

AL amyloidoza z zajęciem mięśnia sercowego – rola oznaczeń wolnych lekkich łańcuchów immunoglobulin w surowicy – Serum Free Light Chains (sFLC) w diagnostyce i klasyfikacji rokowniczej

Cardiac AL Amyloidosis – the role of serum Immunoglobulin Free Light Chain assay (sFLC) in diagnosis and prognostic classification

Emilia Czyżewska^{1,2} Anna Rodziewicz-Lurzyńska¹, Dagna Bobilewicz^{1,2}

¹Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Wydziału Nauki o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny

²Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny w Warszawie, Laboratorium Centralne

Streszczenie

Pierwotna amyloidoza łańcuchów lekkich (AL) jest chorobą nowotworową, w której włókna amyloidu utworzone są z łańcuchów lekkich immunoglobulin (FLC) κ lub λ , produkowanych przez nowotworowy klon plazmocytów lub limfoplazmocytów. Wytworzone białko przyjmuje strukturę β -kartyki i odkładając się pozakomórkowo w tkankach i narządach doprowadza do upośledzenia ich funkcji. Kardiomiopatie stanowią główną przyczynę zgonów w grupie pacjentów z amyloidozą, a rozpoznanie zajęcia serca stawiane jest zwykle zbyt późno ze względu na nieswoistość objawów i brak wczesnych charakterystycznych zmian widocznych w badaniach obrazowych. Aktualnie obowiązująca klasyfikacja rokownicza AL amyloidozy wg Kumara i wsp. opiera się na parametrach biochemicznych oceniających funkcję i stopień uszkodzenia mięśnia sercowego: stężeniu troponiny (Tn) i N-końcowego fragmentu peptydu natriuretycznego typu B (NT-proBNP) oraz wartości dFLC, stanowiącej różnicę między stężeniem sFLC zaangażowanych i niezaangażowanych w proces nowotworowy. Istnieją doniesienia wskazujące, że dysfunkcja mięśnia sercowego w AL amyloidozie wynika nie tylko z deponowania amyloidu w narządzie, ale również jest efektem kardiotoksycznego działania jego prekursorów – FLC, krążących we krwi obwodowej.

Summary

Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis (AL amyloidosis) is a cancer in which the amyloid fibrils are formed from amyloid immunoglobulin free light chain (FLC) κ or λ , produced by a plasma cell clone. The created protein adopts the structure of β -sheets, and depositing in tissues and organs leads to their function impairment. Cardiomyopathies are the main cause of death in patients with amyloidosis. Diagnosis of cardiac involvement is too late owing to nonspecific symptoms and no early characteristic changes observed in imaging studies. The currently valid prognostic classification of AL amyloidosis created by Kumar et al. is based on biochemical parameters evaluating function and the degree of myocardial damage: concentration of troponin (Tn) and N-terminal fragment of B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) and the value of dFLC, representing the difference between the concentration of serum FLC (sFLC) involved and not involved in the neoplastic process. There are reports indicating that myocardial dysfunction in AL amyloidosis stems not only from the amyloid deposit in the organ, but it is also the result of the cardiotoxicity amyloid precursor – FLC, circulating in the blood.

Słowa kluczowe: amyloidoza AL, wolne lekkie łańcuchy immunoglobulin, amyloid, amyloidoza serca

Keywords: AL amyloidosis, Immunoglobulin Free Light Chains, Amyloid, Cardiac amyloidosis

AL amyloidoza – patogeneza i diagnostyka

Amyloidozy (skrobiawice, betafibrylozy) stanowią heterogenną grupę chorób charakteryzujących się odkładaniem w przestrzeni zewnątrzkomórkowej amorficznego, nierozpuszczalnego białka o budowie włóknikowej. Struktura chemiczna omawianych białek jest bardzo zróżnicowana, jednak ich wspólną cechą jest tworzenie charakterystycznej konfiguracji β -harmonijki, która

warunkuje zarówno określone właściwości optyczne jak i barwne amyloidu [1, 2]. Białka amyloidogenne wykazują oporność na proteolizę i odkładając się w narządach, powodują ich uszkodzenie oraz upośledzenie funkcji. Podstawową klasyfikacją amyloidoz jest ich podział na amyloidozy uogólnione (systemowe), w których złogi amyloidu odkładają się w wielu narządach, ścianach naczyń i tkance łącznej (np. AL amyloidoza) i amyloidozy miejscowe

(zlokalizowane) – ograniczone tylko do jednego narządu (np. amyloidoza rogówki, w której amyloid utworzony jest z laktoferyny, ALac). Dodatkowo, klasyfikacja obejmuje amyloidozy wrodzone, będące następstwem mutacji określonego genu prekursorowego białka i amyloidozy nabyte [1, 3, 4].

Pierwszy opis przypadku, który mógł dotyczyć pacjenta z amyloidozą pochodzi już z 1600 r. [1]. Z kolei w roku 1842 Karl von Rokitansky – austriacki anatomopatolog zdiagnozował u jednego z pacjentów „nacieczenie wątroby niezidentyfikowaną szarą substancją” [4]. Pionierem zastosowania terminu „amyloid” był Schleiden, który w 1838 r. określił tym mianem skrobię roślinną (łac. *Amylum* – skrobia). Natomiast w roku 1854 Rudolf Virchow „amyloidem” nazwał „skrobiopodobne” tkankowe depozyty białkowe wybarwiający się na niebiesko pod wpływem jodyny. W następnych latach odkryto, że amyloid po zabarwieniu czerwienią Kongo daje w mikroskopie świetlnym w świetle przechodzącym pomarańczowoczerwone zabarwienie, a w świetle spolaryzowanym – kolor zielonego jabłka. Ponad sto lat po odkryciach Virchowa dzięki mikroskopii elektronicznej potwierdzono, że amyloid wykazuje budowę włókienkową i opisano konfigurację β -harmonijki. W latach 70. ubiegłego wieku wykazano, że wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin (FLC; *free light chains*) mogą być prekursorami amyloidu, natomiast w roku 1984 Glenner scharakteryzował i wyizolował białko związane z tworzeniem się amyloidu w chorobie Alzheimera [1, 4]. Obecnie znanych jest 31 zewnątrzkomórkowych białek, które mogą być prekursorami amyloidu u ludzi. Zidentyfikowano również 9 podobnych białek u zwierząt i wiele białkowych wtrętów wewnątrzkomórkowych, wykazujących niektóre cechy amyloidu, które określono mianem „wewnątrzkomórkowego amyloidu” („*intracellular amyloid*”) [5, 6]. Pierwotna amyloidoza łańcuchów lekkich (AL; *immunoglobulin light chain amyloidosis*) jest chorobą nowotworową, w której włókna amyloidu utworzone są z łańcuchów lekkich immunoglobulin κ lub λ , bądź ich fragmentów, produkowanych przez nowotworowy klon plazmacytów lub limfoplazmacytów. Wytworzone białko przyjmuje strukturę β -kartki i odkładając się pozakomórkowo w tkankach i narządach doprowadza do upośledzenia ich funkcji. AL amyloidoza określana jest również mianem amyloidozy zależnej od immunoglobulin (*immunoglobulin-related amyloidosis*) należącej do grupy rzadkich dyskrazji plazmacytowych – tzw. chorób z odkładania monoklonalnych immunoglobulin, chorób depozytowych (MIDD; *monoclonal immunoglobulin deposition diseases*). We wszystkich typach chorób depozytowych dochodzi do produkcji przez klonalne komórki plazmatyczne immunoglobulin monoklonalnych (lub ich fragmentów), które odkładają się pozakomórkowo w różnych narządach; natomiast tylko w przypadku AL amyloidozy wytwarzane białko przyjmuje włókienkową strukturę β -harmonijki i barwi się czerwienią Kongo. AL amyloidoza stanowi 4/5 wszystkich amyloidoz i jest najczęstszym typem amyloidozy układowej. Poza postacią układową AL amyloidozy wyróżnia się także postać zlokalizowaną (amyloidoza zlokalizowana, AZ), gdzie deponowanie amyloidu ograniczone jest zazwyczaj do jednego narządu. Amyloid również tworzą łańcuchy lekkie immunoglobulin, natomiast białko monoklonalne nie jest wykrywalne zarówno w surowicy, jak i w moczu. Warto jednak podkreślić, że „nieobecność” białka

monoklonalnego w surowicy/moczu nie jest podstawą do zdiagnozowania amyloidozy miejscowej. Określenie „zlokalizowana” odnosi się również do samego miejsca wytwarzania przez plazmocyty prekursorów amyloidu – wolnych lekkich łańcuchów, które w przypadku AZ zachodzi w zajęтым narządzie, a w postaci układowej – w szpiku kostnym. AZ stanowi ok. 8 – 10% wszystkich typów amyloidoz; obejmuje zwykle: drogi oddechowe (krtań, tchawicę), skórę, układ moczowo-płciowy, przewód pokarmowy, węzły chłonne i nie ulega transformacji do postaci układowej. Amyloidoza zlokalizowana charakteryzuje się zwykle łagodnym przebiegiem i leczona jest głównie objawowo [7, 8, 9].

Nie istnieje wyraźna granica między AL amyloidozą i pozostałymi dyskrazjami plazmacytowymi. Omawiane zaburzenia mogą współwystępować, bądź ewoluować w stronę objawów bardziej dominujących, ponieważ tworzą niejako spektrum klonalnych chorób pokrewnych. Amyloidoza pierwotna może rozwijać się w czasie trwania szpiczaka plazmacytowego (SzP) (ok. 6%), bądź wyprzedzać jego pełnoobjawową postać (ok. 0,4%). W 10 – 15% AL amyloidoza związana jest ze SzP, rzadziej – towarzyszy makroglobulinemii Waldenströma (MW) [8, 10].

Patogeneza powstawania amyloidu w AL amyloidozie nie została dokładnie rozpoznana. Istnieje hipoteza, że łańcuchy lekkie w amyloidozie pierwotnej są skrócone (w porównaniu np. z chorobą łańcuchów lekkich) i dzięki temu łatwiej przyjmują strukturę β -harmonijki [11]. Wolne lekkie łańcuchy κ lub λ wytwarzane są zwykle przez niewielki klon komórek plazmatycznych w szpiku kostnym – mediana oceniana jest na ok. 5 – 10% plazmacytów w badaniu trepanobiopsyjnym; jedynie u 22% pacjentów odsetek plazmacytów jest większy niż 20% [11-13]. Najczęściej białko monoklonalne w surowicy jest niewykrywalne przy wykorzystaniu rutynowego badania elektroforetycznego, a zaledwie u 50% chorych wolny lekki łańcuch monoklonalny stwierdzany jest w badaniu immunofiksacji białek surowicy. Nie wszystkie monoklonalne łańcuchy lekkie wykazują podobną amyloidogenność. Przemawia za tym fakt, że jedynie u 10 – 15% chorych na współwystępuje AL amyloidoza, natomiast zaledwie 1% chorych z transformuje do pierwotnej amyloidozy. Wydaje się, że u podstaw „amyloidogenności” leżą właściwości klonalnych plazmacytów, które skutkują wytwarzaniem immunoglobulin z somatyczną mutacją genu dla części zmiennej. Czyni to wolne lekkie łańcuchy białkami predysponującymi do zainicjowania procesu amyloidogenezy [11]. U ponad połowy pacjentów potwierdzanym zaburzeniem cytogenetycznym w klonalnych plazmacytach jest translokacja t(11;14) współlistniejąca z obecnością cykliny D1. Potwierdzono ponadto, że nadekspresja cykliny D1 w komórkach plazmatycznych związana jest z wytwarzaniem przez nie głównie wolnych monoklonalnych łańcuchów lekkich. Dodatkowo jest ona związana z gorszą odpowiedzią pacjentów na leczenie pierwszego rzutu, co potencjalnie czyni ją niezależnym czynnikiem prognostycznym śmiertelności w tej grupie chorych [14, 15]. W populacji ludzi zdrowych i u pacjentów ze SzP stosunek części zmiennej κ : λ wynosi 3:1, natomiast u pacjentów z AL amyloidozą 1:2, co potwierdza hipotezę, że linia zarodkowa λ jest potencjalnie bardziej amyloidogenna w porównaniu z linią κ . Ponadto, pewne geny części zmiennej Ig (IGLV i IGKV) prawdopodobnie bardziej predysponują

do wytwarzania amyloidu niż pozostałe, biorąc pod uwagę np. częstość ich występowania u pacjentów z AL amyloidozą i w populacji ogólnej. Np. IGLV6 występujący bardzo rzadko, zarówno w prawidłowych limfocytach B, jak i w klonalnych plazmocytach w przypadku innych dyskracji, w grupie z AL amyloidozą obecny jest w ok. 30% przypadków pacjentów z monoklonalnym wzrostem λ . Obiecujące wydaje się również wykorzystanie genu IGLV3-1 [7, 16]. Podstawą diagnostyki amyloidozy jest potwierdzenie obecności amyloidu w tkance. Objawy kliniczne, badania obrazowe i parametry biochemiczne mogą nasuwać podejrzenie amyloidozy, jednak tylko wykrycie amyloidowych włókien w badaniu histopatologicznym jest rozstrzygające. W większości przypadków biopsja narządowa nie jest konieczna, ponieważ złogi amyloidu w amyloidozach układowych deponują również w łatwiej dostępnej tkance tłuszczowej brzucha (czułość oceniana na ok. 80–94%) lub w błonie śluzowej dziąsła, odbytnicy i gruczołów ślinowych (czułość ok. 75-85%) [4]. Biopsja narządowa niesie za sobą ryzyko wielu powikłań, głównie krwotocznych, szczególnie w przypadku AL amyloidozy. Biopsja aspiracyjna podskórnej tkanki tłuszczowej jest natomiast procedurą mało inwazyjną, bezpieczną, szybką i tanią. Już w roku 1970 Westmark i Stenkvist odkryli, że amyloid deponuje również w tkance tłuszczowej, co może być wykorzystywane w toku diagnostyki amyloidoz. W przypadku biopsji narządowych, niezależnie od miejsca pobrania, zaleca się, aby pozyskiwany bioptat tkankowy zawierał również naczynia, ponieważ bardzo często złogi amyloidu zlokalizowane są wokół naczyń krwionośnych [1, 7, 17, 18, 19, 20].

W barwieniu hematoksyliną-eozyną (HE) amyloid stanowi bezpostaciowe, pozakomórkowe, homogenne, różowe, kwasochłonne masy. „Złotym standardem” jest natomiast barwienie tkanki czerwienią Kongo, której związanie przez amyloidowe włókna w mikroskopie świetlnym nadaje im barwę czerwono-pomarańczową, zaś w mikroskopie spolaryzowanym obraz charakterystycznych jasnozielonych dwójłomnych depozytów. Barwienie to nie jest wykonywane rutynowo, więc zawsze na skierowaniu na badanie histopatologiczne powinna być zawarta informacja o podejrzeniu amyloidozy. Bardzo istotne jest samo pozyskanie i przygotowanie materiału do badań. Bioptat powinien być skrojony na skrawki grubości ok. 8–10 μm . Wykonanie cieńszych preparatów może skutkować niezwiązaniem barwnika i uzyskaniem wyniku fałszywie ujemnego. Inne techniki barwienia, np. Tioflawina T i S, fioletem metylowym lub błękitem Alcjańskim charakteryzują się mniejszą czułością i swoistością w identyfikacji amyloidu. W mikroskopie elektronowym amyloid widoczny jest jako nierozgałęzione, linearne, chaotycznie ułożone włókna o średnicy ok. 7–12 nm i długości ok. 30–10000 nm. W związku z tym, że włókna amyloidu gromadzą się w tkance ogniskowo i nieregularnie, konieczna jest analiza wielu preparatów [1, 2, 4, 6, 21, 22]. Zgodnie z definicją amyloidozy, jej rozpoznanie wymaga albo barwienia tkanki czerwienią Kongo, albo potwierdzenia włókienkowego charakteru depozytów amyloidu z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej [22].

Kolejny etap obejmuje diagnostykę różnicową typu amyloidu z wykorzystaniem badań immunohistochemicznych i immunofluorescencyjnych przy zastosowaniu przeciwciał skierowanych

przeciwko białkom tworzącym amyloid; w przypadku AL amyloidozy są to przeciwciała wiążące łańcuchy κ i λ immunoglobulin. W przypadkach wątpliwych wykorzystywana jest również mikroskopia elektronowa i sekwencjonowanie materiału histopatologicznego, co wymaga jednak odpowiedniego zaplecza laboratoryjnego. „Złotym standardem” w określaniu rodzaju białek tworzących amyloid i jego składu strukturalnego jest natomiast spektrometria masowa [8, 22, 23].

Potwierdzenie monoklonalnej dyskracji plazmocytów wymaga przeprowadzenia we wstępnym etapie diagnostyki elektroforezy białek surowicy. Jednak ze względu na niskie stężenie białka monoklonalnego w surowicy w przypadku pacjentów z AL amyloidozą jest to badanie o niskiej czułości diagnostycznej, ocenianej zaledwie na ok. 66%. Wśród 474 pacjentów diagnozowanych w ośrodku referencyjnym w Mayo Clinic w latach 1981–1992 jedynie w przypadku 48% z nich elektroforeza surowicy wykazywała obecność prążka monoklonalnego. U 38% chorych w momencie rozpoznania monoklonalny pik lokował się obszarze γ -globulin, a u 10% widoczny był we frakcji β -globulin. Średnie stężenie białka monoklonalnego, oceniane na podstawie dodatkowego pików, wynosiło 1,4 g/dl. U 20% pacjentów wykazano hipogammaglobulinemię, a u 1% – hipergammaglobulinemię poliklonalną [24]. Typowy obraz rozdziału elektroforetycznego białek surowicy pacjenta z AL amyloidozą charakteryzuje się: obniżeniem frakcji albuminy, podwyższeniem frakcji α_2 -globulin i obniżeniem frakcji γ [25]. Badaniami przesiewowymi w diagnostyce wczesnych stadiów amyloidozy pierwotnej są immunofiksacja białek surowicy krwi i moczu i oznaczenie stężenia FLC (κ i λ) [26–28]. Najwyższą czułością w rozpoznawaniu AL amyloidozy charakteryzuje się oznaczenie stężenia FLC w surowicy (sFLC), które średnio wynosi 88%. Pozytywny wynik elektroforezy białek surowicy, immunofiksacji surowicy i oznaczenia stężenia sFLC umożliwia identyfikację 94% chorych, a dodatkowe wykonanie immunofiksacji moczu, wykazującej obecność białka monoklonalnego, zwiększa czułość aż do 98% [29–30]. Ocenia się, że oznaczenie stężenia sFLC wykazuje ok. 10–krotnie wyższą czułość w wykrywaniu białka monoklonalnego w porównaniu z immunofiksacją. Ponieważ jest to test ilościowy, może być wykorzystywany nie tylko do diagnostyki, ale również oceny progresji choroby i monitorowania leczenia. Istotne pod względem diagnostycznym jest nie tylko samo stężenie wolnych lekkich łańcuchów κ i λ , ale przede wszystkim stosunek ich stężeń (κ/λ), będący niejako liczbowym wykładnikiem klonalności w wytwarzaniu przez patologiczne plazmocyty jednego z łańcuchów. Prawidłowy zakres stosunku stężeń κ/λ wynosi 0,26–1,65. Wartości poniżej 0,26 sugerują obecność monoklonalnego łańcucha λ , a powyżej 1,65 – monoklonalnego łańcucha κ . W badaniach przeprowadzonych przez Katzmann'a i wsp. nad grupą 110 pacjentów ze zdiagnozowaną AL amyloidozą wynik immunofiksacji w surowicy był pozytywny u 69% chorych, immunofiksacji moczu – u 83%, a nieprawidłowy stosunek stężeń κ/λ – u 91% pacjentów. Kombinacja wykorzystania nieprawidłowego stosunku κ/λ i dodatniego wyniku immunofiksacji surowicy umożliwiła identyfikację 99% chorych [31, 32]. Z kolei w innej grupie 169 pacjentów z amyloidozą pierwotną, swoistość i wartość predykcyjna nieprawidłowego stosunku κ/λ była wyższa w porównaniu

ze stężeniem wolnych lekkich łańcuchów u pacjentów z monoklonalnym rozrostem κ [33]. Wykazanie obecności białka monoklonalnego w surowicy i/lub moczu nie potwierdza rozpoznania AL amyloidozy. Etapem nieodzownym diagnostyki jest biopsja tkankowa. Ponadto, wykrycie białka monoklonalnego narzuca konieczność wykonania biopsji szpiku kostnego w celu wykluczenia innych niż AL amyloidoza dyskrazji plazmocytowych, które również mogą współwystępować z AL amyloidozą lub wyprzedzać jej rozwój. Dodatkowo, niewielkie ilości białka monoklonalnego są wykrywalne w surowicy ok. 5 – 10% pacjentów po 70 r.ż., jako manifestacja MGUS, i u ¼ chorych na amyloidozę transtyretynową (ATTR). Diagnostyka pierwotnej amyloidozy układowej wymaga ponadto różnicowania z jej postacią zlokalizowaną [12, 29, 34]. Kryteria rozpoznania układowej, pierwotnej amyloidozy łańcuchów lekkich obejmują:

1. Obecność nieprawidłowości narządowych wynikających z odkładania amyloidu (zajęcie serca, nerek, wątroby, układu nerwowego, przewodu pokarmowego)
2. Obecność amyloidu potwierdzona barwieniem czerwienią Kongo w biopsji tkankowej (tkanki tłuszczowej, szpiku kostnego) lub biopsji narządowej
3. Wykazanie, że amyloid utworzony jest z łańcuchów lekkich immunoglobulin (immunohistochemia, immunofluorescencja, mikroskopia elektronowa, spektrometria mas)
4. Wykazanie dyskrazji komórek plazmatycznych (potwierdzenie obecności białka monoklonalnego w surowicy i/lub w moczu, potwierdzenie występowania klonalnych plazmacytów w szpiku kostnym, nieprawidłowy stosunek stężeń wolnych lekkich łańcuchów κ/λ)

Rozpoznanie układowej AL amyloidozy wymaga spełnienia wszystkich czterech ww. kryteriów. Warto jednak zaznaczyć, że w przypadku ok. 2 – 3% pacjentów w momencie rozpoznania nie wszystkie z nich są spełnione [8, 29].

AL amyloidoza określana jest „chorobą pogarszania się stanu ogólnego pacjenta bez uchwytnej przyczyny” [8]. Ze względu na początkowo powolny przebieg, brak swoistych objawów (występujące przypominają symptomy obserwowane w wielu innych chorobach), zróżnicowany obraz kliniczny i ograniczenia diagnostyczne, jej rozpoznanie jest problematyczne i stawiane zwykle zbyt późno [11]. Powinno być ono uwzględniane w różnicowej diagnostyce pięciu następujących zespołów:

- zespołu nerczycowego u pacjentów nie leczonych z powodu cukrzycy
- kardiomiopatii potwierdzonej badaniem echokardiograficznym, która nie jest skutkiem niedokrwienia mięśnia sercowego
- powiększenia wątroby (z zachowaniem prawidłowego obrazu jej miąższu ocenianego w badaniach obrazowych) lub podwyższonej aktywności fosfatazy alkalicznej
- neuropatii w powiązaniu z obecnością białka monoklonalnego (M) w surowicy
- MGUS, której towarzyszy spadek masy ciała, niewyjaśnione uczucie zmęczenia, obrzęki obwodowe, bądź parestezje [8].

Zajęcie serca jest głównym niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w AL amyloidozie, ponieważ 75% zgonów w tej grupie

chorych spowodowanych jest niewydolnością serca lub zaburzeniami rytmu będącymi następstwem odkładania włókien amyloidu. Deponowanie amyloidu w mięśniu sercowym określane jest amyloidozą serca lub kardiomiopatią amyloidową [35]. Znanych jest 9 rodzajów białek – prekursorów amyloidu, które mogą być przyczyną amyloidozy serca. Zarówno objawy kliniczne, leczenie, jak i rokowanie różnią się w zależności od ostatecznego rozpoznania. Zajęcie serca jest najczęstsze w przypadku AL amyloidozy i amyloidozy ATTR [35, 36]. Deponowanie amyloidu w sercu może być zarówno izolowanym objawem lub zdecydowanie częściej, dotyczyć układowej postaci choroby. Objawy amyloidozy serca mogą być łagodne i mogą przebiegać niemal subklinicznie, np. w amyloidozie AANP (amyloid utworzony z przedsińkowego peptydu natriuretycznego, zlokalizowany w przedsińkach serca), bądź wykazują bardzo szybką progresję, czego przykładem jest amyloidoza pierwotna łańcuchów lekkich [37]. W AL amyloidozie zajęcie serca dotyczy ok. ¾ pacjentów, natomiast u 50% występują objawy niewydolności serca. Inne źródła podają, że deponowanie amyloidu w sercu występuje aż u 90% chorych, a objawy kardiomiopatii restrykcyjnej widoczne są u ok. 50% – już w momencie stawiania diagnozy. Deponowanie amyloidu ograniczone tylko do mięśnia sercowego (izolowana amyloidoza serca) dotyczy mniej niż 5% chorych [38, 39]. Ponadto, mięsień sercowy jest narządem, którego zajęcie wywiera najistotniejszy wpływ na wybór sposobu leczenia. Kardiomiopatie stanowią główną przyczynę zgonów w grupie pacjentów z amyloidozą, a rozpoznanie zajęcia serca jest zwykle stawiane zbyt późno ze względu na nieswoistość objawów i brak wczesnych charakterystycznych zmian widocznych w badaniach obrazowych [29, 40]. Mediana przeżycia u pacjentów z kardiomiopatią amyloidową oceniana jest na 1,3 roku od momentu rozpoznania, co porównywalne jest z najgorzej rokującymi nowotworami [35]. Natomiast objawy niewydolności serca są wyznacznikiem niemal piorunującego przebiegu choroby, gdzie mediana przeżycia u pacjentów nieleczonych wynosi zaledwie 4-6 miesięcy [41, 42]. Amyloidoza serca definiowana jest jako obecność pozakomórkowych złogów amyloidu w sercu, które mogą naciekać i obejmować wszystkie jego struktury: przedsińki, komory, naczynia (głównie drobne, co w badaniu angiograficznym przypomina zmiany miażdżycowe), zastawki, a nawet układ bodźcoprzewodzący, co potwierdzono w kilku przypadkach [35, 43]. Amyloid deponuje pomiędzy kardiomiocytami, w przestrzeni międzykomórkowej, doprowadzając do zaburzeń kurczliwości. Zajęcie serca objawia się pogrubieniem jego ścian w połączeniu z ograniczoną podatnością i zdolnością rozkurczową. Choroba przyjmuje obraz zastoinowej niewydolności serca przebiegającej głównie z pogrubieniem mięśnia lewej komory i, co istotne w diagnostyce różnicowej, zwykle bez zmian jej objętości. Pomimo deponowania amyloidu w obrębie całego mięśnia sercowego, dominujące objawy wynikają głównie z prawokomorowej niewydolności serca z zachowaniem funkcji skurczowej. Najczęstsze symptomy obejmują: zawroty głowy, omdlenia, zasłabnięcia, wodobrzusze, obrzęki obwodowe, obniżenie ciśnienia tętniczego (ciśnienie skurczowe nie przekracza zazwyczaj 100 mmHg), hipotonię ortostatyczną, hepatomegalię, podwyższenie ciśnienia w żyłach szyjnych. U pacjentów z wcześniej zdiagnozowanym

nadciśnieniem tętniczym, w miarę rozwoju choroby dochodzi do tzw. „spontanicznej normalizacji”. Deponowanie amyloidu w drobnych naczyniach, jak również w przydancie i błonie śródkowej ściany tętnic może wywoływać objawy dławicy piersiowej wynikające z niedokrwienia [36, 37, 44].

Referencyjną metodą w rozpoznawaniu amyloidozy serca jest badanie histopatologiczne potwierdzające obecność amyloidu w miokardium. Biopsja narządowa w diagnostyce AL amyloidozy wykazuje różną czułość w zależności od rodzaju narządu i miejsca pobrania biopsji [36, 37]. Wytyczne sformułowane w 2007 r. przez AHA/ACC/ESC rekomendują wykonanie biopsji endomiokardialnej w przypadkach niewyjaśnionej kardiomiopatii restrykcyjnej w klasie IIa C. Ze względu na inwazyjność badania, biopsja serca przeprowadzana jest jedynie w przypadkach niejasnych lub przy podejrzeniu izolowanej amyloidozy serca. Dodatkowo, musi być procedurą wykonywaną podczas badania angiograficznego. Powyższe wytyczne wskazują jednocześnie, że rozpoznanie amyloidozy z zajęciem serca może być oparte na wyniku biopsji tkanki podskórnej i obrazu ECHO. Przemawia za tym niewielka inwazyjność badania i dość wysoka czułość oceniana na ok. 60–80%. W przypadku uzyskania ujemnego wyniku w biopsji tkanki tłuszczowej zaleca się pobranie biopsji z dziąsła, odbytnicy, bądź innego zajętego przez amyloid narządu [12]. Istnieją doniesienia wskazujące, że dysfunkcja mięśnia sercowego w AL amyloidozie wynika nie tylko z deponowania amyloidu w narządzie, ale również jest efektem kardiotoksycznego działania jego prekursorów – FLC, krążących we krwi obwodowej [45].

Od ponad 10 lat kluczowe w diagnostyce amyloidozy serca są biochemiczne markery sercowe, a wśród nich stężenie N–końcowego fragmentu cząsteczki pro-BNP (NT – pro BNP) lub mózgowego peptydu natriuretycznego (BNP) i stężenie troponin T lub I (TnT lub TnI) w surowicy; rzadziej oznaczana jest aktywność kinazy kreatynowej (CK) [29, 30].

W tabeli I. przedstawiono wszystkie obowiązujące do tej pory klasyfikacje rokownicze AL amyloidozy opierające się na wytycznych Mayo Clinic, jako ośrodka referencyjnego, i wytycznych europejskich. Stratyfikacja ryzyka opiera się przede wszystkim na: stężeniu NT – pro BNP, stężeniu TnT lub TnI, wartości ciśnienia skurczowego i wartości dFLC, stanowiącej różnicę pomiędzy stężeniem wolnych lekkich łańcuchów immunoglobulin zaangażowanych w proces nowotworowy (monoklonalnych, amyloidogennych) i stężenia łańcuchów niezaangażowanych (poliklonalnych) (dFLC; *difference between involved and uninvolved FLC*). Dodatkowo, przedstawiono klasyfikację uwzględniającą funkcję nerek (wartość eGFR i dobowe wydalanie białka z moczem), oceniającą ryzyko wdrożenia u pacjenta leczenia nerkozastępczego.

Aktualnie obowiązująca klasyfikacja rokownicza AL amyloidozy wg Kumara i wsp. opiera się na parametrach biochemicznych oceniających funkcję i stopień uszkodzenia mięśnia sercowego: stężeniu troponiny (Tn) i N–końcowego fragmentu peptydu natriuretycznego typu B (NT– pro BNP) oraz wartości dFLC.

Wolne lekkie łańcuchy immunoglobulin– *Free Light Chain (FLC)*

Cząsteczki immunoglobulin zbudowane są z dwóch jednakowych łańcuchów ciężkich i dwóch jednakowych łańcuchów lekkich. Wyróżnia się dwa typy łańcuchów lekkich κ i λ i pięć klas łańcuchów ciężkich: γ , α , μ , δ i ϵ , które warunkują pięć głównych klas immunoglobulin IgG, IgA, IgM, IgD i IgE. Każda odrębna cząsteczka immunoglobulin posiada tylko jeden typ łańcucha lekkiego κ lub λ [11]. Produkcja przez plazmocyty i limfocyty B łańcuchów lekkich jest ok. 40% większa niż łańcuchów ciężkich. Dodatkowo, liczba komórek plazmatycznych wytwarzających łańcuch κ jest dwukrotnie większa, w porównaniu z komórkami wytwarzającymi łańcuch λ . U zdrowych osób w ciągu jednego dnia produkowanych jest ok. 0,5–1,0 g FLC o średnim czasie półtrwania ocenianym na 2–6

Tabela 1. Klasyfikacje rokownicze AL amyloidozy

Klasyfikacja rokownicza	Parametry i ich punkty odcięcia	Stopnie zaawansowania klinicznego	Mediana przeżycia /ryzyko dializoterapii
Mayo Clinic (2004 r.) [72]	-NT-pro BNP >332 ng/L -cTnT >0,035 ng/ml (lub cTnI >0,1 ng/ml)	I: 0 czynników II: 1 czynnik III: 2 czynniki	I: 26 mies. II: 11 mies. III: 4 mies.
Europejska modyfikacja klasyfikacji Mayo Clinic [73]	Stadium III wg Mayo Clinic plus -Ciśnienie skurczowe <100 mmHg - NT– pro BNP >8500 ng/L	a.0 czynników b.1 czynnik c. 2 czynniki	a. 26 mies. b. 6 mies. c. 3 mies.
Nowe wytyczne Mayo Clinic (2012 r.)* [45,74]	- NT– pro BNP \geq 1800 pg/ml -cTnT \geq 0,025 ng/ml (lub cTnI \geq 0,07 ng/ml) -dFLC \geq 180 mg/l	I: 0 czynników II: 1 czynnik III: 2 czynniki IV: 3 czynniki	I: 94 mies. II: 40 mies. III: 14 mies. IV: 6 mies.
Wytyczne „nerkowe” [75]	-eGFR <50 ml/min/1,73m ² - Białkomocz >5g/24h	I: 0 czynników II: 1 czynnik III: 2 czynniki	I: 0-3% ryzyko dializ po 2 latach II: 11-25% ryzyko dializ po 2 latach III: 60-75% ryzyko dializ po 2 latach

* Rozszerzenie wytycznych Mayo Clinic przez Palladini’ego G. i wsp. (*Pavia Amyloidosis Research and Treatment Center, Italy*) uwzględniające stężenie TnI >0,07 ng/ml, cTnT– stężenie troponiny T; NT-pro BNP– N – końcowy propeptyd natriuretyczny typu B, eGFR– estimated glomerular filtration rate – szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej

godzin. Prawidłowe plazmocyty stanowią ok. 1-2% utkania szpikowego, natomiast w szpiczaku plazmocytowym ich odsetek może sięgać nawet 90%. W przebiegu przewlekłych stanów zapalnych i chorób autoimmunizacyjnych liczba względna komórek plazmatycznych wzrasta do ok. 5-10% i związana jest z hipergammaglobulinemią, której towarzyszy zwiększenie stężenia wolnych łańcuchów poliklonalnych [46]. W przebiegu dyskrazji plazmocytowych nowotworowy klon plazmocytoów produkuje jeden rodzaj lekkiego łańcucha κ lub λ – łańcuchy monoklonalne. Łańcuchy κ są najczęściej monomerami o masie cząsteczkowej 25 kDa, natomiast łańcuchy λ stanowią dimery o masie cząsteczkowej 50 kDa [47]. Eliminacja ustrojowa FLC zachodzi drogą nerkową; są one filtrowane w kłębuszkach nerkowych i następnie metabolizowane w kanalikach bliższych nefronu. Po przefiltrowaniu w kłębuszkach nerkowych, na drodze endocytozy i przy współdziałaniu systemu receptorowego megalina – kubulina, FLC przechodzą do wnętrza komórek nabłonkowych kanalików proksymalnych gdzie następuje ich degradacja przez enzymy lizosomalne [48]. Ocenia się, że w nerkach może być metabolizowanych nawet ok. 10-30 g FLC/dobę. W stanie zdrowia czas półtrwania łańcuchów κ we krwi obwodowej wynosi 2 – 4 godziny, natomiast łańcuchów λ 3-6 godzin. Pogorszenie funkcji nerek bądź polimeryzacja wolnych łańcuchów immunoglobulin wydłuża ich czas półtrwania do 2-3 dni. U ludzi zdrowych z moczem wydalane są niewielkie ilości FLC – ok. 1-10 mg/dobę. [11, 46, 47]. Wolne łańcuchy lekkie κ , jako monomery, filtrowane są w kłębuszkach nerkowych trzykrotnie szybciej niż dimeryczne łańcuchy λ , jednak ich stężenie w surowicy jest równoważone dzięki dwukrotnie szybszej produkcji. Stężenie wolnych lekkich łańcuchów w surowicy odzwierciedla ich produkcję przez komórki plazmatyczne, jak i metabolizm zależny od funkcji nerek. Kanaliki proksymalne nefronów mogą metabolizować bardzo duże ilości wolnych łańcuchów. W stanach przebiegających z wysokimi stężeniami FLC we krwi (zarówno monoklonalnych, jak i poliklonalnych) ich stężenie w moczu może być niewielkie i zależne w większym stopniu od funkcji nerek, a dokładniej ich katabolizmu przez kanaliki proksymalne, niż produkcji przez komórki plazmatyczne [46,47].

FLC – aspekty analityczne i diagnostyczne

Oznaczenie FLC w moczu zapoczątkowane już w 1847 r. przez Henry'ego Bence Jonesa stało się przełomem w diagnostyce SzP. Wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin obecne w moczu, tzw. białko Bence'a-Jonesa stały się indykatozem ich monoklonalnej produkcji w przebiegu gammapatii monoklonalnych. Po ok. 150 latach od odkrycia Bence Jonesa w 2001 r. w USA wprowadzono do rutynowej diagnostyki oznaczenie stężenia FLC w surowicy [49, 50]. Metodą wykrywania białka monoklonalnego w surowicy jest elektroforeza białek na żelu agarozowym (SPE; *serum protein electrophoresis*). SPE umożliwia wykrycie białka M, gdy jego stężenie w surowicy wynosi co najmniej 500 mg/l. Elektroforeza białek moczu wykrywa białko M przy jego stężeniach wynoszących ok. 10 – 20 mg/l, jednak w większości laboratoriów granicę wykrywalności stanowi stężenie 40 – 50 mg/l. Immunofiksacja białek surowicy i moczu (IFE), która charakteryzuje się ok. 10-krotnie większą czułością w wykrywaniu białka monoklonalnego niż SPE.

Ponadto IFE stanowi metodę jakościową, w której do identyfikacji białka M wykorzystywane są surowice odpornościowe – zarówno poliwalentna, jak i anty-IgG, anty-IgA, anty-IgM, anty-IgD, anty-IgE, anty- κ i anty- λ . IFE umożliwia nie tylko wykrycie białka M, ale również jego identyfikację pod względem klasy i typu [11, 51, 52]. W diagnostyce gammapatii monoklonalnych wykorzystywane są testy do ilościowego oznaczania stężenia sFLC przy użyciu zestawów nefelometrycznych i turbidymetrycznych. Zalecenia Międzynarodowej Grupy Roboczej ds. Szpiczaka (IMGW; *International Myeloma Working Group*) sformułowane na przełomie ostatnich kilkunastu lat, opierają się na badaniach wykonanych przy wykorzystaniu testów Freelite® firmy Binding Site, które stanowią dwa odrębne testy immunodiagnostyczne. Jeden z nich przeznaczony jest do oznaczania wolnych łańcuchów κ , a drugi – łańcuchów λ . W oznaczeniach stosowane są poliklonalne przeciwciała opłaszczane na cząstkach lateksu, które swoiście wiążą się z wolnymi łańcuchami, natomiast nie rozpoznają lekkich łańcuchów, które związane są z łańcuchami ciężkimi [27]. Stwierdzenie obecności FLC przy zastosowaniu testów Freelite® jest możliwe, gdy ich stężenie w surowicy wynosi co najmniej 3 mg/l (odpowiednio w moczu – ok. 5-krotnie mniej), a zakres oznaczalności szacowany jest na 1-100000 mg/l [46]. Zakresy wartości referencyjnych łańcuchów κ i λ zostały ustalone przez Katzmanna i wsp. na podstawie oznaczeń w próbkach surowic pozyskanych od 282 zdrowych dawców w wieku od 21-90 lat. 95% zakres referencyjny dla wolnych łańcuchów κ wyniósł 3,3 – 19,4 mg/l, a dla łańcuchów λ 5,7-26,3 mg/l [31]. Interpretacja zarówno stężeń sFLC, jak i stosunku κ/λ wymaga jednak uwzględnienia kilku istotnych aspektów. Katzmann i wsp. zauważył, że w populacji ogólnej stężenia łańcuchów κ są zwykle niższe niż łańcuchów λ , a średnia stosunku κ/λ wyniosła 0,59. Wynika to z istotnie szybszego nerkowego metabolizmu łańcuchów κ , który pomimo ich ok. dwukrotnie intensywniejszej produkcji, w ostateczności doprowadza do osiągnięcia niższych surowicznych stężeń. Ponadto, zaobserwowano, że u osób starszych stężenia sFLC wykazują wyższe wartości, co najprawdopodobniej wynika ze zmniejszenia eGFR wraz z wiekiem. Ponadto, infekcje, stany zapalne, czy pogorszenie funkcji nerek prowadzą do zwiększenia stężeń zarówno łańcuchów κ i λ (łańcuchy poliklonalne), z zachowaniem prawidłowej lub nieznacznie podwyższonej wartości stosunku κ/λ . W wyniku uszkodzenia funkcji nerek dochodzi do wydłużenia średniego czasu półtrwania FLC we krwi obwodowej. Ich nerkowy klirens (zarówno łańcuchów κ , jak i λ) istotnie się zmniejsza, a stężenie we krwi w większym stopniu zależy od samej produkcji niż eliminacji. W związku z tym, że liczba komórek plazmatycznych produkujących łańcuchy κ jest ok. dwukrotnie większa, ich stężenie we krwi obwodowej pacjentów z upośledzoną funkcją nerek wykazuje wyższe wartości niż w populacji ogólnej. W grupie chorych z obniżoną wartością eGFR zalecane jest zatem wykorzystanie zmodyfikowanego zakresu stosunku stężeń κ/λ , który oszacowano na 0,37-3,1 [46, 52, 53].

Parametrami rutynowo wykorzystywanymi zarówno w diagnostyce, jak i monitorowaniu leczenia, są stężenia FLC (κ i λ) i wartość stosunku stężeń κ/λ . Natomiast niektóre ośrodki, szczególnie te biorące udział w badaniach klinicznych, uwzględniają również dodatkowe wskaźniki:

- iFLC (involved FLC) – wolne łańcuchy lekkie związane z procesem nowotworowym, tzn. produkowane przez nowotworowy klon plazmocytołów lub limfocytołów B
- unFLC (uninvolved FLC) – wolne łańcuchy lekkie niezwiązane z procesem nowotworowym
- dFLC (iFLC – unFLC) – różnica między stężeniem łańcuchów zaangażowanych w proces nowotworowy i niezaangażowanych
- Σ FLC – suma stężeń wolnych łańcuchów κ i λ [46].

FLC w diagnostyce i monitorowaniu AL amyloidozy

Przeprowadzono wiele analiz, w których porównywano moc diagnostyczną badań elektroforetycznych i oznaczania stężeń sFLC w diagnostyce AL amyloidozy. Katzmann i wsp. w badaniach nad grupą 581 nowo zdiagnozowanych pacjentów wykazał, że czułość stężeń sFLC w diagnostyce układowej amyloidozy pierwotnej wynosi 88,3%; po włączeniu do panelu diagnostycznego immunofiksacji białek surowicy – wzrasta do 97,1%. Dodatkowe wykonanie immunofiksacji białek w moczu zwiększa czułość diagnostyczną aż do 98,1% [26]. Z kolei w badaniach Palladini'ego i wsp. w grupie 121 pacjentów z rozpoznaną AL amyloidozą wykazano, że czułość stosunku stężeń κ/λ wynosi 76%, w porównaniu z czułością immunofiksacji białek surowicy i moczu ocenianą na 96%. W omawianej analizie porównano również czułość stosunku κ/λ w zależności od rodzaju łańcucha zaangażowanego; w przypadku pacjentów z rozrostem nowotworowym κ wynosiła ona 97%, a w przypadku pacjentów z rozrostem λ – 69% [54]. Liczne badania oceniające moc diagnostyczną wartości stosunku κ/λ w diagnostyce AL amyloidozy wykazały, że jego czułość oscyluje w zakresie od 75% do 98%. Nieprawidłowy wskaźnik κ/λ wykazywał niekiedy wyższą czułość diagnostyczną niż kombinacja immunofiksacji białek surowicy i moczu (98% vs. 79%), czego w innych publikacjach nie potwierdzono. Nie mniej jednak jest to wskaźnik stanowiący cenne narzędzie diagnostyki „klonalności” wolnych lekkich łańcuchów u pacjentów z AL amyloidozą [32, 55, 56, 57].

Badania Kumara i wsp. wykazały, że mediana stężeń zaangażowanych FLC κ i λ u pacjentów z AL amyloidozą wynosi odpowiednio 314 mg/l vs. 194 mg/l i jest istotnie niższa niż u pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym. Dodatkowo, w nielicznych przypadkach immunofiksacja białek moczu może wykazywać obecność białka monoklonalnego, przy jednoczesnym prawidłowym stosunku stężeń κ/λ . Jest to związane zwykle z różnicami czasowymi pobrania moczu i surowicy pacjenta [46, 58].

Wytyczne IMWG z 2009 r. i Brytyjskiego Komitetu Standardów w Hematologii (*British Committee for Standards in Haematology*) z 2015 r. rekomendują oznaczanie stężenia sFLC w kombinacji z immunofiksacją białek surowicy i moczu u wszystkich pacjentów z podejrzeniem AL amyloidozy [27, 59]. Stężenie sFLC wykorzystywane jest nie tylko w rozpoznawaniu amyloidozy pierwotnej, ale stanowi również cenny wskaźnik prognostyczny i jest parametrem zalecanym przez IMWG do oceny średniego czasu przeżycia pacjentów [59]. Badania Kumara i wsp. nad grupą 730 pacjentów ze zdiagnozowaną AL amyloidozą wykazały, że mediana przeżycia u chorych z prawidłowym stosunkiem κ/λ w momencie rozpoznania była istotnie wyższa niż u pacjentów z jego nieprawidłową wartością; odpowiednio 63,6 vs. 16,2 mies [58]. Parametrem

prognostycznym jest również wartość dFLC, stanowiąca różnicę między stężeniem łańcuchów zaangażowanych i niezaangażowanych, na którym obok stężenia Tn i NT-pro BNP opiera się aktualnie obowiązująca klasyfikacja rokownicza Kumara i wsp. Wyznaczony punkt odcięcia w ocenie stadium zaawansowania choroby stanowi wartość dFLC wynosząca 180 mg/l [45]. Potwierdzono, że całkowity czas przeżycia pacjentów z początkową wartością dFLC niższą niż 196 mg/l był istotnie dłuższy niż chorych z dFLC przekraczającą 196 mg/l; odpowiednio 37,1 vs. 10,9 mies. [60]. Wartość dFLC w analizie wieloczynnikowej okazała się niezależnym prognostycznym wskaźnikiem przeżycia pacjentów z AL amyloidozą. Dodatkowo, wykazano, że wysokie wartości dFLC w momencie rozpoznania związane są z gorszym rokowaniem wśród pacjentów poddawanych transplantacji komórek macierzystych [45, 61]. Interesujący jest również fakt wskazujący, że pacjenci z wartością dFLC >196 mg/l w momencie rozpoznania częściej wykazywali zajęcie mięśnia sercowego przez amyloid, co manifestowało się m.in. wyższymi stężeniami parametrów sercowych: troponin i NT-pro BNP. Z diagnostycznego punktu widzenia uzasadniona wydaje się również próba oceny zależności między stężeniem sFLC, a parametrami laboratoryjnymi i echokardiograficznymi oceniającymi stan mięśnia sercowego w grupie pacjentów z AL amyloidozą, ze szczególnym uwzględnieniem związku między rodzajem łańcucha monoklonalnego tworzącego amyloid (κ i λ), a stopniem nasilenia dysfunkcji serca. Stanowiłoby to niejako próbę wyboru łańcucha, który mógłby okazać się bardziej niekorzystnym wskaźnikiem rokowniczym. Serce bowiem stanowi narząd, którego zajęcie przez włókna amyloidu wykazuje największy wpływ na sposób leczenia i całkowite przeżycie pacjentów. Ciekawym zagadnieniem wydaje się zależność funkcji i stopnia uszkodzenia mięśnia sercowego nie tylko od zgromadzonego w sercu amyloidu, ale również od krążących we krwi obwodowej jego prekursorów – zaangażowanych łańcuchów monoklonalnych. Badania kliniczne Rappezzie'go i wsp. wykazały brak korelacji pomiędzy ilością włókien amyloidowych obecnych w mięśniu sercowym i stopniem jego uszkodzenia, a co za tym idzie – średnią długością przeżycia pacjentów [62]. Z kolei Palladini i wsp. potwierdzili, że zmniejszenie w wyniku zastosowanego leczenia stężenia „krążących” łańcuchów monoklonalnych u pacjentów z AL amyloidozą prowadzi do spadku stężenia NT-pro BNP i przedłużenia całkowitego przeżycia chorych, niezależnie od wielkości amyloidowych depozytów w sercu [63]. Na podstawie klinicznych obserwacji wysnuto hipotezę, że monoklonalne wolne łańcuchy lekkie mogą wykazywać u pacjentów z amyloidozą pierwotną bezpośredni toksyczny wpływ na komórki miokardium. Jedno z pierwszych badań potwierdzających bezpośredni kardiotoxyczny wpływ łańcuchów lekkich immunoglobulin przeprowadził Liao i wsp. w 2001 r. W opisywanej analizie przedstawiono, że wyizolowanie FLC od pacjentów z AL amyloidozą (w odróżnieniu od FLC wyizolowanych z krwi pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym) i wszczepienie ich do serca myszy, skutkowało pojawieniem się objawów dysfunkcji rozkurczowej [64]. Z kolei badania Brennera i wsp. wykazały, że nawet niskie stężenia sFLC pochodzące od pacjentów z kardiomiopatią w przebiegu AL amyloidozy, wywoływały *in vitro* nasilenie stresu oksydacyjnego w wyizolowanych kardiomiocytach, np. poprzez

zwiększenie ilości reaktywnych form tlenu (ROS) i zaburzenie równowagi między reakcjami redox i utleniania. Skutkowało to m.in. upośledzeniem kurczliwości i relaksacji komórek mięśnia serca. Co warto zaznaczyć, były to zmiany niezależne od ilości włókien i depozytów amyloidowych, wynikały tylko i wyłącznie z interakcji pomiędzy wolnymi „amyloidogennymi” FLC i kardiomiocytami [65]. Badania Shi i wsp. przyniosły więcej informacji na temat samego patomechanizmu stresu oksydacyjnego wywołanego przez FLC. W przytoczonej pracy wskazano, że FLC wyizolowane od pacjentów z AL amyloidozą z zajęciem serca nasilają stres oksydacyjny, dysfunkcję i apoptozę kardiomiocytów poprzez aktywację kinazy MAPK p38 [66]. Kinazy aktywowane mitogenami (MAPK; *mitogen activated protein kinase*) stanowią kinazy białkowe wykazujące aktywność serynowo–treoninową, a ich główną rolą jest regulacja wielu kluczowych procesów komórkowych, takich jak: transkrypcja genów, synteza białek, podziały i różnicowanie komórek, jak również ich przeżycie i apoptoza. Grupę MAPK tworzą trzy główne kinazy: ERK1/2, JNK 1-3 i wspomniana p38 MAPK. Ich aktywacja następuje w wyniku podwójnej fosforylacji treoniny i tyrozyny w tzw. pętli aktywacyjnej. Aktywacja MAPK skutkuje nasileniem procesów zapalnych, różnicowania, proliferacji i apoptozy komórek. W standardowych warunkach p38 MAPK aktywowana jest poprzez MKK3 i MKK6 (*mitogen-activated protein kinase kinase*) [67]. Shi i wsp. wykazali, że fosforylacja p38 MAPK zainicjowana przez FLC u pacjentów z AL amyloidozą serca, nie przebiega z udziałem MKK3/6, lecz za pośrednictwem odmiennego procesu fosforylacji, w którym uczestniczy TAB1 (*transforming growth factor β -activated protein kinase-1 binding protein-1*). Na podstawie omawianych badań, potwierdzono, że kinaza p38 MAPK może stanowić kluczowy mediator w patogenezie dysfunkcji mięśnia sercowego u pacjentów z AL amyloidozą. Jednocześnie wskazano, że zastosowanie selektywnych inhibitorów tej kinazy (SB203580) mogłoby ograniczyć następstwa stresu oksydacyjnego w komórkach zainicjowane przez działanie amyloidogennych, kardiotoksycznych FLC u chorych z amyloidozą pierwotną [66]. Bezpośredni efekt toksyczny wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin na komórki mięśnia sercowego u chorych na AL amyloidozę potwierdzono również w badaniach Sikkink i wsp [68]. W odniesieniu do innych typów amyloidoz (np. amyloidozy transtyretynowej) wykazano, że również inne formy pośrednie włókien amyloidowych (oligomery) wywołują efekt toksyczny na komórki i tkanki [69, 70]. Odmienne wnioski natomiast zostały sformułowane na podstawie badań McWilliams-Koeppen H. P. i wsp. W przytoczonej analizie wykazano, że to głównie włókna amyloidowe, a nie postacie monomeryczne, istotnie pogarszają metabolizm sercowy w sposób zależny od dawki, m.in. poprzez zmniejszenie aktywności enzymatycznej komórkowej NADPH – zależnej od oksydoreduktaz; nie inicjując jednak śmierci komórki. W opisywanym badaniu potwierdzono wpływ fibryli amyloidowych na zwiększone zużycie tlenu przez kardiomiocyty i nasilone powstawanie reaktywnych form tlenu. Ponadto, wstępnie zasugerowano, że toksyczny wpływ postaci monomerycznych wymaga ich wnikięcia do komórki i internalizacji z lizosomami, zaś postacie włóknikowe amyloidu inicjują „procesy kardiotoksyczności” już na powierzchni komórek, w wyniku interakcji

ze strukturalnymi elementami powierzchniowymi komórki, np. z proteoglikanami [71].

Podsumowanie

Pierwotna układowa amyloidoz łańcuchów lekkich w większości przypadków jest rozpoznawana zbyt późno, głównie ze względu na bardzo różnorodny i niejasny obraz kliniczny, zróżnicowany przebieg i ograniczoną dostępność niezbędnych metod diagnostycznych. Szybkie i rzetelne rozpoznanie AL amyloidozy musi opierać się na współpracy lekarzy wielu specjalności, z jednoczesnym wykorzystaniem odpowiedniego zaplecza laboratoryjnego; szczególnie jest to istotne w przypadku pacjentów z III i IV stopniem zaawansowania klinicznego wg Kumara i wsp., dla których mediany całkowitego przeżycia oceniane są odpowiednio na 14,0 i 5,8 miesięcy [45]. Kluczowa zatem jest możliwość oceny zajęcia serca przez amyloid nie tylko na podstawie nieswoistych objawów klinicznych, badań obrazowych, ale również badań laboratoryjnych. Standardowymi laboratoryjnymi „parametrami sercowymi”, wykorzystywanymi w klasyfikacji rokowniczej AL amyloidozy, są stężenia troponin i NT-pro BNP. Interesująca wydaje się również bezpośrednia zależność między uszkodzeniem i dysfunkcją mięśnia sercowego, a „prekursorami” amyloidu – monoklonalnymi łańcuchami lekkimi immunoglobulin. Udowodniono, że stężenie sFLC jest silnym predyktorem przeżycia pacjentów z rozpoznaną AL amyloidozą [58]. Jednocześnie nie wykazano korelacji między stopniem uszkodzenia narządów, a ilością zdeponowanego w nich amyloidu. Co nasuwa podejrzenie, że nie tylko złogi amyloidu, ale również ich prekursorzy odgrywają istotną rolę w rozwoju dysfunkcji narządowej, w tym mięśnia sercowego. W analizie bezpośredniego związku między lekkimi wolnymi łańcuchami immunoglobulin, a stanem mięśnia sercowego istotna jest ocena mocy diagnostycznej (m.in. czułości i swoistości diagnostycznej, wartości predykcyjnej wyniku dodatniego i ujemnego) nie tylko ich stężeń, ale również wartości stosunku stężeń κ/λ i wartości dFLC. Kluczowa również wydaje się ocena wpływu dysfunkcji nerek na wiarygodność diagnostyczną ww. parametrów, ponieważ zmniejszenie wartości eGFR związane jest ze zwiększeniem stężenia wolnych łańcuchów poliklonalnych, niezwiązanych z procesem nowotworowym, których stężenie wykorzystywane jest zarówno do wyliczenia stosunku stężeń κ/λ , jak i wartości dFLC.

Piśmiennictwo

1. Antczak A. Amyloidoz nerek. W: Myśliwiec M (red). Wielka interna – Nefrologia. Medical Tribune, Warszawa 2016.
2. Kidd J, Carl DE. Renal amyloidosis. *Current problems in cancer* 2016; 40.
3. Jurczyszyn A, Skotnicki AB. Postępy w badaniach nad molekularną patogenezą amyloidozy oraz implikacje kliniczne. *Adv Clin Exp Med*, 2004; 13: 669–676.
4. M. Kościelska, Shebani Z, Matuszkiewicz-Rowińska J. Amyloidoz nerek. *Przegląd Lekarski* 2013; 70.
5. Sipe JD1, Benson MD, Buxbaum JN et al: Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid* 2014; 21: 221–224.
6. Wechalekar AD, Gillmore JD, Hawkins PN. Systemic amyloidosis. *Lancet* 2016; 25: 2641–2654.
7. Dispenzieri A, Gertz MA, Buadi F. What do I need to know about immunoglobulin light chain (AL) amyloidosis? *Blood Rev* 2012; 26: 137–154.
8. Dmoszyńska A, Walter-Croneck A, Pieńkowska-Grela B. Zalecenia Polskiej Grupy

- Szpiczakowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocytoowego oraz innych dyskrazji plazmocytoowych na rok 2016. *Acta Haematologica Polonica* 2016; 2: 39–85.
9. Dispenzieri A, Buadi F, Kumar SK, et al: Treatment of Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis: Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Statement. *Mayo Clin Proc* 2015; 90: 1054-1081.
 10. Jędrzejczak WW. Zasady rozpoznawania i leczenia amyloidozy AL. *Acta Haematologica Polonica* 2009; 2: 363–367.
 11. Charliński G, Jędrzejczak WW. Pierwotna układowa amyloidoza łańcuchów lekkich: diagnostyka i leczenie. W: Dmoszyńska A, Giannopoulos K (red). Szpiczak plazmocytoowy i inne dyskrazje plazmocytoowe. Czelej 2015.
 12. Sanchorawala V. Light-chain (AL) amyloidosis: diagnosis and treatment. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 1331-1341.
 13. Abraham RS, Geyer SM, Price-Troska TL, et al: Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis (AL). *Blood* 2003; 101(10): 3801-3808.
 14. Zhou P, Hoffman J, Landau H, et al. Clonal plasma cell pathophysiology and clinical features of disease are linked to clonal plasma cell expression of cyclin D1 in systemic light-chain amyloidosis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2012; 12: 49-58.
 15. Merlini G, Comenzo RL, Seldin DC, et al. Immunoglobulin light chain amyloidosis. *Expert Rev Hematol* 2014; 7: 143-156.
 16. Poshusta TL, Sikkink LA, Leung N, et al. Mutations in specific structural regions of immunoglobulin light chains are associated with free light chain levels in patients with AL amyloidosis. *PLoS One* 2009; 4: e5169.
 17. Sucker C, Hetzel GR, Grabensee B, et al. Amyloidosis and bleeding: pathophysiology, diagnosis, and therapy. *Am J Kidney Dis* 2006; 47: 947-955.
 18. Soares SM, Fervenza FC, Lager DJ, et al. Bleeding complications after transcutaneous kidney biopsy in patients with systemic amyloidosis: single-center experience in 101 patients. *Am J Kidney Dis* 2008; 52: 1079-1083.
 19. Foli A, Palladini G, Caporali R, et al: The role of minor salivary gland biopsy in the diagnosis of systemic amyloidosis: results of a prospective study in 62 patients. *Amyloid* 2011; 18(Suppl 1): 80-82.
 20. Westermarck P, Davey E, Lindbom K, Enqvist S. Subcutaneous fat tissue for diagnosis and studies of systemic amyloidosis. *Acta Histochem* 2006; 108: 209-213.
 21. Lavatelli F, Albertini R, Di Fonzo A, et al. Biochemical markers in early diagnosis and management of systemic amyloidosis. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52: 1517-1531.
 22. Picken MM. Amyloidosis-where are we now and where are we heading? *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 545-551.
 23. Picken MM. New insights into systemic amyloidosis: the importance of diagnosis of specific type. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16: 196-203.
 24. Kyle RA, Gertz MA. Amyloidosis. *Systemic Diseases and the Kidney*. Chapter. <http://www.kidneyatlas.org/book4/adk4-03.pdf>.
 25. Serum Free Light Chain Analysis plus Heavylite. 7th Edition, The Binding Site Group Ltd, Birmingham, UK 2015.
 26. Katzmann JA. Screening panels for monoclonal gammopathies: time to change. *Clin Biochem Rev* 2009; 30: 105-111.
 27. 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.
 28. Shaheen SP, Levinson SS. Serum free light chain analysis may miss monoclonal light chains that urine immunofixation electrophoreses would detect. *Clin Chim Acta* 2009; 406: 162-166
 29. Charliński G, Juryszczyn A, Jędrzejczak WW. Pierwotna, układowa amyloidoza łańcuchów lekkich– objawy kliniczne, aktualna diagnostyka i leczenie. *Przegląd Lekarski* 2014; 2: 102-109.
 30. Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2013 update on diagnosis, prognosis, and treatment. *Am J Hematol* 2013; 88: 416-425.
 31. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, 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: 1437-1444.
 32. Katzmann JA, Abraham RS, Dispenzieri A, et al. Diagnostic performance of quantitative kappa and lambda free light chain assays in clinical practice. *Clin Chem* 2005; 51: 878-81.
 33. Akar H, Seldin DC, Magnani B, et al. Quantitative serum free light chain assay in the diagnostic evaluation of AL amyloidosis. *Clin Chem* 2005; 51: 878-881.
 34. Swan N, Skinner M, O'Hara CJ. Bone marrow core biopsy specimens in AL (primary) amyloidosis. A morphologic and immunohistochemical study of 100 cases. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 610-616.
 35. Guan J, Mishra S, Falk RH, Liao R. Current perspectives on cardiac amyloidosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302: H544-552.
 36. Olesińska M, Jankowska EA, Sukiennik-Kujawa M, et al. Amyloidoza pierwotna AL z zajęciem serca. *Folia Cardiologica Excerpta* 2012; 7: 194-200.
 37. Żelichowski G. Diagnostyka amyloidozy układu sercowo–naczyniowego. *Choroby Serca i Naczyń* 2010; 7: 40–48.
 38. Desport E, Bridoux F, Sirac Ch, et al: AL Amyloidosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2012; 7: 54.
 39. Selvanayagam JB, Hawkins PN, Paul B, et al. Evaluation and management of the cardiac amyloidosis. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 2101-2110.
 40. Jurczyszyn A. Engel A, Rajzer M i wsp. Najnowsze postępy w rozpoznawaniu i leczeniu amyloidozy serca. *Przegląd Lekarski* 2014; 71: 340-345.
 41. Rodney HF. Diagnosis and Management of the Cardiac Amyloidosis. *Circulation* 2005; 112: 2047-2060.
 42. Shah KB, Inoue Y, Mehra MR. Amyloidosis and the heart: a comprehensive review. *Arch Intern Med* 2006; 166: 1805-1813.
 43. Falk RH, Dubrey SW. Amyloid heart disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2010; 52: 347-361.
 44. Mueller PS, Edwards WD, Gertz MA. Symptomatic ischemic heart disease resulting from obstructive intramural coronary amyloidosis. *Am J Med* 2000; 109: 181-188.
 45. Kumar S, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al: Revised prognostic staging system for light chain amyloidosis incorporating cardiac biomarkers and serum free light chain measurements. *J Clin Oncol* 2012; 30: 989-995.
 46. Serum Free Light Chain Analysis plus Heavylite. 7th Edition, The Binding Site Group Ltd, Birmingham, UK 2015.
 47. Usnarska-Zubkiewicz L, Hołojda J, Kuliczowski K. Wolne łańcuchy lekkie w surowicy – znaczenie diagnostyczne i prognostyczne w dyskrazjach plazmocytoowych. *Acta Haematologica Polonica* 2009; 40: 2.
 48. Dimopoulos MA, Kastritis E, Rosinol L, et al. Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia* 2008; 22: 1485-1493.
 49. Jones HB. On the new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium. *Phil. Trans. R. Soc Lond* 1848; 138: 55-62.
 50. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al: Highly sensitive automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001; 47: 673-680.
 51. Jenner E. Serum free light chains in clinical laboratory diagnostics. *Clin Chim Acta* 2014; 427: 15-20.
 52. Bhole MV, Sadler R, Ramasamy K. Serum– free light– chain assay: clinical utility and limitations. *Ann Clin Biochem* 2014; 51: 528-542.
 53. Hutchison CA, Harding S, Hewins P, et al: Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 1684-1690.
 54. Palladini G, Russo P, Bosoni T, et al. Identification of amyloidogenic light chains requires the combination of serum-free light chain assay with immunofixation of serum and urine. *Clin Chem* 2009; 55: 499-504.
 55. Abraham RS, Katzmann JA, Clark RJ, et al. Quantitative analysis of serum free light chains. A new marker of the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 274-278.
 56. Lachmann HJ, Gallimore R, Gillmore JD, et al. Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating free immunoglobulin light chains following chemotherapy. *Br J Haematol* 2003; 122: 78-84.
 57. Bochtler T, Hegenbart U, Heiss C, et al. Evaluation of the serum-free light chain test in untreated patients with AL amyloidosis. *Haematologica* 2008; 93: 459-462.
 58. Kumar S, Dispenzieri A, Katzmann JA. Serum immunoglobulin free light chain measurement in AL amyloidosis: prognostic value and correlations with clinical features. *Blood* 2010; 116: 5126-5129.
 59. Gillmore JD, Wechalekar A, Bird J. Guidelines of the diagnosis and investigation of AL amyloidosis. *Br J Haematol* 2015; 168: 207-218.
 60. Kristen AV, Giannitsis E, Lehrke S, et al: Assessment of disease severity and outcome in patients with systemic light-chain amyloidosis by the high-sensitivity troponin T assay. *Blood* 2010; 116: 2455-2461.
 61. Dispenzieri A, Lacy MQ, Katzmann JA, et al: Absolute values of immunoglobulin free light chains are prognostic in patients with primary systemic amyloidosis

- undergoing peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2006; 107: 3378-3383.
62. Rapezzi C, Merlini G, Quarta CC, et al: Systemic cardiac amyloidosis: disease profiles and clinical courses of the 3 main types. *Circulation* 2009; 120: 1203-1212.
 63. Palladini G, Lavatelli F, Russo P, et al: Circulating amyloidogenic free light chains and serum N-terminal natriuretic peptide type B decrease simultaneously in association with improvement of survival in AL. *Blood* 2006; 107: 3854-3858.
 64. Liao R, Jain M, Teller P, et al: Infusion of light chains from patients with cardiac amyloidosis causes diastolic dysfunction in isolated mouse hearts. *Circulation* 2001; 104: 1594-1597.
 65. Brenner DA, Jain M, Pimentel DR, et al: Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress. *Circ Res* 2004; 94: 1008-1010.
 66. Shi J, Guan J, Jiang B, et al: Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38alpha MAPK pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 4188-4193.
 67. Bryk D, Olejarz W, Zapolska-Downar D. Kinazy aktywowane mitogenami i ich znaczenie w patogenezie miażdżycy. *Postepy Hig Med Dosw* 2014; 68: 10-22.
 68. Sikkink LA, Ramirez-Alvarado M. Cytotoxicity of amyloidogenic immunoglobulin light chain in cell culture. *Cell Death Dis* 2010; 1: e98.
 69. Reixach N, Deechongkit S, Jiang X, et al. Tissue damage in amyloidosis: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2817-2822.
 70. Sörgjerd K, Klingstedt T, Lindgren M, et al. Prefibrillar transthyretin oligomers and cold stored native tetrameric transthyretin are cytotoxic in cell culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377: 1072-1078.
 71. McWilliams-Koeppen HP, Foster JS, Hackenbrack N, et al: Light Chain Amyloid Fibrils Cause Metabolic Dysfunction in Human Cardiomyocytes. *PLoS One* 2015; 10: e0137716.
 72. Dispenzieri A, Gertz MA, Kyle RA, et al: Serum cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide: a staging system for primary systemic amyloidosis. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3751-3757.
 73. Wechalekar AD, Schonland SO, Kastritis E, et al: A European collaborative study of treatment outcomes in 346 patients with cardiac stage III AL amyloidosis. *Blood* 2013; 121: 3420-3427.
 74. Palladini G, Milani P, Foli A, et al: Oral melphalan and dexamethasone grants extended survival with minimal toxicity in AL amyloidosis: long-term results of a risk-adapted approach. *Haematologica* 2014; 99: 743-750.
 75. Palladini G, Hegenbart U, Milani P, et al: A staging system for renal outcome and early markers of renal response to chemotherapy in AL amyloidosis. *Blood* 2014; 124: 2325-2332.

Autor do korespondencji:

dr Emilia Czyżewska
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Wydziału Nauki o Zdrowiu
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Laboratorium Centralne SP CSK
02- 097 Warszawa, ul Banacha 1a
Tel. +48 22 5992353
e-mail: emiliaciach@wp.p

Otrzymano: 29.05.2017
Akceptacja do druku: 30.09.2017

Konflikt interesów: nie zgłoszono