

Oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich i par łańcuchów ciężki/lekkie w diagnostyce szpiczaka plazmocytozowego oraz w innych chorobach związanych z dyskracją komórek plazmatycznych

Free light chains and heavy/light chains pairs assay in diagnostics of multiple myeloma and other diseases related to plasmatic cells dyscrasias

Ewelina Kudyba¹, Tomasz Wróbel²

¹Szpital Wojewódzki w Opolu, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej

²Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Streszczenie

Nowotwory z komórek plazmatycznych stanowią dużą grupę chorób, charakteryzujących się niekontrolowanym rozrostem pojedynczego klonu plazmocytozów i wytwarzaniem białka monoklonalnego, które może być obecne w surowicy pacjenta pod postacią kompletnych immunoglobulin, wolnych lekkich łańcuchów immunoglobulin, lub obu tych cząsteczek jednocześnie. Oprócz powszechnie wykorzystywanych od lat metod do wykrywania i identyfikacji białka takich jak elektroforeza białek czy immunofiksacja, w ostatniej dekadzie do standardów postępowania klinicznego włączono testy do oznaczania stężenia wolnych łańcuchów lekkich κ i λ w surowicy. Dopełnieniem powyższego profilu badań jest nowa metoda typowania i oznaczania stężenia immunoglobulin z możliwością rozpoznawania wiązania występującego pomiędzy parami łańcucha ciężkiego γ , α , μ oraz lekkiego κ lub λ immunoglobulin. Daje ona możliwość różnicowania osobno cząsteczek immunoglobulin $Ig\kappa$ i $Ig\lambda$ w każdej z klas immunoglobulin. Oznaczane ilościowo, te czułe i swoiste markery są wykorzystywane zarówno we wczesnej diagnostyce choroby jak również dają możliwość precyzyjnego monitorowania leczenia, oceny minimalnej choroby resztkowej i wczesnego wykrywania wznowy gammopatii monoklonalnych m.in. szpiczaka plazmocytozowego.

Summary

Plasma cell neoplasms constitute a large group of diseases characterized by uncontrolled proliferation of a single clone of plasmocytes and production of monoclonal protein which may be present in patient's serum in the form of intact immunoglobulins, free light immunoglobulin chains, or both of these molecules simultaneously. In addition to the methods commonly used for years for the determination of the protein such as protein electrophoresis or immunofixation, clinical standards in the last decade included the test for determining the concentration of κ and λ free light chains in serum. The test profile mentioned above has been complemented by a new method for identifying and determining the concentration of immunoglobulins with the possibility of recognizing the binding between pairs of heavy chains γ , α , μ and κ or λ light chains of immunoglobulins. It gives the opportunity to differentiate separately $Ig\kappa$ and $Ig\lambda$ molecules in each immunoglobulin class. Quantification of these sensitive and specific markers is used for the early diagnosis of the disease and it also provides the ability to accurately monitor the treatment, evaluate minimal residual disease and detect early the recurrence of monoclonal gammopathy like multiple myeloma.

Słowa kluczowe: gammopatie monoklonalne, szpiczak plazmocytozowy, białko monoklonalne, elektroforeza białek surowicy, immunofiksacja białek, wolne lekkie łańcuchy w surowicy, pary łańcuchów ciężki/lekkie.

Key words: monoclonal gammopathy, multiple myeloma, monoclonal protein, serum protein electrophoresis, immunofixation, serum free light chains, pair heavy/light chain.

Wstęp

Transformacja nowotworowa komórek, zaliczanych do późnych stadiów rozwojowych limfocytów B może prowadzić do pojawiania się klonów, powodujących różne skutki kliniczne. Dyskracje plazmocytozowe to grupa chorób, związanych z obecnością w szpiku klonu komórek plazmatycznych, wytwarzających białko

monoklonalne. Białko to, w zależności od charakterystyki klonu, może być obecne w surowicy pod postacią kompletnych immunoglobulin, wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin, lub obu tych cząsteczek jednocześnie. W bardzo rzadkich przypadkach białko to nie jest produkowane lub pozostaje w cytoplazmie komórki plazmatycznej.

Spektrum chorób nowotworowych spowodowanych rozrostem i nagromadzeniem klonalnych komórek plazmatycznych jest szerokie. Obok pełnoobjawowego szpiczaka plazmocytozy (MM; *multiple myeloma*) należy wymienić również chorobę łańcuchów lekkich (LCMM; *light chain multiple myeloma*), szpiczaka bezobjawowego, szpiczak tłący (SMM; *smouldering multiple myeloma*), gammapatię monoklonalną o nieustalonym znaczeniu (MGUS; *monoclonal gammopathy of undetermined significance*), makroglobulinemię Waldenstroma (WM; *Waldenstrom macroglobulinemia*), a także amyloidozę (AL; *immunoglobulin light chain amyloidosis*), chorobę depozytów łańcuchów lekkich (LCDD; *light chain deposition disease*) i zespół POEMS (*polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy, skin disorders*).

Szpiczak plazmocytozy – kryteria rozpoznania

Szpiczak plazmocytozy jest drugą pod względem częstości występowania chorobą nowotworową układu limfoidalnego u dorosłych i stanowi 10-15% wszystkich nowotworów hematologicznych. W około 30% przypadków przebiega bezobjawowo, u pozostałych chorych (ok. 70%) pierwszym dominującym objawem są bóle kostne. Uszkodzenia kości są wynikiem nadmiernej czynności osteoklastów i zahamowania osteoblastów. U 20% chorych w chwili rozpoznania stwierdzana jest niewydolność nerek, a u kolejnych 20% dochodzi do niej w trakcie choroby. Najczęstszą przyczyną niewydolności nerek są złoży monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich w dystalnych i zbiorczych kanalikach nerkowych. Pozostałe objawy kliniczne to podwyższone stężenie wapnia, które jest z kolei przyczyną hiperkalciurii, osmotycznej diurezy, odwodnienia i w rezultacie rozwinięcia się przednerkowej niewydolności nerek.

Diagnostyka szpiczaka objawowego opiera się na zmodyfikowanych w 2014 r. przez Międzynarodową Grupę Roboczą ds. Szpiczaka (IMWG – International Myeloma Working Group) kryteriach diagnostycznych, określanych jako SLiMCRAB (*Sixty, Light Chains, Magnetic Resonance, Calcium, Renal Insufficiency, Anemia, Bones*), które aktualizują wcześniejsze zalecenia z 2009 r. [1, 2]. Istotnym *novum* w obowiązującej obecnie wersji rekomendacji jest wprowadzenie nowego kryterium choroby objawowej u pacjentów wcześniej kwalifikowanych do populacji MGUS lub szpiczaka bezobjawowego. Jest to wartość stosunku stężenia klonalnych do nieklonalnych wolnych łańcuchów lekkich w surowicy (sFLCr; *serum Free Light Chain ratio*) wyższa od 100, przy stężeniu klonalnych wolnych łańcuchów lekkich w surowicy (sFLC; *serum Free Light Chain*), co najmniej 100 mg/L.

Obecnie rozpoznanie objawowego szpiczaka mnogiego obejmuje: obecność klonalnych komórek plazmatycznych $\geq 10\%$ lub guza plazmocytozy potwierdzonego biopsją oraz jeden lub więcej biomarkerów złośliwości SLiMCRAB. Kryteria te zostały również przyjęte przez Polską Grupę Szpiczakową [4].

Oznaczanie stężenia wolnych łańcuchów lekkich w surowicy jest badaniem zalecanym, zarówno w diagnostyce wstępnej, jak i w ocenie skuteczności leczenia. Ze względu na większą czułość w porównaniu z immunofiksacją (IFE; *Immuno Fixation*) weryfikuje większość przypadków szpiczaka niewydzielającego i umożliwia dokładną ocenę remisji choroby [3]. Podkreśla się również, że

dzięki oznaczeniom sFLC uzyskano większe możliwości wykazania tzw. rygorystycznej remisji całkowitej (sCR; *stringent Complete Response*) [5].

Elektroforeza i immunofiksacja

Rola badań laboratoryjnych w diagnostyce gammapatii monoklonalnych jest nie do przecenienia. Badaniem przesiewowym pierwszego rzutu jest rozdział elektroforetyczny białek surowicy (SPE; *Serum Protein Electrophoresis*) wykonywany najczęściej na żelu agarozowym, aczkolwiek ostatnio również metodą elektroforezy kapilarnej (CZE; *Capillary Zone Electrophoresis*). Elektroforeza umożliwia zarówno wykrycie obecności białka monoklonalnego, jak i ocenę jego stężenia w oparciu o skanowanie wybarwionego żelu po rozdziale białek lub pomiarze spektrofotometrycznym w kapilarze.

Wyniki elektroforezy mogą być jednak trudne do interpretacji z uwagi na fakt, iż białko monoklonalne może migrować jednocześnie z innymi białkami surowicy. Często zdarza się to w szpiczaku klasy IgA, białko monoklonalne wędruje w regionie β i wówczas ocena wyniku może być niedokładna lub nawet niemożliwa [6]. Dotyczy to około 5% pacjentów ze szpiczakiem IgG, stanowiących nieco ponad połowę wszystkich chorych, ale już około 50% ze szpiczakiem IgA, który stanowi 20% wszystkich szpiczaków [7].

Podobne problemy mogą czasem wystąpić z wykryciem i pomiarem białka w klasie IgM. W chorobie lekkiego łańcucha elektroforeza pozwalała na zdiagnozowanie tylko 60% pacjentów. W około 40% przypadków stwierdza się brak dodatkowego piku, a także często występującą hipogammaglobulinemię przy prawidłowym lub obniżonym stężeniu białka całkowitego w surowicy [9]. Ponadto metoda elektroforezy w żelu wykazuje brak liniowości wynikającej z nierównomiernego wysycenia żelu barwnikiem, co może prowadzić do niedoszacowania wyników. Dla przykładu, stężenie białka monoklonalnego w rozdziale elektroforetycznym wyniosło 44,9 g/l, natomiast stężenie immunoglobuliny IgG metodą nefelometryczną w tej próbce dało wynik 66,7 g/l, co przemawia za faktem, iż wynik stężenia białka monoklonalnego uzyskany metodą elektroforezy może być znacząco zaniżony, nawet w 30% przypadków. Elektroforeza ma również ograniczoną czułość, ze względu na wysoki współczynnik zmienności przy stężeniu poniżej 20 g/l. Im niższe stężenie tym większa zmienność, co sprawia, że ilościowe oznaczenie białka monoklonalnego przy niskich stężeniach jest obciążone dużym błędem [8].

Czulszą metodą, stosowaną w identyfikacji białka monoklonalnego, jest immunofiksacja, która wykazuje prążki u większości pacjentów, z gammapatią, aczkolwiek w około 3% przypadków MGUS i szpiczaków bezobjawowych nie można przy jej zastosowaniu stwierdzić obecności M-białka.

Dostępne od dawna ilościowe oznaczenia stężenia immunoglobulin w surowicy metodą immunoturbidymetryczną lub nefelometryczną zostały uzupełnione możliwością identyfikacji i ilościowych oznaczeń wolnych łańcuchów lekkich sFLC zgodnie z rekomendacją Międzynarodowej Grupy Roboczej ds. Szpiczaka w oparciu o przeciwciała poliklonalne. Oznaczenie sFLC stało się powszechnie stosowanym badaniem w diagnostyce i monito-

rowaniu szpiczaka plazmocytozowego, co zostało przedstawione w zaleceniach Polskiej Grupy Szpiczakowej w 2016 r. oraz przez Międzynarodową Grupę Szpiczakową w 2014 r. [1, 2, 3, 4].

Wolne łańcuchy lekkie

Zdolność do syntezy i wydzielania wolnych łańcuchów lekkich jest specyficzną cechą komórek plazmatycznych. Każda cząsteczka immunoglobuliny składa się z dwóch identycznych łańcuchów ciężkich spośród pięciu (α , γ , μ , δ , ϵ) i dwóch identycznych łańcuchów lekkich spośród dwóch typów – kappa (κ) lub lambda (λ). Lekkie łańcuchy są produkowane w nadmiarze (40%) w stosunku do łańcuchów ciężkich i jako wolne lekkie łańcuchy są wydzielane do surowicy. Łańcuchy κ , najczęściej będące monomerami są syntetyzowane w ilości dwukrotnie większej niż λ , ale są trzykrotnie szybciej filtrowane w nerkach aniżeli większe cząsteczki λ , występujące w postaci dimerów. W stanie fizjologicznym ilość wytwarzanych poliklonalnych lekkich łańcuchów immunoglobulin typu κ i λ mieści się w zakresie wartości prawidłowych odpowiednio; 3,30 – 19,40 mg/L i 5,71 – 26,30 mg/L (zakres dla zestawów Freelite® The Binding Site, UK) [10]. W dyskrazjach plazmocytozowych dochodzi do nadmiernej proliferacji klonu komórek plazmatycznych i produkcji homogenego białka monoklonalnego. W efekcie następuje wzrost stężenia jednego typu łańcucha lekkiego. U osób zdrowych produkcja FLC wynosi około 0,5-1,0 g dziennie, a okres półtrwania to 2-6 godzin. Wolne lekkie łańcuchy są filtrowane w kłębuszkach nerkowych i metabolizowane w kanalikach bliższych nefronu. Uszkodzenie nerek zwiększa ich czas półtrwania do 2-3 dni. Badania wykazały, że w nerkach jest metabolizowane nawet 10-30 g FLC/24 godz. Dla porównania czas półtrwania cząsteczki immunoglobuliny IgG wynosi 20-25 dni, IgA – 6 dni, IgD – 3 dni, a IgM – 5 dni. Nawet przy wysokich stężeniach sFLC ich wydalanie z moczem może być śladowe w stanach z upośledzoną funkcją nerek [11]. Przy zwiększonej produkcji poliklonalnych immunoglobulin, a tym samym lekkich łańcuchów i/lub niewydolności nerek stężenie sFLC, zarówno łańcuchów κ jak i λ , może wzrosnąć nawet 30-40 krotnie, ale stosunek κ/λ pozostaje w zakresie normy. Warto wspomnieć że prawidłowy zakres stosunku κ/λ powinien wynosić 0,26-1,65 (zakres dla zestawów Freelite® The BindingSite,UK) [10]. Dla pacjentów z niewydolnością nerek przyjmuje się rozszerzony stosunek κ/λ 0,37-3,10 [12]. Pacjenci z wartościami wskaźnika powyżej 1,65 mają nadmiar wolnych lekkich łańcuchów κ , a zatem przyjmuje się, że w szpiku wytwarzane są klonalne wolne lekkie łańcuchy κ . Z kolei chorzy z wartościami wskaźnika poniżej 0,26 mają nadmiar wolnych lekkich łańcuchów λ , co wskazuje na produkcję klonalnych wolnych lekkich łańcuchów λ [23]. U chorych ze szpiczakiem plazmocytozowym obserwuje się wysokie stężenie sFLC, natomiast wzrost ich stężenia w moczu jest uzależniony od zaawansowania choroby i stopnia uszkodzenia nerek. Oznacza to, że w gammapatiach monoklonalnych stężenie wolnych lekkich łańcuchów w surowicy, a nie w moczu, może być wskaźnikiem aktywności choroby [9]. Jak wyżej wspomniano w tej grupie chorób stosunek stężenia łańcuchów κ/λ ma większe znaczenie diagnostyczne niż stężenia sFLC, ponieważ jest on niezależny od przesączania kłębuszkowego. Pomiar w/w wskaźnika klonalności wykorzystuje się w diagnostyce i monitorowaniu leczenia takich

chorób jak: szpiczak plazmocytozowy, szpiczak tłący, amyloidoza AL, chłoniak nieziarniczny, MGUS lub choroba łańcuchów lekkich. Zaznaczyć należy jednak, iż w przypadku amyloidozy AL zaleca się w rozpoznaniu wykonanie również immunofiksacji moczu z dobowej zbiórki [1].

Istnieje możliwość wykorzystania technik elektroforezy w wykrywaniu wolnych łańcuchów lekkich w moczu (białko Bence-Jonesa) dzięki możliwości zagęszczenia próbek moczu, co daje wysoką czułość ich detekcji. Pomiar ten jednak ma swoje ograniczenia u wielu pacjentów z gammapatią monoklonalną, ponieważ ze względu na wysoką pojemność absorpcyjną kanalików proksymalnych poziom FLC w moczu jest długo niemierzalny mimo zaawansowania choroby [13].

Oznaczanie sFLC oparte jest na ocenie stężenia wolnych łańcuchów κ i λ techniką nefelometryczną lub turbidymetryczną. Użyte w teście poliklonalne przeciwciała są swoiste dla epitopów dostępnych tylko w łańcuchach κ lub λ niezwiązanych z łańcuchem ciężkim i gwarantują oznaczanie wyłącznie wolnych łańcuchów lekkich. Badanie to cechuje wysoka czułość nawet poniżej 1 mg/l zarówno w porównaniu z elektroforezą (500-2000 mg/l) jak i immunofiksacją (100-150mg/l) [14]. Stężenia obu wolnych łańcuchów lekkich sFLC umożliwiają wyliczenie stosunku (FLCr) κ/λ , który stanowi istotny czynnik diagnostyczny. Szybkość wykonania oznaczenia oraz wysoka czułość diagnostyczna w odniesieniu do gammapatii pozwalają na kwalifikację pacjentów z podejrzeniem dyskrazji do diagnostyki inwazyjnej – mielogram czy trepanobiopsja szpiku [11, 15, 16].

Ze względu na krótki czas półtrwania FLC w surowicy mogą być one traktowane jako wczesny marker odpowiedzi na leczenie, co pozwala na rezygnację z innych badań takich jak oznaczanie stężenia białka Bence-Jonesa w moczu lub stężenia immunoglobulin w surowicy [17, 18].

Badania, prowadzone u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytozowym wskazują, że stężenie sFLC znajduje zastosowanie w monitorowaniu leczenia oraz może być dobrym wskaźnikiem rokowniczym w szacowaniu wolnego od wznowy i całkowitego czasu przeżycia chorych. Normalizacja stosunku κ/λ jest zaś najsilniejszym czynnikiem prognostycznym u chorych ze szpiczakiem. Nieprawidłowy stosunek κ/λ koreluje z gorszym czasem całkowitego przeżycia. Dwukrotny wzrost lub spadek stosunku κ/λ jest związany z progresją choroby [16, 17, 18]. Wykazano również korelacje sFLC i stosunku κ/λ z odsetkiem plazmocytozów w szpiku, aktywnością LDH i stężeniem kreatyniny w surowicy oraz zaburzeniami cytogenetycznymi [19, 20].

Wyniki przedstawione w pracy Moesbauer i wsp. dowodzą, że wzrost stężenia FLC o około 25% wyprzedzał średnio o 98 dni pojawienie się białka monoklonalnego w immunofiksacji u chorych z nawrotem choroby. Pomiar stężenia sFLC wykazał, że 96% chorych z rozpoznaniem szpiczaka plazmocytozowego ma nieprawidłowe stężenie wolnych lekkich łańcuchów lub nieprawidłowy stosunek κ/λ . Jest to badanie znacznie szybciej wskazujące na tempo zaniku komórek nowotworowych niż oznaczenie całkowitych cząsteczek immunoglobulin [21].

Ponadto dzięki oznaczeniom sFLC i wyliczeniu stosunku κ/λ można różnicować pomiędzy gammapatią monoklonalną, gammapa-

tią poliklonalną, czy supresją szpiku kostnego bez gammapatii lub też niewydolnością nerek z gammapatią monoklonalną lub poliklonalną.

Stosując metodę immunofiksacji u 35 chorych z obecnością choroby lekkich łańcuchów, u wszystkich stwierdzono w moczu obecność lekkich łańcuchów monoklonalnych, jednak tylko u 29 stwierdzono ich obecność w surowicy. W porównaniu z elektroforezą tylko u 25 chorych stwierdzono obecność M-komponentu w moczu i zaledwie 9 chorych wykazywało obecność M-komponentu w surowicy. Wykorzystując oznaczanie sFLC wykazano u wszystkich chorych wzrost albo łańcuchów κ albo λ i nieprawidłowe wartości stosunku wolnych łańcuchów lekkich κ/λ [23]. Nie bez znaczenia jest fakt, że chorzy na szpiczaka niewydzielającego, u których nie wykazano obecności białka monoklonalnego w immunofiksacji surowicy i moczu zostali wykluczani z badań klinicznych, natomiast w oparciu o sFLC wykazano, że mogą być monitorowani i włączeni do programów z zastosowaniem nowych leków [11]. Z przeprowadzonych badań wynika, że w 5 przypadkach, które wcześniej były uważane za niewydzielającą postać szpiczaka, podwyższone wartości stężeń wolnych łańcuchów lekkich w surowicy stwierdzono: u 4 chorych – κ , u 1 chorego – λ [23].

Pary łańcuchów ciężki/lekki immunoglobulin

W oparciu o rozdział elektroforetyczny białek, immunofiksację oraz stężenie immunoglobulin uzyskuje się informacje, dotyczące całkowitych immunoglobulin w poszczególnych klasach IgG, IgM i IgA zarówno monoklonalnych jak i poliklonalnych czyli nienowotworowych. Nową metodą ilościowego oznaczenia i różnicowania kompletnych cząsteczek immunoglobulin, drugiego obok lekkich łańcuchów składnika białka monoklonalnego, są testy Hevylite® The Binding Site [10]. Uzyskanie przeciwciał, które rozpoznają wiązanie pomiędzy lekkim i ciężkim łańcuchem umożliwiło opracowanie oznaczenia, różnicującego specyficzne pary łańcuchów ciężki/lekki immunoglobulin (HLC; *Heavy/Light Chains*). Testy te są uznane w wielu ośrodkach klinicznych na świecie i znalazły zastosowanie w ocenie klonalności immunoglobulin w dyskracjach plazmacytowych. Pojawiły się one stosunkowo niedawno również na polskim rynku.

HLC stanowią dopełnienie dla oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich w surowicy (sFLC), obok rutynowo wykonywanych testów elektroforezy oraz IFE i mogą być bardzo dobrym narzędziem w badaniu składników białka monoklonalnego i jego ilościowym oznaczeniu. Służą one do typowania klas immunoglobulin IgG, IgA i IgM oraz pomiaru stężenia osobno cząsteczek będących parami łańcucha lekkiego κ lub λ oraz ciężkiego α , μ lub γ , w dowolnej ich kombinacji. W przypadku immunoglobuliny w klasie IgG testy te rozpoznają 2 typy cząsteczek. Jedne utworzone przez parę: łańcuch ciężki γ i łańcuch lekki κ , jest to cząsteczka immunoglobuliny IgG κ , oraz druga para: łańcuch ciężki γ i łańcuch lekki λ , jest to cząsteczka IgG λ . Możliwość rozróżniania tych dwóch typów cząsteczek w obrębie jednej klasy immunoglobulin daje przewagę nad rutynowo wykonywanym oznaczeniem stężenia całkowitych immunoglobulin, które odzwierciedla sumę tych cząsteczek w każdej z klas. Pomiar HLC wykonuje się parami dla poszczególnych klas immunoglobulin. Do dyspozycji mamy te-

sty HLC IgG κ , HLC IgA κ i HLC IgM κ , które oznacza się w parach z testami HLC IgG λ , HLC IgA λ i HLC IgM λ , a następnie oblicza się współczynnik stosunku stężeń tych cząsteczek w każdej z klas, na przykład HLC IgG κ /HLC IgG λ oraz porównuje z zakresem wartości prawidłowych, przygotowanym dla każdej pary testów w poszczególnych klasach immunoglobulin. Współczynnik ten (HLCr; *Heavy/Light Chain ratio*) stanowi dokładny wskaźnik klonalności immunoglobulin w każdej z klas i świadczy o tym czy w danej klasie występują immunoglobuliny monoklonalne i które z dwóch cząsteczek są nimi [22]. Testy te dostarczają informacji zarówno o immunoglobulinach monoklonalnych tzw. zaangażowanych – nowotworowych (np. IgG κ u pacjenta ze szpiczakiem IgG κ) jak i poliklonalnych czyli niezaangażowanych (np. IgG λ u pacjenta ze szpiczakiem IgG κ) i są jedynymi testami, które pokazują nadprodukcję immunoglobulin monoklonalnych i supresję immunoglobulin poliklonalnych umożliwiając ilościową ocenę każdego typu cząsteczek, co ma kliniczne znaczenie [28]. Możliwość dokładnego monitorowania zmian stężenia monoklonalnych immunoglobulin, ma szczególne znaczenie w ocenie kompletnej odpowiedzi na leczenie i w wykrywaniu wczesnej wznowy oraz choroby resztkowej [25, 27, 28].

HLC znajdują zastosowanie w szpiczakach skąpowydzielających, gdzie precyzyjne oznaczenia ilościowe M-białka za pomocą tradycyjnie stosowanych metod – elektroforezy i immunoturbidymetrii nie jest możliwe [27]. W najnowszych publikacjach przedstawiane są porównania wartości testów HLC i elektroforezy w monitorowaniu monoklonalnych immunoglobulin migrujących we frakcji β wraz z transferyną i innymi towarzyszącymi im białkami. Oznaczenie IgA HLC w monitorowaniu monoklonalnego IgA w szpiczaku we wspomnianych przypadkach ko-migracji tej immunoglobuliny z innymi białkami dostarcza podobnych informacji jak kombinacja trzech testów: elektroforezy, immunofiksacji i oznaczenia całkowitej IgA, upraszcza zatem dalsze postępowanie kliniczne. 97% czułość diagnostyczna testów HLC w szpiczaku plazmacytowym i w MGUS wskazuje, że niemal wszyscy pacjenci ze szpiczakiem IgA mogą być w ten sposób monitorowani, zarówno w celu oceny klonalności białka jak i ilościowego jego oznaczenia [26, 28]. Badania wskazują również na rolę oznaczeń HLC w ocenie minimalnej choroby resztkowej. Normalizacja wartości HLCr odzwierciedla stopień poprawy stanu układu immunologicznego w okresie po autologicznym przeszczepie komórek szpiku post-ASCT (*Autologous Stem Cell Transplant*), co zwiększa jednocześnie możliwość kontroli immunologicznej choroby w dłuższym okresie [25]. W przeciwieństwie do innych testów, dostępnych dotychczas, stężenie par łańcucha ciężkiego/lekkiego może oprócz informacji o braku minimalnej choroby resztkowej bądź ilościowej ocenie choroby resztkowej dostarczać informacji o stanie prawidłowych komórek plazmatycznych. W części przypadków odpowiedź określona za pomocą testów HLC jest równoważna z odpowiedzią uzyskaną za pomocą konwencjonalnych metod, w innych zaś wykorzystanie tych oznaczeń zwiększa czułość. Test nie tylko pozwala na detekcję stale wydzielających klonów komórek plazmatycznych, ale jest również wskaźnikiem odnowy układu immunologicznego, co przemawia za stopniową eliminacją klonu nowotworowego [7, 25]. Zastosowanie zarówno oznaczeń sFLC i HLC do oceny

odpowiedzi na leczenie zwiększa możliwości wykazania ciągłej nadprodukcji białka monoklonalnego u pacjentów, u których dotychczas stosowane metody elektroforeza i IFE wskazywały na tzw. kompletną odpowiedź.

W pracy M. Kraj i wsp. przedstawiono wykorzystanie HLCr dla wybranych chorych. Oceniono skuteczność diagnostyczną testu HLC w porównaniu do IFE. W większości przypadków wyniki HLCr były zgodne z wynikami IFE. Tylko w dwóch przypadkach IFE wykazała małe prążki IgG κ (w jednym przypadku u chorej na szpiczaka w całkowitej remisji po autologicznym przeszczepie, a w drugim u chorego na chłoniaka Hodgkina w 10-letniej całkowitej remisji) oraz w jednym przypadku IgG λ na tle obrazu poliklonalnego (u chorego na szpiczaka i marskość wątroby), które nie były wykrywane w testach HLC. Uzyskane wyniki wskazują, że HLC i IFE są metodami uzupełniającymi się, przy czym HLC dostarcza wyników ilościowych. Przeprowadzona w pracy ocena rzeczywistego czasu przeżycia 21 chorych z gammopatią IgM z rozpoznaniem szpiczaka lub makroglobulinemii Waldenstroma wykazała dłuższy czas przeżycia (7 lat) u chorych z wartościami HLCr poniżej mediany i krótszy czas przeżycia (5,5 lat) u chorych z wartościami HLCr powyżej mediany, a zatem jest to istotny wskaźnik prognostyczny [24]. Podsumowując, białka monoklonalne migrujące jako szerokie prążki mogą być trudne do rozróżnienia, a ilościowe oznaczanie par immunoglobulin HLC dostarcza informacji na temat syntezy klonalnej. W połączeniu z oceną kliniczną test ten może być wykorzystywany w celu potwierdzenia obecności i ilościowego oznaczania immunoglobulin monoklonalnych, oceny odpowiedzi na leczenie, wykrycia wczesnej wznowy i w rozpoznaniu choroby resztkowej u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym [7, 27, 28].

Przydatność testu HLC jest również dyskutowana w ramach Międzynarodowej Grupy ds. Szpiczaka. Uważa się bowiem, że połączenie 3 składowych metod tzn. negatywna ocena PET, brak klonalnych komórek plazmatycznych w szpiku oraz normalizacja HLCr może dostarczyć dodatkowych informacji przydatnych do oceny odpowiedzi na leczenie, co jednak wymaga dalszych badań [5].

Podsumowanie

sFLC i HLC są dwoma niezależnymi markerami wykorzystywanymi do rozpoznania i monitorowania szpiczaka plazmocyтового. sFLC mierzą stężenie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy natomiast HLC mierzą pary łańcuchów ciężki/lekkie immunoglobulin w surowicy czyli kompletne cząsteczki immunoglobulin. Ich wysoka czułość diagnostyczna pozwala na wczesne wykrywanie i precyzyjne monitorowanie choroby w porównaniu z tradycyjnie stosowanymi metodami. Wieloletnie doświadczenie klinicystów z testami sFLC opartymi na detekcji przeciwciałami poliklonalnymi i ich uwzględnienie w rekomendacjach oraz wciąż rosnąca liczba publikacji i doniesień na temat testów HLC pozwala uznać, że są one niezbędnymi, komplementarnymi narzędziami dla wykrywania, typowania i ilościowego pomiaru składników białka monoklonalnego. Wykorzystanie tych oznaczeń łącznie w panelu testów zapewnia optymalną diagnostykę, a także monitorowanie leczenia oraz ocenę rokowania dla pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym.

Piśmiennictwo

1. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009; 23: 215-224.
2. Rajkumar VS, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014; 15: E538-48.
3. Dmoszyńska A, Walter-Croneck A, Usnarska-Zubkiewicz L, et al. Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczakowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocyowego oraz innych dyskrazji plazmocytowych na rok 2015. *Acta Haem Pol* 2016; 47: 39-85.
4. Dmoszyńska A, Walter-Croneck A, Usnarska-Zubkiewicz L, et al. Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczakowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocyowego oraz innych dyskrazji plazmocytowych na rok 2016. *Acta Haem Pol* 2015; 46: 159-211.
5. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016; 17: e328-46.
6. Rodziewicz-Lurzyńska A, Bobilewicz D. Rola badań laboratoryjnych w diagnostyce szpiczaka mnogiego i innych dyskrazji plazmocytowych. *Diagn Lab* 2015; 51,43-52.
7. 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; 27:213-219.
8. Katzmann J, Snyder MR, Rajkumar SV, et al. Long-term biological variation of serum protein electrophoresis M-spike, and monoclonal serum free light chain quantification: implication for monitoring monoclonal gammopathies. *ClinChem* 2011; 57: 1687-1692.
9. Jenner E. Serum free light chains in clinical laboratory diagnostics. *ClinChemActa* 2014; 427: 5-20.
10. The Binding Site Group Ltd, Freelite® Kappa Free – instrukcja do testu. http://peramed.com/peramed/docs/LK016.S_EN.pdf
11. Usnarska-Zubkiewicz L, Hołojda J, Kuliczowski K. Wolne łańcuchy lekkie w surowicy – znaczenie diagnostyczne i prognostyczne w dyskrazjach plazmocytowych. *Acta Haem Pol* 2009; 40: 349-361.
12. Hutchison CA, Batuman V, Behrens J, et al. The pathogenesis and diagnosis of acute kidney injury in multiple myeloma. *Nat Rev Nephrol* 2011;8: 43-51.
13. Narayan S, Lujan MG, Baskin LB, et al. Measurement of β 1 and β 2-globulins improves detection of M-spikes on high-resolution electrophoresis. *ClinChem* 2003; 49: 676-678.
14. Bradwell AR, Harding SJ, Fourier NJ, et al. Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin κ/λ ratios. *ClinChem*, 2009; 55:1464-1655.
15. Katzmann JA, Kyle RA, Bensen J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *ClinChem* 2009; 55: 1517-1522.
16. Weiss BM, Kuchl WM. Advances in understanding monoclonal gammopathy of undermined significance as a precursor of multiple myeloma. *Exp. Rev. Haematol* 2010; 3: 165-174.
17. Siegel DS, Mc Bride I, Bilotti F, et al. Inaccuracies in 24-hour urine testing for monoclonal gammopathies. *Science* 2009; 40: 341-344.
18. Fulton RB, Fernando SI. Serum free light chain assay reduces the need for serum and urine immunofixation electrophoresis in the evaluation of monoclonal gammopathy. *Ann. Clin. Biochem* 2009; 46: 407-412.
19. Kyrstoson 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: 240-243.
20. Keren DF. Heavy/light-chain analysis of monoclonal gammopathies. *ClinChem* 2009; 55: 1606-1608.
21. Moesbauer T. Monitoring serum free light chains in patients with multiple myeloma who achieved negative immunofixation after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2007; 92: 275-276
22. The Binding Site Group Ltd, Hevylite® Human IgG Kappa Kit – instrukcja do testu. http://www.peramed.com/peramed/docs/NK621.S_EN.pdf
23. Kraj M, Kruk B, Poglód R. Kliniczna wartość ilościowych oznaczeń wolnych lekkich łańcuchów immunoglobulinowych w surowicy chorych na szpiczaka plazmocyowego. *J Oncol* 2011; 61: 353-357.

24. Kraj M, Kruk B, Poglód R, i wsp. Ocena IgG, IgA i IgM monoklonalnej i biklonalnejgammopatii metodą nefelometrycznego oznaczenia stosunku κ/λ indywidualnych immunoglobulin – test Hevylite versus immunofiksacja. *ActaHaema Pol* 2011; 42: 257-271.
25. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016; 8: 328-346.
26. Katzmann J, Willrich MAV, Kohlhagen MC, et al. Monitoring IgA multiple myeloma: immunoglobulin heavy/light chain assay. *ClinChem* 2015; 61: 360-367.
27. Katzmann JA, Clark R, Kyle RA, et al. Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. *Leukemia* 2013; 27: 208-212.
28. Daniela L, Lemaire-Ewing S, Denimal D, et al. Evaluation of the Hevylite IgA assay for the diagnosis and follow-up of monoclonal gammopathies. *Ann BiolClin* 2013; 71: 157-163.
29. Donato LJ, Zeldenrust SaR, MurrajDL, et al. A 71-year-old woman with multiple myeloma status after stem cell transplantation. *ClinChem* 2011; 57: 1645-1648.

Adres do korespondencji:

mgr Ewelina Kudyba
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Szpital Wojewódzki w Opolu
45-372 Opole, ul. Kośnego 53
tel. +48 77 4433221
e-mail: ewelsku@o2.pl

Otrzymano: 07.03.2017

Akceptacja do druku: 31.03.2017

Konflikt interesów: nie zgłoszono