

Современный подход к лабораторной диагностике парапротеинемий

И.А. Дубина, М.Ю. Первакова, С.В. Лапин, к.м.н.

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации», г. Санкт-Петербург, Россия

Парапротеинемия – синдром, при котором в крови обнаруживается моноклональный компонент, синтезируемый клоном В-клеток. Существуют различные варианты моноклонального синтеза, поэтому парапротеин может быть представлен целой молекулой иммуноглобулина или ее фрагментами, а также их сочетанием. Электрофорез с иммунофиксацией является чувствительным методом, позволяющим установить наличие/отсутствие интактной молекулы иммуноглобулина. С помощью этой технологии можно произвести качественную и количественную оценку парапротеина, определить его состав. Однако данных методов недостаточно для выявления тех случаев, когда происходит синтез парапротеина, представленного свободными легкими цепями. В этом случае используют аналитически более чувствительные методы. Для оценки уровня свободных легких цепей наибольшее распространение получили нефелометрия или иммуноферментный анализ. Так как у разных больных парапротеин имеет различный состав, то для диагностики парапротеинемии необходимо использовать комплекс методов, позволяющий выявлять как молекулу иммуноглобулина, так и свободные легкие цепи.

Ключевые слова: парапротен, свободные легкие цепи, электрофорез, иммунофиксация, иммуноферментный анализ.

Contemporary approach to laboratory diagnostics of paraproteinemias

Dubina I.A., Pervakova M.Y., Lapin S.V.

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 197022, Saint Petersburg, Russian Federation

Paraproteinemia is a syndrome when a monoclonal component synthesized by a B cell clone is found in the blood. There are different variants of monoclonal synthesis, so the paraprotein can be represented by an intact molecule of immunoglobulin or its fragments, and also by their combination. Electrophoresis with immunofixation is a sensitive method to establish the presence/absence of an intact immunoglobulin molecule. It is possible to make a qualitative and quantitative assessment of paraprotein, determine its composition by this technology. However, these methods are not enough to identify those cases when there is a synthesis of paraprotein represented by free light chains. In this case, analytically more sensitive methods are used. To assess the level of free light chains, nephelometry or enzyme-linked immunosorbent assay are most widely used. Since paraprotein has different composition for different patients, it is necessary to use a complex of methods for diagnostics of paraproteinemia, which makes it possible to identify both the immunoglobulin molecule and free light chains.

Key words: paraprotein, free light chains, electrophoresis, immunofixation, enzyme-linked immunosorbent assay.

Определение и клиническое значение выявления парапротеина

Парапротеин (ПП) представляет собой белковую молекулу, которая синтезируется клоном зрелых В-клеток, чаще всего плазматических клеток [1]. Первые ПП был обнаружен в 1845 г. в моче больного множественной миеломой. Результаты экспериментов по изучению свойств этого белка Генри Бенс-Джонсом были опубликованы в 1847 г. в журнале «The Lancet». С тех пор белок Бенс-Джонса, т.е. ПП обнаруженный в моче, считается первым описанным в литературе онкомаркером [2]. Термин ПП был предложен Aritz в 1940 г. [3]. Однако, как и другие онкомаркеры, ПП не обладает 100% специфичностью и встречается при разнообразных патологических состояниях.

Синдромом парапротеинемии сопровождаются различные состояния: от бессимптомных лабораторных феноменов, таких как моноклональная гаммапатия неясного значения, до жизнеугрожающих онкологических заболеваний, таких как множественная миелома. При анализе более 1000 случаев

парапротеинемий, наблюдаемых в клинике Майо (США), основными диагнозами были моноклональная гаммапатия неясного значения (51%), множественная миелома (18%), амилоидоз AL (11%), лимфопролиферативные расстройства (4%) и другие заболевания (16%) [4]. Также ПП в крови может выявляться при полиневритах, синдроме Шегрена, криоглобулинемиях, моноклональной гаммапатии ренального значения, POEMS-синдроме, инфекционных заболеваниях [5].

При отсутствии клинических признаков выявление ПП имеет прогностическое значение и служит для оценки риска трансформации в злокачественные состояния. При онкогематологических заболеваниях определение ПП обязательно для диагностики и оценки эффективности терапии. Благодаря пересмотру методов диагностики и внедрению новых препаратов пятилетняя выживаемость в Англии при множественной миеломе увеличилась с 10% в начале 1970-х гг. до >35% в 2005-2009 гг. [6].

С молекулярной точки зрения ПП представляет собой целую молекулу иммуноглобулина (интактный

иммуноглобулин) или же ее фрагменты: свободные легкие цепи (СЛЦ) или, что встречается крайне редко, тяжелые цепи [2]. Типирование ПП, т.е. выяснение его состава, важно для оценки прогноза течения заболевания. Drayson et al. была показана разница в выживаемости между пациентами с IgG и IgA миеломой [7]. Согласно рекомендациям международной группы по изучению множественной миеломы ПП, представленный IgA, является неблагоприятным фактором при множественной миеломе [8], а ПП типа IgA или IgM – при моноклональной гаммапатии неясного значения [9].

При диагностике парапротеинемий необходимо учитывать, что, несмотря на то, то ПП является продуктом одного клона клеток, может возникать явление интраклональной гетерогенности. Когда часть клеток опухолевого клона продуцирует интактный иммуноглобулин, а другая часть плазмочитов вырабатывает только легкие цепи той же клональности [10]. Таким образом, у разных больных ПП может быть представлен или интактным иммуноглобулином, или СЛЦ, или их сочетанием (рис. 1). При этом для определения интактных иммуноглобулинов оптимальным методом является электрофорез, а для СЛЦ – иммуноферментный анализ или нефелометрия.

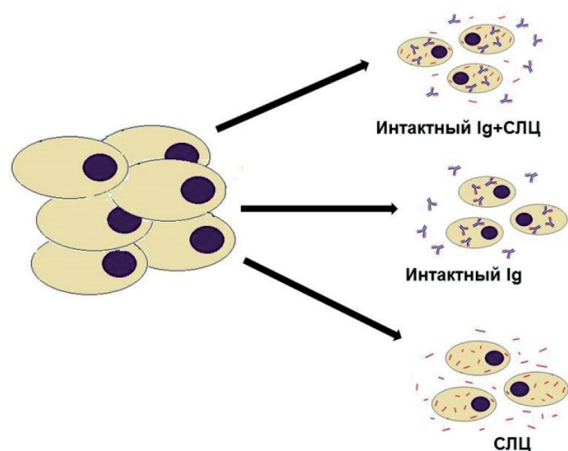


Рис. 1. Варианты моноклонального синтеза по Brioli A. et al.

Примечание: Ig – иммуноглобулин, СЛЦ – свободные легкие цепи

Методы выявления парапротеина с помощью электрофореза

Электрофоретические методы используются для выявления ПП с 1940-х годов. В настоящее время в лабораторной практике используется сочетание электрофореза с высоким разрешением (на основе геля или капилляра) и иммунофиксации (иммунотипирования) [5, 11].

Электрофорез представляет собой направленное перемещение ионов в электропроводящем растворе под действием внешнего электрического поля. Для оценки белкового профиля наиболее часто используют электрофорез в агарозном геле. Он позволяет разделить сыворотку крови на 5-6 фракций и установить наличие/отсутствие ПП в гамма-фракции. Денситометрическое сканирование электрофо-

реграммы с измерением уровня общего белка сыворотки позволяет производить количественную оценку, как отдельных фракций, так и ПП [12]. Однако, использование только данного метода неизбежно приводит к ошибочным заключениям. Так фибриноген или повышенный уровень С-реактивного белка могут сформировать «ложный» М-пик на границе гамма- и бета-фракций. Кроме того, сам ПП может мигрировать не только в гамма-фракции, но и в бета-, и даже в альфа-фракции. На электрофореграмме это выглядит просто как увеличение полосы одной из зон. Во избежание ложноположительных и ложноотрицательных заключений электрофорез дополняют иммунофиксацией [13]. В этом случае после разделения белков на фракции на поверхность геля наносят антисыворотки против белков человека. Они диффундируют и образуют нерастворимые иммунные комплексы в геле. Затем гель отмывается от несвязавшихся белков, после чего иммунный комплекс окрашивается белковым красителем. Основной спектр антисывороток включает пять основных: анти-IgG, анти-IgA, анти-IgM, анти-каппа, анти-лямбда, а также ряд вспомогательных: анти-IgD, анти-IgE, free-каппа, free-лямбда, pentavalent, trivalent. Иммунофиксация с использованием поливалентной антисыворотки (pentavalent) позволяет отличить истинный пик от ложного, а также «увидеть» скрытые пики (рис. 2). Использование моновалентных антисывороток (анти-IgG, анти-каппа и др.) необходимо для определения типа ПП.

Значение СЛЦ в диагностике парапротеинемий

Иммуноглобулины состоят из двух идентичных тяжелых цепей и двух одинаковых легких цепей. В клетки и плазматические клетки продуцируют больше (до 40%) легких цепей, чем тяжелых. Этот избыток необходим для предотвращения агрегации тяжелых цепей и обеспечения правильной конформации иммуноглобулина при сборке молекулы. Легкие цепи, не вошедшие в состав молекул интактного иммуноглобулина, высвобождаются в кровоток, где образуют пул СЛЦ. Ежедневно у здорового человека образуется до 500 мг СЛЦ [14].

Оба типа СЛЦ способны образовывать полимерные формы, однако, обычно к-СЛЦ присутствует в крови в виде мономера (25 кДа), а λ-СЛЦ – в виде димера (50 кДа). Сывороточная концентрация СЛЦ представляет собой баланс между их синтезом и клиренсом. СЛЦ быстро метаболизируются почками, так мономерные к-СЛЦ имеют время полужизни 2–4 часа, а димеры λ-СЛЦ – 3–6 часов. В то время как период полужизни молекулы IgG составляет приблизительно 21 день. Поэтому в качестве раннего маркера оценки эффективности терапии гораздо удобнее использовать уровень СЛЦ [15, 16].

Концентрация СЛЦ в моче не отражает скорость их синтеза опухолевыми клетками и зависит от состояния почек. Проксимальные почечные канальцы обладают выраженной способностью метаболи-

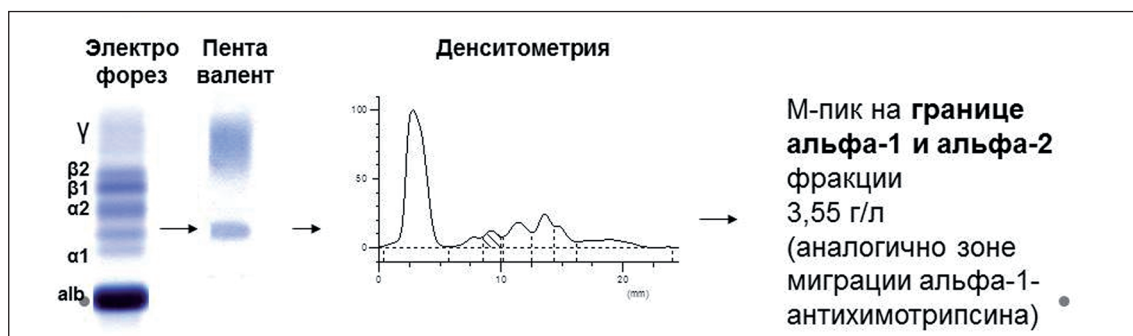


Рис. 2. Миграция ПП в альфа-фракции, «скрытый» М-пик

зировать СЛЦ (до 30 г/сут), поэтому СЛЦ в моче появляются только в случае протеинурии переполнения. В то же время уровень СЛЦ в сыворотке крови напрямую отражает секрецию ПП плазматическими клетками и не зависит от сохранности почечной функции [2, 17].

В физиологических условиях синтез плазмиды к-СЛЦ к λ -СЛЦ составляет 2:1. Однако из-за более быстрого клиренса к-цепей, в сыворотке уровень λ -цепи, как правило, выше. Парапротеинемия может сопровождаться феноменом «рестрикции легкой цепи», под которым понимают преимущественный синтез одного из двух типов легких цепей, с подавлением синтеза другой цепи. В результате соотношение к-СЛЦ/ λ -СЛЦ значительно изменяется, что позволяет использовать этот феномен для диагностики моноклональных гаммапатий [18]. В 2014 г. Международная группа по изучению миеломы (IMWG) утвердила «отношение к-СЛЦ/ λ -СЛЦ» в качестве одного из критериев диагностики множественной миеломы [8]. Кроме того определение СЛЦ особенно важно для амилоидоза, болезни депозитов легких цепей [19], несекреторной множественной миеломы [20].

Существуют различные методы оценки содержания легких цепей [21]. Все тесты можно разделить на несколько групп:

1. В зависимости от аналитического метода, который лежит в их основе, различают нефелометрические (турбидиметрические) и иммуноферментные;
2. По типу антител, которые используются для детекции СЛЦ – на основе поликлональных и моноклональных антител.

Для проведения нефелометрии необходимо специальное дорогостоящее оборудование. Кроме того из-за явления избытка антигена в нефелометрических методах во избежание получения ложноположительного результата требуется неоднократное исследование одного и того же образца в нескольких разведениях. Это приводит к очень высокой себестоимости анализа [22, 23].

Альтернативой нефелометрии является иммуноферментный анализ. Он не требует специального оборудования и обладает достаточной аналитической чувствительностью для определения СЛЦ [24].

Какой метод выбрать каждая лаборатория решает сама, т.к. рекомендованного эталонного метода не существует. Существует множество публикаций

указывающих на разногласия в результатах исследований, выполненных разными методами. С целью стандартизации и гармонизации, а также разработки международных контролей и калибраторов в настоящее время предпринимаются попытки определения СЛЦ методом масс-спектрометрии [21].

Опыт диагностики парапротеинемий в нашей лаборатории

Как уже упоминалось ранее, существует несколько вариантов моноклонального синтеза ПП (рис. 1). Мы проанализировали частоту их встречаемости среди больных с парапротеинемическим синдромом, результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Частота встречаемости разных вариантов синтеза парапротеина

Вариант синтеза	Частота встречаемости
Интakтный Ig	21%
СЛЦ	23%
Интakтный Ig + СЛЦ	56%

Примечание: Ig – иммуноглобулин, СЛЦ – свободные легкие цепи; всего обследовано 130 человек

Так как у разных пациентов ПП имеет разный молекулярный состав (или интактный иммуноглобулин, или СЛЦ, или их сочетание), то результаты

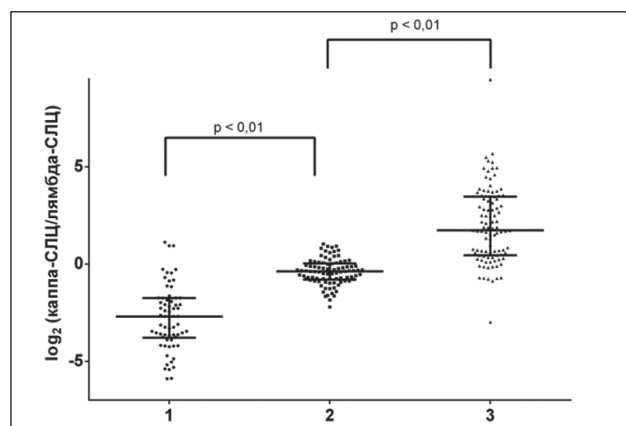


Рис. 3. Отношение к-СЛЦ/ λ -СЛЦ у здоровых доноров и при парапротеинемии.

1 – больные с ПП, содержащим лямбда цепь, 2 – условно здоровые доноры, 3 – больные с ПП, содержащим каппа цепь, – интерквартильный размах, горизонтальная черта – медиана
Примечание: ПП – парапротеин

Таблица 2. Методы диагностики парапротеинемий

Название теста	Определяемые показатели	Использование в диагностике
Электорофорез сыворотки с иммунофиксацией с поливалентной антисывороткой	Наличие парапротеина, его содержание, наличие диспротеинемии	Первичный тест для обследования пациентов
Электорофорез мочи на белок Бенс-Джонса с иммунофиксацией поливалентной антисывороткой	Наличие парапротеина, его содержание, тип протеинурии	Первичный тест для обследования пациентов с протеинурией
Электорофорез мочи и сыворотки с иммунофиксацией с поливалентной антисывороткой	Выявление парапротеинов в двух материалах, оценка белкового профиля, тип протеинурии	Основной скрининговый тест для диагностики миеломы
Иммунофиксация сыворотки крови и иммунофиксация мочи с моновалентными антисыворотками (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, каппа, лямбда)	Наличие парапротеина, его содержание и тип	Обследование при миеломе, болезни Вальденстрема Наиболее чувствительный тест
Определение содержания свободных легких цепей и расчет индекса	Концентрации каппа и лямбда цепи в сыворотке и моче, индекс синтеза каппа/лямбда	Оценка динамики синтеза парапротеина, определение клональности Обследование при амилоидозе, МГНЗ, болезни легких цепей, несекреторной миеломе

электрофореза не всегда совпадают с результатами определения СЛЦ. При анализе 165 случаев парапротеинемий мы наблюдали достоверное увеличение отношения к-СЛЦ/λ-СЛЦ в 62,63% (62/99) случаев (критерий Мана-Уитни) у больных с ПП, содержащим легкую цепь каппа (по результатам иммунофиксации), а достоверное снижение отношения к-СЛЦ/λ-СЛЦ – в 80,3% (53/66) случаев ПП, содержащего легкую цепь лямбда (рис. 3). Поэтому для исключения парапротеинемии мы рекомендуем использовать комплекс тестов (таблица 2). Целесообразность такого подхода продемонстрируют клинические случаи представленные ниже.

Клинический случай 1

Парапротеинемия с продукцией интактного иммуноглобулина и свободных легких цепей. В данном случае значительно изменен индекс к-СЛЦ/λ-СЛЦ и на электрофореграмме имеется М-пик (рис. 4). Определение обоих показателей необходимо для мониторинга течения заболевания и оценки эффективности терапии.

Клинический случай 2

При множественной миеломе с продукцией интактного иммуноглобулина соотношение к-СЛЦ/λ-СЛЦ остается в пределах нормальных значений, и его определение является неинформативным (рис. 5).

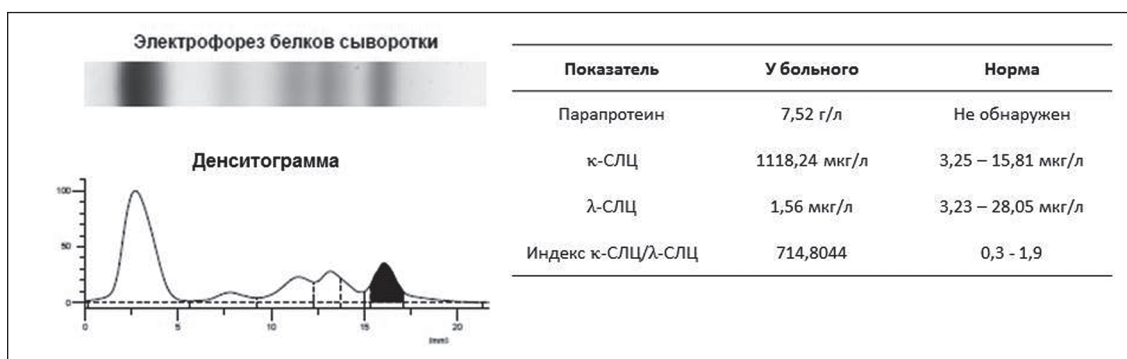


Рис. 4. Результаты исследований сыворотки крови больного с продукцией интактного иммуноглобулина и свободных легких цепей



Рис. 5. Результаты исследований сыворотки крови больного с продукцией интактного иммуноглобулина

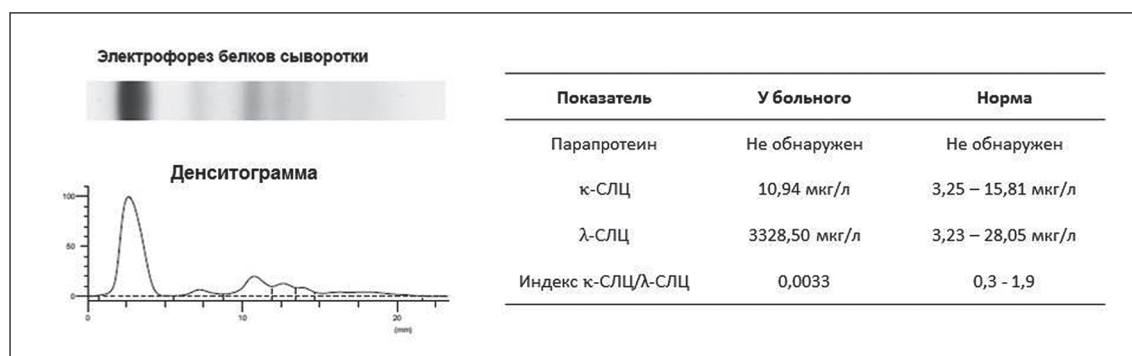


Рис. 6. Результаты исследований сыворотки крови больного с продукцией свободных легких цепей

Клинический случай 3

У некоторых больных, наблюдается изолированный синтез только СЛЦ. В данном случае проведение только электрофореза с иммунофиксацией приведет к ложноотрицательному заключению (рис. 6).

Таким образом, выбор только одного метода исследования (или электрофореза с иммунофиксацией, или определения индекса κ-СЛЦ/λ-СЛЦ) приведет к гиподиагностике. Именно сочетание двух технологий позволяет сделать верное заключение о наличии/отсутствии парапротеинемии.

Литература

1. Mark A. Perazella and Kevin W. Finkel. Paraprotein-Related Kidney Disease: Attack of the Killer M Proteins. Clin J Am Soc Nephrol. 2016; 11(12): 2256–2259.
2. Bradwell A.R. Serum Free Light Chain Analysis (plus Hevlyte), seventh edition. 2015.
3. Rusznyák I., Földi M. G. Lymphatics and Lymph Circulation: Physiology and Pathology Авторы: second edition. 1967.
4. Kyle R.A., Rajkumar S.V. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Br J Haematol. 2006; 134(6):573-89.
5. Keren F.D. Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis, 2012.
6. Research UK. Myeloma survival statistics: <http://www.cancerresearchuk.org>; 2014.
7. Drayson M., Begum G., Basu S., Makkuni S. Dunn J., Barth N., Child J.A. Effects of paraprotein heavy and light chain types and free light chain load on survival in myeloma: an analysis of patients receiving conventional-dose chemotherapy in Medical Research Council UK multiple myeloma trials. Blood. 2006;108(6):2013-9.
8. Rajkumar S.V., Dimopoulos M.A., Palumbo A., Blade J., Merlini G., Mateos M.V. et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Lancet Oncol. 2014; 15(12): e538-48.
9. Kyle R. A. 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 Jun; 24(6):1121-7.
10. Brioli A., Giles H., Pawlyn C., Campbell J.P., Kaiser M.F., Melchor L. et al. Serum free immunoglobulin light chain evaluation as a marker of impact from intraclonal heterogeneity on myeloma outcome. Blood, 2014; 123(22): 3414-9.
11. Шевченко О.П., Долгов В.В., Олефиренко Г.А. Электрофорез в клинической лаборатории. М.: Реафарм, 2006.
12. Le Carrer D. Serum protein. Electrophoresis. Immunofixation. Laboratories Sebia. Ed. FM-BIO, Vanves, 2005.
13. Keren D.F., Schroeder L. Challenges of measuring monoclonal proteins in serum. Clin Chem Lab Med. 2016; 54(6): 947-61.
14. Cigliana G., Gulli F., Napodano C., Pocino K., De Santis E., Colacicco L., Cordone I., Conti L., Basile U. Serum free light chain quantitative assays: Dilemma of a biomarker. J Clin Lab Anal. 2017.
15. Mead G.P., Carr-Smith H.D., Drayson M.T., Morgan G.J., Child J.A., Bradwell A.R. Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. Br J Haematol. 2004; 126(3): 348-54.
16. Hutchison C.A., Harding S., Hewins P., Mead G.P., Townsend J., Bradwell A.R., Cockwell P. Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with chronic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2008; 3(6): 1684-90.
17. Van Hoesen K.H., Bilotti E., McBride L., Berges T., McNeill A., Schillen D., Siegel D. Serum free light chain assays are more sensitive than urinary tests for light chain monoclonal proteins. Clin Chem 2009; 55:C30a.
18. Jenner E. Serum free light chains in clinical laboratory diagnostics. Clin. Chim. Acta. 2014; 427: 15-20.
19. Katzmann J.A., Clark R.J., Abraham R.S., Bryant S., Lymp J.F., Bradwell A.R. et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. Clin Chem. 2002; 48(9): 1437-44.
20. Drayson M., Tang L.X., Drew R., Mead G.P., Carr-Smith H., Bradwell A.R. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. Blood. 2001; 97(9): 2900-2.
21. Jacobs J.F., Tate J.R., Merlini G. Is accuracy of serum free light chain measurement achievable? Clin Chem Lab Med. 2016; 54(6): 1021-30.
22. te Velthuis H., Knop I., Stam P., van den Broek M., Bos H.K., Hol S., Teunissen E., Fishedick K.S., Althaus H., Schmidt B., Wagner C., Melsert R. N Latex FLC – new monoclonal high-performance assays for the determination of free light chain kappa and lambda. Clin Chem Lab Med. 2011; 49(8): 1323-32.
23. Bradwell A.R., Carr-Smith H.D., Mead G.P. Tang L.X., Showell P.J., Drayson M.T., et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. Clin Chem. 2001; 47: 673-80.
24. Jacobs J.F.M., de Kat Angelino C.M., Brouwers H.M.L.M., Croockewit S.A., Joosten I., van der Molen R.G. Evaluation of a new free light chain ELISA assay: bringing coherence with electrophoretic methods. Clin Chem Lab Med. 2018; 56(2): 312-322.