



М.Ю. Первакова



И.А. Дубина



С.В. Лапин



Е.А. Суркова



Т.В. Блинова



В.Л. Эмануэль

Информативность лабораторных методов определения парапротеина для диагностики моноклональных гаммапатий

М.Ю. Первакова, врач КЛД

И.А. Дубина, врач КЛД

С.В. Лапин, к.м.н., зав. лабораторией

Е.А. Суркова, к.б.н., с.н.с.

Т.В. Блинова, к.м.н., с.н.с., врач КЛД

А.В. Мазинг, к.м.н., в.н.с.

В.Л. Эмануэль, д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, директор НМЦ по молекулярной медицине Минздрава России

Лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Diagnostic value of laboratory methods of paraprotein evaluation for diagnosis of monoclonal gammopathy

M. Yu. Pervakova, I. A. Dubina, S. V. Lapin, E. A. Surkova, T. V. Blinova, A. V. Mazing, V. L. Emanuel
The First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov, Saint Petersburg, Russia

Резюме

Электрофорез с иммунофиксацией представляет собой чувствительный метод выявления парапротеина (ПП) и определения его состава при моноклональных гаммапатиях (МГ). Альтернативным способом оценки клональности ПП является иммунометрическое определение концентрации свободных легких цепей (СЛЦ) иммуноглобулинов, основанное на изменении абсолютного или относительного содержания СЛЦ в сыворотке крови, возникающего в результате феномена рестрикции легких цепей при моноклональном синтезе. В настоящее время для скрининга и мониторинга МГ рекомендовано определение соотношения СЛЦ в сыворотке крови. Для сравнения информативности определения СЛЦ и электрофореза с иммунофиксацией для диагностики МГ мы обследовали 89 здоровых доноров и 165 больных МГ, получающих лечение в гематологических стационарах. Во всех образцах был выполнен электрофорез с иммунофиксацией с помощью оборудования и реактивов для электрофореза (Helena Biosciences, Великобритания). Концентрация СЛЦ была измерена с помощью набора для определения СЛЦ методом иммуноферментного анализа (ООО «Полигност», Россия). Референсные границы концентрации каппа-СЛЦ составили 3,25–15,81 мкг/мл, лямбда-СЛЦ — 3,23–28,05 мкг/мл, а их соотношения — 0,3–1,9 в сыворотке крови. У больных с ПП, содержащим легкую цепь каппа, увеличение абсолютного содержания каппа-СЛЦ отмечалось в 67,68% (67 из 99) случаев, а увеличение индекса каппа/лямбда СЛЦ в 62,63% (62 из 99) случаев ($p < 0,01$). При ПП, содержащем легкую цепь лямбда, увеличение СЛЦ лямбда встречалось у 69,7% (46 из 66), а снижение индекса каппа/лямбда в 80,3% (53 из 66) случаев. Таким образом, мы рекомендуем использовать комбинацию определения СЛЦ с расчетом индекса и иммунофиксации, которая обеспечивает наибольшую чувствительность лабораторной диагностики МГ.

Ключевые слова: парапротеин, свободные легкие цепи, моноклональная гаммапатия, электрофорез, иммунофиксация.

Summary

Electrophoresis with immunofixation is a sensitive technology for paraprotein (PP) detection and characterization in monoclonal gammopathies (MG). Immunometric measurement of immunoglobulin free light chains (FLC) is an alternative method to estimate PP clonality. This method is based on light chain restriction phenomenon in monoclonal synthesis, which leads to absolute or relative change of FLC level. Recently, FLC ratio in blood serum was recommended as a standard test for MG screening and monitoring. To compare efficacy of FLC measurement and immunofixation electrophoresis for MG diagnostics we studied 89 healthy donors and 165 MG patients. We performed immunofixation electrophoresis in all sera by electrophoresis hardware and reagents (Helena Biosciences, England). We detected serum FLC levels by commercial ELISA kit (Polygnost, Russia). The reference values for kappa-FLC serum concentrations were 3.25–15.81 $\mu\text{g/mL}$, for lambda-FLC: 3.23–28.05 $\mu\text{g/mL}$, and for kappa to lambda ratio: 0.3–1.9. An absolute increase of kappa-FLC was found in 67.68% (67 of 99) and kappa to lambda ratio increase in 62.63% (62 of 99) cases with PP, containing kappa-FLC ($p < 0.01$). An increase of lambda-FLC was found in 69.7% (46 of 66), and decrease of kappa to lambda ratio was in 80.3% (53 of 66) cases with PP, containing lambda-FLC. Thereby, it is not possible to identify all patients with MG by the use of FLC measurement only. At the same time, immunofixation in some cases also fails to give complete information. So we recommend the combination of FLC measurement with ratio calculation and immunofixation for highly sensitive laboratory detection of MG.

Key words: paraprotein, free light chains, monoclonal gammopathy, electrophoresis, immunofixation.

Введение

Моноклональная гаммапатия (МГ) представляет собой состояние, при котором происходит избыточная пролиферация определенного клона плазматических клеток [1]. При этом плазмциты синтезируют особый белок парапротеин (ПП), который состоит из моноклональных иммуноглобулинов или их фрагментов — свободных легких цепей (СЛЦ) [2]. При электрофорезе ПП образует отдельную фракцию или М-градиент [3]. Обычно наличие ПП указывает на гематоонкологическое заболевание, хотя может встречаться при аутоиммунных, инфекционных и других заболеваниях или протекать бессимптомно [4].

Электрофорез (ЭФ) представляет собой разделение молекул под действием электрического тока и является базовым методом определения ПП [5]. Для наибольшей эффективности ЭФ сочетают с иммунофиксацией, при которой ПП окрашивают с помощью специфических антител [6]. Данная технология позволяет выделить ПП среди других белковых фракций, а также определить его состав. Сочетание ЭФ с иммунофиксацией является «золотым стандартом» для выявления ПП [7]. Использование поливалентной антисыворотки позволяет проводить скрининг МГ с сохранением преимуществ иммунофиксации [8].

Помимо ЭФ, в настоящее время для диагностики МГ используются методы определения концентрации каппа и лямбда свободных легких цепей (СЛЦ) иммуноглобулинов и их соотношения [9]. В основе данных методов лежит выявление рестрикции легкой цепи, представляет собой избыточный синтез одного типа легких цепей (каппа или лямбда) и подавление другого, что приводит к изменению соотношения каппа/лямбда. Феномен рестрикции является характерной чертой МГ и позволяет отличить моноклональную продукцию СЛЦ от поликлональной, при которой соотношение каппа/лямбда остается неизменным [10].

Изменение отношения каппа/лямбда СЛЦ является критерием диагностики [11] и ответа на терапию при множественной миеломе [12], а также используется для стратификации риска прогрессии моноклональной гаммапатии невыясненного значения в ММ [13]. Определение СЛЦ незаменимо при таких вариантах МГ, как несекреторная миелома [15], болезнь легких цепей, AL-амилоидоз и болезнь депозитов легких цепей [16].

В нашей лаборатории используется чувствительный метод определения концентрации СЛЦ, основанный на использовании моноклональных антител, синтезированных под руководством профессора В. Б. Климовича [14].

Целью нашего исследования является оценка информативности определения СЛЦ методом иммуноферментного анализа, ЭФ с иммунофиксацией и их сочетания для лабораторной диагностики МГ.

Материалы и методы

Для оценки диагностических характеристик ИФА-системы мы собрали 254 образца сыворотки крови. Из них

89 были получены от условно здоровых доноров, а 165 от больных МГ, получающих лечение в гематологических стационарах. Во всех сыворотках больных было определено содержание ПП методом электрофореза с иммунофиксацией с помощью оборудования и реактивов (Helena Biosciences, Великобритания). Процедуры иммунофиксации выполнялись в соответствии с инструкцией производителя. Полученные денситограммы были обработаны с помощью программного обеспечения Platinum 3.0.

Изображения электрофореза белков сыворотки крови, иммунофиксации с поливалентной антисывороткой и с набором моновалентных антисыворонок и денситограммы представлены на рис. 1.

Определение концентрации общего белка для расчета абсолютного содержания М-градиента осуществлялось биуретовым методом с помощью полуавтоматического биохимического анализатора А15 (Biosystems, Испания). Для определения уровня каппа-СЛЦ и лямбда-СЛЦ использовали реактивы для ИФА метода (ООО «Полигност», Россия) согласно инструкции. Для установления референтных интервалов уровней каппа-СЛЦ, лямбда-СЛЦ и отношения каппа/лямбда использовали сыворотки условно здоровых доноров. Расчет производили согласно протоколу EP28-A3c Международной федерации клинической химии и лабораторной медицины [17]. Статистический анализ данных проводили с использованием встроенных функций программы MS Excel, программы Stastitica 6.0 (StatSoft) и GraphPad Prism 4.0.

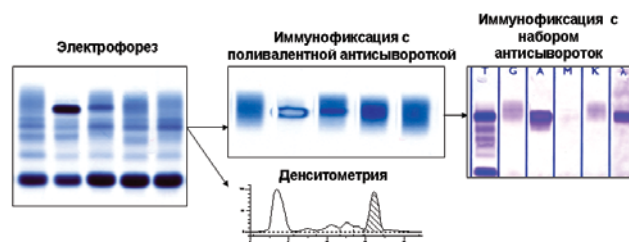


Рисунок 1. Изображения электрофореза белков сыворотки крови, иммунофиксации с поливалентной антисывороткой и с набором моновалентных антисыворонок и денситограммы.

Таблица 1
Распределение МГ по составу ПП, определенному при иммунофиксации

Вид парапротеина, обнаруженный при иммунофиксации	Количество человек, n
IgG / каппа	69
IgG / лямбда	43
IgA / каппа	12
IgA / лямбда	14
IgM / каппа	14
IgM / лямбда	2
Свободная легкая цепь каппа	4
Свободная легкая цепь лямбда	1
IgD / лямбда	6

Таблица 2
Диапазон референсных значений для СЛЦ и отношения каппа/лямбда в сыворотке крови. Рассчитан с помощью набора для определения СЛЦ методом иммуноферментного анализа (ООО «Полигност», Россия)

Показатель	Референсный диапазон
Свободная легкая цепь каппа	3,25–15,81 мкг/мл
Свободная легкая цепь лямбда	3,23–28,05 мкг/мл
Каппа-СЛЦ / лямбда-СЛЦ	0,3–1,9

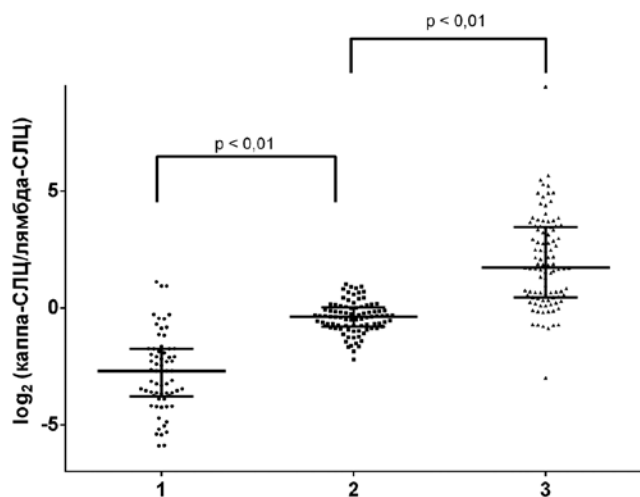


Рисунок 2. Отношение каппа/лямбда СЛЦ у здоровых доноров и больных МГ. Примечания: 1 — больные с МГ, представленными ПП, содержащим лямбда-цепь; 2 — условно здоровые доноры; 3 — больные с МГ, представленными ПП, содержащим каппа-цепь

Результаты

Мы обследовали 89 здоровых доноров и 165 больных МГ. Всем больным МГ было произведено типирование ПП, результаты которого представлены в табл. 1.

Мы измерили концентрацию СЛЦ в образцах сыворотки крови 89 здоровых доноров и 165 больных мо-

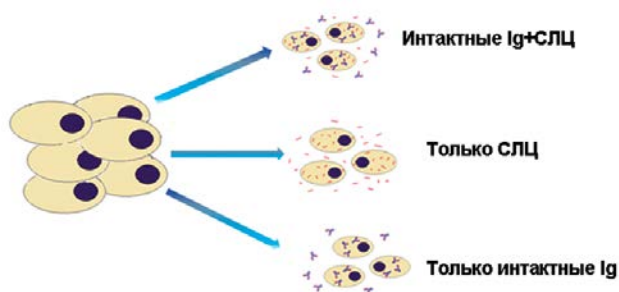


Рисунок 3. Варианты моноклонального синтеза по Brioli A. et al. 2014. Примечание: Ig — иммуноглобулин; СЛЦ — свободные легкие цепи.

ноклональными гаммапатиями. Диапазон референсных значений абсолютных значений СЛЦ и каппа/лямбда соотношения представлен в табл. 2.

У больных с ПП, содержащим легкую цепь каппа, увеличение абсолютного содержания каппа-СЛЦ отмечалось в 67,68% (67 из 99), а увеличение индекса каппа/лямбда СЛЦ в 62,63% (62 из 99) случаев ($p < 0,01$). При ПП, содержащем легкую цепь лямбда, увеличение СЛЦ лямбда встречалось в 69,7% (46 из 66), а снижение индекса каппа/лямбда в 80,3% (53 из 66) случаев. Отношение каппа/лямбда СЛЦ у здоровых доноров и больных МГ представлено на рис. 2.

Обсуждение

С молекулярной точки зрения ПП является продуктом одного клона клеток и представляет идентичные друг другу иммуноглобулины, то есть представленные одним классом, подклассом и изотипом и содержащие легкие цепи одного типа. Однако при моноклональном синтезе может наблюдаться такое явление, при котором часть плазматических клеток опухолевого клона синтезируют целый иммуноглобулин (интактный ПП), а оставшиеся плазмциты вырабатывают только СЛЦ той же клональности [18, 19]. Таким образом, моноклональный синтез

Таблица 3

Показатель	Норма	У больного
Каппа-СЛЦ в сыворотке крови	3,25–15,81 мкг/мл	92,91 мкг/мл
Лямбда-СЛЦ в сыворотке крови	3,23–28,05 мкг/мл	55,32 мкг/мл
Каппа-СЛЦ / лямбда-СЛЦ	0,3–1,9	1,68
Типирование ПП в сыворотке крови с помощью иммунофиксации	Парапротеина, представленного IgG, IgA, IgM и легкими цепями лямбда и каппа, не обнаружено	Обнаружен парапротеин IgG / каппа, содержание: 35,56 г/л

Таблица 4

Показатель	Норма	У больного
Каппа-СЛЦ в сыворотке крови	3,25–15,81 мкг/мл	5,11 мкг/мл
Лямбда-СЛЦ в сыворотке крови	3,23–28,05 мкг/мл	80,73 мкг/мл
Каппа-СЛЦ / лямбда-СЛЦ	0,3–1,9	0,06
Типирование ПП в сыворотке крови с помощью иммунофиксации	Парапротеина, представленного IgG, IgA, IgM и легкими цепями лямбда и каппа, не обнаружено	Парапротеина, представленного IgG, IgA, IgM и легкими цепями лямбда и каппа, не обнаружено

у разных больных с МГ может быть представлен как изолированной продукцией СЛЦ или интактного иммуноглобулина, так и их сочетанием [20] (рис. 3).

При этом для определения СЛЦ оптимальны иммунометрические методы, а для оценки интактных иммуноглобулинов методом выбора является электрофорез с иммунофиксацией.

Таким образом, при МГ, представленных интактным иммуноглобулином, уровень СЛЦ и их соотношения могут быть в пределах нормы [21]. В нашем исследовании повышение СЛЦ каппа было обнаружено в 67% образцов с ПП, содержащим легкую цепь каппа, а повышение СЛЦ лямбда в 69,7% случаев с ПП с легкой цепью лямбда.

Ниже приведены два клинических случая, которые демонстрируют необходимость совместного использования методов определения СЛЦ и электрофореза с иммунофиксацией.

Клинический случай 1

Множественная миелома с продукцией интактного парапротеина. Нормальное соотношение каппа/лямбда СЛЦ при продукции интактного Ig. Тест определения СЛЦ не информативен (табл. 3).

Сканированные изображения иммунофиксации для клинического случая 1 представлены на рис. 4.

Клинический случай 2

AL-амилоидоз с продукцией лямбда-СЛЦ. В данном случае выявление ПП методом ЭФ с иммунофиксацией не информативно (табл. 4).

Сканированные изображения иммунофиксации для клинического случая 2 представлены на рис. 5.

Таким образом, выбор в пользу одного из предложенных методов приведет к гиподиагностике в одном из представленном случаях. Именно сочетание двух технологий и правильная интерпретация результатов позволят предоставить врачу-гематологу необходимую информацию для диагностики МГ.

Благодарности

Исследование было выполнено при поддержке Российского научного фонда (соглашение № 16-15-00118). Также выражаем благодарность автономной некоммерческой организации «Развитие» за поддержку выполнения исследования.

Список литературы

- Alexanian R., D. Weber and F. Liu. Differential diagnosis of monoclonal gammopathies. Arch. Pathol. Lab. Med., 1999. 123 (2): p. 108–13.
- George E. D. and R. Sadovsky. Multiple myeloma: recognition and management. Am. Fam. Physician, 1999. 59 (7): p. 1885–94.
- Keren D. F., ed. Protein electrophoresis in clinical diagnosis., ed. A. London. 2003. 71–77.
- Andreeva N. E. [Rare forms of paraproteinemic hemoblastosis]. Ter. Arkh., 1984. 56 (6): p. 59–63.
- O'Connell T. X., T. J. Horita and B. Kasravi. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. Am. Fam. Physician, 2005. 71 (1): p. 105–12.
- Лапин С. В., Мазинг А. В., Эмануэль В. Л., Современные подходы в диагностике парапротеинемий. Оснащение современной лаборатории. Справочник заведующего КДЛ, 2011. 6: p. 17.

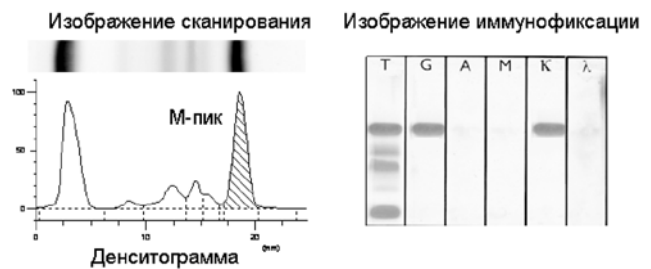


Рисунок 4. Электрофорез и иммунофиксация сыворотки крови пациента с МГ с синтезом интактного ПП и нормальным индексом САЦ. М-градиент IgG / каппа в гамма-фракции, содержание: 35,56 г/л.

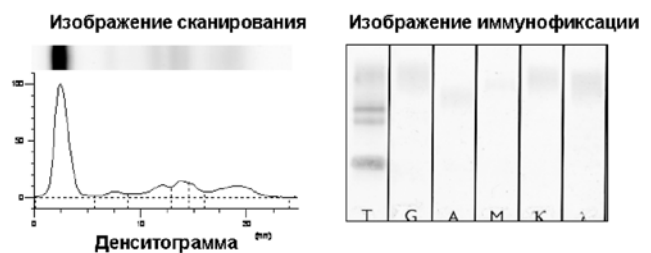


Рисунок 5. Электрофорез и иммунофиксация сыворотки крови пациента с AL-амилоидозом и снижением индекса САЦ. М-градиент отсутствует.

- PRU Handbook of Clinical Immunochemistry, ninth edition, ed. P. publications. 2004.
- Keren D. F., et al. Guidelines for clinical and laboratory evaluation patients with monoclonal gammopathies. Arch. Pathol. Lab. Med., 1999. 123 (2): p. 106–7.
- Bradwell A. R., Serum Free Light Chain Analysis (plus Hevlyte), sixth edition. 2003.
- Jenner E., Serum free light chains in clinical laboratory diagnostics. Clin. Chim. Acta, 2014. 427: p. 15–20.
- Rajkumar S. V., et al., International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Lancet Oncol., 2014. 15 (12): p. e538–48.
- Bird J. M., Owen R. G., D'Sa S., Snowden J. A., Ashcroft J., Yong K., Cook G., Feyler S., Davies F., Morgan G., Cavenagh G., Low E., Behrens J., Jenner M., Pratt G., Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2014. British Committee for Standards in Haematology (BCSH), UK Myeloma Forum, 2014.
- Zingone A. and W. M. Kuehl. Pathogenesis of monoclonal gammopathy of undetermined significance and progression to multiple myeloma. Semin Hematol, 2011. 48 (1): p. 4–12.
- Грязева И. В., Климович В. Б., Пашкова С. Ф., Моноклональные антитела к легким цепям иммуноглобулинов человека и их применение в иммуноанализе. Иммунология, 1994 (3): p. 31–37.
- Drayson M., et al. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. Blood, 2001. 9 (9): p. 2900–2.
- Katzmann J. A., 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): p. 1437–44.
- Horowitz G. L., A. S., Boyd J. C., Ceriotti F., Garg U., Horn P., Pesce A., Sine H. E., Zakowski J., Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline — Third Edition. 2010.
- Ayliffe M. J., et al. Demonstration of changes in plasma cell subsets in multiple myeloma. Haematologica, 2007. 92 (8): p. 1135–8.
- Keats J. J., et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. Blood, 2012. 120 (5): p. 1067–76.
- Brioli A., et al. Serum free immunoglobulin light chain evaluation as a marker of impact from intracranial heterogeneity on myeloma outcome. Blood, 2014. 123 (22): p. 3414–9.
- Bhole M. V., R. Sadler and K. Ramasamy. Serum-free light-chain assay: clinical utility and limitations. Ann. Clin. Biochem., 2014. 51 (Pt. 5): p. 528–42.