analýze jedinců s IgM typem byly taktéž zjištěny velmi silné korelace hladin IgM $\kappa$  ( $r = 0,904$ ,  $p = 0,001$ ) resp. IgM $\lambda$  ( $r = 0,783$ ,  $p = 0,013$ ) a hladin M-proteinu. Nejsilnější korelace byly opět zjištěny mezi součtem obou izotypových párů a celkových hladin IgM imunoglobulinu v séru ( $r = 0,967$ ,  $p < 0,0001$ ). Při porovnání míry suprese hladin polyklonálních imunoglobulinů u jednotlivých rizikových tříd v souboru IgG MGUS byly zjištěny signifikantně vyšší hladiny IgA imunoglobulinu u jedinců s nízkým resp. nízkým středním rizikem ve srovnání se skupinou s vysokým středním rizikem ( $p = 0,0001$  resp.  $p = 0,047$ ). Při analýze skupiny MGUS s IgA izotypem byly zjištěny významně vyšší hladiny IgM imunoglobulinu u skupiny s nízkým středním rizikem nežli u jedinců s vysokým středním resp. vysokým rizikem ( $p = 0,035$  resp.  $p = 0,017$ ). V souboru IgG MGUS bylo rovněž provedeno porovnání hladin alternativních izotypových párů mezi jednotlivými rizikovými skupinami. U jedinců s dominantní sekrecí IgG $\kappa$  byly zjištěny signifikantně vyšší hladiny alternativního páru IgG $\lambda$  ve skupině nízkého a nízkého středního rizika nežli ve skupině vysokého středního rizika ( $p = 0,003$  resp.  $p = 0,006$ ). V případě dominantní sekrece IgG $\lambda$  byly zjištěny významně vyšší hladiny IgG $\kappa$  u jedinců s nízkým resp. nízkým středním rizikem nežli ve skupině s vysokým středním rizikem ( $p = 0,0006$  resp.  $p = 0,009$ ).

**Závěr:** Analýza potvrdila velmi těsnou korelaci mezi hladinami M-proteinu a stanovením HLC, která se jeví jako pomocná ev. alternativní metoda stanovení M-proteinu s výhodou u atypických výsledků elektroforézy (zejména u IgA izotypu) či v případě velmi nízkých koncentrací M-proteinu s výhodou výpočtu indexu Ig $\kappa$ /Ig $\lambda$ . Odhalená souvislost míry imunoprese v závislosti na rizikovosti MGUS a zejména jasně patrný přínos stanovení alternativního HLC páru přináší další aspekt k pochopení souvislosti biologie, chování a případné maligní evoluce MGUS s výhodou získání dobře měřitelného parametru. Využití platformy SPA Plus se jeví jako rychlé, efektivní, s vysokou výpovědní hodnotou a v neposlední řadě i s příznivými ekonomickými aspekty.

**Klíčová slova:** monoklonální gamapatie nejistého významu, páry těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu, imunoglobuliny, imunitní paréza, riziková stratifikace.

## SUMMARY

### **Pika T., Lochman P., Klincová M., Maisnar V., Tichý M., Zapletalová J., Sandecká V., Ščudla V., Hájek R.: Suppression of alternative immunoglobulin pairs correlates with the MGUS risk degree more significantly than suppression of polyclonal immunoglobulin levels – partial results from HevyLite™ examination in MGUS**

*Introduction:* Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) indicates an asymptomatic and potentially malignant state characterised by benign clonal proliferation of plasma cells secreting (discharging) monoclonal immunoglobulin (MIG, M-protein) detectable in serum and/or urine in the absence of malignant lymphocyte proliferation. It has been observed that in some patients, MGUS transforms into one of the malignant forms of monoclonal gammopathy. The well-known factors determining the risk degree of progression include in particular the quantity, M-protein type and the ratio of immunoglobulin free light chains (FLC) allowing the efficient stratification of MGUS patients. In addition, several authors consider the present suppression of polyclonal immunoglobulin levels to be a potential factor of progression.

*Aim:* The study aimed at conducting a pilot analysis of levels of immunoglobulin heavy/light chains pairs (HLC) in a group of MGUS patients and at comparing the results with the M-protein levels detected by gel electrophoresis. Furthermore, the polyclonal immunoglobulin levels and the levels of HLC alternative pairs were to be compared with a view to verify the degree of immune paresis depending on the MGUS risk degree.

*Methods:* The analysed set comprised 148 serum samples of MGUS patients (102 IgG, 28 IgA, 18 IgM type) who were stratified into 4 risk groups (low, low-intermediate, high-intermediate, and high risk of transformation) according to the levels, M-protein type and FLC index values. FLC levels, polyclonal immunoglobulin levels, and HLC levels were determined by means of the SPA Plus turbidimeter platform. In the statistical analysis, Spearman's rank correlation and Mann-Whitney U Test with Bonferroni correction were applied.

*Results:* When comparing the HLC levels, the IgG MGUS group revealed strong correlation with M-protein levels both in the case of IgG $\kappa$  ( $r = 0.698$ ,  $p < 0.0001$ ), and in the case of IgG $\lambda$  ( $r = 0.847$ ,  $p < 0.0001$ ), the summation of both pairs of the IgG isotype correlated considerably with the total levels of IgG in serum ( $r = 0.893$ ,  $p < 0.0001$ ). Similar results were acquired in MGUS with the IgA isotype of MIG. In case of the IgA $\kappa$  isotype pair, medium-strong correlation with M-protein levels was detected ( $r = 0.601$ ,  $p = 0.018$ ), and strong correlation in case of the IgA $\lambda$  ( $r = 0.733$ ,  $p = 0.004$ ), whereas the summation of both HLC pairs showed very strong correlation with levels of the total IgA ( $r = 0.941$ ,  $p < 0.0001$ ). Moreover, analyses of IgM type patients revealed very strong correlation of IgM $\kappa$  levels ( $r = 0.904$ ,  $p = 0.001$ ) or IgM $\lambda$  ( $r = 0.783$ ,  $p = 0.013$ ) and M-protein levels. Again, the strongest correlation was found between the summation of both isotype pairs and the total levels of IgM immunoglobulin in serum ( $r = 0.967$ ,  $p < 0.0001$ ). Comparison of the suppression degree of polyclonal immunoglobulin levels in individual risk classes in the IgG MGUS group brought significantly higher levels of IgA immunoglobulin in patients with low or low-intermediate risk as opposed to the group with high-intermediate risk ( $p = 0.0001$  and  $p = 0.047$  respectively). When analysing the MGUS group with IgA isotype, notably higher levels of IgM immunoglobulin were evident in the group with low-intermediate risk than in patients with high-intermediate or high risk ( $p = 0.035$  and  $p = 0.017$  respectively). In addition, the levels of alternative isotype pairs were compared among the individual risk groups of the IgG MGUS group. Patients with dominant IgG $\kappa$  secretion showed significantly higher levels of the IgG $\lambda$  alternative pair in the group of low and low-intermediate risk than in the group of high-intermediate risk ( $p = 0.003$  and  $p = 0.006$  respectively). In case of dominant IgG $\lambda$  secretion, considerably higher IgG $\kappa$  levels were detected in patients with low or low-intermediate risk than in the group of high-intermediate risk ( $p = 0.0006$  and  $p = 0.009$  respectively).

*Conclusion:* The analysis confirmed a very close correlation between M-protein levels and HLC determination which appears to be an auxiliary or alternative method of M-protein determination with an advantage in case of atypical electrophoresis results (in particular in IgA isotypes) or by very low M-protein concentrations with the benefit of Ig $\kappa$ /Ig $\lambda$  index calculation. The discovered connection between the degree of immune suppression depending on the MGUS risk level and especially the clearly visible benefit of determining the alternative HLC pairs contributes with another aspect to understanding the links between the biology, behaviour, and the potential malignant evolution of MGUS with the advantage of obtaining a well-measurable parameter. The use of the SPA Plus platform seems to be fast, effective, with high prognostic value and, last but not least, even with favourable economic aspects.

*Key words:* monoclonal gammopathy of undetermined significance, pairs of immunoglobulin heavy/light chains, immunoglobulins, immune paresis, risk stratification.

## Úvod

Jako monoklonální gamapatie (MG) je označována heterogenní skupina onemocnění charakterizovaná přítomností molekul monoklonálního imunoglobulinu (MIG) nebo jejich fragmentů (lehkých, těžkých řetězců), detekovatelných v séru a/nebo v moči [1, 2]. Mezi základní vyšetření běžně využívaná k charakterizaci M-proteinu v séru patří elektroforéza, dovolující kvantifikaci a imunofixaci, která představuje kvalitativní metodu umožňující typizaci M-proteinu [3, 4]. V současnosti je již zcela běžně dostupné vyšetření hladin volných lehkých řetězců (VLŘ) imunoglobulinu v séru pomocí souprav Freelite™. Stanovení se provádí nefelometricky nebo turbidimetricky a využívá vysoce specifických detekč-

ních protilátek proti vnitřním epitopům volných lehkých řetězců kappa ( $\kappa$ ) a lambda ( $\lambda$ ). Vyšetření umožňuje jejich přesnou kvantifikaci a stanovení jejich vzájemného poměru kappa/lambda – tedy indexu klonality lehkých řetězců, a tím i klonality přítomné plazmocytární populace [5 - 7]. Nejnovějším testem ve spektru vyšetření monoklonálního proteinu je systém HevyLite™, principiálně založený na užití dvojice specifických protilátek proti junkčním epitopům mezi doménami těžkého a lehkého řetězce v konstantní oblasti řetězců imunoglobulinu [8 - 10]. V závislosti na typu použité soupravy metoda umožňuje stanovení hladin HLC u různých izotypů imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM) a poskytuje kvantitativní výsledky i v případě, kdy není elektroforetická kvantifikace M-proteinu možná, a analogicky jako v případě vyšet-

ření sérových hladin volných lehkých řetězců umožňuje výpočet poměru HLC – indexu klonality  $Ig\kappa/Ig\lambda$ .

Jako monoklonální gamapatie nejistého významu (MGUS) je označován bezpříznakový a potenciálně maligní stav charakterizovaný nezhoubnou klonální proliferací plazmatických buněk secernujících monoklonální imunoglobulin detekovatelný v séru a/nebo v moči při nepřítomnosti zhoubného lymfoproliferativního stavu [2, 11]. MGUS představuje přibližně 60 % všech monoklonálních gamapatií, přičemž 1-2 % jedinců s MGUS ročně transformuje v některou ze zhoubných monoklonálních gamapatií [12]. Cílem mnoha studií byla identifikace rizikových faktorů určujících míru rizika a pravděpodobnost transformace MGUS do některé z forem maligní MG. Ze serologických metod byly identifikovány jako významné koncentrace a izotyp MIG a část autorů pokládá jako významný prediktor i přítomnost Bence Jonesovy bílkoviny v moči a přítomnost suprese izotypů polyklonálních imunoglobulinů [13 - 17]. Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců (FreeLite™) se stanovením indexu klonality  $\kappa/\lambda$ , dovořilo lépe identifikovat jedince s vyšším rizikem transformace do zhoubných forem MG. Následnou kombinací indexu klonality  $\kappa/\lambda$ , kvantitativní a izotypu M-proteinu byl vytvořen a všeobecně akceptován stratifikační systém dle Rajkumara, rozdělující nemocné do 4 prognosticky rozdílných skupin s následným doporučením pro optimální přístup sledování (Tabulka 1.) [18 - 21].

**Table 1.** Risk stratification system for monoclonal gammopathy of undetermined significance according to Rajkumar et al.[18].

<b>Risk factors:</b>
1. M-protein in serum < 15 g/l
2. IgG izotype
3. Normal $\kappa/\lambda$ ratio of serum free light chains
<b>Stratification model:</b>
Low risk - normal values of all 3 factors
Low-intermediate risk - abnormality of 1 factor
High-intermediate risk - abnormality of 2 factors
High risk - abnormality of all 3 factors

Cílem studie bylo provedení pilotní analýzy hladin HLC u jedinců s MGUS, porovnání výsledků s hladinami M-proteinu stanovenými elektroforézou a celkovými hladinami imunoglobulinu vyšetřenými turbidimetricky. Cílem druhé části práce bylo posouzení míry imunoparézy definované supresí hladin polyklonálních imunoglobulinů a mírou suprese alternativního páru imunoglobulinu u jednotlivých stádií rizikové stratifikace MGUS dle Rajkumara v souboru IgG a IgA MGUS. Pro laboratorní analýzu bylo v maximální míře užito turbidimetrického systému SPA Plus (The Binding Site).

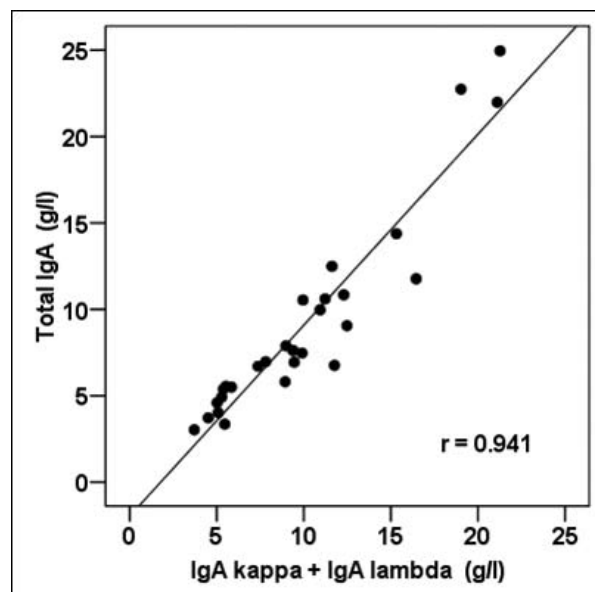
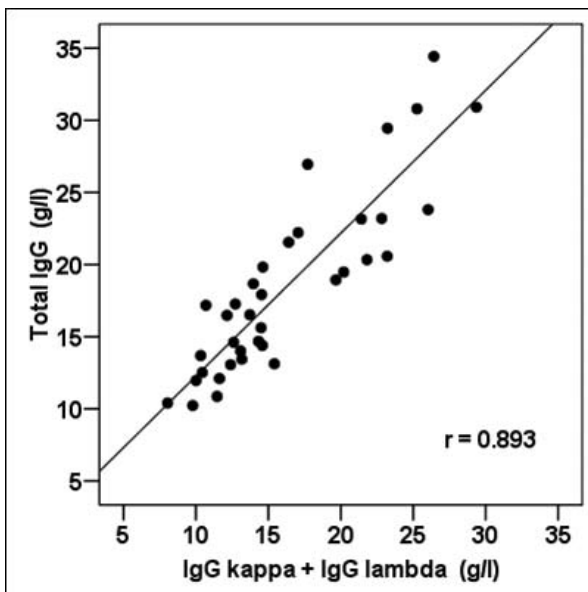
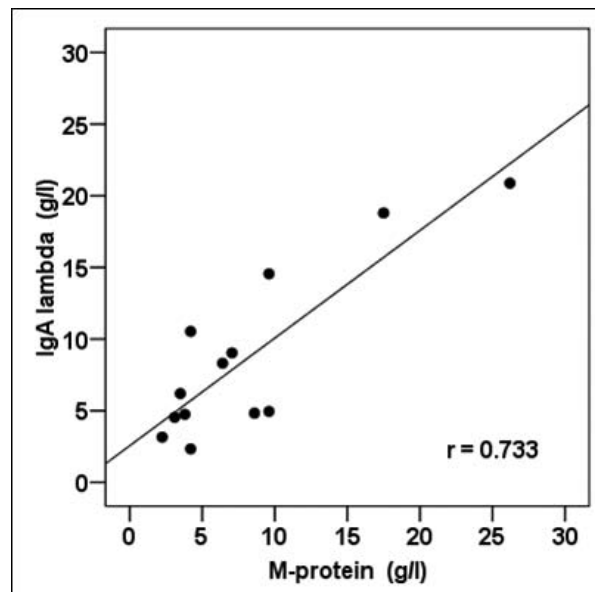
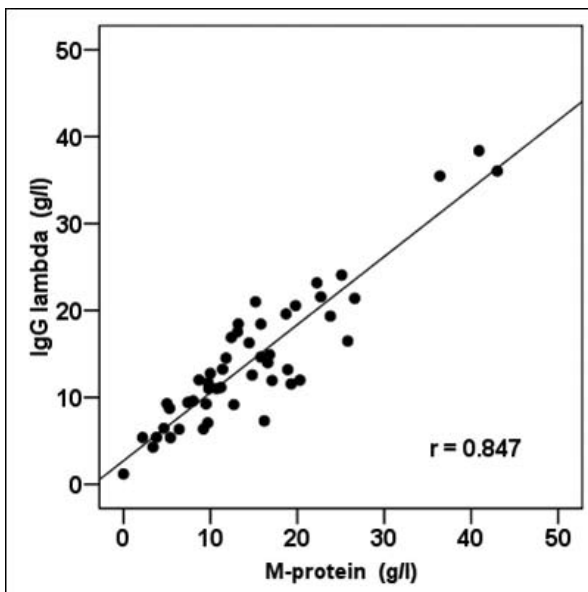
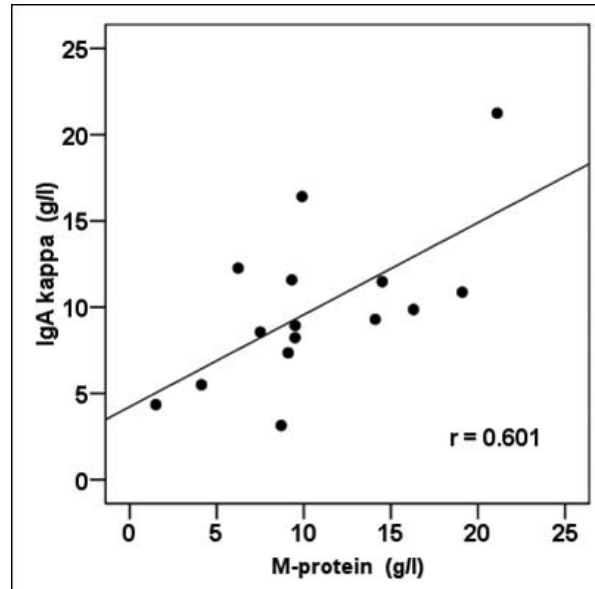
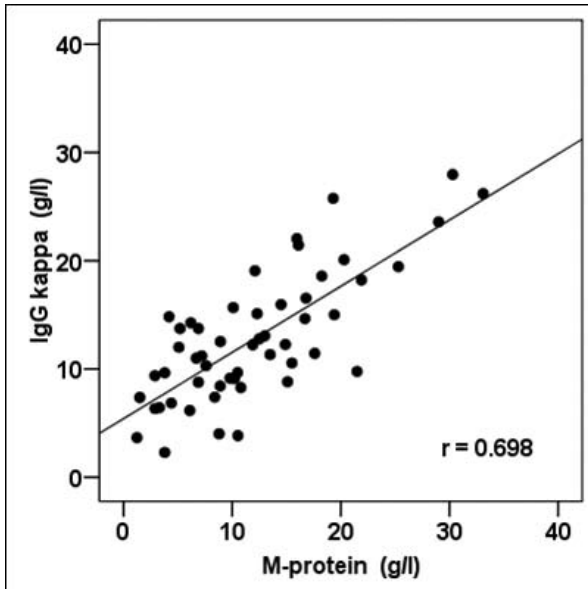
## Soubor a metody

Pro analýzu bylo užito zamražených sér deponovaných v sérových bankách FN Brno Bohunice (CMG) a FN Olomouc (III. interní klinika) se známým izotypem

a kvantitou M-komponenty, stanovených standardními laboratorními metodami. Analyzovaný soubor zahrnoval 102 jedinců s IgG MGUS (poměr sekrece kappa 52 % (n = 53)/ lambda 48 % (n = 49)). Při využití Rajkumara stratifikačního systému 32 % (n = 33) jedinců splňovalo kritéria nízkého rizika, 46 % (n = 47) nízkého-středního a 22 % (n = 22) vysokého-středního rizika. Analyzovaná sestava MGUS IgA izotypu čítala 28 jedinců (poměr sekrece kappa 54 % (n = 15)/ lambda 46 % (n = 13)), 54 % (n = 15) bylo ve skupině nízkého-středního rizika, 29 % (n = 8) vysokého-středního rizika a 17 % (n = 5) vysokého rizika zhoubné transformace. Soubor IgM MGUS čítal 18 jedinců (poměr sekrece kappa/ lambda 50 %), přičemž 50 % (n = 9) jedinců bylo ve skupině nízkého-středního rizika, 39 % (n = 7) vysokého-středního rizika a 11 % (n = 2) ve skupině vysokého rizika. Pro stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců bylo užito souprav FreeLite SPA Plus kappa free (normální rozmezí (NR): 3,3 – 19,4 mg/l) a FreeLite SPA Plus lambda free (NR: 5,71 – 26,3 mg/l) s následným výpočtem indexu klonality. Hladiny polyklonálních imunoglobulinů byly stanovovány soupravami Human IgG kit (NR: 7 – 16 g/l), Human IgA kit (0,7 – 4 g/l) a Human IgM kit for SPA Plus (0,4 – 2,3 g/l). Pro analýzu hladin HLC bylo užito souprav HevyLite Human IgG kappa (NR: 3,84 – 12,07 g/l), IgG lambda (NR: 1,91 – 6,74 g/l), IgA kappa (NR: 0,57 – 2,08 g/l), IgA lambda (NR: 0,44 – 2,04 g/l), IgM kappa (NR: 0,19 – 1,63 g/l) a IgM lambda kit for the use on the SPA Plus (NR: 0,12 – 1,01 g/l), vzájemný poměr párů izotypů imunoglobulinu byl zjištěn výpočtem. Analýza byla provedena na turbidimetru SPA Plus (The Binding Site) v laboratořích Oddělení klinické biochemie, FN Olomouc. Část analyzovaných vzorků vyžadovala manuální předředění z důvodu extrémních hodnot mimo měřicí rozsah přístroje. Statistická analýza byla provedena pomocí Spearmanovy korelační analýzy a Mann-Whitneyeho U testu s Bonferroniho korekcí.

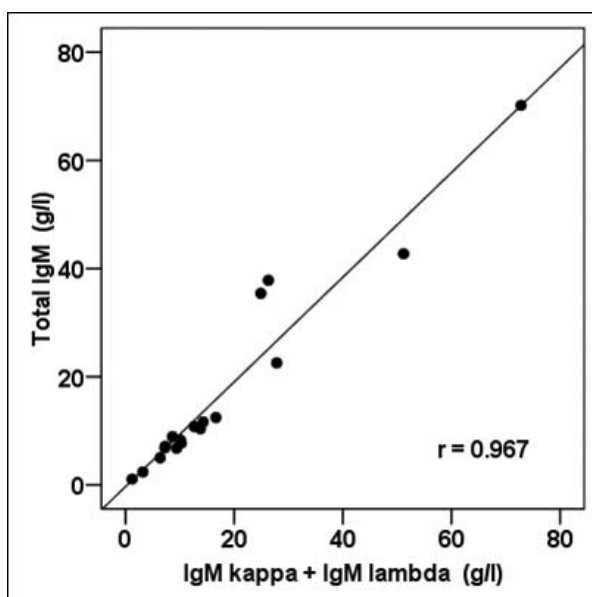
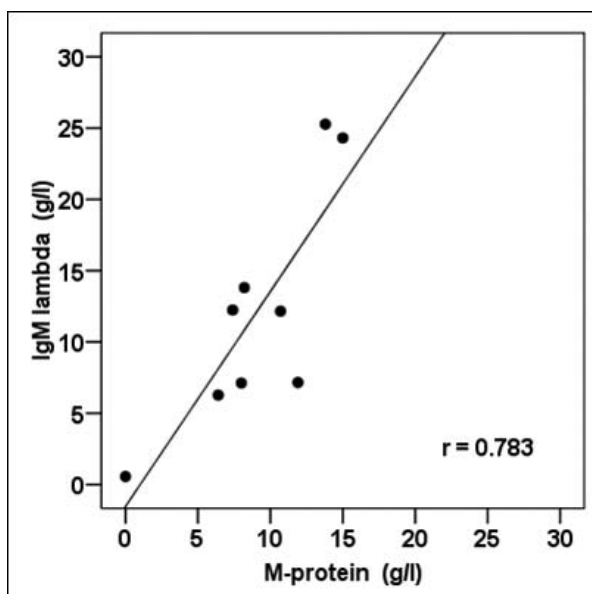
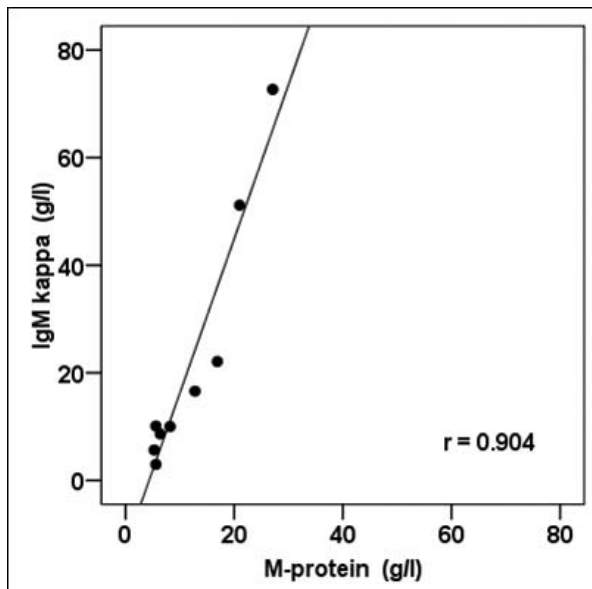
## Výsledky

Při porovnání hladin HLC byla v souboru IgG MGUS zjištěna silná korelace s hladinami M-proteinu jak v případě  $IgG\kappa$  ( $r = 0,698$ ,  $p < 0,0001$ ) tak v případě  $IgG\lambda$  ( $r = 0,847$ ,  $p < 0,0001$ ), přičemž součet obou párů izotypu IgG velmi silně koreloval s celkovými hladinami IgG v séru ( $r = 0,893$ ,  $p < 0,0001$ ) (obr. 1). Obdobné výsledky byly získány při analýze skupiny MGUS s IgA izotypem. V případě izotypového páru  $IgA\kappa$  byla zjištěna středně silná korelace s hladinami M-proteinu ( $r = 0,601$ ,  $p = 0,018$ ), v případě  $IgA\lambda$  pak silná korelace ( $r = 0,733$ ,  $p = 0,004$ ), kdežto součet izotypových párů vykazoval velmi silnou korelaci s hladinami celkového IgA imunoglobulinu v séru ( $r = 0,941$ ,  $p < 0,0001$ ) (obr. 2). Při analýze vzorků s IgM typem byly taktéž zjištěny velmi silné korelace hladin  $IgM\kappa$  ( $r = 0,904$ ,  $p = 0,001$ ) resp.  $IgM\lambda$  ( $r = 0,783$ ,  $p = 0,013$ ) a hladin M-proteinu a nejsilnější korelace byly opět zjištěny mezi součtem koncentrací obou izotypových párů a celkových hladin IgM imunoglobulinu v séru ( $r = 0,967$ ,  $p < 0,0001$ ) (obr. 3).



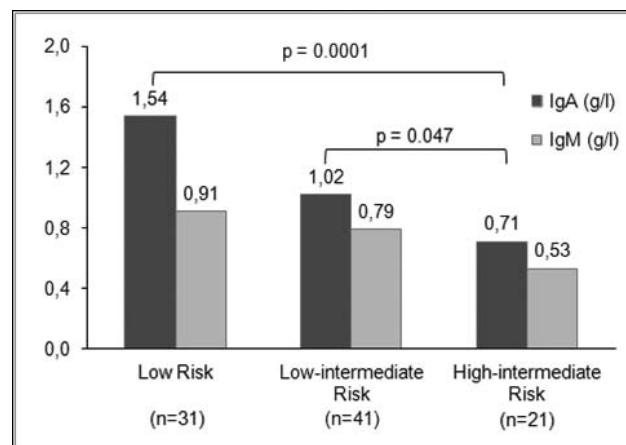
**Fig. 1.** Correlation between serum M-protein levels and IgG kappa resp. IgG lambda determined by HevyLite™ in IgG MGUS. Correlation of total IgG to summation of IgG Hevy-Lite™ pairs.

**Fig. 2.** Correlation between serum M-protein levels and IgA kappa resp. IgA lambda determined by HevyLite™ in IgA MGUS. Correlation of total IgA to summation of IgA Hevy-Lite™ pairs.



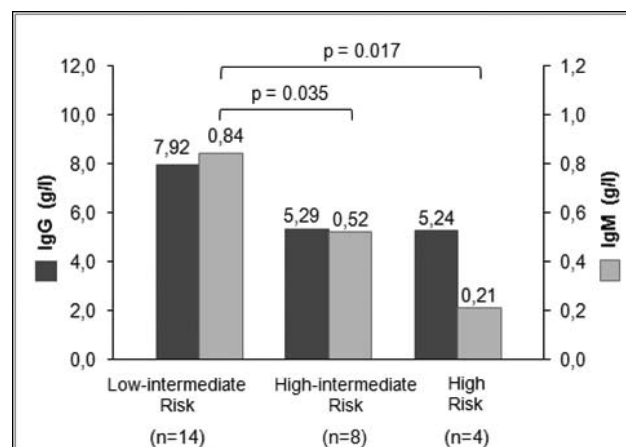
**Fig. 3.** Correlation between serum M-protein levels and IgM kappa resp. IgM lambda determined by HevyLite™ in IgM MGUS. Correlation of total IgM to summation of IgM Hevy-Lite™ pairs.

Při porovnání míry suprese hladin polyklonálních imunoglobulinů u jednotlivých rizikových tříd v souboru IgG MGUS byly zjištěny signifikantně vyšší hladiny IgA imunoglobulinu u jedinců s nízkým resp. nízkým středním rizikem ve srovnání se skupinou s vysokým středním rizikem ( $p = 0,0001$  resp.  $p = 0,047$ ) (obr. 4, Tabulka 2).



**Fig. 4.** The comparison of polyclonal IgA and IgM immunoglobulin levels between risk stages in IgG MGUS.

V případě IgM imunoglobulinu se skupiny signifikantně nelišily, avšak i zde byla naznačena klesající hodnota hladin s mírou rizikovosti MGUS. Při analýze skupiny MGUS s IgA izotypem byly zjištěny významně vyšší hladiny IgM imunoglobulinu u skupiny s nízkým středním rizikem nežli u jedinců s vysokým středním resp. vysokým rizikem ( $p = 0,035$  resp.  $p = 0,017$ ) (obr. 5, Tabulka 3). Stejně tak i hladiny IgG imunoglobulinu vykazovaly klesající tendenci s rizikovostí MGUS, avšak ne na hladině statistické významnosti.



**Fig. 5.** The comparison of polyclonal IgG and IgM immunoglobulin levels between risk stages in IgA MGUS.

V početně dostatečném souboru jedinců s IgG izotypem bylo rovněž provedeno porovnání hladin alternativních izotypových párů mezi jednotlivými rizikovými skupinami. U jedinců s dominantní sekrecí IgG $\kappa$  byly zjištěny signifikantně vyšší hladiny alternativního páru IgG $\lambda$  ve skupině nízkého a nízkého-středního rizika nežli ve skupině vysokého-středního rizika ( $p = 0,003$  resp.  $p = 0,006$ ) (obr. 6). V případě dominantní sekrece IgG $\lambda$  byly zjištěny významně vyšší hladiny IgG $\kappa$  u je-

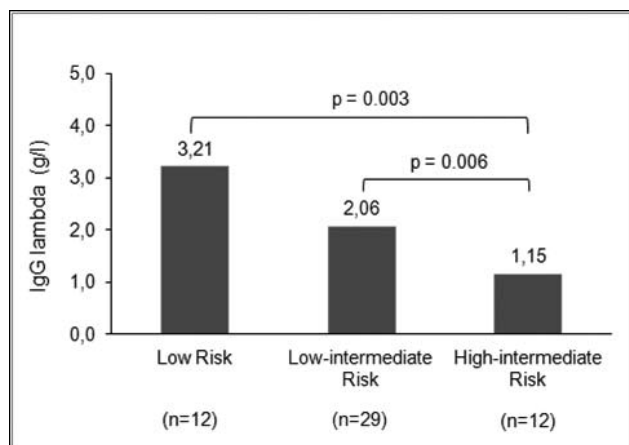
**Table 2.** Suppression of polyclonal immunoglobulin and uninvolved isotype HLC pair levels in each risk group of IgG monoclonal gammopathy of undetermined significance.

Risk:	Suppression of polyclonal IgA	Suppression of polyclonal IgM	Suppression of uninvolved IgG HLC pair
Low (n = 33)	6% (2/33)	9% (3/33)	39% (13/33)
Low-intermediate (n = 47)	25% (12/47)	10% (5/47)	45% (21/47)
High-intermediate (n = 22)	45% (10/22)	41% (9/22)	100% (22/22)

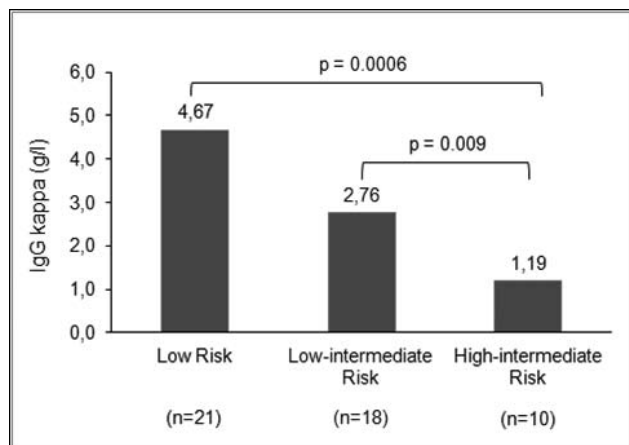
**Table 3.** Suppression of polyclonal immunoglobulin and uninvolved isotype HLC pair levels in each risk group of IgA monoclonal gammopathy of undetermined significance.

Risk	Suppression of polyclonal IgG	Suppression of polyclonal IgM	Suppression of uninvolved IgA HLC pair
Low-intermediate (n = 15)	27% (4/15)	0% (0/15)	27% (4/15)
High-intermediate (n = 8)	75% (6/8)	38% (3/8)	63% (5/8)
High (n = 5)	60% (3/5)	60% (3/5)	100% (5/5)

dinců s nízkým resp. nízkým-středním rizikem nežli ve skupině s vysokým-středním rizikem ( $p = 0,0006$  resp.  $p = 0,009$ ) (obr. 7).



**Fig. 6.** The comparison of uninvolved IgG lambda levels determined by HevyLite™ between risk stages in IgG kappa MGUS.



**Fig. 7.** The comparison of uninvolved IgG kappa levels determined by HevyLite™ between risk stages in IgG lambda MGUS.

## Diskuse

Stěžejní problematikou v diagnostice a sledování nemocných s monoklonálními gamapatiemi je stanovení a kvantifikace molekul monoklonálního imunoglobulinu či jejich součástí (lehkých/těžkých řetězců). V tomto ohledu představuje systém HevyLite™ novou principiálně odlišnou metodu pro detekci a kvantifikaci monoklonálního imunoglobulinu nežli dosavadní běžné elektroforetické a imunofixační techniky [8 - 10]. Systém je metodicky založený na využití specifických ovčích polyklonálních protilátek proti junkčním epitopům mezi doménami těžkého a lehkého řetězce v konstantní oblasti řetězců imunoglobulinu, následně vzniklé komplexy je možné kvantifikovat nefelometricky či turbidimetricky. Publikované práce ukazují, že systém HevyLite™ je citlivější než konvenční elektroforéza a nespornou výhodou je možnost získat numerické výsledky u pacientů s hraniční imunofixační pozitivitou bez možnosti elektroforetické kvantifikace [8 - 10]. Proto první částí práce bylo porovnání získaných výsledků analýzy HLC s hladinami M-proteinu vyšetřených standardní gelovou elektroforézou. Ve všech třídách byla zjištěna poměrně silná korelace obou metod, přičemž nejvyšší shody bylo dosaženo v případě izotypu IgG a IgM. V třídě IgA byla zjištěná korelace méně těsná, což je v souladu s doposud publikovanými pracemi, kdy se předpokládá jistá limitace elektroforetických technik při analýze IgA M-proteinu, který se mnohdy vlivem svých biochemicky-fyzikálních vlastností chová odlišně a migruje atypicky v oblasti  $\beta$ -zóny elektroforeogramu, a tudíž běžná elektroforéza nevede ke správné kvantifikaci tohoto izotypu [8, 10, 22 -24]. Naopak poměrně překvapivým zjištěním byly poměrně silné korelace obou metod ve třídě IgM. Je známo, že analýza izotypu IgM je mnohdy obtížná, vzhledem k velikosti molekuly, pentamerické formě, časté dodatečné glykosylaci molekul či kryoprecipitačním vlastnostem. Při srovnání součtu obou izotypových párů HLC (tedy dominantního i alternativního) a celkových hladin imunoglobulinu stanovenými turbidimetricky byly zjištěny velmi silné korelace obou metod, což je rovněž v souladu s předchozími studiemi, v našem případě je však nutno

podotknout, že pro obojí stanovení bylo využito optimální kombinace reagensů a analyzátorové platformy turbidimetru od jednoho výrobce. Je tedy možno říci, že systém HevyLite™ lze využít jako jistou alternativu stanovení M-proteinu s výhodou detekce alternativního (nedominantního) izotypového páru. Je ale nutno si uvědomit, že na rozdíl od systému FreeLite™, kdy je známo, že při analýze hladin VLŘ se jedná o parametr zcela nezávislý na hodnotách M-proteinu, nelze stanovení HLC užít jako další nezávislý ukazatel. Z dosavadních zjištění vyplývá, že hlavní oblastí využití vyšetření hladin HLC s výpočtem vzájemného poměru HLC párů zůstává oblast nízkých koncentrací M-proteinu a stavy s hraniční pozitivitou imunofixační elektroforézy.

Hledání rizikových faktorů pro transformaci s možností identifikace a časného zachytu jedinců s MGUS s vysokým rizikem vývoje zhoubné monoklonální gamapatie je náplní vědeckých záměrů mnoha řešitelských skupin. Pomineme-li velmi slibné moderní metody průtokové cytometrie s identifikací aberantních fenotypů, molekulárně – cytogenetické metody či analýzy genové exprese, patří mezi hlavní rizikové faktory typ a kvantita M-proteinu. Některé publikace rovněž zmiňují i přítomnost Bence Jonesovy bílkoviny v moči, vysoké aktivity laktátdehydrogenázy a v neposlední řadě i stanovení sérových hladin VLŘ [13 - 15, 25 - 28]. Poměrně rozsáhlá analýza 1148 jedinců s MGUS ve vztahu k rizikovým faktorům transformace byla publikována Rajkumarem [18]. U známých parametrů – tedy kvantita a izotypu M-proteinu (IgA, IgM, biklonální IgA+IgM) dosahoval v multivariační analýze index relativního rizika hodnoty 2,4 resp. 2,5. Při analýze absolutních hladin VLŘ bylo zjištěno, že nemocní s elevací VLŘ vykazují mnohem vyšší riziko transformace do některé z forem maligní MG (index relativního rizika 2,1) než jedinci s nízkými hladinami. V multivariační analýze však mnohem přesvědčivěji vyzněla hodnota indexu  $\kappa/\lambda$ , přičemž jedinci s abnormální hodnotou tohoto indexu měli vyšší riziko transformace (index relativního rizika 2,6) než jedinci s normální hodnotou indexu  $\kappa/\lambda$ . Tento ukazatel byl navíc nezávislý na ostatních vyhodnocených parametrech. Kombinací hodnoty indexu  $\kappa/\lambda$ , kvantita a izotypu M-proteinu jako diskriminačních parametrů byl vytvořen a všeobecně akceptován výše použitý stratifikační systém, který dokáže poměrně spolehlivě identifikovat jedince s vyšším rizikem transformace a který byl inkorporován do IMWG (International Myeloma Working Group) doporučení pro MGUS [19]. Jako další rizikový faktor pro progresi MGUS je často zmiňována přítomnost suprese hladin polyklonálních imunoglobulinů, což také bylo dříve jedno z „malých“ kritérií SWOG (Southwest Oncology Group) diagnostického systému mnohočetného myelomu [14, 15, 29]. Je známo, že rozvinutý mnohočetný myelom je spojen se supresí hladin polyklonálních imunoglobulinů nepostižených tříd, stejně tak i Bence Jonesova či nesekretorická forma myelomu bývá spojena se supresí všech tříd polyklonálních imunoglobulinů. Proto bylo částí naší studie posouzení hladin polyklonálních imunoglobulinů v závislosti na rizikosti MGUS a v početně dostatečně analyzované sestavě IgG MGUS i porovnání hladin alternativního páru

HLC. Při porovnání hladin polyklonálních imunoglobulinů byly v souboru IgG MGUS zjištěny signifikantní rozdíly v hladinách IgA, přičemž jedinci ve vysokém-středním riziku vykazovali hladiny nejnižší, obdobný trend byl zachycen i pro imunoglobulin IgM, avšak bez statistické významnosti. V případě IgA MGUS byly v případě imunoglobulinu IgM zjištěny nejnižší hodnoty u jedinců s vysokým rizikem transformace, přičemž hladiny IgG taktéž vykazovaly klesající tendenci s rizikovostí MGUS, avšak opět bez statistické významnosti. V souboru IgG MGUS bylo rovněž provedeno porovnání hladin alternativního HLC páru, přičemž bylo zjištěno, že jedinci s vysokým-středním rizikem vykazovali signifikantně nižší hladiny nežli ostatní rizikové skupiny. Statistický rozdíl byl mnohem výraznější nežli v případě hladin polyklonálních imunoglobulinů. Imunitní paréza je u rozvinutého mnohočetného myelomu poměrně častá a souvisí s poklesem funkčních B- a posléze i T-buněk, přičemž je nejlépe postižitelná právě vyšetřením hladin polyklonálních imunoglobulinů, které informují o míře produkce „nenádorovými“ plazmocytami. Je známo, že někteří autoři pokládají supresi polyklonálních imunoglobulinů za jeden z rizikových faktorů pro transformaci MGUS do MM [14, 15]. V našem souboru jsme prokázali vztah této imunitní parézy k rizikovosti MGUS, přičemž jedinci s vysokým rizikem transformace mají nejen častěji sniženy hladiny polyklonálních imunoglobulinů pod fyziologickou mez, ale rozdíl je signifikantní i v absolutních hladinách. Posouzení reziduální „nenádorové“ produkce imunoglobulinu, který je stejného typu jako M-protein produkovaný nádorovými plazmocytami, nebylo principiálně možné, neboť nefelometrické či turbidimetrické stanovení imunoglobulinů zahrnuje celkovou sumu polyklonálních i monoklonálních typů. Doposud bylo možné stanovení alternativního imunoglobulinu, resp. lehkého řetězce imunoglobulinu pomocí systému FreeLite™ s následným výpočtem indexu  $\kappa/\lambda$ , přičemž právě nízké hladiny alternativního řetězce do jisté míry vypovídaly o stavu reziduální „nenádorové sekrece“. Stanovení alternativního HLC páru umožňuje posoudit reziduální sekreci „nenádorové“ plazmocytární populace produkující imunoglobulin s těžkým řetězcem shodným s typem M-proteinu, ale s rozdílným řetězcem lehkým. Nicméně nadále vyvstává otázka, jak vysvětlit vyšší rozdíly v hladinách alternativních HLC párů oproti hladinám polyklonálních imunoglobulinů mezi jednotlivými rizikovými skupinami MGUS. Je nutné říci, že podobné pozorování již bylo publikováno Katzmanem et al. v případě transformujících jedinců s MGUS v IgG třídě, kdy míra suprese alternativního HLC páru byla výraznější a ukazovala se jako rizikový faktor pro evoluci MGUS, avšak pro izotyp IgA a IgM tento fenomén v této studii potvrzen nebyl [30].

## Závěr

Prvotní analýza HLC párů u jedinců s MGUS poukázala výsledky, které patrně rozšíří diagnostické a zejména prognostické možnosti u MGUS. Byla zjištěna vysoká korelace výsledků HLC s hladinami M-proteinu

vyšetřených standardní gelovou elektroforézou, a lze tedy říci, že se stanovení HLC jeví jako pomocná ev. alternativní metoda v případě atypických výsledků běžné elektroforézy (zejména u IgA izotypu) či v případě velmi nízkých koncentrací M-proteinu s přídatnou výhodou výpočtu indexu Igκ/Igλ. Zjištěná souvislost míry imunosuprese v závislosti na rizikovosti MGUS a zejména dobře patrný přínos stanovení alternativního HLC páru, přináší další aspekt k pochopení souvislosti biologie, chování a případné maligní evoluce MGUS s výhodou získání měřitelného parametru. Výše uvedené výsledky bude nutno ovšem ověřit i v třídách izotypů IgA a IgM. Využití platformy turbidimetru SPA Plus pro veškeré výše uvedené analýzy se jeví jako efektivní po stránce analytické i organizační a v neposlední řadě i po stránce ekonomické.

## Literatura

1. Špička, I. et al. *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. Galén 2005, Praha, s. 39-60.
2. **The 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: 749-757.
3. Tichý, M. *Laboratorní analýza monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů)*. Český Těšín: FINIDR s. r. o., 1997, ISBN 80-902022-1-7.
4. Tichý, M., Maisnar, V. Laboratorní průkaz monoklonálních imunoglobulinů. *Vnitř. Léč.*, 2006; 52: 41-45.
5. Bradwell, A. R. Serum free light chain measurements move to center stage. *Clin. Chem.*, 2005, 51, 5, p. 805-807.
6. Ščudla, 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.
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. Chem.*, 2001; 47: 673-680.
8. Bradwell, A. R. Analysis of immunoglobulin heavy chain/light chain pairs (Hevylite™). In Bradwell A.R: *Serum free light chain analysis, 6<sup>th</sup> edition*. Birmingham: The Binding Site Ltd., 2010, p. 301-320.
9. Bradwell, A. R., Harding, S., Fourrier, N. J. et al. Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin kappa/lambda ratios. *Clin. Chem.*, 2009, 55: 1646-55.
10. Ščudla, V., Pika, T., Heřmanová, Z. Hevylite – nová analytická metoda v diagnostice a hodnocení průběhu monoklonálních gamapatií. *Klin. Biochem. Metab.*, 2010, 18, 39, 2, p. 62-68.
11. Ščudla, V., Pika, T. Monoklonální gamapatie nejistého významu ve světle současných poznatků. *Klin. Biochem. Metab.*, 2009; 38: 62-71.
12. Kyle, R. A., Therneau, T. M., Rajkumar, S. V. et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.*, 2006; 354: 1362-9.
13. Kyle, R. A., Therneau, T. M., Rajkumar, S. V. et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.*, 2002, 346: 564-569.
14. Baldini, L., Guffanti, A., Cesana, B. M. et al. Role of different hematologic variables in defining the risk of malignant transformation in monoclonal gammopathy. *Blood*, 1996; 87: 912-918.
15. Cesana, C., Klersy, C., Barbarano, L. et al. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.*, 2002; 20: 1625-1634.
16. Veneri, D., Agel, H., Franchini, M. et al. Malignant evolution of monoclonal gammopathy of undetermined significance: analysis of 633 consecutive cases with a long term follow-up. *Haematologica*, 2004; 89: 876-878.
17. Sackmann, F., Pavlovsky, M. A., Corrado, C. et al. Prognostic factors in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica*, 2008; 93: 153-154.
18. 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.
19. Kyle, R. A., Durie, B. G. M., Landgren, O. et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*, 2010; 24: 1121-1127.
20. Bianchi, G., Kyle, R. A., Colby, C. L. et al. Impact of optimal follow-up of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) on early diagnosis and prevention of myeloma-related complications. *Blood*, 2010; 116: 2019-2025.
21. Pika, T., Minařík, J., Lochman, P., Bačovský, J., Ščudla, V. Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonální gamapatie nejistého významu a jejich přínos pro stratifikaci a sledování. *Transfúze, Hematol. dnes.*, 2011; 17: 177-181.
22. Eckhold, J., Poenisch, W., Kratzsch, J., Thiery, J., Bruegel, M. Analytical validation of Hevylite IgA assay for the diagnosis of monoclonal gammopathies. *Hematology Reports*, 2010; 2(s2), p. 52.
23. Assert, R., Eisele, L., Chapot, V. et al. First experiences with measurement of IgA heavy/light chains in IgA monoclonal gammopathies. *Hematology Reports*, 2010; 2(s2), p. 52.
24. Pika, T., Heřmanová, Z., Lochman, P. et al. Systém Hevylite™ u IgA monoklonálních gamapatií – první zkušenosti. *Klin. Biochem. Metab.*, 2011; 19: 86 – 91.
25. Mailankody, S., Mena, E., Yuan, C. M. et al. Molecular and biologic markers of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Leuk. Lymph.*, 2010, 51: 2159-2170.
26. Pérez-Persona, E., Vidriales, M. B., Mateo, G. et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*, 2007; 110: 2586-2592.
27. Kovářová, L., Burešová, I., Buchler, T. et al. Phenotype of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Neoplasma*, 2009; 56: 526-532.
28. Radocha, J., Maisnar, V., Klincová, M. et al. Výsledky prvních analýz z registru RMG – význam volných lehkých řetězců v prognóze MGUS a hodnocení kompletní remise MM. *Klin. Biochem. Metab.*, 2011; 2: 82-84.



29. **Durie, B. G. M., Salmon, S. E.** Multiple myeloma, macroglobulinemia and monoclonal gammopathies. In: Hoffbrand AV, Blain MC, Hirsh J. Recent advances in hematology. *Churchill Livingstone*, 1977, New York, p. 243-261.
30. **Katzmann, J., Clark, R., Dispenzieri, A. et al.** Isotype-specific heavy/light chain (HLC) suppression as a predictor of myeloma development in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Blood*, 2009, 114: abstract 1788.

*Tato práce vznikla s podporou grantu NT 12451/5, NS 10387 a fy The Binding Site Česká republika.*

Do redakce došlo 14. 2. 2012

*Adresa pro korespondenci  
MUDr. Tomáš Pika*

*III. interní klinika - NRE, Fakultní nemocnice Olomouc  
I. P. Pavlova 6  
775 20 Olomouc  
Tel.: 585 853 362*

*Email: tomas.pika@seznam.cz*