

Význam vyšetření párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu u monoklonálních gamapatií

Vlastimil Ščudla^{1,2}, Tomáš Píka², Jiří Minařík²

¹ III. interní klinika – nefrologie, revmatologie, endokrinologie LF UP a FN Olomouc, přednosta prof. MUDr. Josef Zadražil, CSc.

² Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc, přednosta prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

Souhrn

Náplní sdělení je aktuální informace o přínosu nové, vysoce senzitivní metody analýzy imunoglobulinů séra (Hevylite™), umožňující separátní kvantitativní vyšetřování párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu (HLC), tj. monoklonálního (involved) a polyklonálního (noninvolved) izotypu včetně jejich poměru (HLC-r) u monoklonálních gamapatií. Hlubší pozornost je věnována východiskům a charakteristice této analytické metody, srovnání jejího klinického přínosu se standardními technikami používanými v diagnostice, sledování průběhu, časné detekce relapsu a progresu nemoci, stratifikace, hodnocení léčebné odezvy a prognózy monoklonální gamapatie nejistého významu, mnohočetného myelomu, Waldenströmovy makroglobulinemie, systémové AL-amyloidózy a některých ne Hodgkinských lymfomů. Z dosavadních výsledků vyplývá, že ve srovnání s dosavadními standardně používanými metodami obohacuje metoda Hevylite™ klinickou praxi o vyšetření hladiny noninvolved Ig s možností vyhodnocení hloubky imunoparézy, stanovení indexu HLC-r uplatňujícího se při stratifikaci MM do rizikových skupin a přispívajícího k odhadu prognózy a zlepšení hodnocení hloubky léčebné odezvy, zatímco v případě MGUS poskytuje informaci o riziku maligní evoluce. Ke zpřesnění indikací metody Hevylite™ u MG v běžné klinické praxi zřejmě přispěje zveřejnění výsledků aktuálně probíhajících validačních studií.

Klíčová slova: Hevylite™ – mnohočetný myelom – monoklonální gamapatie nejistého původu – monoklonální imunoglobulin – ne Hodgkinské lymfomy – pár těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu – systémová AL-amyloidóza – Waldenströмова makroglobulinemie

The role of the assessment of heavy/light chain pairs of immunoglobulin in monoclonal gammopathies

Summary

The aim of the paper is to inform about the contribution of novel, highly sensitive analytic technique for the assessment of serum immunoglobulins (Hevylite™), enabling separate quantitative assessment of heavy/light chain pairs of immunoglobulin (HLC), i. e. the monoclonal („involved”) and polyclonal („noninvolved”) isotype including their ratio (HLC-r) in monoclonal gammopathies. We particularly target the characteristics of this technique, the comparison of its clinical contribution with standard methods used in the diagnostics, course and the detection of relapse and progression of the disease, as well as the stratification, assessment of therapeutic outcome and prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, Waldenström's macroglobulinemia, systemic AL-amyloidosis and some non-Hodgkin lymphomas. Present results show that in comparison with existing routinely used techniques the Hevylite™ method enriches clinical practice with the assessment of serum levels of „uninvolved” Ig. It enables the evaluation of the depth of „immunoparesis”, and the determination of HLC-r index that is needful for the stratification of MM into „risk cohorts”. It also contributes to prognostic assessment and improvement of the evaluation of the depth of therapeutic response. In MGUS individuals the HLC-r index provides information about the risk of malignant transformation. We await the results of ongoing validation studies that are expected to provide specific indications for Hevylite™ technique for MG in routine practice.

Key words: heavy/light chain pair of immunoglobulin – Hevylite™ – monoclonal immunoglobulin – monoclonal gammopathy of undetermined significance – multiple myeloma – non-Hodgkin lymphomas – systemic AL-amyloidosis – Waldenström's macroglobulinemia

Úvod

Pojem monoklonální gamapatie (MG) je souhrnné označení pro stavy spojené s maligní nebo potenciálně maligní monoklonální proliferací elementů B buněčné linie vyznačující se produkcí homogenního/monoklonálního imunoglobulinu (Mlg, M protein, paraprotein), případně pouze jeho strukturálních komponent, tj. lehkého řetězce (LŘ) κ (K) nebo λ (L), vzácně i těžkých řetězců molekuly imunoglobulinu (Ig) typu α , β , μ a δ [1–3]. U MG jsou pro diagnostiku, sledování průběhu, monitorování léčebné odezvy a odhad prognózy jednotlivých MG velmi důležité precizní kvantifikace Mlg s hodnocením jeho změn, odlišení monoklonálního a normálního/polyklonálního Ig (PIg) s určením jejich poměrů a posouzení tíže imunosuprese [4–8]. Samotná analýza proteinů séra u MG má 3 hlavní cíle: detekci Mlg, jeho imunochemickou typizaci a kvantifikaci [9]. IMWG (International Myeloma Working Group) guidelines doporučují jako základní metody vyšetřovacího panelu MG standardní elektroforézu proteinů séra (SPE) nebo moči, imunofixační elektroforézu (IFE), nefelometrické vyšetření bílkovin séra i moči (NEF) a vyšetření hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu (FLC) κ a λ včetně poměru K/L (index monoklonality, FLC-r) metodou Free-lite™ [1,3,6,8]. Použitelnost SPE u MG je omezena nízkou hodnotou Mlg v séru, (0,5–3 g/l), umístěním a úzkostí proužku Mlg v analyzovaném gelu [5]. V případě IgA typu Mlg je nutno počítat navíc s „fenomémem překrytí“, neboť jeho elektroforetická anodální migrační pozice interferuje s dalšími proteiny séra, např. v oblasti α frakce s haptoglobinem, v oblasti β zóny s transferinem, lipoproteiny a C3 složkou komplementu, v případě IgM typu M proteinu je nutno zohlednit jeho sklon k autoagregaci [9]. Katodální proužek IgG Ig lze hodnotit mnohem snadněji nežli anodální IgA, vyznačující se navíc sklonem k polymeraci. Předložené okolnosti významně zkreslují skutečnou koncentraci Mlg v séru nebo v moči vyšetřovanou standardní technikou, a tím i nepřesné hodnocení celkové nádorové masy v organizmu [6,8,10–12]. Vyšetření celkové hladiny Ig s pomocí NEF některé z těchto limitací odstraňuje, má však především v případě vysoké koncentrace IgG a IgM M proteinu sklon jeho výši nadhodnocovat a zejména neumožňuje diskriminaci mezi monoklonální (Mlg) a polyklonální formou Ig (PIg) [6,13]. Tato omezení, stejně jako další zkreslení výšky sérové hladiny Mlg v důsledku změny objemu plazmy, hodnoty hematokritu a rozdílného poločasu katabolismu jednotlivých tříd Ig, vedou k nespolehlivému určení koncentrace Mlg v séru, a tím i k nepřesnému zhodnocení celkového objemu produkční nádorové tkáně [4,6,9,11]. Přesné stanovení Mlg s pomocí SPE denzitometrie selhává u 46 % [6], 57 % [12] resp. u 33 % [17] nemocných s IgA typem MM, zatímco u IgG typu pouze ve 4 % [6]. Významným nedostatkem IFE je přes její vysokou citlivost v detekci a přesnost v typizaci imunochemických tříd Mlg nemožnost jeho kvantifikace a pouze vizuální hodnocení IFE proužku [4,14]. Přes tyto limitace zastává IFE i v současnosti pro svou vysokou senzitivitu roli „zlatého stan-

dardu“ v detekci a typizaci všech tříd Mlg, tj. IgG, IgA, IgM, IgD, IgE [11]. Metoda Free-lite™, dnes již standardní nefelometrická, případně turbidimetrická technika k vyšetření hladin FLC imunoglobulinu, se vyznačuje vysokou přesností a schopností kvantitativního vyjádření klonality procesu (poměr K/L) se zohledněním stavu renálního metabolismu LŘ a změn krevního objemu, postrádá ale informaci o syntéze intaktních forem Mlg [4,15].

Charakteristika Hevylite™ metody

Všeobecně známé limitace standardních metod odstraňuje metoda Hevylite™ zavedená Bradwellem v roce 2009 [5]. Tato nefelometrická, případně turbidimetrická technika umožňuje díky přípravě vysoce specifickým, avidním polyklonálním protilátkám proti junkčním epitopům umístěným mezi konstantními doménami těžkých a lehkých řetězců molekul Ig přesnou separátní kvantitativní analýzu páru těžkých/lehkých řetězců Ig κ a λ (HLC-K a HLC-L) [4,5,9,13,16,17]. Příprava univerzální, reproduktibilní a analyticky spolehlivé imunoeseje byla limitována strukturální variabilitou terčových epitopů, umístěných oboustranně na obou raménkách řetězců molekuly Ig [5]. Metoda Hevylite™ poskytuje přesnou separátní identifikaci a kvantifikaci sérových hladin HLC-K a HLC-L, tj. nádorového (involved) Mlg vytvářeného nádorově transformovanými plazmocytami nebo lymfoplazmocytyárními elementy, a nenádorového, tj. polyklonálního/normálního (noninvolved) Ig stejné třídy, vytvářeného normálními reziduálními plazmatickými buňkami, a tím i zhodnocení hloubky „imunoparézy“ [4–6,14]. Izotypově specifická suprese noninvolved HLC (suprese páru HLC) se definuje jako nález nižší koncentrace polyklonální složky HLC páru nežli je dolní hranice koncentrace referenčního rozmezí (např. u IgG-K typu MGUS suprese noninvolved IgG-L pod dolní hranici referenčního rozmezí pro IgG-L) [13]. U MG jde tedy o typ IgG-K/IgG-L, IgA-K/IgA-L a IgM-K/IgM-L s velmi přínosnou možností výpočtu jejich vzájemného poměru (HLC-r), tj. poměru monoklonálního involved/polyklonálního noninvolved Ig (HLC-K/HLC-L) [7,8,18,19]. Takto získané vyhodnocení klonality procesu je přínosné v diagnostice a monitorování průběhu nemoci, stratifikaci, pro časnou detekci relapsu/progrese a prognózu nemocných s MG, tj. u MGUS [13,20], u MM [10], Waldenströmovy makroglobulinemie [21] a u systémové AL-amyloidózy [4,7,9,18,22]. Hevylite™ metoda umožňuje v případě pouze izolované positivity IFE kvantitativní stanovení hladin HLC-K a HLC-L včetně jejich poměru, tj. HLC-r [5]. Z dosavadních zkušeností vyplývá, že v případě IgG typu Mlg je nález abnormální hodnoty HLC-r méně častý, nežli v případě IgA a IgM typu, neboť IgA a IgM imunoeseje je ve srovnání s IgG imunoesejí v hodnocení M komponenty citlivější [5]. Na podkladě rozsáhlé analýzy testovacího panelu dárců krve byla výrobcem (The Binding Site, Birmingham) doporučena pro klinickou praxi normální rozmezí hladin HLC-K a HLC-L, včetně jejich poměru HLC-r (tab. 1) [13,23].

Tab. 1. Normální referenční meze párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu a jejich poměru κ/λ při použití metody Hevylite™. Upraveno podle [13,23]

izotyp HLC a HLC-r	referenční rozmezí (g/l)
IgG-K	3,84-12,07
IgG-L	1,91-6,74
IgG-K/IgG-L	1,12-3,21
IgA-K	0,57-2,08
IgA-L	0,44-2,04
IgA-K/IgA-L	0,78-1,98
IgM-K	0,19-1,63
IgM-L	0,12-1,01
IgM-K/IgM-L	1,18-2,74

HLC – páry těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu

HLC-r – poměr HLC- κ /HLC- λ , K – κ , L – λ

Východiska zavedení HLC analýzy u monoklonálních gamapatií

Již z odlišné biologické podstaty jednotlivých typů MG se nemocní vyznačují abnormální koncentrací HLC-K a HLC-L s různě odchylným vzájemným vztahem, tj. HLC-r. Abnormální hodnoty HLC-r, svědčící pro monoklonální charakter nádorového procesu, jsou výsledkem nejen vzestupu tumorózního (involved) Mlg, ale i suprese netumorózního, tj. normálního (noninvolved) Ig. Ve srovnání s Mlg IgG typu je Hevylite™ analýza u IgA a IgM typu Mlg přesnější nežli standardní SPE a je do značné míry srovnatelná s výsledky IFE [4,5]. U MM s izolovanou pozitivitou IFE přináší Hevylite™ technika vedle kvantitativního pohledu i hodnocení hloubky „imunoparézy“, významně obohacující spektrum popsanych změn oproti pouhému stanovení výše Mlg s pomocí SPE. Současné vyšetření hladin HLC a hodnoty HLC-r poskytuje mnohem přesnější a dynamickou kvantitativní informaci o změnách postihných Ig nežli ostatní standardní techniky [9,18]. Hlavní příčinou abnormální hodnoty HLC-r může být u některých nemocných především imunoprese dokumentovaná nízkou koncentrací netumorózního (noninvolved) HLC identifikující klonalitu procesu i v případě normální koncentrace nádorového (involved) HLC [5]. Předností stanovení HLC-r oproti SPE je nezkrácení získaného výsledku změnami objemu krve a výšky hematokritu a variabilitou katabolizmu Mlg, způsobující až 30–50% kolísání hladin Mlg bez vztahu k vlastní nádorové produkci a k rozsahu nádorové tkáně [24]. Změny hematokritu a objemu plazmy v krevním řečišti ovlivňují hodnoty M proteinu všech tříd poněkud protichůdně [24]. Vzestup hematokritu, např. po úspěšné léčbě MG, vede ke zvýšení koncentrace Mlg bez skutečné změny jeho množství, nutno zohlednit i odlišné setrvání jednotlivých typů Mlg ve vaskulárním kompartmentu (u IgM v 90 %, u IgG v 50 % a v případě sVLŘ pouze v 20 %) v důsledku rozdílné velikosti

jejich molekul. U MG dochází dále vzhledem k osmotické aktivitě molekul Mlg ke změně plazmatického objemu, neboť vysoká koncentrace Mlg objem plazmy zřetelně zvyšuje, takže klesne-li po léčbě koncentrace Mlg, klesne i plazmatický objem a vice versa [24,25]. Pouhé vyšetřování hladiny M proteinu v séru tedy skutečné změny produkce nádorovou tkání podhodnocuje a není spolehlivým měřítkem změny objemu nádorové masy. V případě IgG jsou molekuly Ig odstraňovány z cirkulace procesy závislými na jejich koncentraci, takže jeho hladiny v séru neodpovídají skutečné nádorové produkci [8]. Z těchto příčin není hodnota Mlg vyšetřená při diagnóze MM vhodným prognostickým ukazatelem, zatímco hladina sVLŘ, včetně poměru κ/λ ano [4]. Výše IgA i IgM M proteinu závisí v podstatné míře na stupni jejich degradace [26]. Neonatální Fc receptory pro IgG (FcRn) se vyznačují vedle vazby na albumin i vazbou na IgG typ Ig [27]. Heterodimerické molekuly FcRn tak ochraňují molekuly IgG a albuminu, z malé části i IgA Ig před proteolytickou digescí, což vede k jejich mnohonásobné recyklaci s uvolňováním do kolující krve [28]. Při vysoké koncentraci IgG Ig v séru dochází k plné saturaci FcRn způsobující, že IgG vázaný na FcRn je recyklován, zatímco volný IgG bez vazby na FcRn je urychleně degradován. Katabolický poločas IgG imunoglobulinu, a to obdobně monoklonální i polyklonální frakce, je při normální koncentraci v séru asi 21 dnů, zatímco v případě vysoké koncentrace má frakce nevázaná na FcRn receptory katabolický poločas pouze asi 3 dny. Při velmi nízké koncentraci IgG Ig dosahuje katabolický poločas tohoto izotypu Ig v důsledku vystupňované ochrany délky i několika týdnů [27–29]. V případě IgA i IgM třídy Ig není jejich clearance závislá na koncentraci, a proto katabolický poločas IgA typu M proteinu je asi 6 dnů, u IgM typu asi 5 dnů, takže nálož myelomové masy je u IgA MM ve srovnání s obdobnou koncentrací IgG typu relativně větší [4,26]. Jednoznačným přínosem Hevylite™ metody je skutečnost, že měří nádorem produkované Ig přesněji, nežli poskytuje měření celkové hodnoty Ig s pomocí NEF a koncentrace Mlg s pomocí SPE [8]. I když hladiny IgA-K a IgA-L mají tendenci k navyšování hodnot s narůstajícím věkem, hodnota jejich poměru, tj. IgA HLC-r [11], stejně jako IgG HLC-r, na věku nezávisí [23]. Přínosem vyšetřování HLC a HLC-r technikou Hevylite™ není pouze pomoc v diagnostice a monitorování průběhu MG, ale i poskytnutí informací o biologických vlastnostech nádorových a normálních plazmocytů nebo lymfoplazmocytárních elementů, a tím i patogenezi MG [4,6,14].

Klinický význam vyšetření HLC u jednotlivých typů monoklonálních gamapatií

Mnohočetný myelom

Diagnostika a monitorování průběhu nemoci

Vyšetření koncentrace HLC v séru, a zejména stanovení poměru HLC-K/HLC-L, tj. indexu HLC-r, je v diagnostice MM přínosné, neboť se vyznačuje vysokou senzitivitou a specificitou, převyšující zejména v IgA třídě možnosti

SPE [4,6,9,14]. S výjimkou ojedinělých studií [7,11] považuje konsensus, že jde o citlivý a specifický parametr diagnostiky MM, neboť prakticky všichni nemocní v období diagnózy MM se vyznačují abnormální hodnotou HLC-r navozenou konzistentně zvýšenou hodnotou monoklonálního (involved) izotypu HLC-K nebo HLC-L a vesměs i snížením nemonoklonálního/normálního (noninvolved) izotypu HLC [5,6,15,18]. Metoda Hevylite™ je přínosná zejména u IgA typu MM v situaci, kdy monoklonální IgA v důsledku komigrace s některými proteiny vytváří při SPE obraz širokého proužku, nebo v případě směsi monomerních nebo multimerických molekul obraz 2–3 proužků znemožňujících přesné denzitometrické kvantitativní vyšetření [15]. Hevylite™ technika tedy umožňuje u MM na rozdíl od SPE a NEF přesnou kvantifikaci Mlg. Srovnání hodnot IgA HLC-r s výsledky IFE se vyznačuje 95,6% senzitivitou nasvědčující, že IFE je citlivější a nelze ji nahradit pro nebezpečí selhání detekce Mlg pouze vyšetřením IgA HLC-r [11]. Při interpretaci výsledku HLC-r je nutno zohlednit možnost vyšší hodnoty v důsledku vysoké hodnoty Plg, např. u jaterní cirhózy [11]. U jednotlivých nemocných lze nalézt vysokou shodu výšky Mlg (SPE) s koncentrací tumorózního (involved) HLC Ig [8] a významný vztah celkové koncentrace IgA a hodnoty HLC-r k zastoupení plazmocytů v kostní dřeni (KD) [11]. Koncentrace IgG-HLC převyšující hodnotu mediánu HLC koreluje s pokročilostí MM vyhodnocenou na podkladě hodnot Hb, FLC-r a tíže infiltrace KD myelomovými buňkami, v případě HLC-r navíc s hodnotou β_2 -M, nikoliv ale s hodnotami albuminu, LDH, kreatininu, vápníku, sérové hladiny FLC v séru a tíže myelomové kostní nemoci [18].

Monitorování průběhu MM podle změn hodnoty Mlg v séru vyhodnocené SPE není dostatečně spolehlivé, neboť neodpovídá věrohodně změně produkce Mlg podle rozsahu a vlastností nádorové tkáně. Při monitoraci průběhu IgA MM korelují koncentrace IgA-K i IgA-L docela dobře s hodnotami Mlg (SPE), avšak vyšetření Hevylite™ je citlivější a poskytuje kvantitativní hodnoty hladin monoklonálního (involved) a normálního (noninvolved) izotypu Ig [15]. Monitorování HLC-r v průběhu léčby MM poskytuje nepřímou dynamickou informaci o stupni selektivního zániku myelomových buněk a o změnách zastoupení nemaligních plazmocytů, tedy zejména o míře selektivní redukce nádorové populace v důsledku efektivní léčby [4,5]. Oproti standardním metodám, zejména SPE, má Hevylite™ metoda HLC-r schopnost velmi časně rozpoznání nedostatečné léčebné odezvy a potenciál časnějšího zjištění nástupu relapsu/progrese MM [15]. Při monitorování MM po dosažení kompletní remise (KR) je metoda Hevylite™ využívající stanovení HLC-r podstatně citlivější nežli SPE a téměř stejně citlivá jako IFE [5,15]. V případě hyposekreční formy MM (Mlg < 10 g/l) byla zjištěna uspokojivá korelace výsledků NEF a Hevylite™ analýzy [15,30] a vysoká citlivost HLC-r v rozpoznání časně „evolving“ relapsu/progrese nemoci včetně zhodnocení klonality procesu, stanovení HLC-r by mělo být proto používáno jako další

ukazatel v monitoraci oligosekreční formy MM [6]. U části nemocných s IgG typem MM perzistuje abnormální hodnota HLC-r v průběhu léčby i přes negativitu IFE, nebo dochází k vývinu patologické hodnoty HLC-r jako projev „evolving“ relapsu MM o několik měsíců dříve nežli dochází k pozitivitě IFE [5,6]. Dlouhodobé monitorování změn HLC-r má tedy nadějný potenciál k podchycení nejen hloubky kompletní remise (KR), ale i rozpoznání neúplné léčebné odezvy a časně fáze relapsu/progrese MM [31]. Z hlediska monitorování minimální reziduální nemoci (MRD) je metoda Hevylite™ v některých případech citlivější nežli SPE a dokonce i IFE, neboť poskytuje kvantitativní informaci o delikátních změnách Mlg rozpoznatelných s pomocí IFE pouze kvalitativně [6,30]. Nutno ale uvést, že byla zaznamenána ojedinělá pozorování normálních výsledků Hevylite™ metody přes pozitivitu SPE a IFE. V případě nízké hodnoty Mlg jde nejspíše o MGUS nebo iniciační fázi „low risk“ MM s doposud nízkou produkcí Mlg a s normální hladinou normálních (noninvolved) Ig. V případě přítomnosti tzv. oligoklonálních proužků po intenzivní chemoterapii nebo po vysokodávkované chemoterapii s autologní transplantací kmenových buněk (VDT/ATKB) poskytuje Hevylite™ metoda informaci o jejich migrační pozici, napomáhající k odlišení mezi rekurencí původního M proteinu a oligoklonálními proužky stejného HLC typu s pouze odlišnou elektroforetickou migrací [9]. Hevylite™ technika je tedy úspěšná zejména v monitorování nemocných s IgA a oligosekreční formou MM, neboť na rozdíl od standardních technik umožňuje precizní kvantifikaci M proteinu [6,13,22].

Hodnocení léčebné odezvy

V průběhu léčby MM dochází podle rychlosti a hloubky léčebné odezvy k postupné úpravě hodnoty HLC-r [19]. Bazální hodnoty HLC a HLC-r vyšetřené při diagnóze MM nepredikují hloubku léčebné odezvy po indukční terapii, ale hodnota HLC-r vyšetřená v období maximální léčebné odezvy se významně liší podle hloubky léčebné odezvy, tj. v KR, nKR („nearly“ KR), VGPR („very good“ parciální remise), PR (parciální remise), MR (minimální léčebná odpověď) a SD („stable disease“) [6]. Nemocní s dosažením > VGPR a s normalizací HLC-r po indukční terapii před VDT-ATKB se na rozdíl od normalizace FLC-r vyznačovali nízkým rizikem léčebného selhání s dlouhou dobou do progrese nemoci (PFS) [6]. Je zajímavé, že u IgA typu MM předcházela normalizace HLC-r dosažení MRD vyhodnocené s pomocí multiparametrické průtokové cytometrie (M-FC) a IFE. Vysvětlením je okolnost, že IFE poskytuje informaci pouze o pohybu M proteinu, zatímco HLC-r o vývoji monoklonálního (involved) i polyklonálního (noninvolved) izotypu Ig [30]. Úpravu HLC-r lze považovat za „neinvazivní“ informaci o paralelním vzestupu Plg jako projevu rekonstituce normálních plazmocytů se současným poklesem Mlg v důsledku suprese myelomového klonu [30]. Z jiného úhlu pohledu považují někteří autoři hodnotu HLC-r spíše za ukazatel rekonstituce imunity po inten-

živní terapii nežli za ukazatel MRD [32]. U některých pacientů s IgA typem MM je Hevylite™ v rozpoznání MRD citlivější nežli SPE a ojediněle nežli IFE [10,11]. Ovšem srovnání senzitivity Hevylite™ techniky s pomocí multiparametrické průtokové cytometrie (M-FC) v hodnocení hloubky KR, tj. MRD v předtransplantační a po-transplantační fázi léčby prokázalo vyšší citlivost M-FC (100 vs 80 a 70 %) [33]. Bylo zjištěno, že hodnocení léčebné odezvy založené na současně normalizaci HLC-r a FLC-r je přínosnější nežli dosažení sKR. Citlivěji nežli normalizace hodnoty HLC-r vyzněla u vysoce rizikových nemocných úprava hodnoty „HLC-difference“ $< 1,8$ vs $\geq 1,8$ g/l (rozíl involved a noninvolved HLC) vyšetřená po 2 cyklech, tj. po 8 týdnech intenzivní chemoimuniterapie a nabízí se jako časný a nezávislý indikátor rychle nastupující hluboké reakce na antimyelomovou terapii [34]. Sledování pohybu FLC-r (Freelite™) bylo oproti HLC-r (Hevylite™) méně citlivé a s přítomností diskordantních výsledků, dokumentujících variabilitu klonální evoluce v průběhu MM [6]. Vedle persistence původního nádorového klonu dochází k vývinu nových subklonů, produkujících intaktní formu Mlg [35,36]. Praktickou použitelnost klonální teorie u MM potvrzuje rovněž občasný nový záchyt vysoké produkce samotného LR (tzv. Bence-Jones escape) nebo nález nového izotypu intaktního Mlg v koexistenci s původním izotypem Mlg vytvářeným původní populací myelomových buněk [6,35,36]. Vysoce abnormální hodnoty HLC-r, převyšující hodnotu mediánu zkoumaném souboru IgG a IgA typu MM, mají významný vztah k délce PFS a k TTT (doba do zahájení terapie), provázený většinou poklesem noninvolved izotypu Ig [8]. Nebyl zjištěn významný vztah mezi délkou PFS a koncentrací netumorózního izotypu Ig, tj. hodnot IgA a IgM u IgG a IgG a IgM izotypu Ig u IgA formy MM [8]. HLC-r je tedy možno považovat za nadějný senzitivní ukazatel, napomáhající výběru racionální udržovací a konsolidační terapie. Při hodnocení hloubky léčebné reakce bylo zjištěno, že PR ($> 50\%$ pokles Mlg s pomocí SEP) je většinou spojena s abnormálním HLC-r, zatímco KR (negativita SEP a IFE) obvykle s normálním HLC-r [30,37]. V případě neúplné remise s pozitivitou pouze IFE je většinou HLC-r abnormální. S pomocí HLC-r lze odhalit persistenci MM u 26 % nemocných splňujících standardní kritéria KR. Monitorování HLC-r je schopno detekovat „evolving“ relaps u asi 10 % jedinců před vývinem positivity IFE [6]. Praktickým úskalím rozpoznání KR je okolnost, že v případě „konvenční“ KR není vzácností diskordance HLC-r a FLC-r (Freelite™), kdy persistence MM je doložena abnormální hodnotou HLC-r v KR u asi 26 % [6]. Abnormální HLC-r u některých nemocných s IFE negativní KR nasvědčuje individuálně vyšší senzitivě Hevylite™ v detekci reziduálního Mlg, potvrzená kratší délkou celkového přežití (OS) od dosažení maximální léčebné odezvy [6]. Kontradikcí tohoto závěru je protikladné pozorování normální hodnoty HLC-r u 34 % IFE pozitivních nemocných, splňujících konvenční kritéria nKR nebo VGPR, vysvětlitelné současným vzestu-

pem Plg s perzistencí nízké hodnoty Mlg v důsledku prodlouženého poločasu katabolismu při nízké hodnotě Mlg [25], nebo perzistencí malého plazmatického klonu neodstraněného předchozí terapií [6]. Nález abnormální hodnoty HLC-r při monitorování MM potvrzuje, že nemocní, splňující SPE, NEF a IFE kritéria KR, mají stále reziduální onemocnění. Přestože vyšetření s pomocí M-FC, Hevylite™, Freelite™ a ostatních standardních metod vydávají poněkud rozdílné výsledky, poskytují ve svém souhrnu důležité, vzájemně se doplňující informace, přínosné pro reálné hodnocení vývoje nemoci včetně hloubky léčebné odezvy. Tato vyšetření se vzájemně nezastupují, nýbrž doplňují a měla by být indikována výběrově a individuálně, neboť jejich využití v klinické praxi vyžaduje dostatečnou zkušenost a znalost řady interpretačních úskalí [37,38].

Prognostický význam Hevylite™ u MM

Z dosavadních šetření vyplývá, že vyšetření hladin HLC a hodnoty HLC-r (Hevylite™) má v případě IgA i IgG typu MM prognostický význam, vyznačující se v případě abnormální hodnoty HLC-r krátkou PFS [8,10,38,40] a krátkým celkovým přežitím (OS) [6,10,23]. Hlubší analýza ukázala, že příčinou vztahu HLC-r k délce PFS není pouze výše hladiny nádorového (involved) Mlg, ale i relativní suprese normálního (noninvolved), izotypově specifického HLC, v důsledku změn v mikroprostředí KD pod vlivem působků vytvářených nádorovými plazmocyty [8,13]. Bylo zjištěno, že vysoce abnormální hodnoty HLC-r zjištěné při diagnóze MM ($< 0,022 - > 45$ vs $0,222 - 45$) jsou spojeny s kratším mediánem OS a nízkým 5letým přežitím (33 % vs 59 %), což potvrdila návazná analýza s přítomností vyzrálejších dat (medián OS 35 vs 60 měsíců) [6,39]. Uvedený závěr je v souladu se závěry předchozích analogických studií prokazujících prognostický význam abnormální hodnoty FLC-r (Freelite™) [6,41,42]. Normalizace HLC-r v plateau fázi MM se rovněž vyznačuje prolongovanou PFS [18]. Při hodnocení OS po dosažení $\geq$ PR bylo zjištěno, že nemocní bez trvalé normalizace HLC-r měli podstatně kratší OS nežli s jeho úpravou [6]. Rovněž suprese páru HLC se vyznačuje významnou rozdílností OS s 5letým přežitím 43 % vs 70 % a mediánem OS 4,8 vs 8,5 let, zatímco suprese rozdílného izotypu Ig (např. IgG a IgM Ig u IgA MM) vztah k OS nemá [43]. Nemocní v KR se současnou normalizací FLC a HLC-r měli podstatně delší PFS nežli bez úpravy těchto parametrů [38]. Bylo taktéž zjištěno, že normalizace HLC-r po léčbě je významnějším prediktivním faktorem, nežli úprava FLC a FLC-r [43]. Prakticky důležitý přínos má zjištění, že hodnota HLC-r má větší prognostický význam u IgG nežli u IgA typu MM, nikoliv ale výška celkové hladiny Ig třídy IgG a IgA (NEF) [8,39]. S pomocí multivariační analýzy nemocných s IgG a IgA typem MM bylo zjištěno, že HLC-r spolu s β_2 -M, nikoliv ale FLC-r a sérové hladiny LDH nebo albuminu, jsou nezávislými rizikovými faktory PFS a OS [6,8,18]. S použitím univariační analýzy byla prokázána významná korelace mezi přítomností nebo chyběním

50% suprese páru HLC pod rozmezí normálních hodnot a vysoce rizikovým cytogenetickým obrazem, tj. přítomností t(4;14), t(4;16), del 17p a ampl 1q21, nikoliv ale s tíží plazmocelulární infiltrace KD [39]. S pomocí univariální a multivariální regresní analýzy bylo zjištěno, že v případě aberantních hodnot HLC-r a β_2 -M byl vyjádřen významnější vztah k délce PFS nežli při zhodnocení prognostického významu hladiny albuminu, FLC-r a překvapivě i cytogenetických nálezů charakteru del 13, t(4;14) a del 17p [8].

Stratifikace MM do „rizikových skupin“

Výsledky prognostické analýzy zaměřené na HLC-r (Hevylite™) byly ve 3 studiích světového písemnictví použity k sestavení nově zkoncipovaných stratifikačních systémů rozdělujících nemocné do 3 „rizikových“ skupin MM [8,10,39,40,43] (tab. 2).

Ludwig představil postupně 2 stratifikační modely, v nichž v 1. systému bylo zvoleno vedle hodnoty β_2 -M (3,5 mg/l) jako další kritérium HLC-r (tab. 2) [43]. Statistická analýza potvrdila významnou rozdílnost mezi skupinou 1 vs 2 a 2 vs 3, přičemž 5leté OS v rizikových skupinách 1, 2 a 3 bylo 79 %, 52 % a 50 % a délka celkového přežití (OS) 131, 54 a 29 měsíců [43]. V následně vypracovaném 2. stratifikačním modelu bylo vedle hodnoty β_2 -M (5,5 mg/l) použito hodnocení přítomnosti či nepřítomnosti > 50% suprese hladiny normálního izotypu z páru HLC pod úroveň normálních hodnot (tab. 2) [39]. 75% OS nemocných vyšetřených při diagnóze MM mělo medián v 1.-3. stadiu 41, 25 a 13 měsíců, v souboru nemocných s relabující/refrakterní fází MM byl medián OS x (zatím nevyhodnotitelný), 21 a 8 měsíců [39].

Další 3stupňový stratifikační systém dle Avet-Lousiaua a Bradwella založený na vysoce abnormálních hodnotách HLC-r, tj. HLC-r < 0,01 a > 200 v kombinaci s β_2 -M < 3,5 mg/l se vyznačoval mnohem těsnějším vztahem k PFS nežli v aktuálně používaném stratifikačním systému dle International Staging System (ISS) [1], neboť stadium 3 (high risk) mělo kratší PFS nežli stadium 3 dle ISS (tab. 2) [8,10,40]. Prognostická analýza, věnovaná srovnání kombinace HLC-r a β_2 -M vs albumin a β_2 -M (ISS), vyzněla v obou stratifikačních modelech příznivěji pro kombinaci se začleněním HLC-r [8,43], což dokládá, že

inkorporace HLC-r do stážovacího systému MM dle ISS zlepšuje výpověď o závažnosti prognostického rizika [6,8,16]. Je nasnadě, že nově zkoncipované stratifikační modely MM vyžadují před jejich případným zavedením do klinické praxe ověření na dostatečně rozsáhlých souborech nemocných léčených moderní biologickou léčbou a s rozšířením analýzy PFS o vyhodnocení i OS.

Monoklonální gamapatie nejistého významu

Monoklonální gamapatie nejistého významu (MGUS), bezpříznakový a potenciálně maligní stav, se vyznačuje nezhoubnou proliferací plazmatických buněk secernujících Mlg prokazatelný v séru nebo v moči v případě nepřítomnosti zhoubného lymfoproliferativního stavu [1,44]. Sledování koncentrace Mlg s pomocí SPE, případně hladin FLC v séru a FLC-r (Freelite™), patří k základním parametrům sloužícím k hodnocení stability stavu a podchycení nástupu maligní transformace. Při hodnocení významu Hevylite™ u MGUS bylo zjištěno, že hladiny HLC-K a HLC-L korelují velmi silně s výškou M proteinu vyšetřeno pomocí SPE v třídě IgG a IgM, zatímco u třídy IgA byl pozorován pouze středně významný vztah [45]. V této situaci se metoda Hevylite™ jeví jako pomocná, případně alternativní technika kvantifikace M proteinu zejména u atypických výsledků SPE (především u IgA typu) a v případě nízkých koncentrací Mlg s tím, že poskytuje navíc vyšetření indexu HLC-r [45]. Dobrá korelace byla rovněž zjištěna při porovnání součtu obou párů HLC (involved a noninvolved) s hladinou celkového Ig vyšetřeno nefelometricky [19,45]. Ve studii České myelomové skupiny bylo zjištěno, že u jedinců s dominantní sekrecí involved IgG-K HLC byly přítomny významně vyšší hladiny normálního (noninvolved) IgG-L u nemocných s „low risk“ a „low-intermediate risk“ oproti skupině s „high-intermediate risk“, totéž platilo obráceně i pro IgG-L typ a pro jedince s IgA-K a IgA-L typem MGUS [46]. K obdobnému závěru dospěla studie věnovaná HLC-r, v níž výskyt abnormální hodnoty HLC-r byl nejvyšší v rizikové skupině „intermediate/high risk“ (100 %) oproti skupinám „low-intermediate risk“ (90 %) a „low risk“ (80 %), přičemž abnormální HLC-r byl taktéž spojen s vyšším rizikem maligní transformace [47]. V případě IFE je diagnostická senzi-

Tab. 2. Stratifikační modely mnohočetného myelomu dle Ludwiga [43] a podle Avet-Lousiaua/Bradwella [8,10,40], založené na hodnotách β_2 -mikroglobulinu a poměru párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu (HLC- κ /HLC- λ), a podle Ludwiga [39] založené na hodnotách β_2 -mikroglobulinu a hodnocení 50% suprese normálního izotypu z páru těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu pod úroveň normálního rozmezí, rozdělující nemocné do 3 rizikových skupin

riziková skupina	Ludwig [43]		Avet-Lousiau [8,10,40]	Ludwig [39]	
	β_2 -M (mg/l)	HLC-r	HLC-r	β_2 -M (mg/l)	HLC 50% suprese
1 („low risk“)	< 3,5 a 0,022–45		a 0,01–200	mezi < 5,5 a neg.	
2 („interm.“)	$\geq$ 3,5 nebo < 0,022 až > 45		nebo < 0,01 nebo > 200	nebo poz.	
3 („high risk“)	$\geq$ 3,5 a < 0,022 až > 45		a < 0,01 nebo > 200	5,5 a poz.	

HLC-r – poměr párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu κ/λ , β_2 -M – β_2 -mikroglobulin HLC 50% redukce normálního izotypu z páru těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu pod úroveň rozmezí normálních hodnot: IgG- κ < 1,92 g/l; IgG- λ < 0,95 g/l; IgA- κ < 0,28 g/l; IgA- λ < 0,22 g/l

tivita Hevylite™ u MGUS oproti MM nižší, neboť abnormální hodnota FLC-r byla zjištěna u IgA typu v 97 %, u IgM typu v 90 % a u IgG typu MGUS v 56 %, což do jisté míry omezuje využití stanovení FLC jako spolehlivého nástroje v diagnostice MGUS. Relativní necitlivost FLC-r u IgG typu MGUS se vysvětluje vyšší koncentrací polyklonální formy IgG Ig nežli u IgA a IgM typu MGUS [13]. Prevalence abnormální hodnoty FLC-r narůstá u IgG typu MGUS s narůstající koncentrací Mlg, ale u IgA a IgM typu MGUS se často vyskytuje abnormální index FLC-r i v případech nízké M komponenty [13]. Další analýza IgG typu MGUS zjistila, že suprese FLC a abnormální IgG-FLC-r se vyskytovaly ve stabilní fázi v 22 % a 64 %, ve skupině s následnou progresí v 53 % a v 83 %, zatímco při vyšetření ve fázi maligního zvratu v 90 % a 87 % [48].

Ze studie Wolffa vyplynulo, že u 37 % jedinců s IgA-K typem MGUS je přítomna suprese IgA-L typu FLC, zatímco u jedinců s IgA-L formou MGUS je suprese IgA-K FLC u 43 %, ovšem s významným překrýváním hodnot [11]. Medián IgA FLC-r ve skupině neléčených nemocných s MM IgA-K se významně odlišuje od jedinců se stejným izotypem MGUS (75 vs 11) [11]. V rozsáhlé a velmi důkladné studii Katzmanna, založené na analýze 999 jedinců s MGUS soustředěných v období 1990–1994 na Mayo Clinic (USA), bylo zjištěno, že suprese párů FLC (Hevylite™) byla zaznamenána v 27 %, zatímco suprese nepostiženého IgG, IgA nebo IgM imunoglobulinu (NEF) pouze v 11 %, přičemž v případech cílené analýzy IgG typu MGUS vyznělo srovnání dokonce 29 % vs 5 % [13]. Hlubší rozbor, a to i v dalších studiích, ukázal, že imunoparézu, tj. supresi noninvolved polyklonálního Ig (např. suprese IgG a IgM Ig u IgG typu MGUS) nelze považovat za významný prediktor maligní transformace MGUS [13,46,49]. Nejvýznamnějším přínosem studie, ověřené i dalšími autory, bylo potvrzení pracovní hypotézy, že selektivní suprese noninvolved polyklonálního (nenádorového) izotypově protikladného párů FLC (např. suprese IgG-L v případě IgG-K MGUS) je nejen ukazatelem klonálně pokročilejšího stadia MGUS, ale i nezávislým prediktorem progresu IgG typu MGUS v MM, a to v několikaletém předstihu (medián 10 let) před maligní konverzí [13,50]. Nutno zdůraznit, že toto zjištění popsané u IgG typu se netýká IgA typu MGUS, což je vysvětlitelné přítomností „niche“ efektu specifického pro IgG typ MGUS [48]. Specifický IgG klon plazmocyty totiž suprimuje syntézu nenádorového/polyklonálního izotypu IgG mnohem více nežli produkci izotypu IgA a IgM, takže u IgG typu MGUS lze pozorovat snížení sérových hladin IgA a IgM méně často nežli obvykle efektivní supresi polyklonálního noninvolved typu IgG FLC [13]. Mnohem častější suprese párů IgG FLC nežli Ig odlišného imunochemického typu souvisí s poznatkem, že v případě vysoké hodnoty noninvolved IgG FLC se v KD vyskytuje vyšší počet normálních plazmocyty potlačujících invazivitu klonálních plazmocyty. Bylo zjištěno, že suprese normálních plazmocyty předchází vývinu maligní transformaci MGUS v MM [48]. Chybějící vztah mezi

supresi noninvolved FLC a vysokým rizikem maligní transformace IgA a IgM typu MGUS je vysvětlován taktéž nižším potenciálem těchto typů Ig pro polyklonální supresi a má pravděpodobně vztah i k jejich nízké hodnotě v séru zdravých jedinců [13]. Při analýze Ig v období maligního zvratu MGUS v MM bylo zjištěno, že suprese odlišného typu polyklonálního Ig (imunoparéza) se ve skupině MGUS vyšetřené ve stabilní fázi vs ve skupině s následnou maligní evolucí vs u jedinců v období maligního zvratu se vyskytovala v 6 %, 7 % a ve 46 %, nejde tedy o časný a senzitivní ukazatel predikce maligní transformace [48]. Při analýze rizika maligní transformace MGUS v MM byl s pomocí univariační analýzy zjištěn významný vztah k supresi párů FLC (např. IgG-K u IgG-L typu MGUS) a k abnormální hodnotě FLC-r, což bylo ověřeno pomocí multivariační analýzy, zahrnující vedle suprese párů FLC i hodnotu M-proteinu (< 15 g/l), non-IgG izotyp Mlg a abnormální FLC-r, tj. kritéria standardní stratifikace MGUS dle Rajkumara [13,51]. Je tedy zřejmé, že zjištění suprese párů FLC u IgG typu MGUS poskytuje unikátní, nezávislou prognostickou informaci o predikci maligního zvratu MGUS v MM, přispívá k pochopení biologie maligní evoluce MGUS a obohacuje paletu dosavadních, standardně používaných rizikových faktorů užívaných v klinické praxi (výška Mlg, izotyp těžkého řetězce Mlg, přítomnost Bence-Jonesovy bílkoviny v moči, zastoupení plazmocyty v KD a hodnota FLC-r) o biomarker usnadňující hlubší pochopení patogeneze MGUS a MM [3,13,19,49]. Přiřazení výsledků vyšetření FLC (Hevylite™) posiluje výpovědní schopnost standardního stratifikačního modelu MGUS [47,48,51]. S výjimkou „low risk“ MGUS umožňuje začlenění ukazatele tíže suprese párů FLC hlubší stratifikaci zbývajících rizikových skupin do podskupin „low risk“ a „high risk“. Takto modifikovaný stratifikační model rizikovitosti MGUS, využívající vedle koncentrace, příslušnosti k non IgG typu Mlg a indexu FLC-r i hodnocení stupně suprese párů FLC, rozděluje jedince s MGUS podle počtu přítomných stratifikačních faktorů do 5 rizikových skupin (0, 1, 2, 3 a 4) s gradující pravděpodobností progresu MGUS v MM [13]. Ke zjištění, zdali tento model najde uplatnění v optimalizaci sledování MGUS a rozpoznání kandidátů s nevyšším rizikem progresu vhodných pro případný intervenční zásah, je nutné získání více relevantních dat v rámci dalších studií [52].

Systémová AL-amyloidóza

Systémová AL-amyloidóza (ALA) je „plazmocelulární dyskrázie“ vyznačující se pozvolnou monoklonální proliferací plazmocyty v KD vytvářejících prekurzorové „amyloidogenní“ LR Mlg s tkáňovou depozicí amyloidu v různých parenchymatózních orgánech a tkáních [53]. Základním stavebním kamenem v diagnostice ALA je průkaz Mlg, zejména ale patologických hladin FLC včetně abnormální hodnoty FLC-r. Standardní SPE detekuje obvykle nízkou hodnotu Mlg u systémové ALA v asi 50 %, citlivější IFE v asi 71–84 %, zatímco Freelite™ nachází abnormální hladiny nebo patologický index FLC-r

v 86–98 % [4,53]. Z dosavadních zkušeností vyplývá, že vyšetření HLC (Hevylite™) je i u nemocných se systémovou ALA přínosné. Ve studii Wechalekara bylo zjištěno, že abnormální HLC-r se vyskytovala u všech 8 nemocných s IgM typem Mlg (SPE), u všech 14 jedinců s pozitivitou IFE (SPE pozitivita jen u 7 pacientů) typu IgA a u 54/58 (93 %) nemocných s IgG typem Mlg, z nichž pouze 4 se vyznačovali izolovanou pozitivitou IFE [22]. Normální HLC-r byl u těchto 4 nemocných vysvětlitelný velmi nízkou hladinou Mlg nedosahující senzitivity SPE a normální hladinou polyklonálního uninvolved Ig [22]. U nemocných s IgA Mlg detekovaným pomocí IFE mělo abnormální hodnotu HLC-r 87 % vyšetření [4]. Z předběžných, prozatím jen omezených zkušeností vyplývá, že Hevylite™ technika naznačuje i u systémové ALA, onemocnění s vesměs velmi nízkou hladinou Mlg, vysokou citlivost, což je potenciálním příslibem přínosu pro diagnostiku a monitorování léčebné odezvy především u nemocných s velmi nízkou, případně normální hladinou FLC a FLC-r [4]. Při srovnání senzitivity Hevylite™ a IFE u systémové ALA bylo zjištěno, že 19 % jedinců s negativitou IFE a normálním indexem FLC-r mělo abnormální hodnotu HLC-r [4,22]. Srovnání výsledků FLC-r a HLC-r prokázalo, že vyšetření HLC-r je u systémové ALA podstatně citlivější (61 % vs 32 %). Při izolované pozitivitě IFE se vyskytuje abnormální HLC-r v 87 %, v případě negativy IFE se abnormální HLC-r nalézá u IgA typu v 26 %, u IgG v 20 % a v IgM třídě v 2 %. Monitorování HLC je přínosné zejména při sledování léčebné odezvy v případě normálních nebo lehce abnormálních hladin FLC [22]. Z hlediska OS byl zjištěn excelentní prognostický význam současného použití výsledků hladin FLC a HLC. I v současnosti je v algoritmu diagnostických testů u systémové ALA standardním vyšetřením IFE, zatímco stanovení HLC a HLC-r je vyšetřením doplňkovým, poskytujícím při podobné senzitivitě i kvantitativní výsledky a v ojedinělých případech přítomnost Mlg u jedinců s negativitou IFE a normální hodnotou FLC [22].

Zhoubné lymfoproliferativní stavy Waldenströмова makroglobulinemie

Waldenströмова makroglobulinemie (MW) je indolentní lymfoplazmocytární lymfom s přítomností IgM typu M proteinu v séru. Kvantifikace M komponenty s pomocí SPE i NEF je nepřesná, a proto adekvátně neodráží rozsah nádorové masy a prognózu nemoci [21]. Hevylite™ technika, umožňující kvantitativní hodnocení IgM HLC, se vzhledem k dobré korelaci s SPE a NEF jeví u MW jako potenciálně vhodná analytická technika a vzhledem ke své vysoké senzitivitě by mohla být úspěšná pro IgM třídu Mlg v detekci a monitorování M proteinu migrujícího zejména v β frakci [21]. Z hlediska diferenciální diagnostiky mezi MW a IgM typem MGUS by mohlo být přínosné pozorování statisticky významného rozdílu hodnot IgM HLC-r [21,54,56]. U nemocných s MW korelují hodnota involved IgM HLC a index IgM HLC-r s koncentrací M proteinu (SPE) a součet hodnot IgM-K + IgM-L s celkovou

hladinou IgM (NEF) [54,56]. V některých studiích byl zaznamenán významný vztah hodnot IgM HLC-r k markerům nádorové masy, např. ke stupni infiltrace KD myelomovými plazmocytami [56] a involved IgM HLC k hloubce anémie (mezí hodnota 10 g/l) [57]. Vysoké hodnoty involved IgM HLC a HLC-r ale nekorelovaly s hodnotami Hb, Thr, β_2 -M a s věkem nemocných [57]. Medián indexu IgM HLC-r je nevyšší ve skupině „high risk“ ve srovnání se skupinami s „intermediate“ a „low risk“, vyčleněných podle kritérií IPSS (International prognostic staging system (208, 75 a 98) [54]. Hodnoty involved IgM HLC separovaly nemocné s progresivní, symptomatickou formou nemoci, vyšší hodnota HLC-r byla při srovnání se stabilní fází v období progresu vyžadující bezprostředně zahájení chemoterapie a korelovala s dobou do progresu MW (TTP) [21,56]. Zatím jen sporadicky bylo popsáno pozorování, že v případě „flaire“ po podání rituximabu dochází k vzestupu pouze involved typu IgM HLC provázeným změnou indexu HLC-r [56]. Prozatím panuje nevyhraněný názor o přínosu Hevylite™ analýzy pro prognózu MW. Zatímco některé studie vztah koncentrace Mlg, celkové hodnoty Ig a hodnot HLC i HLC-r vyhodnocených pomocí SPE, NEF a Hevylite™ [57–59] neprokázaly, některé jiné vztah vysoké hladiny IgM HLC k prognóze MW našly. Jednoduchý stratifikační model, založený na hodnotě IgM HLC-r > nežli je hodnota mediánu, β_2 -M > 5,5 mg/l a abnormální hodnotě LDH umožňuje rozčlenění nemocných do 3 prognosticky odlišných skupin [56] s rozpoznáním agresivní formy s nepříznivým prognostickým výhledem [21]. Hevylite™ metoda je tedy nadějná metoda s potenciální perspektivou role referenční analytické techniky v diagnostice a monitorování MW a ostatních IgM forem MG [21].

Nehodgkinské lymfomy

Z hlediska detekce Mlg u nemocných s nehodgkinskými lymfomy (NHL) byla prokázána vyšší citlivost Hevylite™, nežli použití standardní SPE (48 % vs 18 %). Abnormální hodnoty HLC a/nebo HLC-r byly pozorovány v jedné třídě Ig jako projev monoklonality procesu, a to u difúzního velkobuněčného B buněčného lymfomu (DLBCL) v 65 %, u lymfomu plášťové zóny v 63 % a v případě folikulárního lymfomu v 29 % analyzovaných případů [4]. U nemocných s IgM typem maligního lymfomu nebyl prokázán vztah IgM HLC-r k délce OS, což dokládá pozorování, že vysoce abnormální HLC-r (< 0,22 nebo > 45) byl provázen u 58 % nemocných celkovým přežitím převyšujícím 10 let [58]. Studie klinické a prognostické relevance kvantitativního vyšetření HLC v séru v souboru 407 nemocných s DLBCL, že abnormální hodnoty IgM HLC-r spolu s vysokou sérovou hodnotou FLC se vyznačovaly nepříznivou prognózou s krátkou délkou PFS a OS, zatímco patologický HLC-r koreloval u DLBCL s nedostatečnou léčebnou odezvou na chemoterapii [60]. Výsledky vyšetření FLC (Freelite™) a HLC (Hevylite™) byly využity jako kritéria imunobiochemické klasifikace DLBCL rozdělující nemocné do 4 (I-IV) rizikových skupin [60]. V souboru nemocných s IgM typem Mlg charakteru MGUS, MW, IgM

typu MM a MALT formy NHL byla Hevylite™ ve srovnání s SPE, IFE a Freelite™ v detekci reziduální nemoci citlivější [61]. Z dosavadních výsledků vyplývá, že metodu Hevylite™ je možno považovat za perspektivní citlivou techniku v diagnostice a racionalizaci udržovací a konsolidační terapie [62]. HLC protilátky označené peroxidázou nebo fluorochromem byly místo standardních protilátek předběžně úspěšně vyzkoušeny rovněž při imunohistochemickém vyšetření lymfatických uzlin, KD a dalších tkání s přítomností B lymfocytů a plazmocytů [4]. I když předběžné výsledky jsou příslibem citlivé detekce monoklonality u imunoproliferativních chorob, reálný přínos využití HLC esejí v diagnostice a hodnocení léčebné odezvy je nutno vyhodnotit v dalších studiích [4].

Závěr

Z předběžných zkušeností vyplývá, že metoda Hevylite™, umožňující přímé měření frakcí párů těžkých/lehkých řetězců Ig (HLC) a jejich poměru K/L (HLC-r), má nadějný potenciál k obohacení dosavadní palety metod používaných standardně při analýze imunoglobulinů v diagnostice a monitorování průběhu MG, neboť překonává některé limity standardních technik a poskytuje další informace. Jde o dostupnou, citlivou a dynamickou metodu přinášející kvantitativní výsledky, přednostně využitelnou u nízkých koncentrací Mlg a pro hodnocení selektivní suprese normálního, noninvolved Ig párů HCL, převyšující možnosti SPE a doplňující případně i výsledky IFE. U MM „zjemňuje“ diagnostiku zejména iniciálních hyposekrecčních forem MM, rozšiřuje dosavadní možnosti stratifikace do „rizikových skupin“, u části nemocných přispívá ke zvýšení senzitivity v hodnocení hloubky léčebné odezvy zejména pak MRD, zrychluje možnost časné detekce relapsu/progrese MM a zpřesňuje výpočet doby do progrese nemoci (PFS), uplatňuje se i v odhadu délky přežívání (OS), což je ve svém souhrnu přínosné zejména v kontextu stále sofistikovanějších léčebných postupů. U MGUS umožňuje Hevylite™ technika přesnou kvantifikaci nízkých koncentrací Mlg a stratifikaci do rizikových skupin, přičemž průkaz selektivní suprese noninvolved izotypu párů HLC je v případě IgG typu MGUS časným nezávislým prediktorem maligní transformace. U systémové AL-amyloidózy je Hevylite™ metoda příslibem zlepšení časné diagnostiky a monitorování léčebné odezvy u nemocných s nízkými hladinami Mlg a FLC a v kombinaci s Freelite™ i pro přesnou prognostickou predikci. U Waldenströmovy makroglobulinemie napomáhá vyšetření IgM HLC především k rozpoznání progrese nemoci vyžadující terapii a ke zlepšení prognostické stratifikace. V případě NHL je vyšetření HLC potenciálním příslibem v rozpoznání nemocných s nepříznivým průběhem a jedním z kritérií imunobiochemické klasifikace DLBCL, případně i využití HLC imunoesejí při imunohistochemickém vyšetření lymfatických uzlin a kostní dřeně. Nutno zdůraznit, že potenciální využití předložených možností ovšem vyžaduje použití metody Hevylite™ kontinuálně po celou dobu průběhu MM již od jeho diagnózy.

Z dosažených výsledků vyplývá, že Hevylite™ metoda má reálný potenciál doplnění klasických metod analýzy monoklonálních a polyklonálních Ig používaných v klinické praxi s perspektivou zlepšení úrovně diagnostiky MG v éře stále se zlepšujících diagnostických a léčebných metod. Jde však o metodu natolik novou, že její postavení v klinické praxi zatím nedosahuje postavení, které si vydobylo v předchozích letech vyšetřování sérových hladin VLŘ (Freelite™). Dle subjektivního soudu autora sdělení metoda Hevylite™ vzhledem k zaměření pouze na výše MG, vyznačujících se produkcí celé intaktní molekuly Ig obdobného praktického využití, jakého doznalo měření VLŘ, v budoucnu asi ani nedosáhne. Přesto Hevylite™ metoda obohacuje klinickou praxi a naše vědění zejména o významu hodnocení hloubky „imunoparézy“ stanovením stupně suprese noninvolved Ig, zatímco stanovení indexu HLC-r přispívá k citlivému hodnocení hloubky léčebné odezvy a brzké detekci progrese/relapsu MG. V případě MGUS poskytují výsledky Hevylite™ signální informace o nástupu maligní transformace. Stále ještě dosti patrný nedostatek praktických zkušeností neumožňuje jednoznačné doporučení používání výsledků metody Hevylite™ v běžné klinické praxi, a to zejména v rozhodovacím procesu o volbě a načasování terapie. V podmínkách ČR by mělo být vyčkáno na výsledky validačních randomizovaných studií probíhajících v současnosti na řadě pracovišť České myelomové skupiny.

Literatura

1. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International myeloma working group. *Br J Haematol* 2003; 121(5): 749–757.
2. Vávrová J. Stanovení volných lehkých řetězců a Hevylite™ u monoklonálních gamapatií. In: Maisnar V, Tichý M et al. Monoklonální imunoglobuliny – výskyt, význam a možnosti jejich průkazu. Nucleus HK: Praha: 2012: 55–60. ISBN 978–80–87009–87–1.
3. Hájek R, Adam Z, Ščudla V et al. Souhrn doporučení CMG 2012. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. *Transfúze Hematol* 2012; 18(Suppl 1): 5–89.
4. Bradwell AR. Analysis of imunoglobulin heavy chain/light chain pairs (Hevylite™). In: Bradwell AR. Serum free light chain analysis: Plus Hevylite. University of Birmingham: Birmingham: 2008: 301–320. ISBN 9780704427020.
5. Bradwell AR, Harding SJ, Fourrier NJ et al. Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin kappa/lambda ratios. *Clin Chem* 2009; 55(9): 1646–1655.
6. Ludwig H, Milosavljevic D, Zojer N et al. Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients. *Leukemia* 2013; 27(1): 213–219.
7. Ščudla V, Pika T, Heřmanová Z. Hevylite – nová analytická metoda v diagnostice a hodnocení průběhu monoklonálních gamapatií. *Klin Biochem Metab* 2010; 18(39): 62–68.
8. Bradwell A, Harding S, Fourrier N et al. Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig kappa/Ig lambda ratios in multiple myeloma patients. *Leukemia* 2013; 27(1): 202–207.
9. Keren DF. Heavy/light-chain analysis of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009; 55(9): 1606–1608.
10. Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Moreau P et al. Heavy/light chain specific immunoglobulin ratios at presentation are prognostic for

progression free survival in the IFM 2005–01 Myeloma trial. *Blood* 2009; 114(22): Abstract 1818.

11. Wolff F, Debaugnies F, Rozen L et al. Assessment of the diagnostic performances of IgA heavy and light chain pairs in patients with IgA monoclonal gammopathy. *Clin Biochem* 2013; 46(1–2): 79–84.

12. Wang H, Gao C, Xu L et al. Laboratory characterisations on 2007 cases of monoclonal gammopathies in East China. *Cell Moll Immunol* 2008; 5(4): 293–298.

13. Katzmán JA, Rajkumar SV. A windows into immunoglobulin quantitation and plasma cell disease: antigen epitopes defined by the junction of immunoglobulin heavy and light chains. *Leukemia* 2013; 27(1): 1–2.

14. Katzmán JA, Kyle RA, Benson J et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009; 55(8): 1517–1522.

15. Lakomy D, Lemaire-Ewing S, Denimal D et al. Evaluation of the new HevyliteTM IgA assay for the diagnosis and follow-up of monoclonal gammopathies. *Ann Biol Clin (Paris)* 2013; 71(2): 157–163.

16. Legg A, Harding S, Hughes RG et al. Serum free light chain and Hevylite analysis in the diagnosis, monitoring and prognosis of B cell disorders. *Klin Biochem Metab* 2010; 18(39): 56–61.

17. Avet-Loiseau H, Mirbahai L, Mathiot C et al. Nephelometric assays Ig'kappa and Ig'lambda used for diagnosing and monitoring multiple myeloma. *Haematologica* 2011; 96(Suppl 1): P382a.

18. Kouliris E, Panayiotidis P, Harding S J et al. Ratio of involved/uninvolved immunoglobulin quantification by HevyliteTM assay: clinical and prognostic impact in multiple myeloma. *Exp Hematol Oncol* 2012; 1: 9. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1186/2162-3619-1-9>>.

19. Pika T, Heřmanová Z, Lochman P et al. Systém HevyliteTM u IgA monoklonálních gamapatií – první zkušenosti. *Klin Biochem Metab* 2011; 19: 86–91.

20. Katzmán JA, Rajkumar SV. A windows into immunoglobulin quantitation and plasma cell disease: antigen epitopes defined by the junction of immunoglobulin heavy and light chains. *Leukemia* 2013; 27(1): 1–2.

21. Leleu X, Kouliris E, Maltezas D et al. Novel M-component based biomarkers in Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011; 11(1): 164–167.

22. Wechalekar A, Harding S, Lachmann H et al. Serum immunoglobulin heavy/light chain ratios (Hevylite) i patients with systemic AL amyloidosis. *Amyloid* 2010; 17: 188–189. Abstract 186.

23. Ščudla V, Pika T, Minařík J. Význam vyšetření párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu (HevyliteTM) u mnohočetného myelomu. *Čas Lék Čes* 2014; v tisku.

24. Alexanian R. Blood volume in monoclonal gammopathy. *Blood* 1997; 49(2): 301–307.

25. Waldmann TA, Strober W. Metabolism of immunoglobulins. *Prog Allergy* 1969; 13: 1–110.

26. Salmon SE, Smith BA. Immunoglobulin synthesis and total body tumor cell number in IgG multiple myeloma. *J Clin Invest* 1970; 49(6): 1114–1121.

27. Anderson C, Chandbary C, Kim J et al. Perspective-FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends Immunol* 2006; 27(7): 343–348.

28. Wines BD, Hogarth PM. IgA receptors in health and disease. *Tissue Antigens* 2006; 68(2): 103–114.

29. Chandbary C, Brooks C, Carter D et al. Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction. *Biochemistry* 2006; 45(15): 4983–4990.

30. Lakomy D, Lemaire-Ewing S, Denimal D et al. Evaluation of the new HevyliteTM IgA assay for the diagnosis and follow-up of monoclonal gammopathies. *Ann Biol Clin (Paris)* 2013; 71(2): 157–163.

31. Harding S, Drayson M, Lachmann H et al. Novel nephelometric immunoassays for the sensitive detection on of IgA monoclonal gammopathies in multiple myeloma and AL amyloidosis. *Haematologica* 2008; 93: 668a.

32. Tovar N, Fernandez de Larrea C, Elena M et al. Prognostic impact of serum immunoglobulin heavy/light chain ratio in patients with

multiple myeloma in complete remission after autologous stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18(7): 1076–107.

33. Olivero B, Robillard N, Willeme S et al. Heavy/light chain assay, potential new tool in minimal residual disease assessment. A biological study from IFM 2008 trial. *Haematologica* 2011; 96(Suppl 1): S52. Abstract 079.

34. Bhutani M, Landgren O, Korde N. Serum heavy-light chains (HLC) and free light chains (FLC) as predictors for early CR in newly diagnosed myeloma patients treated with carfilzomib, lenalidomide and dexamethasone (CRd). *Blood* 2013; 122(21): 762.

35. Fernández de Larrea C, Tovar N, Cibeira MT 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.

36. Leibson PJ, Loken MR, Panem S et al. Clonal evolution of myeloma cells leads to quantitative changes in immunoglobulin secretion and surface antigen expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(6): 2937–2941.

37. Matsue K, Sugihara H, Nishida Y et al. Heterogeneity of IMWG defined response assessed by FLC assay, multicolor flow cytometry, and heavy/light chain analysis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013; 13: P-203a.

38. Drayson M, Berlanga O, Plant T et al. Immunoglobulin heavy/light chain measurements during monitoring provide prognostic information of relapse after therapy in multiple myeloma patients. *Blood* 2012; 120(21): Abstract 3964.

39. Ludwig H, Milosavljevic D, Zojer N et al. Suppression of the non-involved HLC pair correlates with survival in newly diagnosed and relapsed/refractory patients with myeloma. 19th Congress of EHA. Milano 2014. *Haematologica* 2014; 99(Suppl 1).

40. Avet-Loiseau H, Mirbahal L, Harousseau JL et al. Serum immunoglobulin heavy/light chain ratios are independent risk factor for the predicting progression free survival in multiple myeloma. *Haematologica* 2010; 95: 395. Abstract 0953.

41. Kyrtsonis MC, Vassilakopoulos TP, Kafasi N et al. Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007; 137(3): 240–243.

42. Dispenzieri A, Zhang L, Katzmán JA et al. Appraisal of immunoglobulin free light chain as a marker of response. *Blood* 2008; 111(10): 4908–4915.

43. Ludwig H, Faint J, Milosavljevic D et al. Ig'kappa/ Ig'lambda measurements improve disease monitoring and identify minimal residual disease in patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2011; 96(Suppl 2): 368. Abstract 0885.

44. Ščudla V, Pika T. Monoklonální gamapatie nejistého významu ve světle současných poznatků. *Klin Biochem Metab* 2009; 17(38): 62–71.

45. Pika T, Lochman P, Klincová M et al. Suprese alternativního páru imunoglobulinu koreluje s mírou rizikovosti MGUS výrazněji, nežli suprese hladin polyklonálních imunoglobulinů – dílčí výsledky vyšetření Hevylite TM u MGUS. *Klin Biochem Metab* 2012; 20(41): 63–71.

46. Pika T, Lochman P, Sandecká V et al. Immunoparesis in MGUS – Relation of alternative immunoglobulin pair suppression and polyclonal immunoglobulin levels to MGUS risk categories. *Neoplasma* 2014; in press.

47. Jimenez J, de Carvalho NB, Campos ML et al. Immunoglobulin's specific heavy/light chains pairs in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* 2012; 97(Suppl 1): 597–598.

48. Katzmán JM, 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(22): Abstract 1778.

49. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23(1): 3–9.

50. Espino M, Medina S, Blanchard MJ et al. Involved/uninvolved immunoglobulin ratio identifies monoclonal gammopathy of undetermined significance patients at high risk of progression to

multiple myeloma. *Brit J Haematol* 2013; 164(5): 752–755. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12679>>.

51. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005; 106(3): 812–817.

52. Bianchi G, Kyle RA, Colby CL et al. Impact of optimal follow-up of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) on early diagnosis and preventiv of myeloma-related complications. *Blood* 2010; 116(12): 2019–2025.

53. Ščudla V, Adam Z, Hájek R et al. Diagnostika a léčba systémové AL amyloidózy. Doporučení České myelomové skupiny 2013. *Transfuzie Hematol dnes* 2013; 19: 3–52.

54. Manier S, Dulery R, Duhamel A et al. Hevylite™, a new marker of tumor measurement in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2011; 116: 5076.

55. Morel P, Duhamel A, Gobbi P et al. International prognostic scoring system for Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2009; 113(18): 4163–4170.

56. Koulieris E, Kyrtsonis MCh, Maltezas D et al. Quantification of serum IgM-K and IgM-L in patiens with Waldenström's macroglobulinemia (WM) at diagnosis and during disease course; clinical correlations. *Blood* 2010; 116(8): 1238.

57. Manier S, Lejeune J, Musset L et al. Hevylite, a novel M-component based biomarkers of response to therapy and survival in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2011; 118(5): 1145. Abstract 2667.

58. Kraj M, Kruk B, Prochorec-Sobieszek M. Serum immunoglobulin heavy/light chain (HLC) and free light chain (FLC) concentrations at diagnosis in multiple myeloma and IgM malignant lymphoma patients with survival exceeding 10 years. *Acta Haematol Pol* 2012; 43(2 Pt B): 201–209.

59. Kraj M. Immunoglobulin heavy chain/light chain pairs (HLC, Hevylite™) assays for diagnosing and monitoring monoclonal gammopathies. *Adv Clin Exp Med* 2014; 23(1): 127–133.

60. Jardin F, Delfau-Larue M, Jais J et al. Immunoglobulin heavy light chain/light chain pairs measurement is associated with survival in diffuse large B-cell lymphoma: analysis of a large cohort included in the LNH03-B program of the GELA. *Haematologica* 2012; 97(eSuppl 1): S108.

61. Willenbacher W, Prokop W, Willenbacher E Skewed ratios of heavy chains IgM kappa/IgM lambda characterize remission depht better as immunofixation: appraisal of a new immunoassay in IgM paraprotein positive lymphoproliferative disease. *Haematologica* 2011; 96(Suppl 2): 1314a.

62. Willenbacher E, Prokop W, Willenbacher W. Skewed Hevylite ratios (HLR) may sensitively predict early relapse: a first case report and outline for further studies. *Haematologica* 2011; 96(Suppl 3): 482.

Podpora grantové studie IGA ČR NT 12451–5 a NT 14400–3.

prof. MUDr. Vlastimil Ščudla, CSc.

✉ vlastimil.scudla@fnol.cz

III. interní klinika – nefrologie, revmatologie, endokrinologie
LF UP a FN, Olomouc

www.fnol.cz

Doručeno do redakce 11. 9. 2014

Přijato po recenzi 15. 10. 2014