

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Anna Dyrka

**OCENA TESTU FREELITE[®] - ILOŚCIOWEGO OZNACZENIA
WOLNYCH ŁAŃCUCHÓW LEKKICH IMMUNOGLOBULIN DO
WYKRYWANIA I MONITOROWANIA GAMMAPATII
MONOKLONALNYCH W PORÓWNANIU Z METODAMI
ELEKTROFORETYCZNYMI U PACJENTÓW
ZE SZPICZAKIEM MNOGIM.**

Praca doktorska

Promotor: Dr hab. Ryszard Drożdż

Praca wykonana w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Katedry
Biochemii Klinicznej Collegium Medicum Uniwersytetu
Jagiellońskiego w Krakowie

Kierownik Zakładu: Dr hab. n. med. Bogdan Solnica

Kraków 2012

*Składam serdeczne podziękowania
promotorowi pracy Docentowi Ryszardowi
Drożdżowi za opiekę naukową, pomoc i cenne uwagi.
Pragnę również podziękować pracownikom
Kliniki Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego
w Krakowie za pomoc w dostępie do potrzebnych
materiałów oraz okazaną życzliwość.*

SPIS TREŚCI:

Wykaz skrótów i pojęć:.....	6
1 Wstęp.....	8
1.1 Gammapatie monoklonalne	8
1.1.1 Historia odkrycia szpiczaka mnogiego.....	9
1.1.2 Manifestacje kliniczne gammapatii monoklonalnych	11
1.2 Diagnostyka gammapatii monoklonalnych	16
1.2.1 Metody elektroforetyczne	17
1.2.1.1 Elektroforeza białek surowicy.....	17
1.2.1.2 Immunofiksacja surowicy	20
1.2.1.3 Elektroforeza białek moczu	22
1.2.2 Metody immunochemiczne	23
1.2.2.1 Ilościowe oznaczanie podstawowych klas immunoglobulin ...	23
1.2.2.2 Wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin (FLCs).....	24
1.2.2.3 Łańcuchy ciężkie immunoglobulin.....	25
1.2.3 Zróżnicowanie czułości analitycznej testów diagnostycznych służących do wykrywania gammapatii monoklonalnych	26
1.3 Algorytmy diagnostyczne pozwalające na wykrycie gammapatii monoklonalnych.....	28
2 Założenia i cel pracy	33
3 Pacjenci, materiały i metody	35
3.1 Ogólna charakterystyka pacjentów	35
3.2 Charakterystyka grupy badanej	35

3.3	Materiały	40
3.4	Metody oznaczeń immunologicznych i biochemicznych	40
3.4.1	Ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy i moczu (oznaczenia immunochemiczne)	40
3.4.2	Rozdział elektroforetyczny białek surowicy	40
3.4.3	Immunofiksacja surowicy.....	41
3.4.4	Rozdział elektroforetyczny białek moczu	41
3.4.5	Ilościowe oznaczanie białka całkowitego w moczu.....	41
3.4.6	Oznaczanie stężenia łańcuchów lekkich immunoglobulin (oznaczenia immunochemiczne).....	42
3.4.7	Oznaczanie stężenia podstawowych klas immunoglobulin – IgG, IgA, IgM w surowicy	42
3.4.8	Oznaczanie stężenia beta-2-mikroglobuliny w surowicy.....	43
3.4.9	Wykrywanie obecności oligomerów wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu metodą HPLC	43
3.5	Metody statystyczne.....	43
4	Wyniki i dyskusja.....	44
4.1	Ocena czułości wybranych metod pozwalających na wykrycie białka monoklonalnego	54
4.1.1	Ocena czułości testów diagnostycznych służących do oceny zaburzeń białkowych.....	55
4.1.2	Ocena czułości różnych kombinacji testów diagnostycznych służących do oceny zaburzeń białkowych.....	62
4.2	Ocena współzależności stężenia beta-2-mikroglobuliny i stosunku wolnych łańcuchów lekkich (FLCr) w surowicy	71

4.3	Ocena nowego testu FreeLite®- ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich typu kappa oraz lambda w surowicy	77
4.3.1	Niespójności diagnostyczne i analityczne dotyczące ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin	79
4.3.1.1	Niespójności diagnostyczne związane z ilościowym oznaczaniem wolnych łańcuchów lekkich.....	80
4.3.1.2	Niespójności analityczne dotyczące ilościowego oznaczania FLCs w surowicy metodą nefelometryczną oraz technikami elektroforetycznymi.....	85
4.3.1.3	Niespójności analityczne dotyczące ilościowego oznaczania FLCs w surowicy oraz ilościowego oznaczania całkowitych łańcuchów lekkich w surowicy	88
4.3.1.4	Niespójności analityczne dotyczące ilościowego oznaczania FLCs w moczu oraz ilościowego oznaczania całkowitych łańcuchów lekkich w moczu	92
4.3.1.5	Analiza wzajemnej zależności stężeń poliklonalnych całkowitych oraz wolnych łańcuchów lekkich w moczu.	94
4.3.2	Niespójności diagnostyczne i analityczne dotyczące ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin – dyskusja wyników	96
5	Podsumowanie	107
6	Wnioski	111
7	Streszczenie	113
8	Summary.....	116
9	Piśmiennictwo	118

WYKAZ SKRÓTÓW I POJĘĆ:

MGUS - (*monoclonal gammopathies of undetermined significance*) gammopatie monoklonalne o nieustalonym znaczeniu

MM - (*multiple myeloma*) szpiczak mnogi

SPE - (*serum protein electrophoresis*) rozdział elektroforetyczny białek surowicy

UPE - (*urine protein electrophoresis*) rozdział elektroforetyczny białek moczu

FLC - (*free light chains*) wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin

TLC - (*total light chains*) całkowite łańcuchy lekkie

IFE - (*immunofixation electrophoresis*) immunofiksacja

FLCr - (*FLC ratio*) stosunek stężenia wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda

HLC - (*Hevylite - heavy chain/light chain immunoassays*) łańcuchy ciężkie

SMM - (*smouldering multiple myeloma*) szpiczak bezobjawowy

NSMM – (*nonsecretory multiple myeloma*) szpiczak nie wydzielający

NPMM – (*nonproducing multiple myeloma*) szpiczak niewytwarzający

HRE - rozdziały elektroforetyczne na podłożach o podwyższonej rozdzielczości

MRI - rezonans magnetyczny

CT - tomografia komputerowa

PET - emisyjna tomografia pozytonowa

PET/CT - emisyjna tomografia pozytonowa w połączeniu z tomografią komputerową

niespójności (niezgodności) diagnostyczne – zdefiniowano, jako takie, w których jeden z elementów składających się na obraz gammapatii monoklonalnej jest niespójny z innymi.

niespójności (niezgodności) analityczne – brak zgodności pomiędzy wynikami ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich uzyskanymi różnymi metodami oraz wewnątrz metody nefelometrycznej

1 WSTĘP

1.1 Gammapatie monoklonalne

Gammapatie monoklonalne jest to grupa chorób spowodowanych nowotworowym rozrostem komórek plazmatycznych, produkujących i wydzielających do osocza immunoglobuliny lub fragmenty immunoglobulin. Pierwotną przyczyną gammapatii monoklonalnych jest nowotworowy rozrost klonu komórek produkujących jednorodne białko, którego obecność we krwi można wykryć dokonując rozdziału elektroforetycznego białek surowicy. Białko to zwane białkiem monoklonalnym najczęściej lokalizuje się w rozdzielach elektroforetycznych w obszarze wędrowania gammaglobulin. Zmienione nowotworowo komórki plazmatyczne podobnie jak analogiczne komórki prawidłowe mogą produkować kompletne immunoglobuliny jednej z wybranych klas (IgG, IgA, IgM) lub tylko fragmenty cząsteczki immunoglobulin (łańcuchy lekkie, łańcuchy ciężkie). W miarę rozwoju choroby ekspansja jednorodnych komórek plazmatycznych produkujących kompletną immunoglobulinę powoduje, że białko monoklonalne staje się dominującą frakcją wśród białek surowicy oraz następuje wzrost całkowitego stężenia białka w osoczu. Mówimy wtedy o hipergammaglobulinemii monoklonalnej. Jeżeli nowotworowe plazmocyty produkują fragmenty immunoglobulin (łańcuchy lekkie, łańcuchy ciężkie), które są usuwane z osocza na drodze filtracji kłębuszkowej, obecność białka monoklonalnego stwierdza się w moczu. Równocześnie wypieranie przez namnażające się komórki nowotworowe normalnych, produkujących przeciwciała, immunokompetentnych komórek plazmatycznych przez namnażające się komórki nowotworowe może prowadzić do hipogammaglobulinemii w obszarze puli immunoglobulin poliklonalnych. W zaawansowanych stadiach choroby dochodzi często do paradoksalnej sytuacji, w której obserwujemy wysoki poziom immunoglobulin - spowodowany intensywnym wytwarzaniem immunoglobuliny monoklonalnej a równocześnie obserwujemy objawy niedoboru immunoglobulin poliklonalnych odpowiedzialnych za procesy odporności humoralnej.

Częstość wykrywanych gammapatii monoklonalnych rośnie z roku na rok. Po części wiąże się ze wzrostem odsetka osób w wieku podeszłym w populacji, a także z większą wykrywalnością choroby. Rozrosty plazmatyczne stanowią ok. 1% wszystkich nowotworów w ogóle oraz 14% nowotworów hematologicznych [1]. Najczęściej spotykaną formą rozrostu komórek plazmatycznych jest szpiczak mnogi wydzielający immunoglobuliny klasy IgG (szpiczak IgG, stanowiący ok. 50% wszystkich rozpoznań). W dalszej kolejności spotyka się szpiczaka klasy IgA (25%) i chorobę łańcuchów lekkich (ok.15%). Szczególną grupę stanowią osoby z łagodną bezobjawową postacią gammapatii monoklonalnej, u których przez dłuższy czas wykrywa się obecność niewielkich ilości białka monoklonalnego w surowicy bez innych objawów choroby. Tę formę choroby zwaną gammapatią monoklonalną o nieokreślonym znaczeniu (ang. *monoclonal gammopathy of unknown significance* - MGUS), często wykrywaną przypadkowo, uważa się za stan poprzedzający pełnoobjawową chorobę. Mimo, iż w przypadku MGUS nie podejmuje się leczenia, osoby, u których zdiagnozowano tego typu zaburzenia powinny podlegać monitorowaniu głównie poprzez wykonywanie raz w roku elektroforezy białek surowicy [2].

1.1.1 Historia odkrycia szpiczaka mnogiego

Obecność szczególnego typu białka w moczu została opisana już ponad 150 lat temu przez doktora Henry'ego Bence-Jones'a, patologa pracującego w Szpitalu Św. Grzegorza w Londynie, który po raz pierwszy zidentyfikował w moczu pacjenta z chorobą charakteryzującą się bólami kości, złamaniami i obrzękami białko, które po wytrąceniu kwasem octowym, podczas ogrzewania rozpuszczało się, a po oziębieniu ulegało ponownej precypitacji [3]. Obecność tego białka Bence-Jones powiązał z opisaną przez siebie chorobą. W roku 1873 J. von Rustizky opierając się na obecności w kościach typowych dla opisaney przez Bence-Jonesa choroby licznych zmian ognisk rozrostu komórek plazmatycznych wprowadził nazwę „szpiczak mnogi” [4]. Określenie „białko Bence-Jonesa” po raz pierwszy zastosował Fleischer w roku 1880 [5]. W opisanych wyżej historycznych badaniach prowadzących do opisania szpiczaka mnogiego, białko monoklonalne wykrywano tylko w moczu.

W 1922 roku Stanhope Bayne-Jones i D. Wright Wilson opisali dwie grupy białka Bence-Jonesa [6], a w 1956 roku Leonhard Korngold i współpracujący z nim technik-analityk Rose Lipari posługując się metodą immunodyfuzji radialnej na żelu agarozowym używając surowicy zwierząt immunizowanych przeciwko białku Bence-Jonesa, zidentyfikowali dwa rodzaje tego białka, a także wykazali, że antysurowica przeciw białku Bence-Jonesa reaguje z białkiem obecnym we krwi chorych ze szpiczakiem [7]. Dla upamiętnienia odkrycia Korngolda i Lipari'ego, dwie klasy białek Bence-Jones'a zidentyfikowane w moczu nazwano kappa (κ) i lambda (λ) [8]. Wkrótce białka te zidentyfikowano jako łańcuchy lekkie stanowiące część cząsteczki immunoglobuliny.

Możliwość identyfikacji łańcuchów lekkich w białku monoklonalnym wykorzystana została w klasyfikacji klinicznej gammapatii monoklonalnych [Tab. 1], która opiera się na charakterystyce produkowanego białka oraz ocenie dynamiki rozwoju choroby poprzez oznaczanie ilości białka.

Tab. 1 Klasyfikacja WHO nowotworów wywodzących się z komórki plazmatycznej

[*Szpiczak mnogi. Najnowsze metody rozpoznawania i leczenia.* Dmoszyńska Anna red. 2009]

Gammapatie monoklonalne o nieustalonym znaczeniu (MGUS)
Szpiczak plazmocytowy
<i>Szpiczak bezobjawowy (tłący)</i>
<i>Szpiczak niewydzielający</i>
<i>Białaczka plazmatyczno-komórkowa</i>
Guz plazmatyczno-komórkowy
<i>Izolowany szpiczak kości</i>
<i>Pozakostny (pozaszpiczkowy) guz plazmatyczno-komórkowy</i>
Choroby z odkładania immunoglobulin
<i>Amyloidoza pierwotna</i>
<i>Choroba łańcuchów lekkich i łańcuchów ciężkich</i>
Szpiczak z osteosklerozą (zespół POEMS)

Łańcuchy lekkie immunoglobulin należą do grupy białek drobnocząsteczkowych osocza i są szybko usuwane w wyniku filtracji w nerkach. Z tego powodu ich stężenie w osoczu jest niskie i ich wykrycie wymaga stosowania czułych metod immunochemicznych.

Obecnie białko monoklonalne wykrywa się w surowicy chorego odpowiednimi metodami diagnostycznymi dostosowanymi do tego czy białko to akumuluje się w osoczu (kompletne cząsteczki immunoglobulin), czy też ulega filtracji w nerkach (łańcuchy lekkie immunoglobulin i inne ich fragmenty).

1.1.2 Manifestacje kliniczne gammapatii monoklonalnych

Kliniczne objawy szpiczaka są niecharakterystyczne. Najczęściej chorzy zgłaszają się z dolegliwościami bólowymi w obszarze kręgosłupa i niedokrwistością. Obecność nieprawidłowego białka w surowicy i moczu pociąga za sobą różnego rodzaju konsekwencje kliniczne składające się na symptomatykę szpiczaka mnogiego. Wśród objawów szpiczaka mnogiego

związanych z obecnością białka monoklonalnego wymienia się zwiększoną lepkość osocza i postępujące uszkodzenie nerek. Fragmenty immunoglobulin: łańcuchy lekkie i łańcuchy ciężkie są filtrowane przez nerki, jednak ich obecność w wysokich stężeniach w filtracie kłębuszkowym powoduje uszkodzenie miąższu nerek i prowadzi do tzw. zespołu nerki szpiczakowej, którego ostatecznym efektem jest schyłkowa niewydolność nerek [9]. Ponadto, rozrost patologicznego klonu komórek plazmatycznych powoduje wypieranie innych linii komórkowych obecnych w szpiku, czego konsekwencją jest anemia i obniżenie odporności przez zmniejszenie ilości immunoglobulin pełniących funkcję przeciwciał. Wynika to stąd, że immunoglobuliny monoklonalne nawet, jeśli nie wykazują zmian struktury w stosunku do normalnie obecnych w osoczu immunoglobulin, nie pełnią funkcji przeciwciał przeciw znanym antygenom. Ogniska rozplemu plazmacytów w kościach powodują tworzenie obszarów osteolizy będącej przyczyną dolegliwości bólowych a także skłonności do złamań upośledzających życie pacjentów. Ze względu na brak wyraźnych objawów towarzyszących wczesnej fazie rozwoju szpiczaka nierzadko patologiczne złamania są pierwszym zauważalnym objawem, który powoduje rozpoczęcie diagnostyki w kierunku szpiczaka. Dlatego jako objawy dla tego schorzenia wymienia się bóle i złamania kości.

Jak już wspomiano najczęściej występującą gammadatią monoklonalną jest szpiczak mnogi. Według Roberta A. Kyle'a [10] wyróżnia się następujące postacie tej choroby:

- gammadatia o nieustalonym znaczeniu (MGUS),
- szpiczak tłący (smouldering multiple myeloma SMM),
- szpiczak plazmacytowy uogólniony (myeloma multiple, plazmacytoma MM).

Szpiczaka mnogiego zwykle rozpoznaje się u ludzi starszych (>55 lat), jednak rzadziej może pojawiać się u osób młodych. Nowotwór najczęściej ma charakter rozsiały, zajmując szpik a w późniejszej fazie także tworząc w kościach odrębne ogniska rozplemu. Możliwe są także formy lokalnego rozrostu

komórek plazmatycznych, jako guzy tkanek miękkich (plazmacytoma). Wśród wczesnych objawów choroby wymienia się niedokrwistość, wysokie (trzycyfrowe) wartości OB i/lub upośledzenie funkcji nerek. Ze względu na szanse skutecznego leczenia i zapobiegania powikłaniom duże znaczenie ma wykrycie gammapatii w najwcześniejszym okresie [11]. Za wstępne stadium choroby wielu autorów uważa gammapatię monoklonalną o nieustalonym znaczeniu - MGUS. W tym stadium stężenie białka monoklonalnego nie przekracza 20 g/l. Wszystkie parametry diagnostyczne, z wyjątkiem obecności słabo zaznaczonego prążka białka monoklonalnego są prawidłowe:

- liczba plazmocytów w szpiku nie przekracza 10%,
- nie stwierdza się obecności łańcuchów lekkich w moczu,
- nie stwierdza się obniżonego stężenia immunoglobulin pozostałych klas,
- parametry oceniające pracę nerek są prawidłowe.

MGUS oznacza występowanie gammapatii monoklonalnej bez innych zmian typowych dla rozrostu komórek chłonnych linii B [12]. Jest ona dość często spotykana u osób w starszym wieku i dotyczy nawet do 5% populacji po 70. roku życia. Ze względu na to, że ten typ gammapatii łagodnej w ciągu kilku lat u 30% do 70% chorych przechodzi w aktywną postać szpiczaka, jest ona rozpatrywana również jako jego wczesne stadium. Dlatego też pacjenci z rozpoznaniem MGUS powinni się znajdować pod stałą kontrolą [13].

Kolejną postacią szpiczaka jest „szpiczak tłący się”, w którym stężenie białka monoklonalnego rośnie do 30 g/l. Liczba plazmocytów w szpiku wzrasta do 30%, ale parametry laboratoryjne oceniające pracę nerek są prawidłowe. Poziom immunoglobulin, pozwalający ocenić humoralną odpowiedź immunologiczną, jest również prawidłowy. Ta postać choroby podobnie jak MGUS może utrzymywać się przez dłuższy czas

W ostatnim stadium choroby, czyli w szpiczaku uogólnionym, stężenie białka monoklonalnego jest wysokie, często rzędu 80 g/l, a liczba plazmocytów w szpiku wynosi powyżej 50-70%. Dochodzi do uszkodzenia nerek, które manifestuje się jako „nerka szpiczakowa”. Powikłanie to wiąże się z obecnością

w kanalikach i cewkach zbiorczych złogów łańcuchów lekkich. W moczu również wykrywa się wolne łańcuchy lekkie. W nerkach mogą się także odkładać tworzące złogi konglomeraty immunoglobulin monoklonalnych i lekkich łańcuchów, co prowadzi do niewydolności nerek. Postępujący proces nowotworowy prowadzi do osłabienia humoralnej odpowiedzi immunologicznej, manifestującej się spadkiem stężenia immunoglobulin [12]. Definicję szpiczaka mnogiego i pokrewnych gammopatii monoklonalnych przedstawiono w Tab. 2.

Podsumowując, szpiczak mnogi jest chorobą manifestującą się licznymi objawami związanymi z uszkodzeniem i zaburzeniem funkcji wielu narządów. Leczenia szpiczaka mnogiego angażuje lekarzy różnych specjalizacji - hematologów, nefrologów, immunologów a także neurologów i ortopedów. Rokowanie jest poważne, a przewidywanie postępu choroby trudne, ponieważ u niektórych pacjentów choroba postępuje szybko, prowadząc do śmierci w ciągu kilku miesięcy, a u innych „tli” się latami. Ogólnie szpiczak mnogi uważany jest za nieuleczalną chorobę przewlekłą, wymagającą wiedzy oraz dużego doświadczenia ze strony zespołu leczącego umożliwiającego indywidualne podejście do poszczególnych chorych. W ostatnich latach średnia długość życia pacjentów ze szpiczakiem mnogim znacznie się wydłużyła [14,15]. Badania populacyjne chorych na szpiczaka mnogiego, oparte na danych rejestrów europejskich i USA, wskazują na poprawę względnego przeżycia 5-letniego (57%) i 10-letniego (41%), która wystąpiła w latach 1990-2000 i jest szczególnie znacząca u chorych w wieku < 60 r.ż. [16,17]. Równocześnie, przy całej złożoności symptomatyki szpiczaka mnogiego i nowych metodach diagnostyki obrazowej, wstępna diagnostyka choroby oraz monitorowanie leczenia od lat opiera się na wykrywaniu i monitorowaniu obecności immunoglobulin monoklonalnych.

Tab. 2 Definicje szpiczaka mnogiego i pokrewnych gammapatii monoklonalnych

[Jurczyszyn A; *Szpiczak mnogi – poradnik dla lekarzy: historia badań nad chorobą, epidemiologia, patofizjologia, objawy kliniczne oraz najnowsze sposoby leczenia*].

Nazwa standardowa	Nowa nazwa	Definicja
MGUS (gammapatia monoklonalna o nieznanym znaczeniu)	MGUS lub MG (gammapatia monoklonalna, bez zmian)	<ul style="list-style-type: none"> • Białko monoklonalne <30g/l • Komórki plazmatyczne w szpiku <10% • Brak objawów sklasyfikowanych jako „CRAB”
Szpiczak tłący się lub łagodny	Szpiczak bezobjawowy	<ul style="list-style-type: none"> • Białko monoklonalne ≥30g/l i/lub • Komórki plazmatyczne w szpiku ≥10% • Brak objawów sklasyfikowanych jako „CRAB”
Szpiczak mnogi	Szpiczak objawowy	<ul style="list-style-type: none"> • Białko monoklonalne w surowicy lub moczu • Zajęcie szpiku kostnego przez monoklonalne plazmocyty • Jedna lub więcej objawów sklasyfikowanych jako „CRAB”

Dysfunkcja narządowa klasyfikowana jako "CRAB":

C - podniesione stężenie wapnia (> 2,75 mmol/l lub 10 mg/dl)

R - dysfunkcja nerek (kreatynina > 173 μmol/l lub 2 mg/dl)

A - niedokrwistość (hemoglobina < 100 g/l)

B - choroba kości (osteoliza lub osteoporoza)

Inne: zwiększona lepkość osocza, amyloidoza, powracające infekcje bakteryjne (>2 epizody w miesiącu)

1.2 Diagnostyka gammapatii monoklonalnych

W wyniku rutynowych badań diagnostycznych (morfologia, OB, białko całkowite) otrzymujemy informacje nasuwające podejrzenie występowania gammapatii monoklonalnej. W wyniku badań bardziej specjalistycznych (elektroforeza białek surowicy, immunofiksacja) otrzymujemy informacje określające rodzaj i stężenie białka monoklonalnego [18].

Do niezbędnego panelu badań w diagnostyce gammapatii monoklonalnych zalicza się rozmaz krwi obwodowej i badanie aspiracyjne szpiku. Jednak morfologia krwi, jako rutynowe badanie w pierwszym okresie może nie wykazywać zmian lub wykazywać niewielki spadek poziomu hemoglobiny i liczby krwinek czerwonych. Krwinki czerwone mogą ulegać rulonizacji – szczególnie w zaawansowanym stadium choroby, kiedy we krwi obwodowej znajdują się znaczne ilości białka monoklonalnego. We krwi obwodowej rzadko pojawiają się pojedyncze plazmocyty. Liczba krwinek białych i płytek, zazwyczaj prawidłowa, może zmniejszać się wraz z postępem choroby. Charakterystycznym objawem laboratoryjnym jest przyspieszenie opadania krwinek czerwonych (OB) nawet do wartości ponad 100 mm/godz. Ponadto w badaniach podstawowych można stwierdzić wzrost stężenia białka całkowitego w surowicy (hiperproteinemię) przekraczający znacznie zakres wartości referencyjnych 60-80 g/l, osiągający nierzadko stężenie powyżej 100 g/l. Ponieważ poza trywialnymi przypadkami odwodnienia poziom białka całkowitego rzadko bywa podwyższony, to wysokie wartości (oznaczanego zwykle metodą biuretową) białka w surowicy są jednym z sygnałów alarmowych mogących świadczyć o występowaniu gammapatii monoklonalnej. Stwierdzenie hiperproteinemii stanowi bezwzględne wskazanie do wykonania rozdziału elektroforetycznego białek surowicy w celu diagnostyki różnicowej hipergammaglobulinemii i ewentualnego wykrycia obecności białka monoklonalnego [1]. Do oceny zajęcia szpiku poza biopsją aspiracyjną powinna być także wykonana trepanobiopsja. Zdarzają się bowiem przypadki wykrycia w trepanobiopsji skupiska plazmocytów, podczas gdy rozmaz szpiku jest prawidłowy. Dodatkowo w przebiegu choroby może dojść do zwłóknienia szpiku, co uniemożliwia uzyskanie materiału techniką biopsji. Pojawienie się we

krwi obwodowej plazmocytołów w trakcie trwania i leczenia choroby jest złym prognostykiem i wiąże się z czasem przeżycia poniżej 2 miesięcy [19].

Bardzo istotnym elementem diagnostyki szpiczaka mnogiego jest ocena kośćca. Najczęściej zajęty przez proces chorobowy jest kręgosłup - 49%, czaszka - 35%, miednica - 34%, żebra - 33%, kości ramienne - 22%, kości udowe - 13% i żuchwa - 10% [20]. Rezonans magnetyczny (MRI) zapewnia szybką ocenę całego kośćca, zajęcie przez szpiczaka tkanek miękkich oraz wykazuje nacieczenia szpiku kostnego. Alternatywnymi metodami są tomografia komputerowa (CT) oraz emisyjna tomografia pozytonowa (PET) lub w połączeniu z CT (PET/CT) [21].

Zróznicowana manifestacja choroby związana z obecnością różnych form białka monoklonalnego wymaga w celu wykrycia gammapatii monoklonalnych całego panelu badań diagnostycznych. Częstym przedmiotem dyskusji jest potrzeba wykonywania rozdziału elektroforetycznego białek i immunofiksacji moczu. Białko Bence-Jonesa jest jednym z markerów pozwalających na wykrycie gammapatii monoklonalnych, ponieważ u 10-20% pacjentów z tego typu zaburzeniami białko monoklonalne stanowią wyłącznie monoklonalne wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin [22]. W przeciwieństwie do form szpiczaka produkujących kompletne monoklonalne cząsteczki immunoglobulin, w postaciach produkujących łańcuchy lekkie białko Bence-Jonesa łatwiej wychwycić jest w moczu niż w surowicy. Jest to związane z faktem, iż wolne łańcuchy lekkie są z łatwością filtrowane do moczu. Dlatego też wykrywanie białka monoklonalnego u pacjentów ze szpiczakiem mnogim i chorobami pokrewnymi powinno obok surowicy obejmować próbki moczu.

1.2.1 Metody elektroforetyczne

1.2.1.1 Elektroforeza białek surowicy

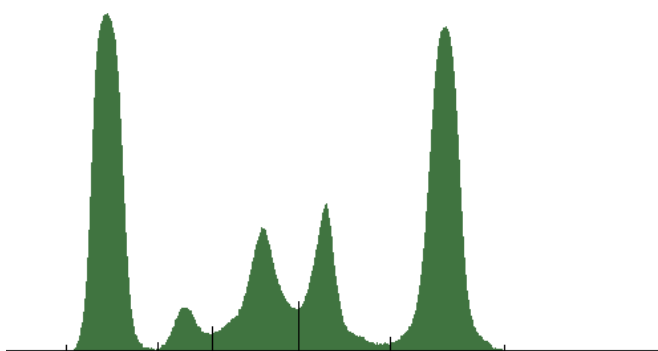
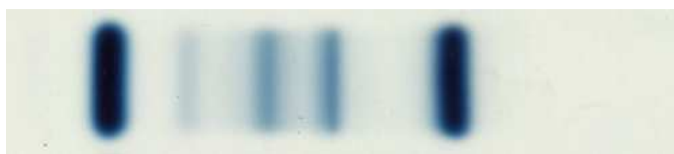
Jednym z podstawowych narzędzi w diagnostyce chorób z gammapatią monoklonalną jest elektroforeza. Technika elektroforetyczna umożliwia rozdzielanie białek surowicy na kilkanaście frakcji. Ocena tzw. profilu elektroforetycznego

pięciu głównych frakcji białek surowicy dostarcza cennych informacji różnicujących przyczyny zaburzeń poziomu immunoglobulin. Podstawowa technika - typowa elektroforeza prowadzona na podłożach agarozowych lub z octanu celulozy dzieli białka surowicy na pięć podstawowych frakcji - albuminy, alfa-1, alfa-2, beta i gammaglobuliny. Technika ta pozwala na wykrycie nawet słabych stref białka monoklonalnego zwłaszcza, jeżeli znajdują się w typowej lokalizacji obszaru gammaglobulin. W proteinogramie obecny jest wówczas charakterystyczny prążek białka monoklonalnego, najczęściej w regionie gamma [Ryc. 1] lub beta [Ryc. 2], rzadziej w regionie alfa-2. Wysokość pików (odczytana densytometrycznie) jest proporcjonalna do stężenia białka monoklonalnego. Klasyczną elektroforezą stwierdza się obecność monoklonalnej frakcji białkowej u ok 80% pacjentów ze szpiczakiem mnogim.

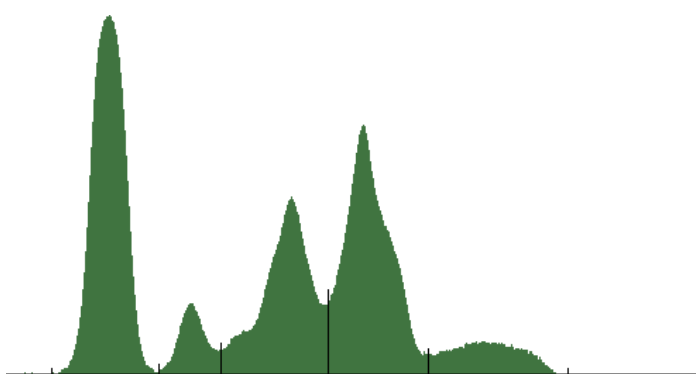
W przypadku, gdy słaba strefa białka monoklonalnego zlokalizowana jest nietypowo (blisko frakcji beta, w obrębie beta lub nawet alfa-2 globulin) pomocna może się okazać elektroforeza o podwyższonej rozdzielczości. Zmieniony skład buforu, obecność jonów wapnia powoduje, że białka surowicy dzielą się na kilkanaście frakcji, z których niektóre reprezentują poszczególne białka osocza. Rozdziały na podłożach o podwyższonej rozdzielczości (HRE – *high resolution electrophoresis*) są rekomendowane do wykrywania, monitorowania i ilościowego określania stężenia białka monoklonalnego. Niestety ze względów ekonomiczno-organizacyjnych ten typ podłoży jest rzadko stosowany w rutynowych laboratoriach diagnostycznych.

Rozwijająca się w ostatnich kilkunastu latach szybka i wydajna technologia elektroforezy kapilarnej jest mniej czuła, jeśli chodzi o możliwości wykrywania słabych stref białka monoklonalnego.

Rozdział elektroforetyczny jest jedyną jak dotąd techniką pozwalającą na określenie ilości białka monoklonalnego. Ustawiając odpowiednio znaczniki frakcji na rozdziale densytometrycznym możliwe jest oddzielenie immunoglobuliny monoklonalnej od poliklonalnego tła decydującego o odporności.



Ryc. 1 Rozdział elektroforetyczny białek surowicy z widocznym prążkiem monoklonalnym w strefie gamma.

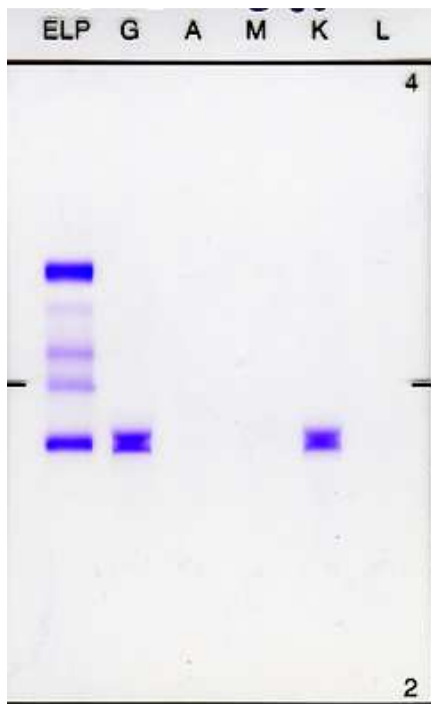


Ryc. 2 Rozdział elektroforetyczny białek surowicy z widocznym prążkiem monoklonalnym w strefie beta.

1.2.1.2 Immunofiksacja surowicy

Kolejnym etapem diagnostyki gammapatii monoklonalnych po wykryciu obecności białka monoklonalnego jest określenie jego rodzaju, do czego wykorzystuje się technikę immunofiksacji lub immunoelektroforezy. Metoda immunofiksacji polega na sześciokrotnym równoległym rozdiale elektroforetycznym tej samej próbki surowicy, a następnie na kolejnych ścieżkach selektywnym utrwaleniu (przy pomocy odpowiednich przeciwciał) wszystkich białek surowicy, immunoglobulin klasy IgG, IgA, IgM oraz łańcuchów kappa i łańcuchów lambda. Białko monoklonalne w technice Immunofiksacji daje homogenny ostro zaznaczony prążek, w odróżnieniu od immunoglobuliny poliklonalnej, gdzie precypitat jest rozproszony i rozciągnięty wzdłuż drogi migracji białek [Ryc. 3]. Gotowe zestawy do immunofiksacji są produkowane przez wszystkie duże firmy wytwarzające materiały do elektroforezy.

W systemie elektroforezy kapilarnej odpowiednikiem immunofiksacji jest immunosubstrakcja, w której potencjalna strefa białka monoklonalnego jest wiązana na wstępnym etapie przygotowania próbki. W technice immunoelektroforezy o obecności białka monoklonalnego decyduje kształt łuku precypitacyjnego [1].



Ryc. 3 Wynik immunofiksacji surowicy, w której wykryto obecność białka monoklonalnego – IgG, kappa.

Należy podkreślić, że elektroforeza i immunofiksacja białek surowicy są testami, które mogą służyć dwóm różnym celom. Wykrywaniu gammapatii monoklonalnej albo monitorowaniu odpowiedzi na leczenie, w którym jednym z kryteriów jest:

- Brak obecności białka monoklonalnego – elektroforeza i immunofiksacja.
- Bardzo słaba strefa białka monoklonalnego w elektroforezie, pozytywny wynik immunofiksacji.
- Stosunkowo niewielki spadek białka M w elektroforezie (rzędu 50%)

Szczególne trudności diagnostyczne nastęcza poprawna diagnostyka hipergammaglobulinemii poliklonalnej, która towarzyszy chorobom wątroby. Uszkodzający komórki wątroby czynnik pierwotny (alkohol, inne czynniki toksyczne, zakażenie wirusowe) powoduje, że uwolnione z komórek wątrobowych białka są rozpoznawane przez układ immunologiczny jako obce antygeny. Odpowiedź immunologiczna jest tak silna, że w rozdziale

elektroforetycznym białek otrzymujemy charakterystyczny obraz, w którym intensywna strefa immunoglobulin strefy gamma łączy się ze strefą beta (mostek gamma-beta). Równocześnie niektóre białka (czasem posiadające aktywność enzymatyczną) pochodzące z uszkodzonych komórek wątroby tak silnie stymulują układ immunologiczny, że w obszarze gamma obserwujemy występowanie jednego lub czasem kilku wyraźnych prążków białkowych. Prążki te, nierzadko klasy IgM, są wynikiem klonalnej odpowiedzi układu immunologicznego na określony antygen. Klonalność tych prążków można potwierdzić metodą immunofiksacji. Towarzysząca schorzeniom wątroby hipergammaglobulinemia daje niekiedy objawy krioglobulinemii. Interpretacja tego typu rozdziałów wymaga od pracowników laboratorium dużego doświadczenia.

1.2.1.3 Elektroforeza białek moczu

Badaniem, które zdaniem niektórych autorów jest również konieczne do wykrywania gammadatii monoklonalnych jest elektroforeza białek moczu. Występuje ona w dwóch podstawowych wariantach: SDS elektroforezy oraz elektroforezy na podłożach agarozowych lub octanie celulozy z wykorzystaniem wybranych przeciwciał (odpowiednik immunofiksacji). Możliwe do zastosowania przeciwciała mogą być przeciw albuminie, łańcuchom kappa, łańcuchom lambda, immunoglobulinom, białkom drobnocząsteczkowym białkomoczu cewkowego i innym. Istnieją też systemy analizy białek moczu pracujące na platformie elektroforezy kapilarnej.

Metodą referencyjną do analizy białek moczu jest SDS elektroforeza. W technice tej w pierwszym etapie analizowane białka opłaszczane są detergentem anionowym (siarczanem dodecyłu – Sodium Dodecyl Sulphate) w stałym stosunku wagowym białko-detergent. Po przyłożeniu pola elektrycznego białka migrują w usieciowanej strukturze żelu poliakrylamidowego stanowiącego podłoże, z szybkością odwrotnie proporcjonalną do logarytmu masy cząsteczkowej. Po wybarwieniu żelu otrzymuje się pełną informację o profilu białkowym moczu.

Można wykryć obecność:

- wolnych łańcuchów lekkich typu kappa lub lambda lub ewentualnie innych białek drobnocząsteczkowych (białkomocz cewkowy)
- albuminy i transferyny (selektywny białkomocz kłębuszkowy)
- strefy immunoglobulin (nieselektywny białkomocz kłębkowy).

Należy też pamiętać, że jednym z kryteriów całkowitej remisji choroby jest brak obecności białka monoklonalnego w surowicy i w moczu stwierdzony metodą immunofiksacji.

1.2.2 Metody immunochemiczne

1.2.2.1 Ilościowe oznaczanie podstawowych klas immunoglobulin

Dokonując ilościowego oznaczenia podstawowych klas immunoglobulin (IgG, IgA, IgM) technikami immunologicznymi (metodą nefelometryczną lub turbidymetryczną) określa się stężenie zarówno immunoglobuliny produkowanej przez prawidłowe plazmocyty jak i przez komórki nowotworowe.

Techniki immunologiczne służą także do oznaczania wirtualnego stężenia związanych z immunoglobulinami łańcuchów lekkich kappa i lambda, oraz następnie wyliczeniu ich stosunku. Jeżeli u pacjenta stwierdza się podwyższone wartości immunoglobulin wszystkich trzech klas a stosunek stężeń łańcuchów kappa/lambda leży w zakresie referencyjnym (1.35 - 2.65) to wynik taki świadczy o hipergammaglobulinemii poliklonalnej. Gdy natomiast otrzymamy podwyższenie poziomu tylko jednej z klas immunoglobulin a stosunek κ/λ jest zaburzony to prawdopodobną przyczyną hipergammaglobulinemii jest obecność białka monoklonalnego. Zmiana stosunku stężeń łańcuchów lekkich κ/λ ujawnia się dopiero wtedy, gdy stężenie immunoglobuliny monoklonalnej jest porównywalne z sumą stężeń pozostałych immunoglobulin. W związku z powyższym, zmiana stosunku całkowitego stężenia łańcuchów lekkich związanych z resztą cząsteczki immunoglobuliny nie jest zbyt czułym testem na obecność białka monoklonalnego.

Opisana wyżej metoda immunochemicznych oznaczeń ilościowych, mimo że droższa niż elektroforeza jest szczególnie użyteczna, gdy immunoglobulina

monoklonalna należy do klasy IgA. Immunoglobuliny tej klasy w rozdziale elektroforetycznym lokują się w wąskiej, ostrej frakcji beta-globulin i mogą być przeoczone przy interpretacji wyniku elektroforezy.

1.2.2.2 Wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin (FLCs)

W ostatnich latach wprowadzono do diagnostyki szpiczaka oznaczanie stężenia wolnych łańcuchów lekkich w surowicy. Ten nowy test wykorzystuje znane i występujące również w warunkach prawidłowych zjawisko produkcji i wydzielania do osocza pewnej ilości wolnych tj., niezwiązanych z łańcuchami ciężkimi łańcuchów lekkich kappa i lambda. Ilość wolnych łańcuchów lekkich (ang. *free light chains* – *FLC*) koreluje z aktywnością komórek plazmatycznych i jest miarą ilości produkowanych immunoglobulin. Stwierdzono, że u chorych ze szpiczakiem ilość wolnych łańcuchów lekkich koreluje z zaostrzeniem procesu chorobowego. Jako miarę aktywności procesu wykorzystuje się ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich oraz ocenę stosunku stężenia wolnych łańcuchów lekkich typu kappa do stężenia wolnych łańcuchów lekkich typu lambda [23, 24].

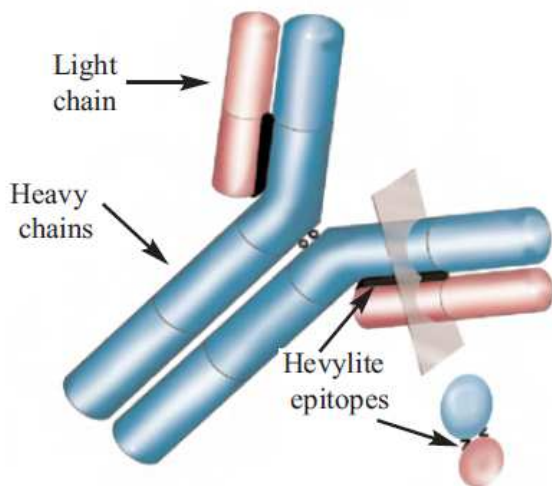
Okres półtrwania wolnych łańcuchów lekkich w osoczu wynosi dla łańcuchów kappa 2-4 godziny, dla łańcuchów lambda 3-6 godzin, jest więc kilkaset razy krótszy niż okres półtrwania kompletnej cząsteczki immunoglobuliny klasy IgG (21 dni). Stężenie wolnych łańcuchów w surowicy jest więc miarą intensywności syntezy immunoglobulin przez plazmocyty ujętą w „czasie rzeczywistym”. Ilościowe oznaczenie FLCs pozwala na wykrycie przypadków szpiczaka niewydzielającego, w którym nie stwierdza się obecności białka monoklonalnego w surowicy i łańcuchów lekkich w moczu za pomocą elektroforezy a nawet immunofiksacji. Stężenie FLCs w surowicy jest też dobrym markerem syntezy łańcuchów i umożliwia prognozę uszkodzenia nerki i innych narządów w wyniku tworzenia złogów amyloidowych.

Materiałem do ilościowego oznaczenia FLCs jest surowica. Przeciwciała poliklonalne wykorzystane do oznaczania FLCs reagują wyłącznie z epitopami, które są odsłonięte tylko wtedy, gdy łańcuchy lekkie występują w formie wolnej. Natomiast w kompletnej cząsteczce immunoglobuliny epitopy te są przykryte

przez fragmenty łańcuchów ciężkich. Podobnie jak w przypadku cząsteczek immunoglobulin, oznaczenia FLCs są wykonywane z zastosowaniem techniki immunonefelometrycznej (ze wzmocnieniem lateksem) i immunoturbidymetrycznej opartej o aglutynację opłaszczonych przeciwciałami anty-kappa i anty-lambda granulek lateksu.

1.2.2.3 Łańcuchy ciężkie immunoglobulin

Najnowszym testem, wprowadzanym obecnie na rynek jest test służący do oznaczania łańcuchów ciężkich (heavy chain/light chain immunoassays - "Hevylite" (HLC)). Cząsteczka immunoglobuliny posiada unikatowe epitopy łączące ze sobą łańcuchy ciężkie i lekkie w regionie stałym [Ryc. 4], właśnie te epitopy są celem przeciwciał stosowanych w teście Hevylite (HLC). W związku z tym możliwe jest oddzielne oznaczanie łańcuchów ciężkich immunoglobulin różnych klas (IgG κ , IgG λ , IgA κ , IgA λ , IgM κ and IgM λ). Oznaczenie wykonuje się w parach: IgG κ /IgG λ tak, aby ocenić ich stosunek do siebie i tym samym stwierdzić czy immunoglobulina ma charakter monoklonalny czy poliklonalny, podobnie jak w przypadku FLCr κ/λ . Wprowadzany test ma cechować się większą czułością niż elektroforeza i immunofiksacja. Pozwala również na ocenę wybiórczej selektywności wybranej metody leczenia wobec komórek nowotworowych w stosunku do komórek prawidłowych [25].



Ryc. 4 Docelowe epitopy (zaznaczone na czarno) dla przeciwciał stosowanych w teście Hevylite znajdują się w regionie stałym cząsteczki immunoglobuliny pomiędzy łańcuchem ciężkim i lekkim [25]

1.2.3 Zróżnicowanie czułości analitycznej testów diagnostycznych służących do wykrywania gammapatii monoklonalnych

Każda z wymienionych wyżej metod cechuje się określoną czułością i specyficnością diagnostyczną. Powstaje zatem pytanie jak dobrze metody te nadają się do rozpoznania i monitorowania leczenia szpiczaka mnogiego, zwłaszcza w jego wczesnej bezobjawowej fazie, kiedy podjęcie właściwego leczenia może zapobiec powikłaniom stwarzającym zagrożenie życia pacjenta.

Zgodnie z opisem producenta systemów elektroforetycznych SEBIA poziom detekcji białka monoklonalnego dla rozdzału elektroforetycznego białek surowicy na żelu agarozowym może być różny w zależności od umiejscowienia na rozdziale frakcji składnika monoklonalnego oraz „tła poliklonalnego” we frakcji gamma. Najniższe wykrywalne stężenie białka monoklonalnego w elektroforetycznym badaniu surowicy krwi określa się na poziomie 170 mg/l. W przypadku zastosowania immunofiksacji (IFE) w stosunku do rozdzielonych białek surowicy w zależności od lokalizacji frakcji monoklonalnej, poziomu tła

poliklonalnego w strefie gamma oraz procedury barwienia minimalne poziomy detekcji mieszczą się w zakresie 120-250 mg/l.

Czułość analityczna oznaczeń wolnych łańcuchów lekkich (FLCs), czyli najmniejsze wykrywane stężenie jest w pewnym sensie zależne od rodzaju badanego materiału. W nierozcieńczonym, klarownym moczu oraz płynie mózgowo-rdzeniowym najmniejsze wykrywane stężenie FLCs typu kappa oraz typu lambda wynosi 0,1 mg/l. Dla surowicy czułość jest 5-krotnie słabsza, z powodu obecności interferujących lipidów oraz innych cząsteczek rozpraszających światło i wynosi około 0,5 mg/l [25].

Ilościowe oznaczenie FLCs techniką nefelometryczną pozwala na monitorowanie obecności frakcji monoklonalnej w przypadku braku obecności widocznego M-piku na obrazach białek surowicy rozdzielonych techniką elektroforezy. Ilościowe oznaczenie wolnych łańcuchów lekkich, poprzez monitorowanie wzrostu stężenia wolnych łańcuchów lekkich (FLCs) związanego z progresją choroby może mieć także znaczenie prognostyczne w przypadku MGUS oraz szpiczakach niewydzielniczych (progresja choroby) a także w szpiczaku mnogim, plazmacytomie i amyloidozie (prognoza przeżycia). Uważa się, że podwyższony poziom wolnych łańcuchów lekkich albo nieprawidłowy stosunek stężeń wolnych łańcuchów lekkich κ/λ (FLCr) może być związany z większością chorób wywodzących się z komórek plazmatycznych.

Wykazano również ograniczenia techniki ilościowego oznaczania FLCs. Należą do nich: brak liniowości, podatność na efekt nadmiaru antygeny i zależność od jednego producenta testu [26, 27, 28]. Jednak z racji wysokiej czułości diagnostycznej, szczególnie w przypadku choroby łańcuchów lekkich, a także potencjału prognostycznego oraz przydatności podczas monitorowania chorych, hematolodzy włączają oznaczenie stężenia wolnych łańcuchów lekkich w surowicy do panelu badań przesiewowych przy podejrzeniu chorób rozrostowych komórek plazmatycznych.

1.3 Algorytmy diagnostyczne pozwalające na wykrycie gammapatii monoklonalnych

Istnieje bardzo obszerne piśmiennictwo na temat różnych algorytmów diagnostycznych pozwalających na wykrycie gammapatii monoklonalnych. Obejmują one różne techniki oraz konieczność stosowania różnych rodzajów materiału pobranego od pacjenta. Nie ma jak dotąd uznanej standardowej procedury badania. Przedmiotem wciąż powracającej kontrowersji pojawiającej się w wielu publikacjach jest potrzeba równoczesnego badania na obecność białka monoklonalnego próbki moczu obok próbek surowicy.

Opracowując wydajny panel diagnostycznych badań laboratoryjnych przeznaczony do wykrywania i monitorowania gammapatii monoklonalnych należy wziąć pod uwagę badaną populację. Inny panel skринingowy zaproponuje się populacji ogólnej a inny populacji pacjentów z zaburzeniami hematologicznymi, u których podejrzewa się gammapatie monoklonalne. W pracy Hill'a i wsp. z 2006 r. [29] zaproponowano zastąpienie badania moczu (rozdział elektroforetyczny białek moczu lub immunofiksacja) w pierwszej linii diagnostyki oznaczeniem wolnych łańcuchów lekkich w surowicy, które w połączeniu z elektroforezą surowicy pozwalają na wykrycie wszystkich istotnych patologii związanych z rozrostem komórek B. Jeżeli jednak, tak jak w badaniu Hill'a i wsp. badana jest populacja generalna szpitala, a nie pacjenci hematologiczni, należy rozważyć możliwość pewnej ilości wyników fałszywie dodatnich w zakresie stosunku stężeń wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda. Wyniki fałszywie dodatnie dotyczą grupy pacjentów z nieznaczącymi odchyleniami spowodowanymi innymi czynnikami niż rozrost monoklonalny (np. przewlekłe odczyny zapalne i choroby o typie autoagresji). Do niedawna złotym standardem w skринingu chorób wywodzących się z komórek plazmatycznych był rozdział elektroforetyczny białek z immunofiksacją zarówno surowicy jak i moczu [30]. Wprowadzone niedawno na rynek oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy techniką Freelite® dało nowe możliwości i poprawiło czułość paneli diagnostycznych. Należy jednak pamiętać, iż włączenie do algorytmu badań wykrywających obecność białka monoklonalnego ilościowego oznaczenia FLCs oraz jednoczesna eliminacja z tego algorytmu badania

moczu, pozwoli wprowadzić na zwiększenie czułości diagnostycznej algorytmu, jednak zwiększy także ilość wyników fałszywie dodatnich [31]. Brak jest zatem przekonujących dowodów potwierdzających fakt, iż wyeliminowanie badania moczu nie zmniejszy czułości diagnostycznej algorytmu. Jeżeli badanie moczu nie będzie kontynuowane w pierwszej linii diagnostyki, powinno ono być nadal wymagane w dalszej diagnostyce specyficznych dysproteinemii oraz w monitorowaniu gammapatii monoklonalnych [31].

Podobne sugestie przedstawiono w badaniu Piehler'a i wsp. w roku 2008 [32]. Wykazano, iż kombinacja elektroforezy białek surowicy z ilościowym oznaczeniem wolnych łańcuchów lekkich w surowicy jest zdolna do wykrycia prawie wszystkich pacjentów z istotnymi klinicznie gammopatiami monoklonalnymi. Ponadto zasugerowano, iż wystarczy oznaczać poziom wolnych łańcuchów lekkich w surowicy tylko u tych pacjentów, u których na podstawie danych klinicznych, biochemicznych lub wyniku rozdziału elektroforetycznego białek surowicy podejrzewa się zaburzenia wywodzące się z komórek plazmatycznych.

Katzmann i wsp. w pracy z 2006 roku [33] ocenili znaczenie diagnostyczne analizy moczu (rozdział elektroforetyczny białek, immunofiksacja) jako części algorytmu badania przesiewowego w kierunku gammapatii monoklonalnych. Zgodnie z rekomendacjami Międzynarodowej Roboczej Grupy Szpiczakowej z roku 2003 [34] do badań przesiewowych pacjentów, u których podejrzewa się szpiczaka mnogiego powinno stosować się elektroforezę i immunofiksację zarówno surowicy jak i moczu. W związku z wysoką czułością ilościowego oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich w surowicy, zasugerowano jako wstępny skrining badanie wyłącznie surowicy obejmujące rozdział elektroforetyczny białek, immunofiksację oraz stężenie FLCs. Według Jerry'ego A. Katzmanna [33] badanie moczu może być przydatne do postawienia ostatecznej diagnozy u pacjentów z już rozpoznaną gammopatią monoklonalną.

Szeroka dyskusja na temat potrzeby badania próbki moczu podczas wykrywania zaburzeń o charakterze gammapatii monoklonalnych prowadzona

była na łamach *British Journal of Haematology* 2008 pomiędzy dwoma zespołami badawczymi. Pratt i wsp. [35] zaproponowali algorytm diagnostyczny obejmujący elektroforezę białek surowicy (SPE) oraz ilościowe oznaczenie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy, nie uwzględniając badania moczu. Do tej propozycji odnieśli się Vermeersch i wsp. [36] twierdząc, że powinno się wykonać więcej badań oceniających procent fałszywie dodatnich wyników ilościowego oznaczenia FLCs w surowicy w rutynowej praktyce klinicznej. Należałoby zdobyć bardziej znaczące dowody potwierdzające fakt, iż wyeliminowanie badań moczu nie zmniejszy czułości diagnostycznej algorytmu pozwalającego na wykrycie gammapatii monoklonalnych.

Vermeersch i wsp. [36] uznali również, że istnieje potrzeba przeprowadzenia badania porównującego wydajność algorytmu diagnostycznego w kierunku gammapatii monoklonalnych obejmującego badania surowicy (SPE+FLCr lub IFE+FLCr) oraz algorytmu uwzględniającego badanie moczu.

Abraham i wsp. [37] w swojej pracy z 2002 r. zauważyli, iż zmiany poziomu wolnych łańcuchów lekkich w surowicy w czasie korelują ze zmianami poziomu białka monoklonalnego w dobowej zbiórce moczu. Co sugeruje, iż oznaczanie stężenia wolnych łańcuchów lekkich w surowicy może stanowić logiczną i realną alternatywę dla oznaczania białka monoklonalnego w 24-godzinnych zbiórkach moczu. Jednak Singhal i wsp. (2007) [38] uzyskali wyniki, które pokazały, iż prawidłowy stosunek stężenia wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda (FLCr) nie wyklucza znaczącej proteinurii oraz, że oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy nie wykrywa proteinurii monoklonalnej w 100%. Ponadto w przeciwieństwie do nasilenia proteinurii, wartość FLCr nie koreluje z funkcją nerek. Dlatego też Singhal i wsp. [38] uznali, iż z klinicznego punktu widzenia oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy nie może zastąpić oznaczania poziomu białka w dobowej zbiórce moczu.

Kliniczną czułość i specyficzność elektroforezy białek moczu (Hydragel Urine Profile) jako badania pozwalającego na wykrycie i identyfikację białka Bence-Jonesa w porównaniu z immunonefelometrycznym oznaczeniem wolnych łańcuchów lekkich w moczu oceniono w badaniu Wolff'a i wsp. [39]. Porównano

wyniki ilościowego oznaczenia FLCs w moczu oraz wykrywanie białka Bence-Jonesa metodą elektroforezy w próbkach moczu pochodzących od pacjentów, u których zlecono także immunofiksację surowicy. 27% (15/55) spośród pacjentów „poliklonalnych” miało nieprawidłowy FLCr w moczu (obecnie przyjęty przedział wartości referencyjnych: 2-10.4). We wszystkich 15 przypadkach stosunek był nieznacznie podwyższony, co potwierdzałoby hipotezę postawioną przez Hill'a i wsp. [29], w której założono, że ilość wyników fałszywie dodatnich nieprawidłowego FLCr jest znacznie wyższa niż wcześniej opisywano. Może to być związane ze wzrostem poziomu immunoglobulin poliklonalnych. Czulość metody nefelometrycznej wyniosła 69% i była znacznie wyższa w porównaniu z elektroforezą, której czulość wyniosła 36%. Specyficzność porównywanych metod wyniosła odpowiednio 73% i 100%. W celu poprawy czulości techniki elektroforetycznej zaproponowano zagęszczanie próbek moczu, ale tylko w przypadkach, gdy wykryje się białko monoklonalne w surowicy metodą immunofiksacji oraz podejrzewa się obecność białka Bence-Jonesa w moczu. Pomimo mniejszej czulości elektroforezy w porównaniu z oznaczeniem nefelometrycznym, technika ta pozwala na ocenę różnorodnych białek, które są trudno dostępne dla innych technik [39].

W pracy Smitha i wsp.(2006) [40] jako złoty standard rozważano połączenie immunofiksacji surowicy oraz immunofiksacji moczu. Testy te jednak mogą być ujemne u pacjentów ze szpiczakiem niewydzielniczym czy chorobą wolnych łańcuchów lekkich. Dlatego też niedawne wprowadzenie ilościowej oceny wolnych łańcuchów lekkich podniosło czulość strategii wykrywania białka monoklonalnego opartych na testach surowicy [41, 42] zwłaszcza w przypadkach choroby łańcuchów lekkich, kiedy nie ma w surowicy wystarczająco dużej ilości krążących wolnych łańcuchów lekkich, aby mogły być one wykryte metodą immunofiksacji surowicy bądź moczu. O ile bowiem poziom wolnych łańcuchów lekkich typu kappa oraz lambda w surowicy wykazuje tendencję do wzrostu wraz z wiekiem, FLCr jest z powodzeniem stosowany w diagnostyce [42].

Zgodnie z wytycznymi ESMO (European Society for Medical Oncology) z 2009 r. [43] diagnostyka szpiczaka mnogiego powinna obejmować rozdział

elektroforetyczny białek surowicy oraz moczu (24-godzinna zbiórka moczu) oraz immunofiksację surowicy. Natomiast w celu identyfikacji i monitorowania szpiczaka niewydzielniczego oznaczenie stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy. Podobne wnioski pojawiły się wcześniej (2001r.) w pracy Draysona i wsp.[23]. Stwierdzono, iż oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy dostarcza użytecznych informacji w przypadku pacjentów, którzy nie wydzielają lub wydzielają niewielką ilość białka monoklonalnego.

W najświeższych doniesieniach Międzynarodowej Grupy Szpiczakowej dotyczących skriningu diagnostycznego gammapatii monoklonalnych rekomenduje się rozdział elektroforetyczny białek surowicy oraz immunofiksację surowicy wraz z oznaczeniem poziomu wolnych łańcuchów lekkich w surowicy. Zalecenia te dotyczą gammapatii monoklonalnych z wyłączeniem amyloidozy, w przypadku której zaleca się dodatkowo wykonanie immunofiksacji moczu [30].

2 ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

W procesie diagnozowania i monitorowania leczenia rozrostowych chorób komórek plazmatycznych szczególnie ważną rolę odgrywa ocena obecności białka monoklonalnego. Wykrycie, identyfikacja oraz ilościowy pomiar białka monoklonalnego są niezbędne do klasyfikacji oraz oceny dynamiki rozwoju choroby i monitorowania procesu leczenia. Jednak ze względu na dużą heterogenność zmian białkowych towarzyszących gammopatiom monoklonalnym oraz różnorodność metod wykrywania białka M, brak jest jednolitego schematu oceny zaburzeń białkowych związanych z proliferacją komórek plazmatycznych. W ostatnich latach do diagnostyki zaburzeń o charakterze gammopatii monoklonalnych wprowadzono test ilościowego oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy (FreeLite®). Badanie to zrewolucjonizowało możliwości rozpoznawania i oceny leczenia u chorych na szpiczaka mnogiego.

Celem niniejszej pracy jest ocena testu FreeLite® - ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin (FLCs) w surowicy do wykrywania i monitorowania gammopatii monoklonalnych w porównaniu z metodami elektroforetycznymi u pacjentów ze szpiczakiem mnogim.

W szczególności:

1. Ocena czułości diagnostycznej testu FreeLite® w porównaniu z immunofiksacją białek surowicy (IFE), elektroforezą białek surowicy (SPE) i elektroforezą białek moczu (UPE).
2. Porównanie czułości diagnostycznej różnych konfiguracji czterech powszechnie stosowanych testów laboratoryjnych do wykrywania zaburzeń o charakterze gammopatii monoklonalnych: rozdziału elektroforetycznego białek surowicy krwi (SPE), immunofiksacji surowicy (IFE), oznaczania stężenia i stosunku wolnych łańcuchów lekkich kappa/lambda w surowicy (FLCs, FLCr) i rozdziału elektroforetycznego białek moczu (UPE).

3. Opis niespójności diagnostycznych dotyczących testu FreeLite® (niezgodności wyników ze stanem klinicznym oraz wynikami innych testów diagnostycznych) i testów opartych na technikach elektroforetycznych.
4. Opis niespójności analitycznych pomiędzy wynikami ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich metodą nefelometryczną (FreeLite®) i innymi metodami immunologicznymi i elektroforetycznymi. Opis ograniczeń testu FreeLite®.

Podjęte badania powinny się przyczynić do optymalizacji wciąż modyfikowanych algorytmów diagnostycznych, podniesienia czułości i specyficzności zespołów metod diagnostycznych i racjonalizacji kosztów badań.

3 PACJENCI, MATERIAŁY I METODY

3.1 Ogólna charakterystyka pacjentów

Badaniami objęto 116 pacjentów Kliniki Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Grupę badaną stanowiło 55 mężczyzn i 61 kobiet w przedziale wiekowym od 36 do 85 lat (średnia 61.3). W grupie badanej było 96 chorych ze zdiagnozowanym szpiczakiem mnogim (49 ze szpiczakiem typu IgG, 19 ze szpiczakiem typu IgA, 9 ze szpiczakiem mnogim umiejscowionym – plazmacytoma), 11 z MGUS-em, 9 z chorobą łańcuchów lekkich.

3.2 Charakterystyka grupy badanej

W Tab. 4 przedstawiono wartości średnie oraz skrajne (minimalne i maksymalne) stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin typu kappa [flc κ], stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin typu lambda [flc λ], wartości stosunku stężeń wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin typu kappa do lambda [FLCr κ/λ], stężenia immunoglobulin typu IgG, IgA oraz IgM oraz stężenia beta-2-mikroglobuliny w czterech grupach pacjentów:

Grupa 1: chorzy ze świeżo postawioną diagnozą [nowe rozpoznania]

(18 osób)

- Do grupy 1 włączono chorych zdiagnozowanych 'de novo', którzy spełniali kryteria Międzynarodowej Roboczej Grupy Szpiczakowej z 2006 roku [44, 34], wśród których wymienia się: obecność białka monoklonalnego w osoczu (≥ 30 g/l) i/lub moczu i/lub rozrost klonalny plazmacytów w szpiku ($>10\%$) i/lub stwierdzenie obecności plazmacytów (z cechami klonalności) w biopsji tkankowej. U chorych, u których obecności białka monoklonalnego nie można wykazać metodą elektroforezy, jako kryterium diagnostyczne można alternatywnie stosować zaburzony stosunek wolnych łańcuchów lekkich (FLCr) w surowicy, wyrażający się stosunkiem kappa/lambda >1.65 lub <0.26 [44].

Grupa 2: chorzy w stanie całkowitej remisji hematologicznej - całkowita odpowiedź na leczenie [remisja] (15 osób).

- Do grupy 2 włączono chorych, u których białko monoklonalne nie było wcale wykrywalne dostępnymi metodami we krwi i/lub moczu, szpik kostny nie był zajęty przez chorobę oraz inne testy laboratoryjne potwierdzały stan remisji. Zgodnie z klasyfikacją B.G.M. Durie [Tab. 3] stwierdzono u tej grupy chorych całkowitą odpowiedź na leczenie.

Grupa 3: chorzy z objawową gammopatią monoklonalną [choroba objawowa] (74 osoby)

- Do grupy 3 włączono chorych ze zdiagnozowaną gammopatią monoklonalną, zgodnie z kryteriami Międzynarodowej Roboczej Grupy Szpiczakowej z 2006 roku [34, 44] będących w trakcie leczenia a także w stanie zaostrzenia lub nawrotu choroby.

Grupa 4: chorzy z gammopatią monoklonalną o nieustalonym znaczeniu [MGUS] (9 osób)

- Do grupy 4 włączono chorych, u których dostępnymi metodami wykryto obecność białka monoklonalnego, jednak nie stwierdzono u nich innych objawów choroby.

Wszyscy chorzy ze zdiagnozowanym szpiczakiem mnogim i innymi zaburzeniami o charakterze gammopatii monoklonalnych włączeni do badania spełniali kryteria Międzynarodowej Roboczej Grupy Szpiczakowej z 2006 roku [44, 34], wśród których wymienia się: obecność białka monoklonalnego w osoczu (≥ 30 g/l) i/lub moczu i/lub rozrost klonalny plazmocytów w szpiku ($>10\%$) i/lub stwierdzenie obecności plazmocytów (z cechami klonalności) w biopsji tkankowej. U chorych, u których obecności białka monoklonalnego nie można wykazać metodą elektroforezy, jako kryterium diagnostyczne można alternatywnie stosować zaburzony stosunek wolnych łańcuchów lekkich (FLCr) w surowicy, wyrażający się stosunkiem $\kappa/\lambda >1.65$ lub <0.26 [44]. Chorzy, u których nie stwierdzono ani białka monoklonalnego ani zaburzonego stosunku κ/λ w surowicy wymagają do rozpoznania obecności plazmocytów w szpiku $\geq 10\%$. W tym przypadku rozpoznawany jest tzw.

szpiczak niewydzielający. Stwierdzenie klonalności plazmocytów opiera się na zaburzonym stosunku kappa/lambda: $>4:1$ lub $<1:2$. W tym celu wymagana jest analiza minimum 100 plazmocytów stosując technikę immunohistochemii lub immunofluorescencji [44].

W stawianiu rozpoznania należy wziąć także pod uwagę:

- Inne gammapatie monoklonalne, głównie MGUS
- Reaktywną plazmocytozę poliklonalną w przebiegu zakażeń (np. różyczka)
- Hipergammaglobulinemię
- Amyloidozę pierwotną
- Nowotwory dające przerzuty do kości (np. rak nerki, rak stercza, rak piersi czy niedrobnokomórkowy rak płuca).

U wszystkich pacjentów w grupie badanej wykonano w celach diagnostycznych oznaczenia:

- Stosunek wolnych łańcuchów lekkich kappa/lambda w surowicy (FLCr)
- Rozdział elektroforetyczny białek surowicy (SPE)
- Immunofiksacja surowicy (IFE)
- Rozdział elektroforetyczny białek moczu (UPE)

Ocenie poddano czułość diagnostyczną każdego z testów oddzielnie, a także różne konfiguracje ocenianych testów w celu wskazania najbardziej korzystnej kombinacji zarówno pod względem czułości diagnostycznej jak i kosztów.

Czułość i swoistość diagnostyczna stanowią zależności pomiędzy wynikami testów diagnostycznych, które mogą być prawdziwie dodatnie i prawdziwie ujemne (wynik dodatni u chorego, ujemny u zdrowego) bądź fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne (wynik dodatni u zdrowego i ujemny u chorego). Zostały one oznaczone skrótami:

- PD-wynik prawdziwie dodatni
- PU-wynik prawdziwie ujemny
- FD-wynik fałszywie dodatni
- FU-wynik fałszywie ujemny

Czułość diagnostyczną testu definiowano, jako proporcję osób w grupie chorych, które miały dodatni wynik testu i zostały poprawnie zidentyfikowane, jako chorzy:

$$\text{Czułość (\%)} = \frac{PD}{PD + FU} \times 100\%$$

Swoistość diagnostyczna odpowiada odsetkowi osób zdrowych, które miały ujemny wynik testu, a zatem za pomocą ocenianego testu poprawnie wykluczono chorobę:

$$\text{Swoistość (\%)} = \frac{PU}{PU + FD} \times 100\%$$

Czułość i swoistość testu zależą od usytuowania wartości granicznej, którą przyjęto na podstawie danych z piśmiennictwa [42]. Moc diagnostyczną testu (czasem tłumaczoną również jako dokładność testu) można wyliczyć dzieląc sumę wyników poprawnych przez sumę wszystkich uzyskanych wyników:

$$\text{Dokładność} = \frac{PU + PD}{PU + FU + PD + FD}$$

W grupie badanej znajdowali się chorzy na różnych etapach choroby, w związku z tym ocenę czułości przeprowadzono w 4 podgrupach z uwzględnieniem odpowiedzi na leczenie [Tab. 3]:

- Chorzy ze świeżo postawioną diagnozą (nowe rozpoznania)
- Chorzy w stanie całkowitej remisji hematologicznej (odpowieź całkowita)
- Chorzy z gammopatią objawową
- Chorzy z gammopatią monoklonalną o nieustalonym znaczeniu (MGUS)

Tab. 3 Kryteria oceny odpowiedzi na leczenie szpiczaka mnogiego na podstawie wyników badań laboratoryjnych ze szczególnym uwzględnieniem obrazów elektroforetycznych. [Poradnik dla lekarzy opracowany przez dr A. Jurczyszyna na podstawie „Concise Review Of The Disease And Treatment Options” pod redakcją Prof. B.G.M. Duriej]

Odpowiedź całkowita (CR)	Białko monoklonalne nie jest wcale wykrywalne dostępnymi metodami we krwi i/lub moczu
	Szpik kostny pokazuje brak dowodów na zajęcie przez chorobę
	Inne testy laboratoryjne potwierdzają stan remisji
Odpowiedź prawie całkowita (nCR)	Białko monoklonalne nie jest normalnie wykrywalne we krwi i/lub moczu, lecz może być wykryte bardziej czułymi metodami laboratoryjnymi
	Szpik kostny zawiera mniej niż 5% plazmocytów
Odpowiedź częściowa (PR)	Redukcja stężenia białka monoklonalnego > 50% i wciąż jest mierzalna ilość pozostałego białka
	Szpik kostny zawiera > 5% plazmocytów i jest redukcja ponad 50% nacieku nowotworowego
Minimalna odpowiedź obiektywna (MR)	Stężenie białka monoklonalnego obniżyło się > 25 % lecz mniej niż 50% regresji
Choroba stabilna (SD)	Stężenie białka monoklonalnego zmieniło stężenie > ±25%
Choroba postępująca (PD)	Wzrost stężenia białka monoklonalnego > 25%

3.3 Materiały

Materiałem badanym, w którym wykonywano oznaczenia biochemiczne były surowice i mocze (pierwsza poranna próbka) pacjentów przesyłane do rutynowych badań kontrolnych do Zakładu Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Nie pobierano od pacjentów żadnych dodatkowych próbek. Badanie uzyskało pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

3.4 Metody oznaczeń immunologicznych i biochemicznych

3.4.1 Ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy i moczu (oznaczenia immunochemiczne)

Oznaczenie wolnych łańcuchów lekkich (FLCs) w surowicy oraz w moczu przeprowadzono posługując się testem Freelite® firmy Binding Site (Wielka Brytania). Pomiarów dokonano na nefelometrze BNII (Dade Behring; Nephelometer™II). Użyty w badaniu zakres wartości referencyjnych dla wolnych łańcuchów lekkich typu kappa (κ FLC) w surowicy wyznaczony przez producenta wynosił od 3.3 do 19.4 mg/l oraz dla wolnych łańcuchów lekkich typu lambda (λ FLC) od 5.71 mg/l do 26.3 mg/l. Natomiast zakres referencyjny dla stosunku stężeń κ do λ w surowicy (κ/λ FLCr) wynosił 0.26-1.65. (95% zakresu dystrybucji dla grupy referencyjnej).

Zakres wartości referencyjnych dla κ FLC w moczu wynosił od 1.35 do 24.19 mg/l oraz dla λ FLC od 0.24 do 6.66 mg/l. Natomiast dla stosunku κ/λ FLCr w moczu zakres referencyjny wynosił od 2.04 do 10.37 (95% zakres dystrybucji dla grupy referencyjnej [42]).

3.4.2 Rozdział elektroforetyczny białek surowicy

Rozdział elektroforetyczny białek surowicy krwi wykonywany był systemem automatycznym Hydrasys przy pomocy zestawów Hydragel 30 protein(e) (SEBIA) na podłożach agarozowych. Procedurę rozdziału wykonywano zgodnie z instrukcją producenta. Metoda umożliwia rozdzielanie białek surowicy krwi na 5 głównych frakcji. Rozdzielone frakcje białkowe barwiono roztworem czerni amidowej. Po ostatnim etapie automatycznego odbarwiania i suszenia

dokonywano pomiarów densytometrycznych. Najniższe wykryte stężenie białka monoklonalnego określono na poziomie 0,17 g/l. Trzeba jednak zaznaczyć, że poziom detekcji białka może być różny w zależności od umiejscowienia frakcji monoklonalnej na rozdziale elektroforetycznym (sąsiedztwo frakcji beta) oraz intensywności tła poliklonalnego we frakcji gamma.

3.4.3 Immunofiksacja surowicy

Obecność białka monoklonalnego w surowicy krwi wykrywano metodą immunofiksacji przy pomocy zestawów Hydragel 2 IF (SEBIA), które są przeznaczone do automatycznego systemu barwienia rozdzielonych frakcji białkowych Hydrasys. Białka surowicy poddawane były elektroforezie i immunofiksacji przy użyciu antysurowic o różnych specyficznościach: łańcuchy ciężkie anty-gamma (IgG), anty-alfa (IgA), anty-mu (IgM) i łańcuchy lekkie: anty-kappa i anty-lambda (wolne i związane). Procedurę rozdziału wykonywano zgodnie z instrukcją producenta. Po immunofiksacji utworzone immunoprecypitaty wybarwiano za pomocą kwaśnego fioletu. W zależności od pozycji migracji składnika monoklonalnego, poziomu tła poliklonalnego w strefie gamma oraz procedury barwienia, minimalne poziomy detekcji mieściły się w zakresie 120-250 mg/l.

3.4.4 Rozdział elektroforetyczny białek moczu

Rozdziały elektroforetyczne białek moczu wykonywano na 11% żelach poliakrylamidowych [45]. W pierwszym etapie analizy opłaszczano białka detergentem anionowym (siarczanem dodecyłu – *Sodium Dodecyl Sulphate*) w stałym stosunku wagowym białko-detergent. Bufor próbkowy nie zawierał czynników redukujących (dithiotreitol, merkaptoetanol). Po przyłożeniu pola elektrycznego białka migrowały w usieciowanej strukturze żelu poliakrylamidowego z szybkością odwrotnie proporcjonalną do logarytmu masy cząsteczkowej. Po rozdziale białka wybarwiano przy użyciu Commasie Blue G250.

3.4.5 Ilościowe oznaczanie białka całkowitego w moczu

Oznaczenie białka całkowitego w moczu wykonywano metodą Bradforda [45]. Przygotowany odczynnik Bradforda (50 mg Commasie Blue G250, 25 ml 95%

etanolu, 50 ml 85% kwasu ortofosforowego, uzupełniano wodą destylowaną do 500 ml) w ilości 2.5 ml mieszano z 50 μ l badanego moczu. Następnie mierzono absorpcję przy długości fali 595 nm (Spektrofotometr UV-VIS HeLios Gamma&Delta firmy Thermo Spectronic). Uzyskane wyniki przeliczano w oparciu o przygotowaną krzywą wzorcową, uzyskaną z roztworów wzorcowych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin typu lambda o następujących stężeniach: 0; 0.2; 0.5; 1.0; 2.5; 5.0; 10 g/l.

3.4.6 Oznaczenie stężenia łańcuchów lekkich immunoglobulin (oznaczenia immunochemiczne)

Ilościowe oznaczenia całkowitych (związanych i wolnych) łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy i moczu wykonywano metodą nefelometryczną. Pomiarów dokonano na nefelometrze BNII (Dade Behring; NephelometerTMII).

Zakresy referencyjne dla próbek surowicy pochodzących od zdrowych osób wynosiły odpowiednio dla łańcuchów lekkich typu kappa 1.7-3.7 g/l, dla łańcuchów lekkich typu lambda: 0.9-2.1 g/l oraz dla stosunku stężenia łańcuchów kappa/lambda 1.35-2.65 (percentyl 2.5-97.5) [46, 47].

W przypadku oznaczeń próbek moczu górna granica zakresu referencyjnego dla wydalania łańcuchów lekkich typu kappa wynosiła 7.099 mg/l oraz dla wydalania łańcuchów lekkich typu lambda 3.899 mg/l. Zakres referencyjny dla stosunku stężenia łańcuchów kappa/lambda w moczu wynosił 0.75-4.4 [48].

3.4.7 Oznaczenie stężenia podstawowych klas immunoglobulin – IgG, IgA, IgM w surowicy

Ilościowe oznaczenia immunoglobulin IgG, IgA i IgM przeprowadzono techniką nefelometryczną. Pomiarów dokonano na nefelometrze BNII (Dade Behring; NephelometerTMII).

Użyty w badaniu zakres wartości referencyjnych dotyczący próbek surowicy i osocza pochodzących od zdrowych osobników dorosłych wynosił dla IgG 7.0-16.0 g/l, dla IgA 0.7-4.0 g/l, dla IgM 0.4-2.3 g/l [49].

3.4.8 Oznaczanie stężenia beta-2-mikroglobuliny w surowicy

Oznaczenie stężenia beta-2-mikroglobuliny w surowicy przeprowadzono techniką nefelometryczną. Pomiarów dokonano na nefelometrze BNII (Dade Behring; NephelometerTMII).

Użyty w badaniu zakres wartości referencyjnych dla stężenia beta-2-mikroglobuliny w surowicy wynosił 0.7-1.8 mg/l.

3.4.9 Wykrywanie obecności oligomerów wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu metodą HPLC

Wykrywanie oligomerów wolnych łańcuchów lekkich w moczu przeprowadzono za pomocą wysokorozdzielczej chromatografii cieczowej - HPLC (Kontron). Przy użyciu kolumny Ultrapac TSK G2000SW (7,5x600mm), przepływ 0.5 ml/min. Fazą ruchomą był 0.1M bufor fosforanowy o pH=6.5. Detekcje przeprowadzono przy długości fali 210 nm. Czas pomiaru wynosił 80 minut. Jako roztworu wzorcowego służącego do kalibracji kolumny użyto roztworu zawierającego lizozym (14200 Da), łańcuchy lekkie kappa (monomer 23000 Da, dimer 46000 Da) oraz albuminę (64000 Da) w stężeniu 5 mg/ml.

3.5 Metody statystyczne

Na podstawie piśmiennictwa [50] do oceny statystycznej zastosowano test korelacji rang Spearmana. Współczynnik korelacji Spearmana zależy wyłącznie od uporządkowania zaobserwowanych wartości. Może zatem być stosowany do dowolnych zmiennych, których wartości można uporządkować rosnąco. Współczynnik korelacji Spearmana oraz testy jego istotności mogą być stosowane przy dowolnym rozkładzie porównywanych zmiennych. Zależność między zmiennymi losowymi (niezależnie od tego, jakim wskaźnikiem jest mierzona) nie musi oznaczać związku przyczynowo-skutkowego.

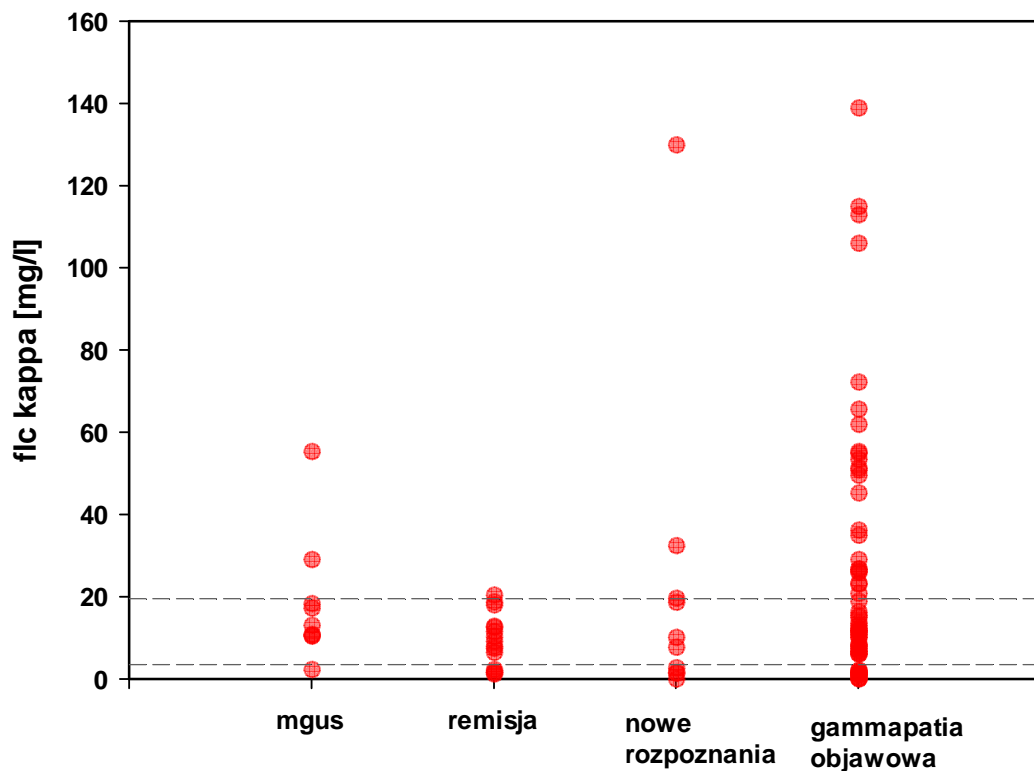
4 WYNIKI I DISKUSJA

Wartości średnie oraz skrajne (minimalne i maksymalne) parametrów biochemicznych charakteryzujących chorych z rozpoznaniem szpiczakiem mnogim, w grupach badanych przedstawiono w Tab. 4.

Tab. 4 Wartości średnie oraz skrajne (minimalne i maksymalne) wybranych parametrów biochemicznych w czterech grupach badanych.

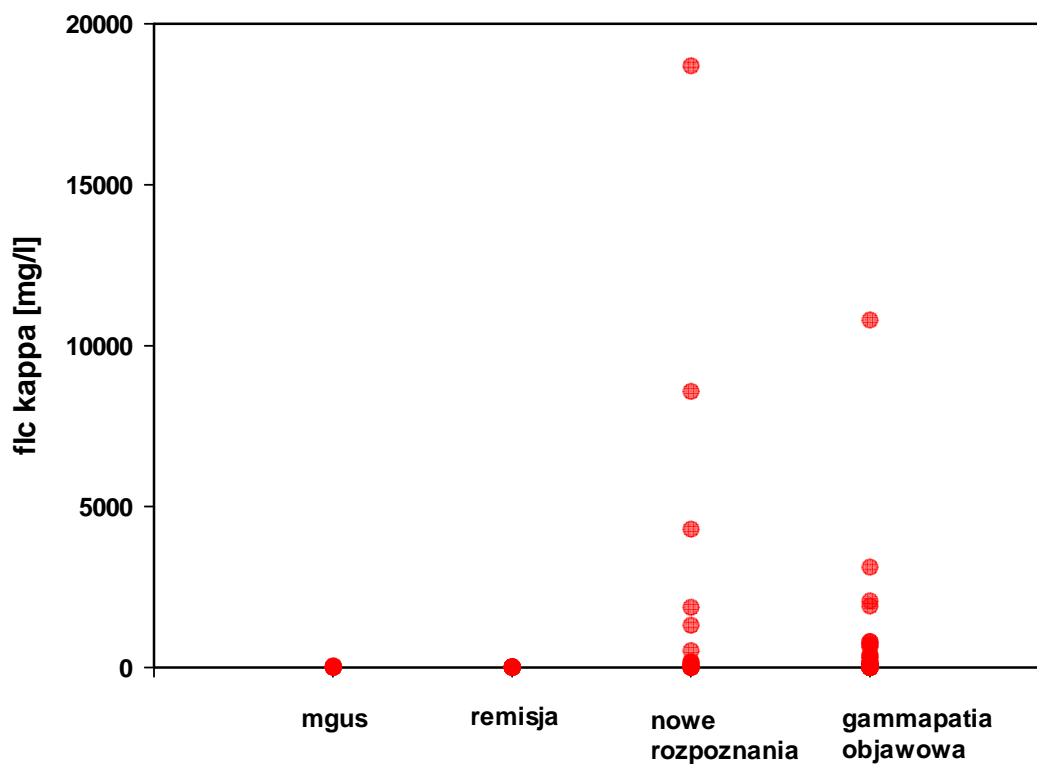
Badany parametr	Wartości referencyjne	MGUS (n=9)		Nowe rozpoznania (n=18)		Gammapatia objawowa (n=74)		Remisja (n=15)	
flc κ [mg/l]	3,3-19,4 mg/l	$x_{\text{sr}} = 18,64$		$x_{\text{sr}} = 1991,6$		$x_{\text{sr}} = 334,99$		$x_{\text{sr}} = 9,55$	
		$x_{\text{min}}=2,39$	$x_{\text{max}}=55,4$	$x_{\text{min}}=0,05$	$x_{\text{max}}=18700$	$x_{\text{min}}=0,05$	$x_{\text{max}}=10800$	$x_{\text{min}}=1,28$	$x_{\text{max}}=20,5$
flc λ [mg/l]	5,71-26,3 mg/l	$x_{\text{sr}} = 60,53$		$x_{\text{sr}} = 702,26$		$x_{\text{sr}} = 214,2$		$x_{\text{sr}} = 17,1$	
		$x_{\text{min}}=7,57$	$x_{\text{max}}=302$	$x_{\text{min}}=0,49$	$x_{\text{max}}=8470$	$x_{\text{min}}=0,07$	$x_{\text{max}}=9290$	$x_{\text{min}}=1,13$	$x_{\text{max}}=58,9$
FLCr κ/λ	0,26-1,65	$x_{\text{sr}} = 1,32$		$x_{\text{sr}} = 1170,05$		$x_{\text{sr}} = 497,2$		$x_{\text{sr}} = 0,75$	
		$x_{\text{min}}=0,04$	$x_{\text{max}}=7,31$	$x_{\text{min}}=0,0002$	$x_{\text{max}}=10579$	$x_{\text{min}}=0,00004$	$x_{\text{max}}=27285$	$x_{\text{min}}=0,19$	$x_{\text{max}}=2,22$
IgG [g/l]	7,0-16,0 g/l	$x_{\text{sr}} = 18,89$		$x_{\text{sr}} = 16,87$		$x_{\text{sr}} = 15,34$		$x_{\text{sr}} = 9,91$	
		$x_{\text{min}}=8,88$	$x_{\text{max}}=30,9$	$x_{\text{min}}=2,5$	$x_{\text{max}}=81,7$	$x_{\text{min}}=1,21$	$x_{\text{max}}=70,7$	$x_{\text{min}}=0,47$	$x_{\text{max}}=23,2$
IgA [g/l]	0,7-4,0 g/l	$x_{\text{sr}} = 1,67$		$x_{\text{sr}} = 10,36$		$x_{\text{sr}} = 2,81$		$x_{\text{sr}} = 1,25$	
		$x_{\text{min}}=0,75$	$x_{\text{max}}=4,14$	$x_{\text{min}}=0,22$	$x_{\text{max}}=48,1$	$x_{\text{min}}=0,21$	$x_{\text{max}}=36,1$	$x_{\text{min}}=0,22$	$x_{\text{max}}=5,34$
IgM [g/l]	0,4-2,3 g/l	$x_{\text{sr}} = 0,71$		$x_{\text{sr}} = 0,47$		$x_{\text{sr}} = 1,42$		$x_{\text{sr}} = 0,51$	
		$x_{\text{min}}=0,3$	$x_{\text{max}}=1,5$	$x_{\text{min}}=0,16$	$x_{\text{max}}=3,19$	$x_{\text{min}}=0,17$	$x_{\text{max}}=55,4$	$x_{\text{min}}=0,17$	$x_{\text{max}}=1,06$
β_2 -mikroglob. [mg/l]	0,7-1,8 mg/l	$x_{\text{sr}} = 3,69$		$x_{\text{sr}} = 8,41$		$x_{\text{sr}} = 5,87$		$x_{\text{sr}} = 3,03$	
		$x_{\text{min}}=1,61$	$x_{\text{max}}=13,4$	$x_{\text{min}}=2,22$	$x_{\text{max}}=51,3$	$x_{\text{min}}=1,51$	$x_{\text{max}}=65$	$x_{\text{min}}=1,42$	$x_{\text{max}}=9,62$

Stwierdzono, że wartości stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin typu kappa w grupie chorych z gammopatią monoklonalną o nieustalonym znaczeniu oraz w grupie chorych w stanie remisji w znacznej większości mieszczą się w zakresie referencyjnym. Są to grupy najbardziej jednorodne. Zostało to zobrazowane na Ryc. 5. Liniami przerywanymi zaznaczono zakres wartości referencyjnych dla stężenia FLC typu kappa (3,3-19,4 mg/l).



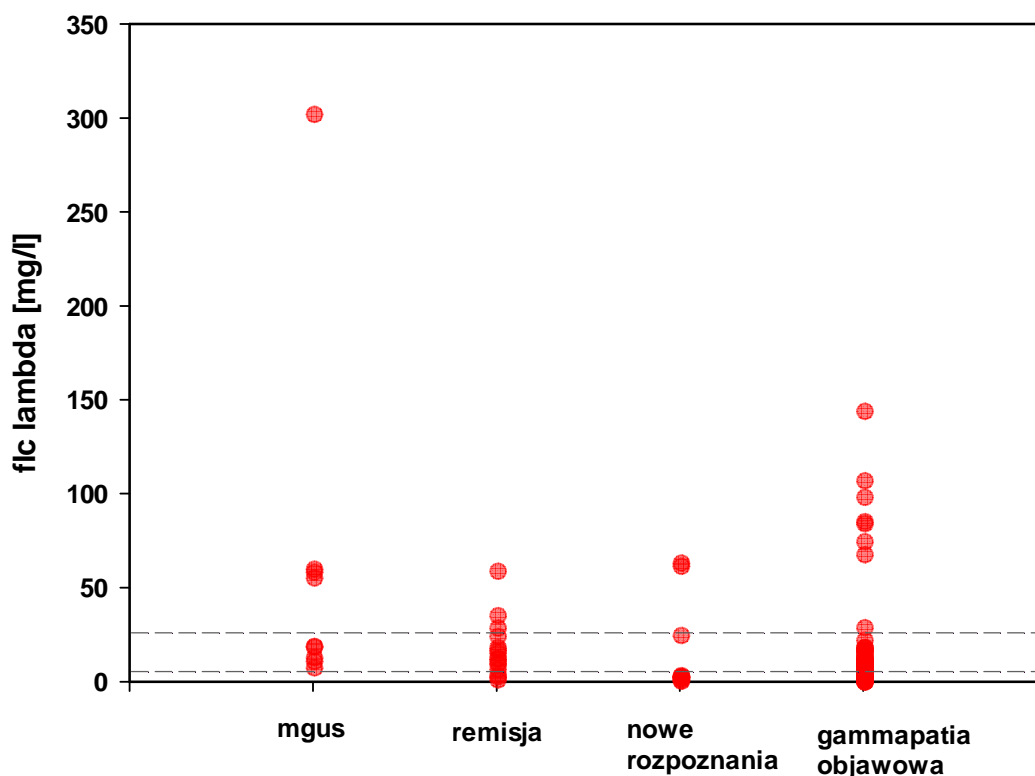
Ryc. 5 Wartości stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin typu kappa w czterech grupach badanych. Liniami przerywanymi zaznaczono zakres wartości referencyjnych dla wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin typu kappa, który wynosi 3,3-19,4 mg/l.

Największe zróżnicowanie w wartościach stężenia wolnych łańcuchów lekkich typu kappa występuje w grupach chorych z gammopatią objawową oraz chorych świeżo zdiagnozowanych. Na Ryc. 5 odrzucono skrajne wartości (powyżej 160 mg/l) tak, aby wykres był czytelny oraz aby można było na skali zaznaczyć zakres referencyjny. W grupie ze świeżo postawioną diagnozą odrzucono 8 wartości, natomiast w grupie z gammopatią objawową 15. Na Ryc. 6 przedstawiono wszystkie wyniki. Na analizowanym wykresie maksymalna wartość stężenia flc κ zanotowana została w grupie pacjentów świeżo zdiagnozowanych i wyniosła 18700 mg/l, natomiast wartość minimalna zanotowana została w grupie z gammopatią objawową oraz ze świeżo postawioną diagnozą i wyniosła 0,05 mg/l.



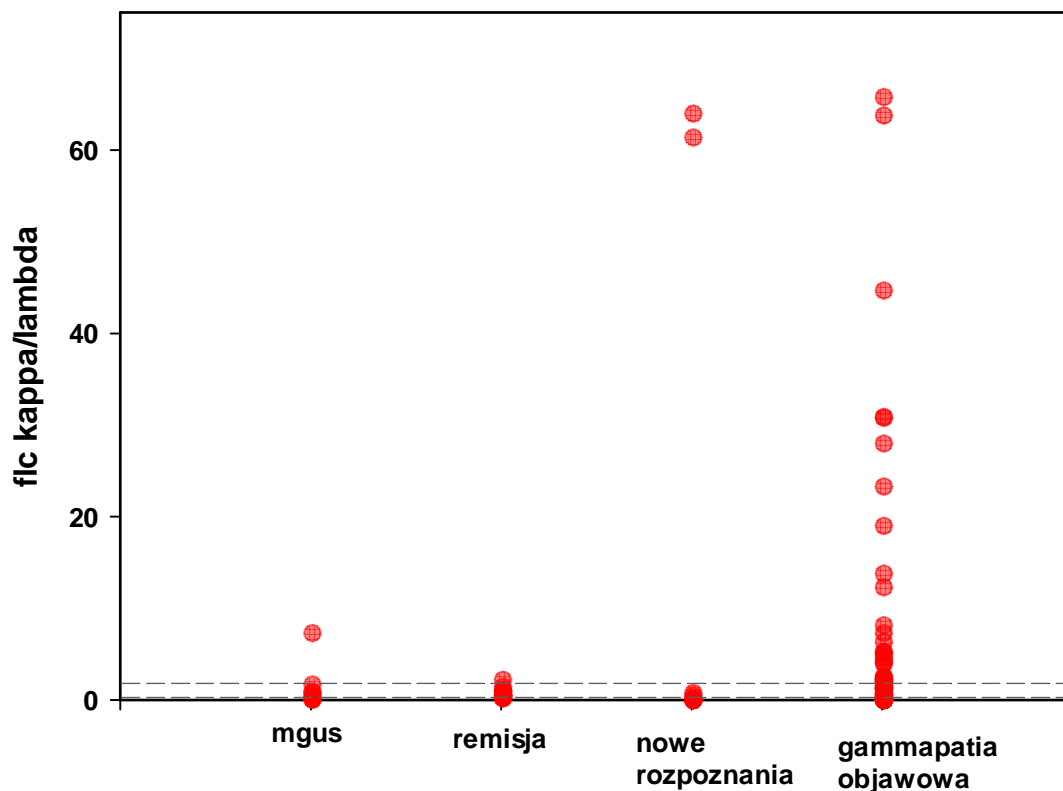
Ryc. 6 Wartości stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin typu kappa w czterech grupach badanych.

Podobny zabieg zastosowano przedstawiając graficznie stężenie wolnych łańcuchów lekkich typu lambda w czterech grupach badanych. Na Ryc. 7 tak dobrano skalę (0-350 mg/l), aby widoczny był zakres wartości referencyjnych (naniesiony liniami przerywanymi), dlatego też na wykresie nie przedstawiono 6 wartości w grupie z nowymi rozpoznaniem choroby oraz 9 w grupie z gammapatią objawową. Maksymalna oraz minimalna wartość stężenia fIc λ zanotowana została w grupie z gammapatią objawową i wyniosła 9290 mg/l oraz 0,07 mg/l. Najbardziej jednorodna była grupa pacjentów w stanie remisji, natomiast największe zróżnicowanie odnotowano w grupie z gammapatią objawową.



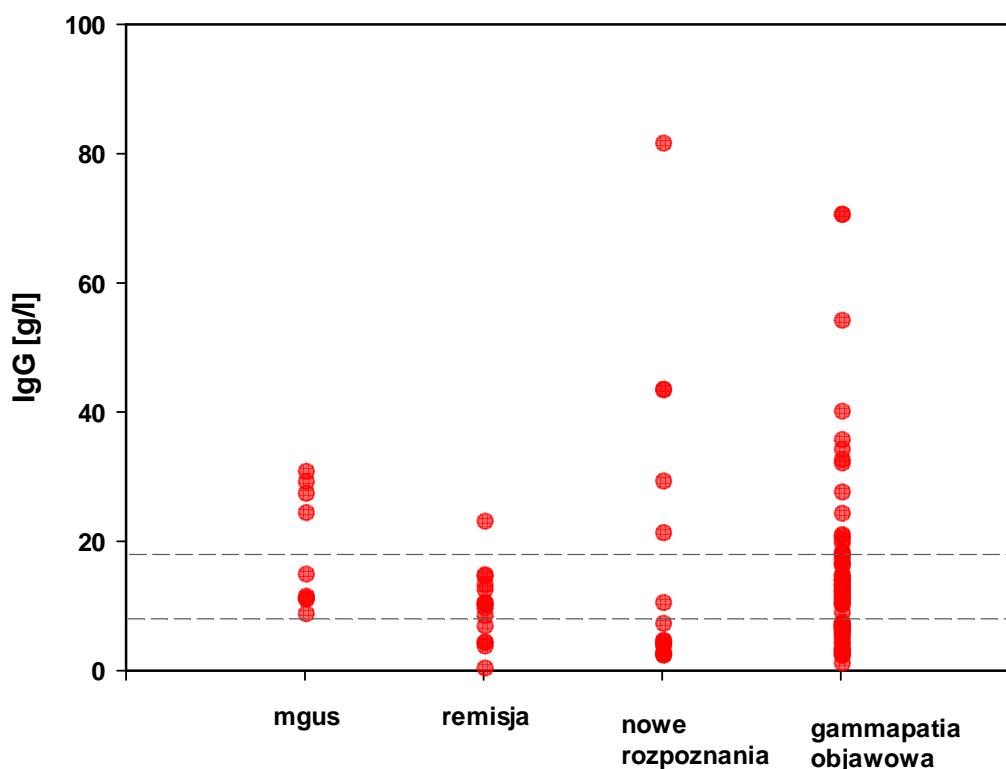
Ryc. 7 Wartości stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin typu lambda w czterech grupach badanych. Liniami przerywanymi zaznaczono zakres wartości referencyjnych dla wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin typu lambda, który wynosi 5,71-26,3 mg/l.

Na Ryc. 8 przedstawiono stosunek stężenia wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda w czterech grupach badanych. Ponownie najbardziej jednorodna okazała się grupa pacjentów w stanie remisji, w której prawie wszystkie wyniki znajdują się w zakresie wartości referencyjnych. Podobnie jak przy poprzednich parametrach, aby uzyskać czytelniejszy wykres odrzucono skrajnie wysokie wartości (7 z grupy ze świeżo postawioną diagnozą oraz 9 z grupy z gammapatią objawową). Maksymalna oraz minimalna wartość stosunku wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda zanotowana została w grupie z gammapatią objawową i wyniosła 27285 oraz 0,00004. Również w tej grupie odnotowano największe zróżnicowanie.



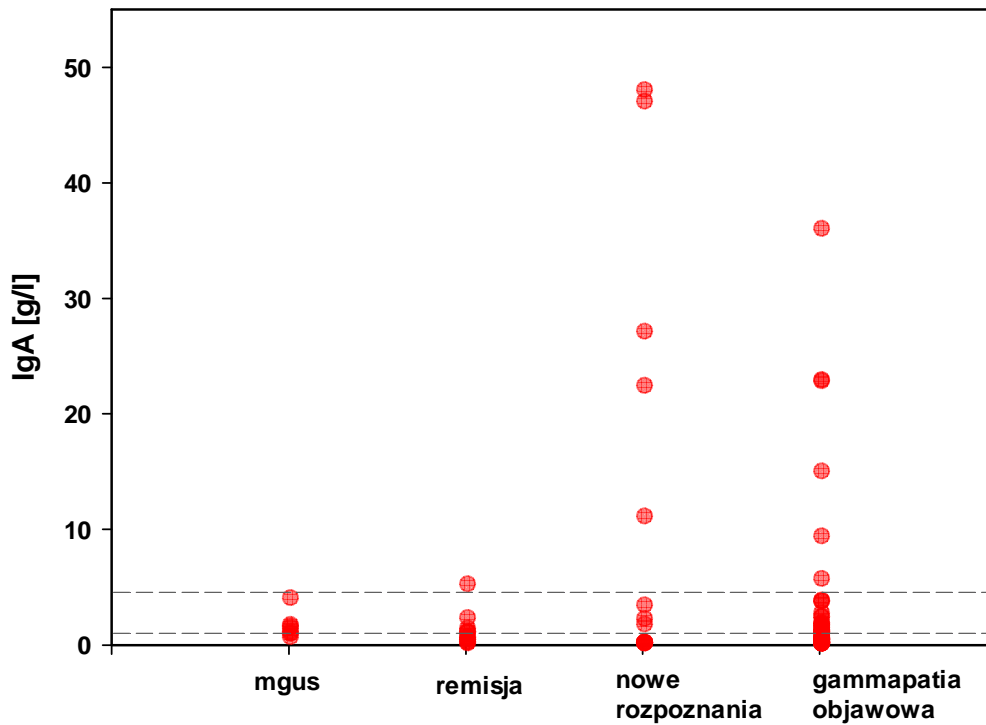
Ryc. 8 Wartości stosunku stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin typu kappa do lambda w czterech grupach badanych. Liniami przerywanymi zaznaczono zakres wartości referencyjnych dla stosunku stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin typu kappa do lambda, który wynosi 0,26-1,65.

Na Ryc. 9 przedstawiono stężenie immunoglobuliny typu IgG w czterech grupach badanych. Ponownie najbardziej jednorodna okazała się grupa pacjentów w stanie remisji, w której większość wyników znajduje się w zakresie wartości referencyjnych. Również w tej grupie (remisja) odnotowano minimalną wartość stężenia immunoglobuliny IgG, która wyniosła 0,47 g/l. Wartość maksymalna stężenia IgG zanotowana została w grupie pacjentów ze świeżo postawioną diagnozą i wyniosła 81,7. Również w tej grupie odnotowano największe zróżnicowanie.



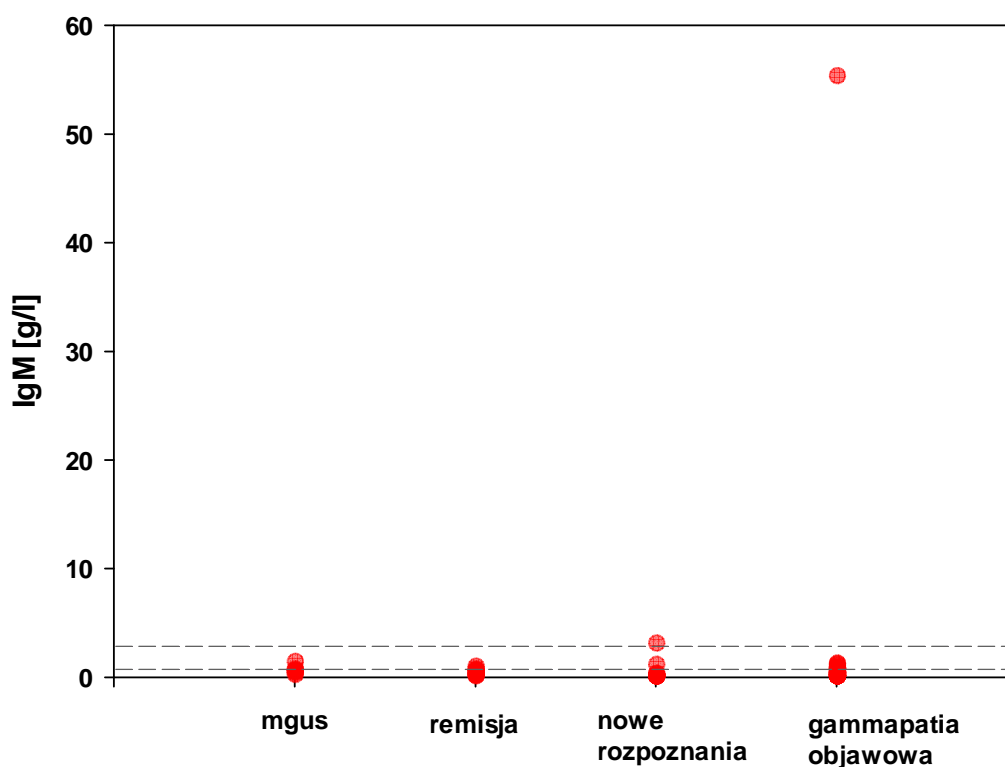
Ryc. 9 Wartości stężenia immunoglobuliny typu IgG w czterech grupach badanych. Liniami przerywanymi zaznaczono zakres wartości referencyjnych dla stężenia immunoglobuliny typu IgG, który wynosi 7-16 g/l.

Na Ryc. 10 przedstawiono stężenie immunoglobuliny typu IgA w czterech grupach badanych. Najbardziej jednorodną okazała się grupa pacjentów z gammapatią monoklonalną o nieustalonym znaczeniu. Najbardziej zróżnicowane wartości odnotowano w grupie ze świeżo postawioną diagnozą, również w tej grupie odnotowano maksymalną wartość stężenia immunoglobuliny IgA, która wyniosła 48,1 g/l. Wartość minimalna stężenia immunoglobuliny typu A zanotowana została w grupie pacjentów z gammapatią objawową i wyniosła 0,21g/l.



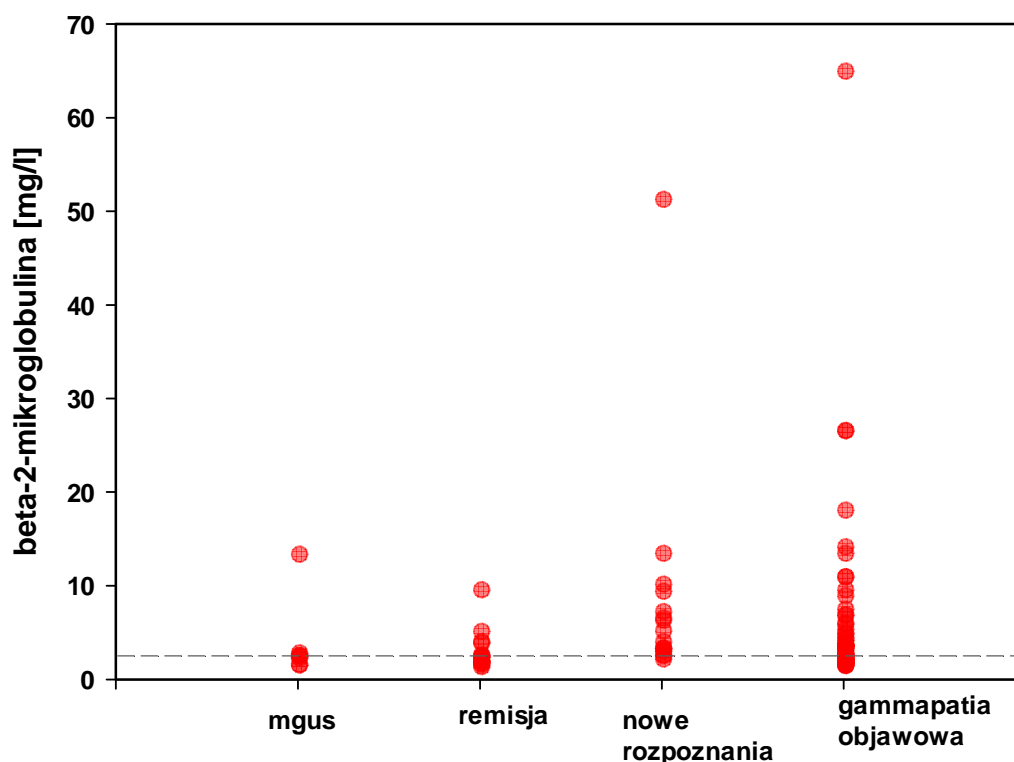
Ryc. 10 Wartości stężenia immunoglobuliny typu IgA w czterech grupach badanych. Liniami przerywanymi zaznaczono zakres wartości referencyjnych dla stężenia immunoglobuliny typu IgA, który wynosi 0,7-4,0 g/l.

Stężenie immunoglobuliny typu IgM w czterech grupach badanych zostało przedstawione na Ryc. 11. Większość wartości stężenia immunoglobuliny IgM w poszczególnych grupach mieści się w zakresie referencyjnym lub jest nieznacznie obniżona. Wyjątek stanowi wartość maksymalna, znacząco odstająca od pozostałych odnotowana w grupie z gammapatią objawową, która wynosi 55,4 g/l.



Ryc. 11 Wartości stężenia immunoglobuliny typu IgM w czterech grupach badanych. Liniami przerywanymi zaznaczono zakres wartości referencyjnych dla stężenia immunoglobuliny typu IgM, który wynosi 0,4-2,3 g/l.

Na Ryc. 12 przedstawiono stężenie beta-2-mikroglobuliny w czterech grupach badanych. Najbardziej zróżnicowane wartości odnotowano w grupie z gammapatią objawową, również w tej grupie odnotowano maksymalną wartość stężenia beta-2-mikroglobuliny, która wynosiła 65 mg/l. Wartość minimalną stężenia beta-2-mikroglobuliny odnotowano w grupie z remisją i wynosiła 1,42 mg/l.



Ryc. 12 Wartości stężenia beta-2-mikroglobuliny w czterech grupach badanych. Linia przerywaną zaznaczono zakres wartości referencyjnych dla stężenia beta-2-mikroglobuliny, który wynosi 0,7-1,8 mg/l.

4.1 Ocena czułości wybranych metod pozwalających na wykrycie białka monoklonalnego

U chorych z zaburzeniami limfoproliferacyjnymi wywodzącymi się z komórek plazmatycznych bardzo ważna jest ocena zaburzeń białkowych obejmująca wykrycie, identyfikację oraz ilościową ocenę białka monoklonalnego. Istnieje wiele różnych testów oceniających charakter i nasilenie zaburzeń białkowych. W praktyce laboratoryjnej ze względów ekonomicznych nigdy nie stosuje się wszystkich dostępnych metod jednocześnie. Tym bardziej dotkliwy jest brak jednolitych wytycznych

dotyczących diagnostyki gammapatii monoklonalnych i monitorowania procesu leczenia szpiczaka mnogiego.

Gdy w 2001 roku w USA wprowadzono do praktyki klinicznej test ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy (FLCs) [41] zaczęły pojawiać się liczne publikacje na temat różnych algorytmów diagnostycznych w wykrywaniu gammapatii monoklonalnych. Omawiano przydatność narzędzi diagnostycznych obejmujących tradycyjne techniki elektroforetyczne oraz nowy nefelometryczny test FLCs. Cały czas autorzy analizują zalety i wady różnych badań zarówno w wykrywaniu zaburzeń białkowych, które towarzyszą gammapatii monoklonalnej jak i podczas prognozowania oraz monitorowania leczenia szpiczaka. Dyskusja na ten temat toczy się cały czas, jest wciąż żywa [51, 52, 53, 54].

W niniejszej pracy wybrano cztery najszerzej stosowane testy diagnostyczne pozwalające na wykrycie a niekiedy także pomiar ilościowy białka monoklonalnego w surowicy i moczu chorych z zaburzeniami o charakterze gammapatii monoklonalnej. W czterech grupach chorych oceniono czułość diagnostyczną następujących testów:

- stosunek stężenia wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda w surowicy (FLCr)
- rozdział elektroforetyczny białek surowicy (SPE)
- rozdział elektroforetyczny białek moczu (UPE)
- immunofiksację surowicy (IFE).

4.1.1 Ocena czułości testów diagnostycznych służących do oceny zaburzeń białkowych

Czułość diagnostyczną definiuje się jako stosunek wszystkich wyników dodatnich do liczebności całej badanej grupy chorych i można wyrazić ją procentowo.

W pracy oceniono czułość diagnostyczną czterech wybranych testów diagnostycznych:

1. **FLCr** (FLC ratio - stosunek stężenia wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda w surowicy- κ/λ)

Na podstawie wartości FLCr ocenia się klonalność łańcuchów lekkich. Zakres wartości referencyjnych: 0.26-1.65. W sytuacji, gdy rozrastający się klon plazmocytów syntetyzuje wolne łańcuchy lekkie typu lambda wartość stosunku FLCr ulega obniżeniu. Wartości FLCr <0.26 wskazują na monoklonalny charakter łańcuchów lekkich typu lambda. Analogicznie, jeśli rozrastający się klon plazmocytów syntetyzuje wolne łańcuchy lekkie typu kappa wartość stosunku FLCr wzrasta. Wartości FLCr > 1.65 wskazują na monoklonalny charakter łańcuchów lekkich typu kappa. Mimo ustalenia wąskich zakresów wartości referencyjnych FLCr w praktyce w wielu przypadkach spotyka się pacjentów, u których stężenie jednego z typów łańcuchów lekkich jest sto a nawet tysiąc razy wyższe w stosunku do typu łańcucha niezwiązanego z rozrostem klonalnym.

2. **SPE** (rozdział elektroforetyczny białek surowicy krwi)

Rozdział elektroforetyczny prowadzony na podłożu agarozowym dzieli białka surowicy na pięć podstawowych frakcji - albuminy, alfa-1, alfa-2, beta i gammaglobuliny. SPE pozwala na wykrycie stref białka monoklonalnego w lokalizacji obszaru gamma, beta lub nawet alfa-2 globulin. W niniejszej pracy jako wynik dodatni zdefiniowano taki, w którym na podstawie oceny wizualnej żelu wykryto strefę białka monoklonalnego.

3. **IFE** (immunofiksacja surowicy)

IFE jest połączeniem metod immunologicznych i elektroforetycznych. Metoda ta polega na sześciokrotnym równoległym rozdziale elektroforetycznym tej samej próbki surowicy, a następnie na kolejnych ścieżkach selektywnym utrwaleniu (przy pomocy odpowiednich przeciwciał) wszystkich białek surowicy, immunoglobulin klasy IgG, IgA, IgM oraz łańcuchów kappa i łańcuchów lambda. W niniejszej pracy wynik dodatni zdefiniowano jako taki, w którym wykryto obecność białka monoklonalnego, widocznego jako wyraźnie wyróżniona strefa białkowa kompletnej cząsteczki

immunoglobuliny oraz odpowiadający mu prążek jednego z dwóch łańcuchów lekkich (kappa lub lambda) (Ryc. 3).

4. **UPE** (rozdział elektroforetyczny białek moczu)

Rozdział elektroforetyczny białek moczu wykonywano techniką SDS elektroforezy. W teście tym istnieje możliwość wykrycia:

- obecności wolnych łańcuchów lekkich typu kappa lub lambda ewentualnie innych białek drobnocząsteczkowych (białkomocz cewkowy)
- obecności albuminy i transferyny (selektywny białkomocz kłębuszkowy)
- strefy immunoglobulin (nieselektywny białkomocz kłębkowy).

Wynik dodatni testu UPE zdefiniowano jako taki, w którym wykryto obecność monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. Widocznych jako wyraźnie wyróżniona podwójna lub pojedyncza strefa białkowa o masie cząsteczkowej odpowiednio 44kDa i 22kDa.

Oceny czułości czterech wybranych testów diagnostycznych dokonano w 4 grupach chorych:

1. Chorzy ze świeżo zdiagnozowanymi zaburzeniami o charakterze gammapatii monoklonalnej [nowe rozpoznania]
2. Chorzy ze zdiagnozowanymi zaburzeniami o charakterze gammapatii monoklonalnej będący w stanie remisji [remisja].
3. Chorzy ze zdiagnozowanymi zaburzeniami o charakterze gammapatii monoklonalnej będący w trakcie leczenia [gammapatia objawowa]
4. Chorzy z gammapatią monoklonalną o nieustalonym znaczeniu [MGUS]

W Tab. 5 przedstawiono obliczoną czułość diagnostyczną 4 ocenianych testów w 4 badanych grupach.

Tab. 5 Czułość diagnostyczna czterech testów (FLCr, SPE, IFE, UPE) obliczona w czterech grupach chorych. Czułość wyrażono procentowo, jako odsetek wyników dodatnich w całej badanej grupie.

Oceniany test	Grupa badana			
	Nowe rozpoznania	Remisja	Choroba objawowa	MGUS
FLCr	88.9%	20%	78.4%	55.5%
SPE	100%	0	74.3%	100%
IFE	100%	0	87.8%	100%
UPE	83.3%	0	48.6%	11.1%

Wśród analizowanych testów laboratoryjnych największą czułością charakteryzowała się immunofiksacja surowicy (IFE) i to zarówno w grupie pacjentów ze świeżo postawioną diagnozą (100%), z gammopatią o nieustalonym znaczeniu - MGUS (100%) oraz z chorobą objawową (87,8%). Wysoka czułość immunofiksacji surowicy jest zgodna z wynikami opublikowanymi przez Kyle i wsp. [55] w 2003r. w dużym badaniu przekrojowym obejmującym 1027 pacjentów ze świeżo rozpoznanym szpiczakiem mnogim, gdzie immunofiksacja była dodatnia aż u 93% pacjentów.

W tym samym badaniu [55] u 82% pacjentów wykryto białko monoklonalne w rozdziale elektroforetycznym białek surowicy (SPE). W niniejszej pracy u wszystkich chorych ze świeżo postawioną diagnozą oraz gammopatią monoklonalną o nieustalonym znaczeniu w rozdziale elektroforetycznym białek surowicy (SPE) wykryto białko monoklonalne, natomiast w grupie z chorobą objawową u 74.3% chorych. Pomimo, że immunofiksację charakteryzuje większa czułość diagnostyczna, należy pamiętać, iż w praktyce laboratoryjnej ze względów organizacyjnych i ekonomicznych wykonanie immunofiksacji zawsze jest poprzedzone rozdziałem elektroforetycznym białek surowicy (SPE). Wcześniejsze wykonanie

elektroforezy jest także celowe przy dobraniu odpowiednich stężeń przeciwciał stosowanych w immunofiksacji.

Na szczególną uwagę zasługuje grupa pacjentów z gammopatią monoklonalną o nieustalonym znaczeniu (MGUS). Rocznie bowiem 1% przypadków gammopatii monoklonalnej o nieustalonym znaczeniu (MGUS) ulega progresji w szpiczaka mnogiego [56]. W 2009 roku opublikowano wyniki retrospektywnego badania dotyczącego progresji MGUS w szpiczaka mnogiego [57]. We wspomnianym badaniu wykorzystano zabezpieczone surowice pacjentów z rozpoznaną gammopatią monoklonalną. Surowice te zostały zabezpieczone 2 lata lub jeszcze wcześniej przed wykryciem gammopatii monoklonalnych. W celu wykrycia obecności białka monoklonalnego wykonano rozdział elektroforetyczny białek, immunofiksację oraz ilościowe oznaczenie FLCs w zabezpieczonych surowicach pacjentów, u których później wykryto gammopatie monoklonalne. W 27 na 30 zabezpieczonych surowic wykryto obecność białka monoklonalnego. W 77.8% przypadków (n=21) białko monoklonalne zostało wykryte w rozdziale elektroforetycznym białek surowicy i/lub immunofiksacji surowicy. Natomiast tylko u 6 pacjentów (22,2%) wykryto zaburzony stosunek stężeń wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin (FLCr) [57]. Jest to pierwsze tego typu badanie, w którym udokumentowano seryjne zmiany zarówno w poziomie immunoglobulin monoklonalnych jak i wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin na długo przed rozpoznaniem szpiczaka mnogiego [57]. Wyniki oceny czułości wybranych testów diagnostycznych przedstawione w niniejszej pracy są spójne z przytoczonymi. W niniejszej pracy w grupie z gammopatią monoklonalną o nieustalonym znaczeniu (MGUS) metodą elektroforezy białek surowicy i immunofiksacji surowicy wykryto obecność białka monoklonalnego u wszystkich pacjentów. Natomiast stosunek stężeń wolnych łańcuchów lekkich κ/λ był zaburzony tylko u 55,5% pacjentów.

W niniejszej pracy wśród analizowanych testów laboratoryjnych najmniejszą czułością diagnostyczną we wszystkich czterech grupach charakteryzowała się elektroforeza białek moczu (UPE). W badaniu Kyle'a i wsp. [55] rozdział elektroforetyczny białek moczu wskazywał na istnienie gammopatii monoklonalnej u 78% pacjentów.

Podobnie w niniejszej pracy w grupie chorych ze świeżo postawioną diagnozą monoklonalne wolne łańcuchy lekkie wykryto w moczu u 83.3% chorych.

Natomiast w grupie z chorobą objawową zdecydowanie mniej, bo tylko 48.6% chorych miało dodatni wynik rozdziału elektroforetycznego białek moczu (obecność wyraźnie wyróżnionej podwójnej lub pojedynczej strefy białkowej o masie cząsteczkowej odpowiednio 44 kDa i 22 kDa). W grupie z chorobą objawową znajdowali się chorzy będący w trakcie leczenia, które szybko obniża poziom wolnych łańcuchów lekkich w surowicy, redukując ich wydzielanie przez nowotworowy klon plazmocytów. Wolne łańcuchy lekkie znikają wówczas z moczu, w związku z ich krótkim czasem półtrwania. Może to tłumaczyć stosunkowo niski procent dodatnich wyników rozdziału elektroforetycznego białek moczu (obecność monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin).

Dokładniejsza analiza wyników opublikowanych przez Kyle'a i wsp. [55] wykazuje, iż ponad połowa z 1027 przebadanych pacjentów ze szpiczakiem miała parametry biochemiczne (podwyższony poziom kreatyniny i parametry pochodne - GFR) świadczące o upośledzeniu funkcji nerki. Wśród czynników prognostycznych w szpiczaku mnogim wiele dotyczy bezpośrednio funkcjonowania nerki, takich jak kreatynina surowicy, albumina surowicy, białkomocz, obecność wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w moczu. Niewydolność funkcji nerki stanowi bezpośrednią przyczynę aż 25% zgonów chorych, u których rozpoznano szpiczaka. Tak więc mimo, iż przy zastosowaniu nowocześniejszych metod diagnostycznych wykorzystujących ilościowe oznaczenie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy, elektroforeza białek moczu nie podnosi czułości rozpoznania gammapatii monoklonalnych to jest najlepszym narzędziem pozwalającym łatwo i szybko określić profil białek moczu i ocenić parametry funkcjonowania nerki a więc jeden z podstawowych parametrów prognostycznych.

Temat użyteczności badania moczu (UPE i IFE) w diagnostyce gammapatii monoklonalnych oraz podczas monitorowania leczenia szpiczaka mnogiego jest w ostatnich latach szeroko poruszany w wielu publikacjach [58].

W pracy z 2011 r. Levinson [59] rozważa przydatność elektroforezy i immunofiksacji moczu w wykrywaniu gammapatii monoklonalnych. Levinson zauważył, że istnieje ogólne przekonanie o tym, iż nowszy test ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy (FLCs) posiada większą czułość analityczną niż elektroforeza białek moczu, poza tym jego drugą zaletą jest fakt, że jest to test ilościowy w przeciwieństwie do jakościowej immunofiksacji moczu. Test FLCs jest również łatwiejszy w wykonaniu oraz bardziej korzystny z diagnostycznego punktu widzenia i ekonomiczny [30]. Opinie na temat użyteczności rozdziału elektroforetycznego białek moczu wciąż są podzielone. Niektórzy autorzy proponują wręcz rezygnację z wykonywania badania moczu (UPE, IFE), jako niewnoszącego nowych elementów do procesu diagnozy. Holding i wsp. [60] w swojej pracy z 2011r. wykazali, że u wszystkich 126 pacjentów z obecnym białkiem Bence-Jones'a w moczu wykryto nieprawidłowy stosunek wolnych łańcuchów lekkich kappa/lambda w surowicy (FLCr). Na tej podstawie Holding i wsp. [60] uznali, że większą korzyść z klinicznego punktu widzenia przyniesie rutynowe wykonywanie ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy (FLCs) zamiast rozdziału elektroforetycznego białek moczu (UPE). Podobnego zdania są Katzmann i wsp. [33]. Już kilka lat wcześniej publikowano doniesienia wskazujące na to, że oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy jako badanie dodatkowe do rozdziału elektroforetycznego białek surowicy oraz immunofiksacji surowicy pozwoli na rezygnację z badania moczu (UPE) [41, 61].

W szerokiej dyskusji dotyczącej użyteczności badań białek moczu opartych na metodach elektroforetycznych są również głosy podnoszące przydatność tej grupy badań. Palladini i wsp. [62] wykazali, że wykonanie immunofiksacji w moczu pozwoliło na wykrycie amyloidozy u 109 na 115 pacjentów, natomiast nieprawidłowy stosunek wolnych łańcuchów lekkich kappa/lambda w surowicy wykryto tylko u 88 pacjentów. Podobnie Merlini [63] wykazał, że wykonanie immunofiksacji w moczu zwiększa wykrywalność amyloidozy i badanie to powinno być wykonywane wtedy, kiedy istnieją do tego wskazania kliniczne. Levinson [59] w publikacji oceniającej użyteczność oceny

białek moczu potwierdził postulaty Merlini'ego [63], uznając ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy (FLCs) oraz immunofiksację moczu (IFE), jako badania wzajemnie się uzupełniające. Istnieje więc grupa doniesień podnosząca użyteczność badań moczu opartych o techniki elektroforetyczne. Badania elektroforetyczne pozwalają na wykrycie dodatkowych procesów chorobowych towarzyszących gammopatiom monoklonalnym (upośledzenie funkcji nerek, amyloidoza).

Pratt i wsp. [64] oceniając w swojej pracy konieczność wykonywania badania moczu (UPE, IFE) w diagnostyce gammapatii monoklonalnych zauważyli, iż w rzeczywistości w rutynowej diagnostyce gammapatii monoklonalnych wiele laboratoriów otrzymuje wyłącznie próbki surowic, którym nie towarzyszą próbki moczu. Nasza współpraca z Kliniką Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie pozwoliła na wyciągnięcie własnych, nieco odmiennych wniosków. W rutynowej diagnostyce u pacjentów z podejrzeniem zaburzeń o charakterze gammapatii monoklonalnej obok badania surowicy wykonuje się także rozdział elektroforetyczny białek moczu (UPE). Badanie to jest bardzo przydatne, ponieważ charakteryzuje się wysoką czułością przy niskim koszcie. Jednocześnie wbrew doniesieniom nie wymaga przeprowadzenia dobowej zbiórki moczu, ponieważ badanie to ma charakter jakościowy a nie ilościowy. Ponadto rozdział elektroforetyczny białek moczu dostarcza dodatkowych informacji o stanie nerek pacjenta.

4.1.2 Ocena czułości różnych kombinacji testów diagnostycznych służących do oceny zaburzeń białkowych

Jednostki chorobowe związane z klonalnym rozrostem plazmocytów mają bardzo różne manifestacje kliniczne - objawy kostne, różne formy zajęcia szpiku (rozlane nacieki, ogniska), objawy uszkodzenia nerek lub innych narządów (amyloidoza). Różne są także zmiany białkowe towarzyszące tej grupie chorób. W Tab. 6 przedstawiono szacunkową częstość występowania różnych wariantów gammapatii monoklonalnych.

Tab. 6 Szacunkowa częstość występowania różnych wariantów gammapatii monoklonalnych

Klasa immunoglobuliny	% chorych	Szczegóły
IgG	52	Kappa lub lambda (częściej kappa)
IgA	21	Kappa lub lambda (częściej kappa)
IgM	0,5	Kappa lub lambda (częściej kappa)
IgD	2	Kappa lub lambda (częściej kappa)
IgE	*	Kappa lub lambda (pojedyncze przypadki)
Kappa	9	Choroba łańcuchów lekkich
Lambda	7	Choroba łańcuchów lekkich
Tylko łańcuchy ciężkie(G lub A)	<1	Choroba łańcuchów ciężkich – najczęściej A (brak łańcuchów kappa i lambda)
Biklonalne	2	Różne kombinacje klas i typów immunoglobulin
Negatywne	7	Brak wydzielania i (lub) wytwarzania fragmentów immunoglobulin

W tej sytuacji wynik jednego testu diagnostycznego nie wystarczy do prawidłowej oceny zaburzeń białkowych. Sytuację komplikuje fakt, że różne testy diagnostyczne odznaczają się różną czułością. Natomiast równoczesne wykonywanie wszystkich dostępnych badań byłoby nieekonomiczne. Poza tym nie wszystkie laboratoria posiadają tak szeroki panel specjalistycznych badań. Dlatego też w pracy oceniono czułość diagnostyczną różnych kombinacji ocenianych testów w trzech grupach badanych (nowe rozpoznania, choroba objawowa, remisja).

Należy pamiętać o tym, iż badania diagnostyczne służą trzem celom:

1. Postawienie diagnozy
2. Monitorowanie leczenia
3. Stopniowanie zaawansowania choroby i prognozowanie

W przypadku chorób rozrostowych takich jak szpiczak mnogi, kiedy możliwe jest zastosowanie w leczeniu kilku różnych terapii, prawidłowe monitorowanie leczenia jest niezwykle ważne. Chorzy na różnych etapach leczenia poddawani są różnym wariantom terapeutycznym. Nie u wszystkich chorych wybrany tryb leczenia przynosi oczekiwane rezultaty terapeutyczne. Monitorowanie powinno umożliwiać szybkie wykrycie nieefektywności zastosowanej terapii bądź też potwierdzać jej skuteczność (całkowita remisja) [65]. Monitorowanie leczenia powinno także pozwolić na bardzo wczesne wykrycie ewentualnego nawrotu choroby, zanim dojdzie do uszkodzenia narządów, w przypadku szpiczaka mnogiego uszkodzeniu najczęściej ulegają nerki.

Według San Migel'a i wsp. [66] podstawowymi technikami diagnostycznymi w monitorowaniu leczenia pozostają rozdziały elektroforetyczne białek surowicy oraz moczu. Natomiast ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin (FLCs) w surowicy oraz inne badania, takie jak ocena szpiku kostnego metodą cytometrii przepływowej wykonuje się dodatkowo.

W pracy z 2011 roku Dogaru M. i wsp. [67] analizowali czułość diagnostyczną trzech metod: rozdziału elektroforetycznego białek surowicy (SPE), immunofiksacji surowicy (IFE) oraz stosunku wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin kappa/lambda w surowicy (FLCr) w wykrywaniu i monitorowaniu leczenia u 7 chorych na szpiczaka mnogiego. Test FLCr okazał się być bardziej czuły niż SPE, IFE oraz stężenia wolnych łańcuchów lekkich kappa oraz lambda w monitorowaniu efektywności leczenia. Ponadto immunofiksacja, jako metoda jakościowa może być interpretowana w sposób subiektywny, dlatego też nie nadaje się do monitorowania leczenia. Dogaru M. i wsp. [67] jako najlepszy test służący monitorowaniu efektywności leczenia

wskazali wartość stosunku stężeń wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda (rFLC).

W niniejszej pracy do przeprowadzenia oceny czułości diagnostycznej różnych kombinacji ocenianych testów wybrano trzy grupy chorych:

- ze świeżo postawioną diagnozą (nowe rozpoznania)
- z chorobą objawową
- w stanie remisji

Dzięki takiemu doborowi grup, możliwa była ocena czułości diagnostycznej kombinacji testów na różnych etapach choroby: podczas stawiania diagnozy i w monitorowaniu leczenia. Zbadano jak zmieni się czułość wykrywania zaburzeń o charakterze gammapatii monoklonalnej w zależności od zastosowania dwóch lub więcej ocenianych testów diagnostycznych. Wyniki analizy przedstawiono w Tab. 7 oraz Tab. 8.

Tab. 7 Czułość diagnostyczna testów połączonych w pary obliczona w trzech grupach badanych (chorzy ze świeżo postawioną diagnozą, chorobą objawową oraz w stanie remisji). Czułość wyrażono procentowo, jako odsetek wyników dodatnich ocenianych testów w całej grupie badanej.

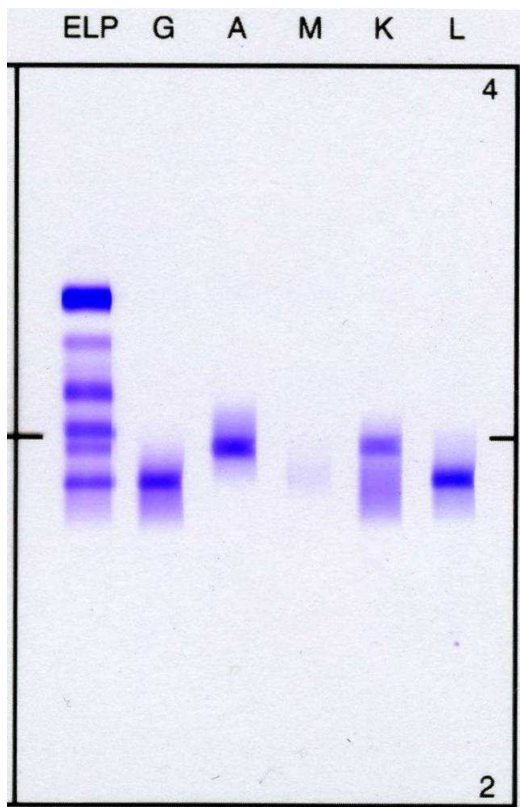
Oceniania kombinacja testów	Grupa badana		
	Nowe rozpoznania	Choroba objawowa	Remisja
FLCr+SPE	100%	95.9%	20%
FLCr+IFE	100%	98.6%	20%
FLCr+UPE	94.4%	83.8%	20%
SPE+IFE	100%	85.1%	0%
SPE+UPE	100%	85.1%	0%
IFE+UPE	100%	87.8%	0%

W grupie chorych ze świeżo postawioną diagnozą 5 na 6 zaproponowanych kombinacji par testów charakteryzowała 100% czułość. Nie jest to jednak wynik zaskakujący w kontekście oceny czułości diagnostycznej pojedynczych testów.

Ponieważ w grupie chorych ze świeżo postawioną diagnozą zarówno immunofiksację (IFE) jak i rozdział elektroforetyczny białek surowicy (SPE) charakteryzowała 100% czułość

W grupie z chorobą objawową spośród czterech ocenianych testów największą czułością charakteryzowała się IFE (87.8%). Dodanie do testu IFE parametru ilościowego, jakim jest stosunek wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda (FLCr -czułość 78.4%) zwiększyło czułość wykrywania białka monoklonalnego do 100%. Żaden z tych testów (ani IFE, ani FLCr) nie był 100% czuły, jednak ich połączenie pozwoliło na wykrycie wszystkich gammapatii monoklonalnych. Dodatkowym atutem połączenia IFE z FLCr jest fakt, iż testy te wzajemnie się weryfikują.

Istnieją rzadkie przypadki, gdy oba typy łańcuchów lekkich mają charakter monoklonalny (gammapatia biklonalna). Wtedy FLCr pozostanie w normie, natomiast testem IFE wykryjemy obecność białka monoklonalnego. Na Ryc. 13 przedstawiono wynik immunofiksacji, w której wykryto obecność białka monoklonalnego typu IgG lambda oraz IgA kappa (gammapatia biklonalna). Wartość stosunku stężenia wolnych łańcuchów lekkich κ/λ (FLCr) u tego pacjenta wynosiła 0.92, pozostawała zatem w granicach zakresu wartości referencyjnych.



Ryc. 13. Wynik immunofiksacji surowicy, w której wykryto strefę białka monoklonalnego - IgG lambda, IgA kappa (gammapatia białkowa).

W grupie z chorobą objawową wysoką, bo 95.9% czułością charakteryzowało się połączenie rozdzielania elektroforetycznego białek surowicy (SPE) ze stosunkiem wolnych łańcuchów lekkich kappa/lambda (FLCr). Pozostałe kombinacje dwóch testów w tej grupie (choroba objawowa) charakteryzowała czułość poniżej 90% (od 84.6% do 88.5%).

Uzyskane wyniki są zgodne z rezultatami obszernego badania z 2009 roku [68], w którym wzięło udział 1877 pacjentów z rozpoznanymi dyskracjami plazmocytozarnymi. Według Katzmanna i wsp. [68] najbardziej wszechstronny i kompleksowy panel badań diagnostycznych w skryningu dyskracji plazmocytozarnych obejmuje elektroforezę białek oraz immunofiksację surowicy i moczu wraz z ilościowym oznaczeniem FLCs w surowicy. Panel taki cechuje się bardzo dużą czułością diagnostyczną wynoszącą 98.6%. Wykluczenie z takiego panelu immunofiksacji surowicy oraz testów moczu spowodowało, że

liczba prawidłowo zdiagnozowanych pacjentów w grupie 1877 chorych zmniejszyła się o 58 osób, co stanowiło 3.1%. Natomiast wykluczenie z panelu diagnostycznego ilościowego oznaczenia FLCs spowodowało pominięcie 30 pacjentów, co stanowiło 1.6%. Wykazano, że różne panele badań laboratoryjnych mogą być skuteczne w wykrywaniu różnych zaburzeń wywodzących się z komórek plazmatycznych. Na przykład w przypadku szpiczaka mnogiego, makroglobulinemii Waldenstroma oraz szpiczaka bezobjawowego wystarczające wydaje się być wykonanie badania surowicy obejmujące elektroforezę białek oraz stężenie FLCs. Natomiast badanie moczu oraz immunofiksację surowicy można zlecać bardziej wybiórczo. Trzeba pamiętać, że stosując nawet pełny panel badań laboratoryjnych obejmujący: elektroforezę białek oraz immunofiksację surowicy i moczu oraz ilościowe oznaczenie FLCs w surowicy nie udało się wykryć niektórych wariantów dyskrazji plazmocytarnej u 1.4 % pacjentów.

W niniejszej pracy w kolejnym etapie analizy oceniono czułość diagnostyczną kombinacji 3 oraz wszystkich 4 testów (FLCr, SPE, IFE, UPE). Wyniki analizy przedstawiono w Tab. 8.

Tab. 8 Czułość diagnostyczna testów połączonych w trójki obliczona w dwóch grupach badanych (chorzy ze świeżo postawiona diagnozą oraz z chorobą objawową). Czułość wyrażono procentowo, jako odsetek wyników dodatnich ocenianych testów w całej grupie badanej.

Oceniana kombinacja testów	Grupa badana		
	Świeża diagnoza	Choroba objawowa	Remisja
FLCr+SPE+IFE	100%	98.6%	20%
FLCr+SPE+UPE	100%	95.9%	20%
FLCr+IFE+UPE	100%	98.6%	20%
SPE+IFE+UPE	100%	89.1%	0%
FLCr+SPE+IFE+UPE	100%	98.6%	20%

Stosując wszystkie cztery oceniane testy diagnostyczne (SPE, IFE, FLCr i UPE) w grupie z chorobą objawową wykryto 98,6% wszystkich zaburzeń. Wyłączenie z panelu diagnostycznego rozdziału elektroforetycznego białek moczu (UPE) nie zmniejszyło czułości tego panelu. Największy spadek czułości odnotowano po wyłączeniu z panelu diagnostycznego badania stosunku stężenia wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda (FLCr). Stosując tylko trzy testy (SPE, IFE i UPE, bez FLCr) zostałyby pominiętych 9,5% pacjentów (n=7).

Z przeprowadzonych z niniejszej pracy badań wynika, że u wszystkich pacjentów z rozpoznaniem 'de novo' w rozdziale elektroforetycznym białek surowicy (SPE) oraz w immunofiksacji surowicy (IFE) wykrywalne jest białko monoklonalne.

W grupie z chorobą objawową również najbardziej czuła okazała się immunofiksacja surowicy (87.8%).

We wszystkich grupach najmniejszą czułością charakteryzował się rozdział elektroforetyczny białek moczu (UPE). Również w połączeniu testów badanie UPE nie podnosiło czułości wykrywania białka monoklonalnego w żadnej z grup. Ponownie nasuwają się wątpliwości dotyczące użyteczności tego badania w diagnostyce i monitorowaniu leczenia szpiczaka mnogiego. Przytaczano już liczne publikacje, w których głosy na ten temat są podzielone. Należy pamiętać o tym, że wykonywanie rozdziału elektroforetycznego białek moczu pozwala na monitorowanie pracy nerek. Jest to bardzo istotne, ponieważ zaburzenia funkcjonowania nerek w przebiegu szpiczaka mnogiego występują często, a ich pojawienie się znacznie pogarsza rokowanie [69, 70, 71]. Ocenia się, że około 25% chorych na szpiczaka mnogiego, przed rozpoznaniem choroby trafia po raz pierwszy na badania diagnostyczne do nefrologów, z powodu towarzyszących objawów klinicznych choroby nerek, które wysuwają się na czoło obrazu klinicznego [70, 72]. Uszkodzenie nerek w przebiegu szpiczaka mnogiego wiąże się z patologicznym oddziaływaniem na nerki monoklonalnych immunoglobulin oraz łańcuchów lekkich. Stosunkowo tanią i prostą metodą pozwalającą na ocenę ryzyka uszkodzenia nerek w przebiegu szpiczaka mnogiego jest SDS-elektroforeza białek moczu. Prawidłowo techniką SDS-elektroforezy nie wykrywa się w moczu żadnych białek. Charakterystyczny dla szpiczaka mnogiego jest białkomocz Bence-Jonesa (Ryc. 14). Widoczna strefa dimeru i monomeru wolnych łańcuchów lekkich oraz brak obecności innych frakcji białkowych świadczących o uszkodzeniu kłębuszków nerkowych.



Ryc. 14. Wynik rozdziału elektroforetycznego białek moczu. Widoczna strefa monomeru i dimeru monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. Brak obecności innych frakcji białkowych świadczących o uszkodzeniu kłębuszków nerkowych.

Widoczne strefy albuminy, transferyny i immunoglobulin oprócz strefy monomeru i dimeru wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin świadczą o uszkodzeniu błony podstawnej kłębuszka nerkowego - nieselektywny białkomocz kłębuszkowy (Ryc. 15).



Ryc. 15. Wynik rozdziału elektroforetycznego białek moczu. Widoczna strefa immunoglobulin (IgG), albuminy (alb), transferyny (trf) oraz monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin (monomer i dimer).

Obrazy te potwierdzają sens wykonywania rozdziału elektroforetycznego białek moczu w diagnostyce i monitorowaniu szpiczaka. BOWIEM szybkie wdrożenie terapii obejmującej prawidłowe nawodnienie chorego, korekcję hiperkalcemii, hiperurikemii oraz leczenie przyczynowe szpiczaka daje szansę na długotrwałą poprawę funkcji nerek i ograniczenie nieodwracalnego uszkodzenia nerek w przebiegu choroby [73].

4.2 Ocena współzależności stężenia beta-2-mikroglobuliny i stosunku wolnych łańcuchów lekkich (FLCr) w surowicy

Beta-2-mikroglobulina jest białkiem drobnocząsteczkowym, obecnym na powierzchni większości komórek w ustroju, szczególnie na limfocytach T, B i makrofagach. Poziom tego białka w surowicy jest zależny zarówno od ilości (a więc całkowitej masy) komórek plazmatycznych, jak i od wskaźnika filtracji kłębuszkowej. Znaczenie rokownicze stężenia beta-2-mikroglobuliny we krwi w szpiczaku mnogim zostało potwierdzone w wielu badaniach na przestrzeni ostatnich 30 lat [74].

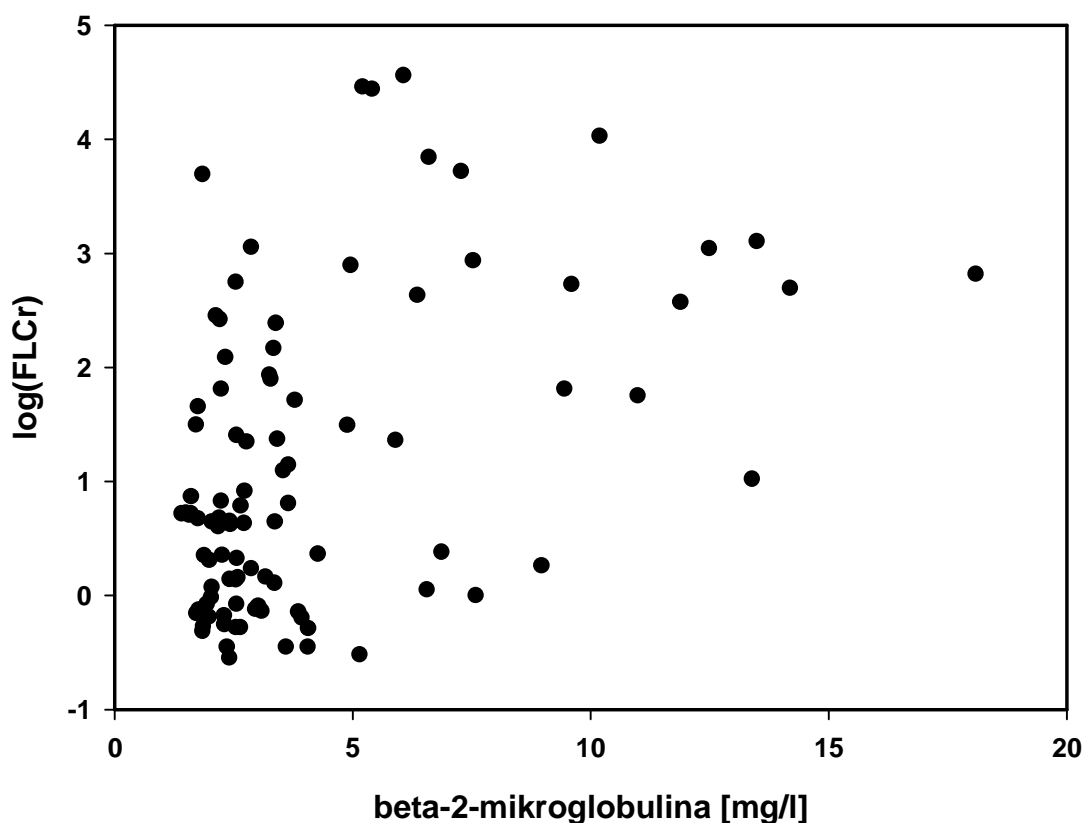
Wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin (FLCs) wytwarzane są przez plazmocyty zawsze w pewnym nadmiarze w stosunku do kompletnych cząsteczek immunoglobulin. Jako białka niekompletne powinny ulec procesowi degradacji we wnętrzu komórki. Jednak w pewnej części wymykają się mechanizmom

kontroli poprawności wydzielanego białka i jako nieliczne białka o wadliwej strukturze wydzielane są na zewnątrz komórki. Okres półtrwania wolnych łańcuchów lekkich we krwi jest krótki i dla łańcuchów typu kappa wynosi 2-4 godzin a dla łańcuchów lambda, które występują wyłącznie w formie dimeru o większej masie cząsteczkowej jest nieco dłuższy i wynosi 3-6 godzin. Intensywna synteza wolnych łańcuchów lekkich jest jednym ze znaczących czynników prowadzących do pogorszenia stanu klinicznego pacjentów chorych na szpiczaka.

W piśmiennictwie potwierdzono korelację stężenia wolnych łańcuchów lekkich (FLCs) oraz beta-2-mikroglobuliny z liczbą plazmacytów w szpiku [75, 76].

W pracy oceniono wzajemne relacje pomiędzy stężeniem beta-2-mikroglobuliny i wartością stosunku wolnych łańcuchów lekkich κ/λ (FLCr) w grupie 98 chorych ze zdiagnozowanymi zaburzeniami o charakterze gammapatii monoklonalnych. W grupie badanej znajdowało się 73 chorych ze zdiagnozowanych szpiczakiem mnogim (MM), 8 chorych ze zdiagnozowaną chorobą łańcuchów lekkich (LCMM), 7 chorych ze zdiagnozowanym guzem plazmacytoma solitare, 6 chorych ze zdiagnozowanym MGUS (gammapatia monoklonalna o nieustalonym znaczeniu) oraz 6 chorych ze zdiagnozowanym szpiczakiem tłącym się (SMM).

Na Ryc. 16 zestawiono wartości stężenia beta-2-mikroglobuliny oraz logarytmy stosunku stężeń wolnych łańcuchów lekkich w surowicy kappa/lambda ($\log(\text{FLCr})$). U chorych, u których frakcję monoklonalną stanowiły wolne łańcuchy lekkie typu lambda zestawiono logarytmy stosunku stężeń wolnych łańcuchów lambda/kappa.



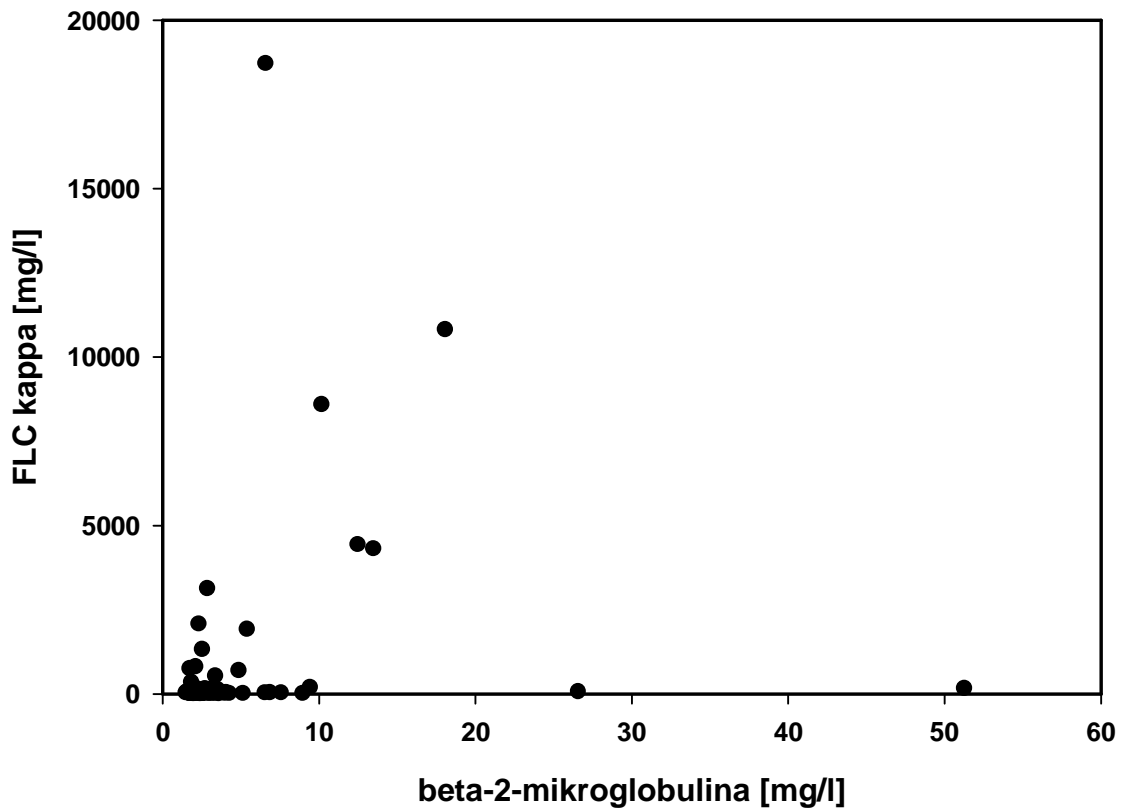
Ryc. 16 Stężenie beta-2-mikroglobuliny, wyrażone w mg/l oraz wartości logarytmu stosunku stężeń wolnych łańcuchów lekkich w surowicy kappa/lambda ($\log(\text{FLCr})$) u 98 pacjentów z rozpoznaną gammapatią monoklonalną. U pacjentów, u których frakcję monoklonalną stanowiły wolne łańcuchy lekkie lambda zestawiono logarytmy stosunku stężeń wolnych łańcuchów lekkich lambda/kappa.

Zależność stężenia beta-2-mikroglobuliny i logarytmu stosunku stężenia wolnych łańcuchów lekkich (kappa/lambda lub lambda/kappa) przeanalizowana testem korelacji rang Spearmana dla wartości $p=0,000859$ dała wynik 0,333, co oznacza, że zależność jest istotna statystycznie, choć nie jest zbyt silna.

Podobną analizę zależności przeprowadzono w opublikowanej w 2008 roku pracy autorstwa T. Pika i wsp. [50] dotyczącej korelacji poziomu wolnych łańcuchów lekkich w surowicy oraz innych wybranych parametrów laboratoryjnych, istotnych w monitorowaniu szpiczaka mnogiego - między innymi beta-2-mikroglobuliny. W publikacji T. Pika i wsp. analizowano grupę

102 chorych ze zdiagnozowanym szpiczakiem mnogim. Analizę statystyczną we wspomnianej pracy przeprowadzono w dwóch podgrupach: z monoklonalną linią plazmocytną wytwarzającą wolne łańcuchy lekkie typu kappa oraz z monoklonalną linią plazmocytną wytwarzającą wolne łańcuchy lekkie typu lambda.

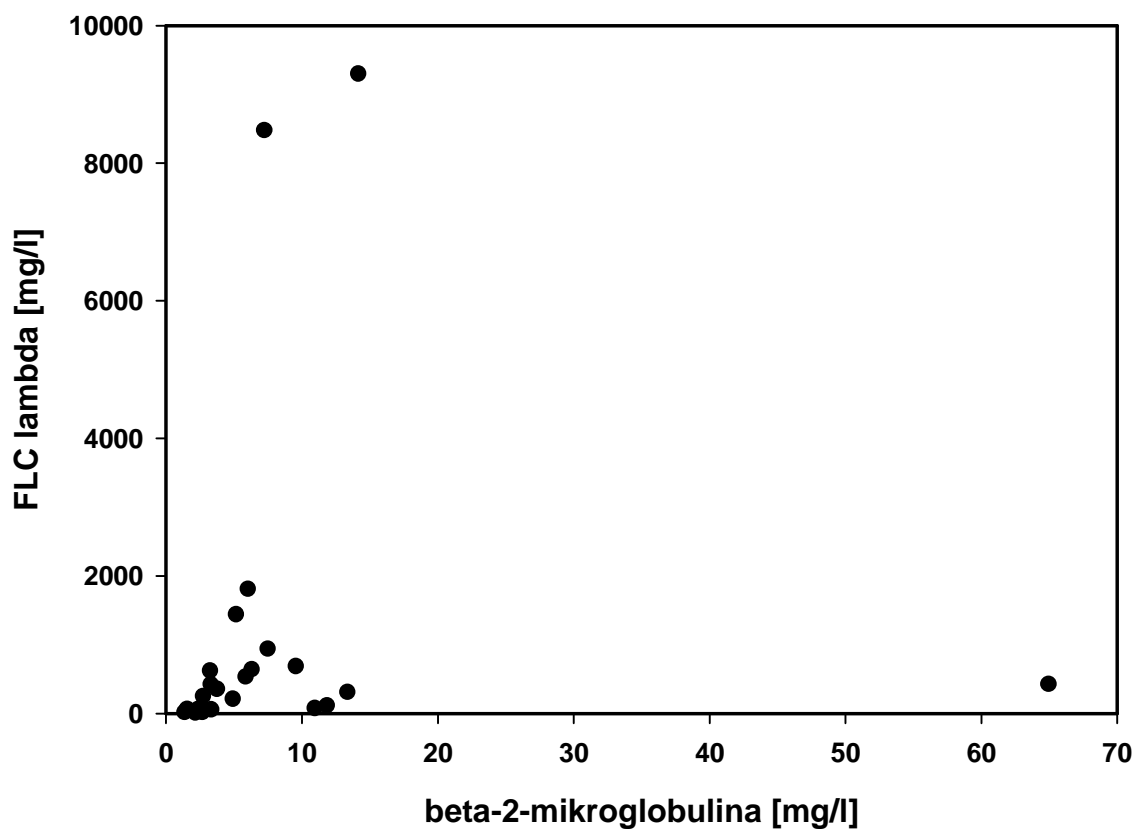
W niniejszej pracy także przeprowadzono analizę zależności między stężeniem beta-2-mikroglobuliny a stosunkiem stężeń wolnych łańcuchów lekkich surowicy uwzględniającą typ wolnych łańcuchów lekkich o charakterze monoklonalnym. U 72 spośród 98 pacjentów monoklonalne łańcuchy lekkie były typu kappa. Na Ryc. 17 przedstawiono wykres zależności stężenia wolnych łańcuchów lekkich typu kappa oraz stężenia beta-2-mikroglobuliny w surowicy krwi.



Ryc. 17. Stężenie beta-2-mikroglobuliny wyrażone w mg/l oraz stężenie wolnych łańcuchów lekkich typu kappa wyrażone w mg/l u 72 pacjentów z rozpoznaną gammopatią monoklonalną, u których charakter monoklonalny wykazują łańcuchy lekkie typu kappa.

Zależność stężenia beta-2-mikroglobuliny i stężenia monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich typu kappa przeanalizowana testem korelacji rang Spearmana dla wartości $p=0,0113$ dała wynik 0,298. Uzyskana wartość jest istotna statystycznie, nie jest to jednak zależność bardzo silna.

U 26 z 98 pacjentów monoklonalne wolne łańcuchów lekkich były typu lambda. Na Ryc.18 przedstawiono wykres zależności stężenia monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich typu lambda oraz stężenia beta-2-mikroglobuliny w surowicy krwi.



Ryc.18 Stężenie beta-2-mikroglobuliny wyrażone w mg/l oraz stężenie wolnych łańcuchów lekkich typu lambda wyrażone w mg/l u 26 pacjentów z rozpoznaną gammapatią monoklonalną, u których charakter monoklonalny wykazują łańcuchy lekkie typu lambda.

Zależność stężenia beta-2-mikroglobuliny i stężenia monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich typu lambda przeanalizowana testem korelacji rang Spearmana dla wartości $p=0,0000295$ dała wynik 0,703. Uzyskana wartość jest istotna statystycznie i jest silna.

Podobne wyniki zostały przedstawione przez czeską grupę naukowców we wspomnianej już pracy [50] z 2008 roku. Wyliczony przez nich współczynnik korelacji rang Spearmana był także wyższy w grupie z monoklonalnymi wolnymi łańcuchami lekkimi typu lambda i wynosił 0,476 dla wartości $p=0,003$, podczas gdy w grupie z monoklonalnymi wolnymi łańcuchami lekkimi typu kappa wyliczony dla $p=0,005$ współczynnik wynosił 0,344.

Dodatnia korelacja między stężeniem beta-2-mikroglobuliny i stężeniem wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin może być związana z faktem, iż oba parametry są w pewnym sensie miarą masy guza. Nie można jednak zapominać o tym, że zarówno beta-2-mikroglobulina jak i wolne łańcuchy lekkie są białkami drobnocząsteczkowymi, więc na ich stężenie w surowicy duży wpływ ma filtracja kłębuszkowa, która z kolei w przebiegu szpiczaka mnogiego bardzo często spada.

Przebieg choroby i czas przeżycia chorych na szpiczaka mnogiego są bardzo zróżnicowane. Wynika to przede wszystkim z cech biologicznych, charakteryzujących samego chorego jak i cech biologicznych nowotworu. Od początku lat sześćdziesiątych prowadzone były liczne badania mające na celu zidentyfikowanie i określenie cech o znaczeniu prognostycznym w przebiegu szpiczaka [77, 78, 79]

Stężenie beta-2-mikroglobuliny jest uznanym czynnikiem o znaczeniu rokowniczym w przebiegu szpiczaka mnogiego, jednak w dalszym ciągu podejmowane są poszukiwania nowych markerów białkowych, pozwalających na ocenę skuteczności zastosowanej terapii bądź nawet przewidywanie odpowiedzi na leczenie [80].

Na Ryc. 17 oraz Ryc.18 zwraca uwagę znaczna rozpiętość zakresu stężeń wolnych łańcuchów lekkich. Najwyższe wartości stężeń rzędu 10000 - 19000 mg/l są 1000 razy wyższe od zakresu górnej wartości zakresu referencyjnego. Natomiast zakres stężeń beta-2-mikroglobuliny zmienia się w znacznie

węższych granicach. Mimo doniesień, że bezwzględne stężenia wolnych łańcuchów lekkich nie są zbyt użytecznym parametrem rokowniczym w przebiegu szpiczaka [25] uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazujące na istnienie istotnej statystycznie zależności między stężeniem wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin i stężeniem beta-2-mikroglobuliny mogą być racjonalnie wytłumaczone. Mimo znacznej (obejmującej cztery rzędy wielkości) rozpiętości stężeń wolnych łańcuchów lekkich, trudno sobie wyobrazić sytuację, w której ilość produkowanych w organizmie wolnych łańcuchów lekkich jest zupełnie niezwiązana z ilością monoklonalnych komórek plazmatycznych. Słabe zależności między stężeniem beta-2-mikroglobuliny i stężeniem wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin są prawdopodobnie spowodowane bardzo zmiennym przebiegiem choroby i jej różnorodnymi manifestacjami klinicznymi. Z jednej strony mamy do czynienia z chorobą łańcuchów lekkich, w której wolne łańcuchy lekkie są jedynym fragmentem immunoglobuliny wydzielanym przez namnażające się plazmocyty, z drugiej strony w szpiczaku niewydzielającym (nonsecretory multiple myeloma - NSMM) lub niewytwarzającym stężenia monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich są bardzo niskie lub zerowe.

4.3 Ocena nowego testu FreeLite®- ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich typu kappa oraz lambda w surowicy

Test FreeLite® firmy Binding Site został wprowadzony do praktyki diagnostyki laboratoryjnej w USA w roku 2001 [41]. Ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin wraz z oceną stosunku wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda jest parametrem stosunkowo nowym. Test ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich jest szeroko rekomendowany w piśmiennictwie, jako element znacznie podnoszący efektywność strategii wykrywania białka monoklonalnego opartej na laboratoryjnych wynikach badań surowicy [41, 42]. Jest użyteczny w przypadkach choroby łańcuchów lekkich czy amyloidozy. Ponadto dowiedziono prognostycznej wartości ilościowego oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich w surowicy dla progresji w przypadku gammapatii monoklonalnej o nieustalonym znaczeniu - MGUS [2], szpiczaka tłęcego [81] oraz dla przeżycia w przypadku

szpiczaka mnogiego [82, 83, 84], guzów plazmacytoma [85] oraz amyloidozy [86].

Test FreeLite® obejmuje oznaczenie stężenia wolnych łańcuchów lekkich typu kappa oraz typu lambda a także wyliczenie stosunku stężeń wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda.

W niniejszej pracy dokonano oceny czułości diagnostycznej stosunku stężeń wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda (FLCr) w surowicy. W zestawieniu z innymi testami laboratoryjnymi. Wykazano, że wśród badanych testów diagnostycznych największą czułością charakteryzowała się oparta o procedury elektroforetyczne immunofiksacja surowicy. Czułość diagnostyczna immunofiksacji w porównaniu z lateksowym testem FLCr jako narzędziem do wykrywania gammapatii monoklonalnej była większa zarówno w grupie pacjentów ze świeżo postawioną diagnozą (100% versus 88.9%), jak i w grupie z chorobą objawową (87.8% versus 78.4%). Należy jednak pamiętać, że immunofiksacja surowicy jest metodą bardzo pracochłonną, złożoną z wielu procedur elektroforetycznych i immunologicznych, które bardzo trudno zautomatyzować. Metoda oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin została zaimplementowana na wiele typów powszechnie używanych w laboratoriach automatycznych analizatorów biochemicznych [25].

Wyspecjalizowane badania laboratoryjne związane z diagnostyką gammapatii monoklonalnych są stosunkowo drogie. Mimo, że z danych zamieszczonych w Tab. 9 wynika, że koszty immunofiksacji są niższe od kosztów FLCr to wartości te są prawdopodobnie prawdziwe tylko w warunkach polskich laboratoriów, gdzie koszty pracy wykwalifikowanego personelu są niskie. W polskich laboratoriach diagnostycznych immunofiksacja białek surowicy wykonywana jest rzadko, gdyż wymaga dobrze wykwalifikowanego personelu potrzebnego do wykonania samego oznaczenia jak i ostatecznej interpretacji wyników obciążonych piętnem subiektywnej interpretacji. Oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin jest procedurą w pełni zautomatyzowaną i ilościową.

Tab. 9 Przybliżone koszty badań laboratoryjnych stosowanych w diagnostyce i monitorowaniu leczenia szpiczaka mnogiego.

Rodzaj badania	Przybliżony koszt badania
Elektroforeza białek surowicy (SPE)	18 zł
Immunofiksacja surowicy (IFE)	125 zł
Ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin kappa oraz lambda (FLCs)	200zł
Elektroforeza białek moczu (UPE)	35zł

4.3.1 Nieśpójności diagnostyczne i analityczne dotyczące ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin

Test ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich w surowicy (FLCs) techniką FreeLite® został wprowadzony do rutynowych oznaczeń w Szpitalu Uniwersyteckim w Krakowie w roku 2008. Doświadczenia własne w ilościowym oznaczaniu wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin dowodzą występowania pewnych nieśpójności. W praktyce laboratoryjnej okazało się, iż zdarzają się przypadki rozbieżności wyników ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich testem Freelite® (Binding Site) i innymi metodami immunochemicznymi a także metodami elektroforetycznymi. W miarę upływu czasu rozbieżności analityczne obserwowane były także przez innych autorów [87, 88, 89, 90]. Znaczące nieśpójności dotyczące oznaczania stężenia wolnych łańcuchów lekkich oraz stosunku stężenia wolnych łańcuchów lekkich kappa/lambda zarówno pomiędzy metodami oraz wewnątrz samej metody zostały potwierdzone przez UK NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*) [87].

Osobną grupę niespójności stanowią **niezgodności diagnostyczne**, w których jeden z elementów składających się na obraz gammapatii monoklonalnej jest niespójny z innymi.

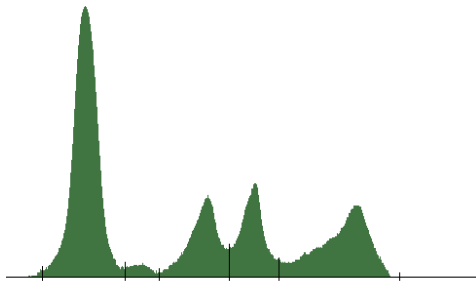
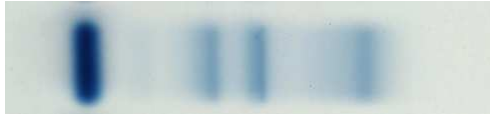
4.3.1.1 Niespójności diagnostyczne związane z ilościowym oznaczeniem wolnych łańcuchów lekkich.

Jak już wspomniano powyżej **niespójności diagnostyczne** zdefiniowano, jako takie, w których jeden z elementów składających się na obraz gammapatii monoklonalnej jest niespójny z innymi.

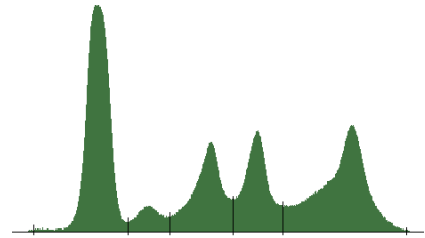
W Tab. 10 zestawiono wyniki pacjenta ze zdiagnozowanym w 2007 roku szpiczakiem mnogim klasy IgG, u którego wyniki stosunku stężenia wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda (FLCr) w surowicy od maja do grudnia 2009 pozostawały w normie, jednak przez cały ten okres w rozdzielach elektroforetycznych białek surowicy krwi w strefie gamma widoczny był prążek białka monoklonalnego, który w każdym kolejnym rozdziale był coraz mocniejszy [ryc 19-22]. Rozdziały elektroforetyczne białek surowicy uwidaczniają znaczny wzrost stężenia białka monoklonalnego w surowicy chorego, bez zmian w poziomach wolnych łańcuchów lekkich oraz w wartości stosunku wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda w surowicy.

Tab. 10 Zestawienie wyników pacjenta ze zdiagnozowanym w 2007 r. szpiczakiem mnogim typu IgG: ilościowe oznaczenie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy wraz z wyliczonym stosunkiem wolnych łańcuchów kappa do lambda oraz stężenie białka monoklonalnego wyliczone techniką densytometryczną na podstawie rozdziału elektroforetycznego białek surowicy. W okrągłych nawiasach podano wartości referencyjne dla poszczególnych parametrów.

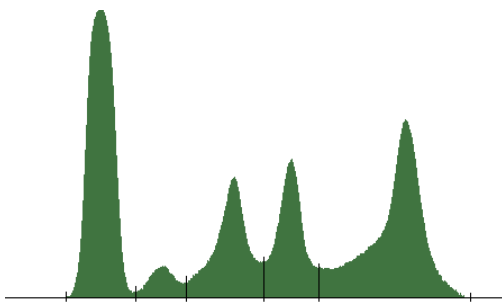
Data badania [D/M/R]	KF [mg/l] (3.3-19.4)	LF [mg/l] (5.71-26.3)	FLCr (0.26-1.65)	Stężenie białka monoklonalnego, wyliczone na podstawie SPE [mg/l]
29/05/2009	15.4	11.1	1.39	8400
21/08/2009	13.3	11.3	1.17	12100
30/11/2009	16.7	12.3	1.35	17700
29/12/2009	22.8	16.1	1.42	16200



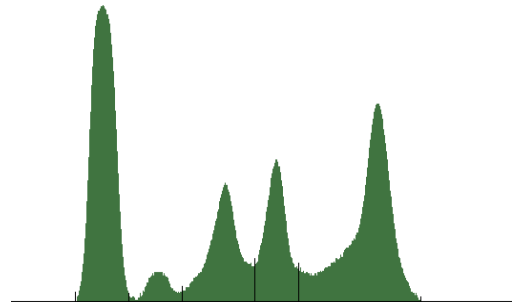
Ryc. 19 Rozdział elektroforetyczny białek surowicy z dnia 29. 05. 2009r. z widocznym prążkiem białka mmonoklonalnego w strefie gamma.



Ryc. 20 Rozdział elektroforetyczny białek surowicy z dnia 21. 08. 2009r. z widocznym prążkiem białka monoklonalnego w strefie gamma.



Ryc. 21 Rozdział elektroforetyczny białek surowicy z dnia 30.11. 2009r. z widocznym prążkiem białka monoklonalnego w strefie gamma.



Ryc. 22 Rozdział elektroforetyczny białek surowicy z dnia 29. 12. 2009r. z widocznym prążkiem białka monoklonalnego w strefie gamma.

Inne przypadki **niespójności diagnostycznej** odnotowano jeszcze u 30 pacjentów. Łącznie w okresie od kwietnia 2008r. do końca grudnia 2009r. odnotowano 40 incydentów (niektórzy pacjenci byli badani więcej niż jeden raz) niespójności wyników ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich w surowicy z wynikami rozdziałów elektroforetycznych białek surowicy oraz moczu, a także z wynikami immunofiksacji surowicy. We wszystkich przypadkach wynik stosunku stężenia wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda (FLCr) pozostawał w normie, natomiast przynajmniej jeden z testów obrazowych (SPE, UPE, IFE) był dodatni tzn. potwierdzał obecność białka monoklonalnego. W Tab. 11 przedstawiono w kolejności chronologicznej 40 incydentów **niespójności diagnostycznych** wyników ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich w surowicy i wyników testów elektroforetycznych (SPE, UPE, IFE).

Tab. 11 Niezgodne wyniki ilościowego oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich w surowicy oraz testów obrazowych (SPE- rozdział elektroforetyczny białek surowicy, IFE-immunofiksacja surowicy, UPE- rozdział elektroforetyczny białek moczu). Wyniki przedstawiono w kolejności chronologicznej. Zakres wartości referencyjnych (surowica) dla wolnych łańcuchów lekkich typu kappa (κ): 3.3-19.4 mg/l; typu lambda (λ): 5.71-26.3 mg/l; rFLC (κ/λ)=0.26-1.65.

Lp.	Data badania	FLC κ [mg/l]	FLC λ [mg/l]	rFLC	Dodatnie testy obrazowe
1	2008-04-11	11,5	9,19	1,25	SPE
2	2008-04-25	1,63	4,69	0,35	SPE, IFE
3	2008-04-25	35,5	49,6	0,72	SPE, IFE
4	2008-05-16	17,1	17,3	0,99	SPE
5	2008-05-30	7,15	20,5	0,35	SPE
6	2008-06-13	10,1	12,8	0,79	SPE
7	2008-07-25	15,5	12,9	1,2	SPE
8	2008-08-22	13,3	33,9	0,39	SPE
9	2008-11-14	21,6	14,8	1,45	SPE, UPE
10	2008-11-28	49,6	84,2	0,59	SPE, IFE, UPE
11	2009-02-06	16,4	11,4	1,44	SPE, IFE, UPE
12	2009-04-03	12,1	9,52	1,27	SPE, IFE, UPE
13	2009-04-17	32,5	63,3	0,51	SPE, IFE, UPE
14	2009-04-24	6,66	19,7	0,34	SPE
15	2009-04-30	5,71	8,58	0,67	SPE
16	2009-04-30	6,72	8,78	0,77	SPE, IFE
17	2009-04-30	23,1	27,5	0,84	SPE, IFE
18	2009-05-22	26	74,6	0,35	SPE, IFE, UPE
19	2009-05-22	23,3	17,1	1,37	SPE, IFE
20	2009-06-12	1,67	3,99	0,42	SPE
21	2009-07-17	11,1	18,3	0,61	SPE
22	2009-07-31	11,9	14,3	0,83	SPE, IFE
23	2009-07-31	19,7	24,7	0,8	SPE, IFE
24	2009-08-21	11,6	8,16	1,42	SPE, IFE
25	2009-08-28	10,5	18,9	0,55	SPE, IFE
26	2009-09-04	27,1	19,2	1,41	SPE
27	2009-09-04	30,4	42,8	0,71	SPE, IFE, UPE
28	2009-09-11	9,28	15,7	0,59	SPE, IFE
29	2009-09-18	14,3	19,2	0,75	SPE
30	2009-10-02	8,58	6,33	1,36	IFE
31	2009-10-16	6,1	11,5	0,53	SPE, IFE
32	2009-10-16	10,9	13	0,83	SPE, IFE
33	2009-10-16	10,3	8,96	1,15	SPE, IFE
34	2009-10-23	62	98,2	0,63	SPE, IFE

35	2009-10-23	8,35	7,12	1,17	IFE
36	2009-10-23	2,18	7,93	0,28	SPE, IFE
37	2009-11-04	9,58	22,8	0,42	SPE, IFE
38	2009-11-04	13,2	18,2	0,72	SPE, IFE
39	2009-11-06	17,3	18,6	0,93	SPE, IFE
40	2009-11-25	6,67	13,2	0,505	SPE

Obserwowane **niespójności diagnostyczne** mogą mieć dwie przyczyny. Biologiczną - szpiczak mnogi jest chorobą o dużej zmienności, może mieć bardzo zróżnicowany przebieg i różną manifestację kliniczną. Towarzyszą temu bardzo zróżnicowane zmiany patologiczne dotyczące profilu białkowego. Wolne łańcuchy lekkie mogą towarzyszyć kompletnej cząsteczce immunoglobuliny monoklonalnej, mogą być jedynym fragmentem immunoglobuliny wydzielanym przez namnażające się plazmocyty (choroba łańcuchów lekkich) ale mogą też występować w bardzo niskim, nawet zerowym stężeniu (szpiczak niewydzielający lub niewytwarzający).

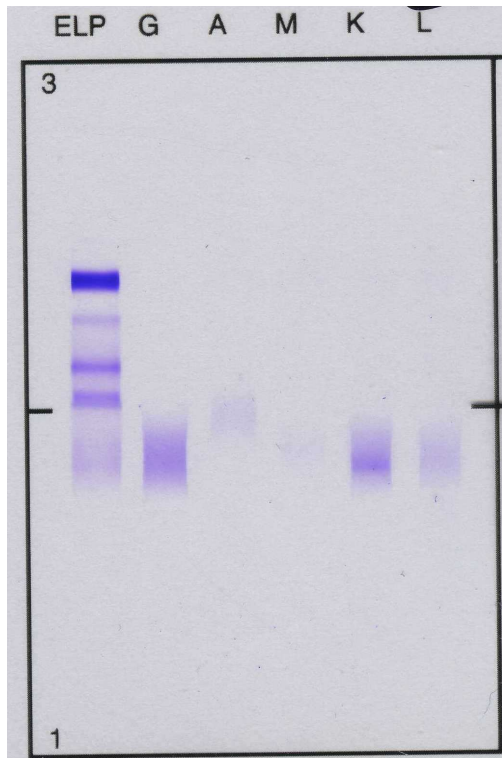
Druga przyczyna **niespójności diagnostycznych** – analityczna, mogąca mieć związek z metodyką oznaczania stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin została omówiona w dalszym rozdziale.

4.3.1.2 Niespójności analityczne dotyczące ilościowego oznaczania FLCs w surowicy metodą nefelometryczną oraz technikami elektroforetycznymi

Niespójności analityczne występują wtedy, kiedy wynik ilościowego oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich uzyskany metodą nefelometryczną nie zgadza się z wynikiem uzyskanym inną metodą.

Jednym z typów niezgodności analitycznych są niepokrywające się wzajemnie wyniki ilościowego oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich techniką nefelometryczną i rozdziałów elektroforetycznych białek oraz immunofiksacji surowicy.

Na Ryc. 23 przedstawiono wynik immunofiksacji surowicy pacjenta z rozpoznanym szpiczakiem mnogim. Na Ryc. 24 przedstawiono rozdział elektroforetyczny białek surowicy tego samego pacjenta.



Ryc.23 Immunofiksacja surowicy pacjenta z widocznym prążkiem monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich typu kappa. Stężenie wolnych łańcuchów lekkich typu kappa w surowicy oznaczone testem FreeLite® wyniosło 5880 mg/l.



Ryc.24 Rozdział elektroforetyczny białek surowicy pacjenta bez widocznego prążka monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich. Stężenie wolnych łańcuchów lekkich typu kappa w surowicy oznaczone testem FreeLite® wyniosło 5880 mg/l.

Na wyniku immunofiksacji [Ryc.23] w obszarze gammaglobulin jest widoczny delikatny prążek monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich typu kappa. Natomiast na wyniku rozdziału elektroforetycznego białek surowicy [Ryc. 24] w obszarze gammaglobulin nie ma żadnego prążka monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. W odniesieniu do wyżej przedstawionych obrazów duży niepokój budzą wyniki ilościowego oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich w surowicy testem FreeLite® przedstawione w Tab. 12.

Tab. 12 Wyniki oznaczeń immunochemicznych pacjentki z rozpoznaniem szpiczakiem mnogim wraz z zakresami wartości referencyjnych.

Nazwa badania	Wynik badania	Zakres referencyjny
FLC kappa	5880,0 mg/l	3,30-19,4
FLC lambda	11,70 mg/l	5,71-26,30
FLCr kappa/lambda	502,56	0,26-1,65
Łańcuchy lekkie kappa	2420 mg/l	1700-3700
Łańcuchy lekkie lambda	1020 mg/l	900-2100
Kappa/lambda	2,37	1,35-2,65

Przedstawione w wyniki są niespójne z wynikiem elektroforezy białek i immunofiksacji surowicy. Widoczny w immunofiksacji prążek monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich w żadnym wypadku nie odpowiada 6 g białka. Zwraca również uwagę niezgodność pomiędzy ilościowym oznaczeniem wolnych łańcuchów lekkich (FLC) a ilościowym oznaczeniem całkowitych łańcuchów lekkich (TLC) w surowicy pacjenta. Wolne łańcuchy lekkie (FLC) stanowią bowiem tylko część całkowitych łańcuchów lekkich (TLC), jednak w tym przypadku stężenie FLC jest ponad dwukrotnie wyższe od stężenia całkowitych łańcuchów lekkich.

Zależność pomiędzy wynikami ilościowego oznaczania immunoglobuliny monoklonalnej metodą elektroforezy białek surowicy i techniką immunonefelometryczną została zbadana przez Murray'a i wsp. [91]. Zauważono systematyczne różnice w ilościowym oznaczaniu immunoglobuliny typu IgM i IgG metodą rozdziału elektroforetycznego białek surowicy oraz metodą nefelometryczną. W przypadku immunoglobulin monoklonalnych klas IgM zauważono tendencję do zawyżania wyniku metodą nefelometryczną. Wspomniane badanie dotyczące kompletnej cząsteczki immunoglobuliny, wskazuje na to, że nie bez znaczenia wydaje się być monoklonalny charakter oznaczanego białka. Ponadto potwierdza brak spójności wyników otrzymanych różnymi metodami.

4.3.1.3 Niespójności analityczne dotyczące ilościowego oznaczania FLCs w surowicy oraz ilościowego oznaczania całkowitych łańcuchów lekkich w surowicy

Niespójności analityczne występują wtedy, kiedy wynik ilościowego oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich uzyskany metodą nefelometryczną nie zgadza się z wynikiem uzyskanym inną metodą.

Drugim z typów niespójności analitycznej pomiędzy metodami, jakim objęte jest ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy jest brak zgodności pomiędzy stężeniem wolnych łańcuchów lekkich (*FLC-free light chains*) w surowicy i stężeniem całkowitych łańcuchów lekkich (*TLC-total light chains*) w surowicy.

W teście FreeLite® (ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich kappa oraz lambda) wykorzystuje się poliklonalne przeciwciała reagujące wyłącznie z epitopami, które są odsłonięte tylko wtedy, gdy łańcuchy lekkie występują w formie wolnej. Epitopy te są schowane, podczas gdy łańcuchy lekkie są połączone z łańcuchami ciężkimi (kompletna cząsteczka immunoglobuliny).

W teście ilościowego oznaczania całkowitych łańcuchów lekkich kappa oraz lambda wykrywane są zarówno łańcuchy lekkie wolne jak te związane z łańcuchami ciężkimi. Dlatego też poziom wolnych łańcuchów lekkich nie powinien przewyższać poziomu łańcuchów całkowitych, ponieważ łańcuchy wolne stanowią tylko część łańcuchów całkowitych.

Badając niespójności analityczne porównywano wyniki ilościowego oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich (FLC) w surowicy testem FreeLite® z wynikami ilościowego oznaczenia całkowitych łańcuchów lekkich (TLC) (Siemens) w surowicy. Badano surowice pacjentów z rozpoznaniem szpiczakiem mnogim.

Analizując otrzymane wyniki zaobserwowano, że niejednokrotnie poziom wolnych łańcuchów lekkich (FLC) typu kappa lub lambda zmierzony testem FreeLite® był kilkakrotnie (nawet 10 razy) wyższy od poziomu całkowitych łańcuchów lekkich (TLC) zmierzonego metodą nefelometryczną (Siemens).

W Tab. 13 przedstawiono 12 niespójnych wyników ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich (FLC) typu kappa z wynikami ilościowego oznaczania całkowitych łańcuchów lekkich (TLC) typu kappa w surowicy wybranych pacjentów z rozpoznaniem szpiczakiem mnogim.

Tab. 13 Niespójne wyniki ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich typu kappa z wynikami ilościowego oznaczania całkowitych łańcuchów lekkich typu kappa w surowicy. Stężenia wolnych i całkowitych łańcuchów lekkich w surowicy wyrażono w mg/l. W czwartej kolumnie wyliczono stosunek stężenia całkowitych łańcuchów lekkich typu kappa do stężenia wolnych łańcuchów lekkich typu kappa, którego wartość nie powinna być < 1.

Lp.	TLC kappa [mg/l]	FLC kappa [mg/l]	TLC/FLC
1	3660	10800	0,34
2	2970	3860	0,77
3	11600	12700	0,91
4	2540	8580	0,29
5	1440	4300	0,33
6	926	3120	0,29
7	1100	3400	0,32
8	2570	10900	0,23
9	1690	5150	0,33
10	14500	99500	0,14
11	4450	22600	0,19
12	4220	11300	0,37

Jak widać w Tab. 13 tylko w dwóch przypadkach wyniki ilościowego oznaczania całkowitych i wolnych łańcuchów lekkich w surowicy były porównywalne. W przypadku oznaczonym numerem 3 stężenie wolnych łańcuchów lekkich przewyższało stężenie całkowitych łańcuchów lekkich o 10%, a stosunek tych stężeń wynosił 0,91. W przypadku oznaczonym nr 2 stężenie wolnych łańcuchów lekkich przewyższało stężenie całkowitych łańcuchów lekkich o

30%, a stosunek tych stężeń wynosił 0,77. W 50% przypadków poziom wolnych łańcuchów lekkich typu kappa 3-krotnie przewyższa poziom całkowitych łańcuchów lekkich typu kappa (nr 1, 4, 5, 6, 7, 9, 12). W 33% przypadków poziom FLC typu kappa przewyższa poziom TLC typu kappa ponad 4-krotnie (nr 8, 10, 11).

W Tab. 14 przedstawiono 7 niespójnych wyników ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich (FLC) typu lambda z poziomem całkowitych łańcuchów lekkich (TLC) typu lambda w surowicy wybranych pacjentów z rozpoznaniem szpiczakiem mnogim.

Tab. 14 Niespójne wyniki ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich typu lambda z wynikami ilościowego oznaczania całkowitych łańcuchów lekkich typu lambda w surowicy. Poziomy łańcuchów wyrażono w mg/l. W czwartej kolumnie wyliczono stosunek stężenia całkowitych łańcuchów lekkich typu lambda do stężenia wolnych łańcuchów lekkich typu lambda, którego wartość nie powinna być <1.

Lp.	TLC lambda [mg/l]	FLC lambda [mg/l]	TLC/FLC
1	2320	8470	0,27
2	2060	11700	0,17
3	2010	5170	0,39
4	3410	8620	0,39
5	2150	9290	0,23
6	1115	2610	0,43
7	9530	40100	0,24

Jak widać w Tab. 14 każda zestawiona para wyników ilościowego oznaczania całkowitych oraz wolnych łańcuchów lekkich typu lambda w surowicy charakteryzuje się brakiem spójności analitycznej. Poziom wolnych łańcuchów lekkich typu lambda przewyższa poziom łańcuchów całkowitych typu lambda od 2.5 do ponad 5 razy.

W przypadku oznaczania stężenia wolnych łańcuchów lekkich w surowicy bez równoczesnej oceny poziomu całkowitych łańcuchów lekkich, znaczne zawyżenie wyników poziomu wolnych łańcuchów lekkich może nie zostać wychwycone ani przez pracownika laboratorium ani przez lekarza zlecającego badanie, co z kolei spowoduje błąd interpretacji wyników laboratoryjnych.

4.3.1.4 Niespójności analityczne dotyczące ilościowego oznaczania FLCs w moczu oraz ilościowego oznaczania całkowitych łańcuchów lekkich w moczu

Do analizy niespójności wyników ilościowego oznaczania całkowitych oraz wolnych łańcuchów lekkich wybrano mocze pacjentów, u których na podstawie rozdziełań elektroforetycznych białek moczu stwierdzono, iż wolne łańcuchy lekkie stanowią główną część białek moczu. Uzyskano w ten sposób materiał naturalnie „oczyszczony”, pozbawiony wielu białek, które znajdują się w surowicy. Dzięki temu możliwe było nie tylko porównanie ze sobą wyników ilościowych oznaczeń wolnych i całkowitych łańcuchów lekkich w moczu, ale także odniesienie wyników stężenia wolnych i całkowitych łańcuchów lekkich w moczu do poziomu białka całkowitego w moczu oznaczonego metodą Bradforda.

W Tab. 15 przedstawiono uzyskane niespójności analityczne wyników ilościowego oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich (FLC) typu kappa lub lambda z wynikami ilościowego oznaczenia całkowitych łańcuchów lekkich (TLC) typu kappa lub lambda w moczu. Wyniki te zestawiono z wartościami stężenia białka całkowitego w moczu oznaczonego metodą Bradforda.

Tab. 15 Wyniki niespójnych analitycznie ilościowych oznaczeń w moczu: poziomów całkowitych oraz wolnych łańcuchów lekkich typu kappa lub lambda oraz stężenia białka całkowitego w moczu oznaczonego metodą Bradforda.

Lp.	Całkowite łańcuchy lekkie (TLC) [mg/l]	Wolne łańcuchy lekkie (FLC) [mg/l]	Białko całkowite [mg/l]
1	6270	67500	12000
2	1700	17700	1869
3	1270	12400	2375
4	1050	1400	3856
5	19	123	204
6	532	938	1107
7	1410	5110	5332
8	269	1070	1274
9	4960	11800	3913
10	2720	13900	3729
11	1060	6720	7445
12	941	5000	798
13	1230	6880	2135
14	98	286	145
15	116	660	386
16	37	94	182
17	289	1380	2034

W 30% przypadków (nr 10, 12, 13, 15, 17) poziom wolnych łańcuchów lekkich w moczu 5-krotnie przewyższa poziom całkowitych łańcuchów lekkich w moczu. W 23% przypadków (nr 7, 8, 14, 16) poziom wolnych łańcuchów lekkich w moczu 3-krotnie przewyższa poziom całkowitych łańcuchów lekkich w moczu. W 18% przypadków (nr 1, 2, 3) poziom wolnych łańcuchów lekkich w moczu 10-krotnie przewyższa poziom całkowitych łańcuchów lekkich w moczu oraz znacznie przewyższa poziom białka całkowitego w moczu. Podobnie w 18% przypadków (nr 4, 6, 9) poziom wolnych łańcuchów lekkich w moczu 2-krotnie przewyższa poziom całkowitych łańcuchów lekkich w moczu. W 12% przypadków (nr 5, 11) poziom wolnych łańcuchów lekkich w moczu 6-krotnie przewyższa poziom całkowitych łańcuchów lekkich w moczu.

W ponad 50% procentach przypadków stężenie wolnych łańcuchów lekkich (FLC) w moczu jest nie tylko znacznie wyższe od stężenia całkowitych lekkich (TLC) w moczu, ale również przewyższa stężenie białka całkowitego w moczu. Wyniki stężenia białka całkowitego w moczu są spójne w wynikami stężenia całkowitych łańcuchów lekkich (TLC) w moczu również w ponad 50% przypadków.

4.3.1.5 Analiza wzajemnej zależności stężeń poliklonalnych całkowitych oraz wolnych łańcuchów lekkich w moczu.

Łańcuchy lekkie immunoglobulin zarówno całkowite jak i wolne są zawsze oznaczane tandemowo w obydwu występujących klasach (kappa oraz lambda).

U pacjentów z zaburzeniami o charakterze gammapatii monoklonalnej tylko jeden typ łańcuchów lekkich ma charakter monoklonalny (bardzo rzadko białko monoklonalne ma charakter biklonalny, czyli obejmuje zarówno łańcuchy typu kappa jak lambda). Drugi typ łańcuchów bez cech monoklonalnych ma charakter poliklonalny. Postanowiono wykorzystać ten fakt i sprawdzić, czy niespójności analityczne pomiędzy poziomem całkowitych i wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin mogą być związane z ich charakterem monoklonalnym.

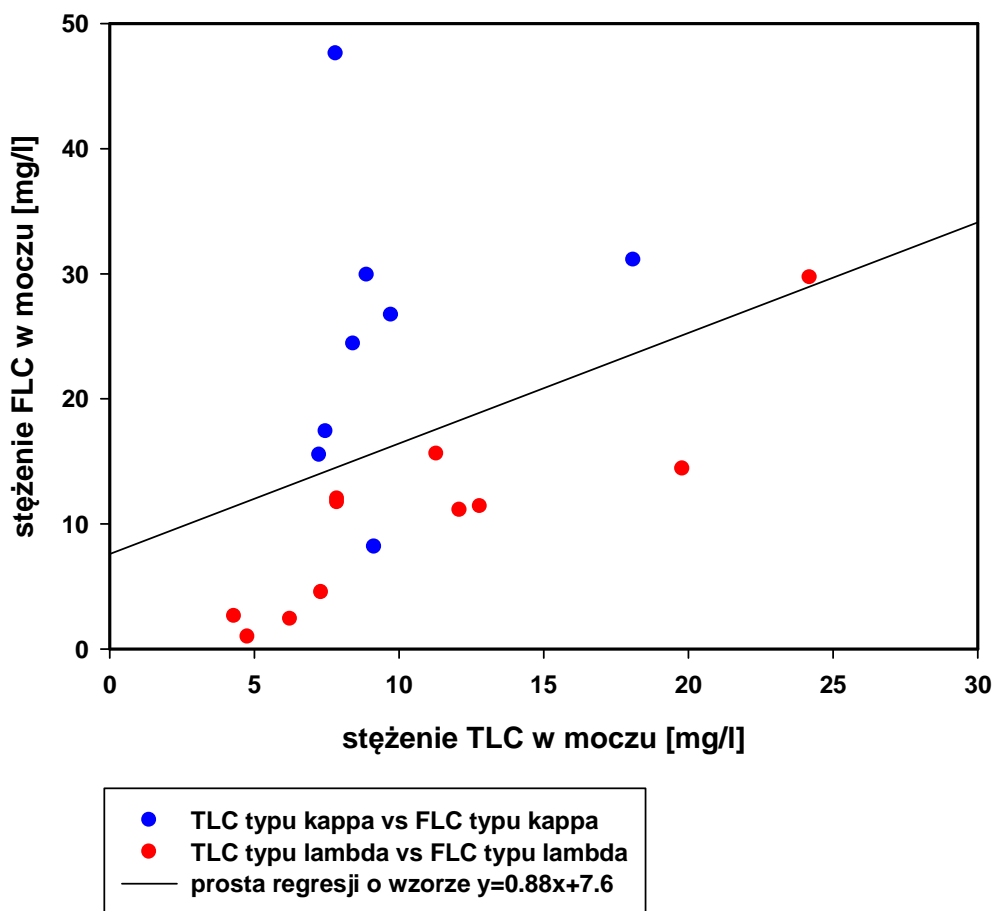
Do analizy wzajemnej zależności stężeń poliklonalnych całkowitych i wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin wybrano mocze pacjentów, u których na podstawie rozdziałów elektroforetycznych białek moczu stwierdzono, iż wolne łańcuchy lekkie stanowią główną część białek moczu.

Dokonano analizy wyników uzyskanych od 19 pacjentów, u których wstępnie ustalono klonalność łańcuchów lekkich. Podstawą do ustalenia klonalności wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin była historia choroby pacjenta oraz wynik immunofiksacji surowicy.

Fracja poliklonalna u 8 pacjentów obejmowała łańcuchy lekkie typu kappa, natomiast u 11 pacjentów obejmowała łańcuchy lekkie typu lambda.

Analizowano regresję i korelację pomiędzy stężeniem poliklonalnych całkowitych łańcuchów lekkich (TLC) typu kappa i lambda a stężeniem poliklonalnych wolnych łańcuchów lekkich (FLC) typu kappa i lambda w moczu.

Na Ryc.25 zestawiono stężenia poliklonalnych całkowitych i wolnych łańcuchów lekkich typu kappa i lambda w moczu.



Ryc.25 Wyniki ilościowego oznaczenia poliklonalnych całkowitych i wolnych łańcuchów lekkich w moczu pacjentów, u których wolne łańcuchy lekkie stanowiły główną część białek moczu.

Współczynnik regresji prostej obrazującej zależność stężeń poliklonalnych całkowitych i wolnych łańcuchów lekkich w moczu wynosił 0.88. Kwadrat współczynnika korelacji(r^2) wynosił 0.14.

4.3.2 Niespójności diagnostyczne i analityczne dotyczące ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin – dyskusja wyników

Immunochemiczny test lateksowy pozwalający na ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin został skomercjalizowany w roku 2001. W początkowym okresie był używany wyłącznie jako narzędzie wspierające diagnostykę gammapatii monoklonalnych. Szybko jednak okazało się, że oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich może być użyteczne w innych jednostkach chorobowych. Opisano użyteczność oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin (FLCs) w płynie mózgowo - rdzeniowym w diagnostyce chłoniaków centralnego układu nerwowego [92] oraz stwardnienia rozsianego [93, 94]. Prowadzone są badania nad oznaczaniem stężenia FLCs w przewlekłej białaczce limfocytowej (CLL) i chłoniakach nieziarnicznych [95]. Wykazano również podwyższony poziom wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin (kappa oraz lambda) u dzieci z ciężkimi postaciami atopowego zapalenia skóry [96].

Równocześnie test ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich okazał się być bardzo użyteczny w diagnozowaniu i monitorowaniu chorób powiązanych z klonalnym rozrostem plazmocytów. Badanie to zrewolucjonizowało możliwości rozpoznawania i oceny leczenia u chorych na szpiczaka mnogiego [23, 97]. FLCs (wolne łańcuchy lekkie) są homogeną populacją łańcuchów lekkich immunoglobulin kappa i lambda, produkowanych przez plazmocyty [98]. Według Bradwella [41] oznaczanie stężenia wolnych łańcuchów lekkich zarówno u chorych świeżo zdiagnozowanych, jak i w celu oceny odpowiedzi na leczenie lub progresji choroby, może być krokiem milowym w leczeniu dyskrazji plazmocytowych. Podobnie jak przełomem w leczeniu cukrzycy okazało się wprowadzenie oznaczeń glukozy we krwi w miejsce wcześniej stosowanych analiz moczu.

Już w roku 1982 przy użyciu kolumny chromatograficznej oddzielono wolne łańcuchy lekkie od łańcuchów związanych i wykazano, że występują u 86% chorych na szpiczaka mnogiego [99]. 25 lat później stwierdzono obecność wolnych łańcuchów lekkich u 95% spośród 576 chorych na szpiczaka mnogiego

ze świeżym rozpoznaniem [82]. W innym badaniu wykazano nieprawidłowy stosunek stężeń wolnych łańcuchów lekkich kappa/lambda (FLCr) u 96% chorych przed leczeniem [100].

Dowiedziano, że ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich testem Freelite® jest użytecznym narzędziem diagnostycznym w wykrywaniu gammopatii monoklonalnych przebiegających z produkcją wolnych łańcuchów lekkich. Ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich jest użyteczne w diagnostyce i monitorowaniu szpiczaka niewydzielającego, amyloidozy i choroby łańcuchów lekkich [23, 101, 102, 103]. Oznaczanie stosunku stężeń wolnych łańcuchów lekkich (FLCr) κ/λ ma istotne znaczenie prognostyczne w przebiegu gammopatii monoklonalnej o nieustalonym znaczeniu (MGUS), szpiczaku odosobnionym i szpiczaku bezobjawowym [2, 81, 85].

Według Hutchinsona i wsp. [104] oznaczanie stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin odgrywa ważną rolę w diagnostyce niewydolności nerek u chorych na dyskracje plazmocytowe. W szczególności wyliczanie stosunku stężeń wolnych łańcuchów lekkich kappa/lambda (FLCr). Wykazano użyteczność niniejszego w porównaniu z biopsją nerki oznaczania stosunku stężenia wolnych łańcuchów lekkich κ/λ w diagnostyce różnicowej zaburzenia funkcji nerek [105]. Niewydolność nerek związana z uszkodzeniem kanalików nerkowych i tworzeniem wałeczków zbudowanych z białka Tamma-Horswilla i łańcuchów lekkich immunoglobulin jest częstą komplikacją szpiczaka. Zaburzenia funkcji nerek mogą przebiegać jako ostra lub przewlekła niewydolność nerek, zespół nerczycowy, nienerczycowa proteinuria lub dysfunkcja kanalików nerkowych [106]. Stężenie kreatyniny w surowicy w momencie rozpoznania przekracza 2 mg/dl aż u 20-50% chorych. Z tego 2-3% wymaga leczenia dializami, a u 9% diagnoza zostaje potwierdzona w czasie przewlekłej dializoterapii [107, 108, 109]. Opracowywane są nowe moduły dializacyjne o podwyższonej przepuszczalności dla białek drobnocząsteczkowych, które pozwalają na uratowanie zdolności filtracyjnej nerek. Ocena stężeń wolnych łańcuchów lekkich kappa oraz lambda pozwala na ocenę skuteczności takiej dializoterapii [110]. Zaczęły się również pojawiać informacje, według których u chorych z ostrym uszkodzeniem nerek związanym

z przebiegiem szpiczaka spadek stężenia wolnych łańcuchów lekkich w surowicy wskutek zastosowanej chemioterapii wraz z zastosowaniem nowoczesnej dializoterapii może prowadzić do przywrócenia prawidłowej funkcji nerek [111].

Roshini i wsp. [112] wysunęli hipotezę, że ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy metodą nefelometryczną na skali logarytmicznej wykazuje liniową korelację ze zmianami w wydzielaniu wolnych łańcuchów lekkich do moczu. W związku z tym oznaczanie stężenia FLCs w surowicy mogłyby stanowić logiczną i realną alternatywę dla monitorowania pacjentów z chorobą łańcuchów lekkich na podstawie badania 24-godzinnej zbiórki moczu. Byłby to dodatkowy atut coraz bardziej rozpowszechnionego testu FreeLite®.

W ostatnich latach pojawiają się coraz liczniejsze doniesienia świadczące o istnieniu pewnych ograniczeń metody ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin - brak liniowości, podatność na efekt nadmiaru antygeny [26, 27, 28]. Pewną niedogodnością jest również fakt, że jak do tej pory test wytwarzany był przez jednego producenta. W miarę coraz szerszego stosowania testu FreeLite® pojawia się coraz więcej doniesień o zawyżaniu i zaniżaniu wyników ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich testem FreeLite®, a także braku liniowości podczas rozcieńczania próbki [87, 88, 89, 90]. W świetle licznych doniesień o ograniczeniach techniki FreeLite® niezbędne wydaje się przeprowadzenie badań prospektywnych, aby można było dokładniej określić rolę ilościowego oznaczenia FLCs w diagnostyce i monitorowaniu zaburzeń o charakterze gammopatii monoklonalnych [113].

Według Davis'a i wsp. [114] można uniknąć potencjalnych ograniczeń w precyzji testu FreeLite® zapewniając doświadczony personel oraz dbając o sprzęt laboratoryjny, a przede wszystkim poświęcając szczególną uwagę na prawidłowe przeprowadzanie technik laboratoryjnych (stabilność odczynników).

Ilościowe oznaczanie monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich w surowicy techniką immunochemiczną jest skomplikowane. Kalibracja jest wykonywana na łańcuchach poliklonalnych, które mogą się różnić swoimi

właściwościami od łańcuchów monoklonalnych. W pracy z 2007 roku Tate i wsp. [115] zamiast analizować środowisko reakcji zwrócili szczególną uwagę na charakter wolnych łańcuchów lekkich uczestniczących w reakcji. Porównanie wyników uzyskanych z próbek zawierających tylko monoklonalne lub tylko poliklonalne wolne łańcuchy lekkie wykazało znaczne zróżnicowanie wyników po rozcieńczeniu próbek. Liniowość po rozcieńczeniu była znacznie lepsza w przypadku łańcuchów poliklonalnych, na których metoda jest kalibrowana.

Skomplikowanie testu FreeLite® pogłębia również fakt, że zakres wartości referencyjnych dla stężenia wolnych łańcuchów lekkich jest stosunkowo szeroki. Natomiast epitopy znajdujące się na monoklonalnych wolnych łańcuchach lekkich mogą się między sobą różnić [87].

We wspomnianej już pracy z 2007 roku Tate i wsp. [115] wykazali dużą zmienność w reaktywności różnych partii odczynników stosowanych w teście FreeLite®. Oznacza to, trudność interpretacji wyników pacjenta monitorowanego przez kilka lat ze względu na nieuchronne zastosowanie kilku różnych partii odczynnika (o różnej reaktywności). Ponadto opisano przypadek 70-letniego pacjenta z chorobą łańcuchów lekkich typu kappa, u którego monoklonalne wolne łańcuchy lekkie były całkowicie niereaktywne (przeprowadzono oznaczenia stosując kilka różnych partii przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom znajdującym się na wolnych łańcuchach lekkich). Przyczyna niereaktywności nie została wyjaśniona, jednak jasno wskazuje na fakt, iż poliklonalne przeciwciała mogą nie rozpoznawać wszystkich wolnych łańcuchów lekkich (monoklonalnych czy też poliklonalnych) ze względu na swoją strukturalną różnorodność [115].

Jak już wspomniano oceniając test FreeLite® należy zwrócić szczególną uwagę na efekt nadmiaru antygeny, który powoduje fałszywe zniżenie wyników. Bosmann i wsp. [116] wykazali efekt nadmiaru antygeny w 2,2% analizowanych przypadków (n=91) ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich testem FreeLite® przy użyciu platformy BN II (Siemens).

Murata i wsp. [117] wykazali efekt nadmiaru antygeny podczas ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich typu kappa w 0,12% analizowanych

przypadków (n=7538) oraz brak efektu nadmiaru antygeny podczas ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich typu lambda.

W pracy z 2011 roku autorstwa Vercammena i wsp. [87] oznaczano stężenie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy metodą FreeLite® na platformie BN II (Siemens). Vercammen i wsp. [87] zwrócili szczególną uwagę na niespójności wyników uzyskanych z kolejnych rozcieńczeń surowicy oraz na efekt nadmiaru antygeny. Każda próbka surowicy była oznaczana w 100- oraz 2000-krotnym rozcieńczeniu. Niektóre próbki dodatkowo rozcieńczano 20-, 400-, 800- lub 40000-razy. Vercammen i wsp. [87] wykazali ponad 2-krotne zawyżenie wyników oraz brak spójności pomiędzy 100- i 2000-krotnym rozcieńczeniem w procedurze ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich typu kappa u 12,7% pacjentów oraz w procedurze ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich typu lambda u 3,1% pacjentów.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki dotyczące problemów metodologicznych związanych z oznaczaniem wolnych łańcuchów lekkich są zgodne z opublikowanymi ostatnio rezultatami prac innych ośrodków. Ponadto przeprowadzając porównanie ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich (FLCs) testem FreeLite® z ilościowym oznaczaniem całkowitych łańcuchów lekkich (TLC) wniesiono spójne informacje uzupełniające. Uzyskane wyniki ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich testem FreeLite® były zawyżone. W 50% analizowanych przypadków poziom wolnych łańcuchów lekkich (FLC) typu kappa 3-krotnie przewyższał poziom całkowitych łańcuchów lekkich (TLC) typu kappa. Podobnie było w przypadku łańcuchów lekkich typu lambda. Poziom wolnych łańcuchów lekkich (FLC) typu lambda przewyższał poziom łańcuchów całkowitych (TLC) typu lambda od 2.5 do ponad 5 razy.

Wykorzystując mocze pacjentów, u których stwierdzono wolne łańcuchy lekkie, jako główną komponentę białkową dodatkowo potwierdzono znaczne zawyżanie wyników stężenia wolnych łańcuchów lekkich techniką FreeLite®, porównując wyniki stężenia wolnych łańcuchów lekkich z białkiem całkowitym oznaczonym metodą Bradforda. Stężenie białka całkowitego w moczu było w ponad 50% analizowanych przypadków niższe od stężenia wolnych łańcuchów lekkich w moczu. Podobnie w pracy z 2003 roku Tate i wsp. [89] zauważyli, że

stężenie wolnych łańcuchów lekkich w moczu oznaczone testem FreeLite® niejednokrotnie przewyższało stężenie białka całkowitego w moczu.

Znaczące niespójności dotyczące oznaczania stężenia wolnych łańcuchów lekkich oraz stosunku stężenia wolnych łańcuchów lekkich kappa/lambda zarówno pomiędzy metodami oraz wewnątrz samej metody zostały potwierdzone przez UK NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*) [87]. W ramach pracy NEQAS oznaczono stężenie wolnych łańcuchów lekkich w surowicach pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego na kilku różnych platformach. Uzyskane wyniki były bardzo zróżnicowane. Przykładowo stężenie wolnych łańcuchów lekkich typu kappa w surowicy pacjenta ze zdiagnozowanym szpiczakiem mnogim klasy IgA kappa oznaczane na najczęściej używanej platformie BNII - Siemens wahało się od 1.1 mg/l do 1710.0 mg/l, przy wartości średniej równej 628.15mg/l oraz wyliczonym wysokim współczynnikiem zmienności równym 81.05%. Analogicznie stężenie wolnych łańcuchów lekkich typu kappa oznaczone u tego samego pacjenta na platformie Roche wahało się w granicach 23.5 mg/l - 945.7 mg/l (wartość średnia wynosiła 437.5 mg/l, CV=94.91%), zaś na platformie Beckman wyniki ilościowego oznaczania FLCs wahały się od 9.8 mg/l do 1143 mg/l (wartość średnia wynosiła 567.64 mg/l, CV= 60.12%). Tak wysokie różnice znacznie odbiegają od wartości precyzji oczekiwanych dla testów powszechnie stosowanych w diagnostyce laboratoryjnej. Rozrzut wyników w zakresie 1- 1000 mg/l powoduje utratę wiarygodności wyniku.

Producent testu FreeLite® - firma Binding Site, zdefiniowała problem nadmiaru antygeny jako warunki, w których niespójności wyników uzyskanych z różnych rozcieńczeń są zróżnicowane co najmniej 4-krotnie [118]. Takie zdefiniowanie problemu znowu znacząco odbiega od standardów powszechnie przyjętych w diagnostyce laboratoryjnej. Prowadzi do niespójności wyników FLCr uzyskanych dla różnych rozcieńczeń. Takie podejście producenta testu do niespójności wyników prowadzi do sytuacji, w której diagnosta laboratoryjny może otrzymać wyniki stosunku wolnych łańcuchów lekkich (FLCr), które różnią się między sobą wielokrotnie. Nie ma równocześnie opracowanego algorytmu

walidacji otrzymanych rozbieżności. Niespójne wyniki ograniczają użyteczność testu, jako narzędzia do monitorowania procesu leczenia lub choroby.

Potwierdzono, że zmiany stężenia wolnych łańcuchów lekkich mniejsze niż 50% wartości wyjściowej nie powinny stanowić potwierdzenia ani remisji ani progresji choroby [100, 119]. Należałoby jednak zbadać znaczenie kliniczne 2- i 4-krotnych różnic stężenia FLC pomiędzy różnymi rozcieńczeniami na innym etapie patologii (rozpoznanie, dalsze monitorowanie).

W przebiegu gammopatii monoklonalnych stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin mogą się wahać w bardzo szerokim zakresie stężeń (od jednego do kilkudziesięciu tysięcy mg/l). Stwarza to dodatkowe problemy analityczne związane ze wstępnym rozcieńczeniem próbki.

Vercammen i wsp.[87] w swojej pracy potwierdzili niezdolność wykrycia efektu nadmiaru antygeny na najczęściej używanej platformie BNII (Siemens) przy standardowym rozcieńczeniu 1:100. Ujawnili również istotne problemy związane z rozcieńczaniem próbek w procedurze ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich (brak liniowości).

W publikacjach rekomendujących użyteczność stosunku stężeń wolnych łańcuchów lekkich kappa/lambda (FLCr) w diagnostyce, monitorowaniu i prognozowaniu szpiczaka mnogiego i chorób pokrewnych zazwyczaj nie zamieszcza się informacji na temat strategii rozcieńczania (jakie rozcieńczenie dla jakiego zakresu stężeń) stosowanej w danym laboratorium. Na niektóre platformy analityczne (Roche Cobas Integra® oraz SPAPlus™) obsługujące test ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich FreeLite® został opracowany skuteczny system wykrywania nadmiaru antygeny. W przypadku najczęściej używanego nefelometru BNII taki system jest nadal w fazie badań [120].

W odpowiedzi na liczne doniesienia o nadmiarze antygeny producent testu FreeLite® - The Binding Site wprowadził do instrukcji testu nowe zalecenia, które powinny zmniejszyć podatność testu na zakłócenia powodowane przez nadmiar antygeny. Zaleca się powtórne oznaczanie przy większym

rozcieńczeniu stężenia wolnych łańcuchów lekkich we wszystkich surowicach, w których oznaczone stężenie FLC było nieprawidłowe [25]. Natomiast w przypadkach, w których zawartość białka monoklonalnego (kompletnej cząsteczki immunoglobuliny) da się określić ilościowo, oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich w celu monitorowania nie jest konieczne i nie jest zalecane, co zmniejsza znaczenie problemu braku liniowości [54]. Problem komplementarności oznaczania wolnych łańcuchów lekkich z innymi parametrami białkowymi oraz zagadnienia związane z użytecznością stosowania testu FreeLite® są dalej przedmiotem intensywnej badań. Nie określono do tej pory potencjalnej roli ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich w celu oceny odpowiedzi na leczenie u pacjentów, u których nowotworowo zmienione plazmocyty produkują wyłącznie kompletną cząsteczkę immunoglobuliny. W opublikowanej niedawno pracy na łamach *Hematological Oncology* [121], podniesiono temat użyteczności ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich w surowicy pacjentów, u których techniką immunofiksacji wykryto kompletną cząsteczkę immunoglobuliny monoklonalnej. We wspomnianej pracy [121] porównano wyniki stężenia wolnych łańcuchów lekkich oraz wyniki oznaczania białka monoklonalnego (kompletna cząsteczka immunoglobuliny) jako potencjalne zmienne odpowiedzi u nowo zdiagnozowanych pacjentów ze szpiczakiem mnogim, rozpoczynających leczenie według nowych standardów. Na podstawie otrzymanych wyników potwierdzono zasadność oznaczania stężenia wolnych łańcuchów lekkich w surowicy w celu oceny odpowiedzi na leczenie u pacjentów, u których wykryto kompletną cząsteczkę immunoglobuliny [121]. Ponadto krótki czas półtrwania FLCs w surowicy pozwala na wcześniejszą ocenę wyników leczenia, niż przy pomocy badania pełnej cząsteczki monoklonalnej immunoglobuliny.

Białko Bence-Jonesa jest jednym z głównych markerów pozwalających na wykrycie gammapatii monoklonalnych, ponieważ u 10-20% pacjentów z tego typu zaburzeniami białko monoklonalne stanowią wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin. W przeciwieństwie do monoklonalnych kompletnych cząsteczek immunoglobulin, białko Bence-Jonesa łatwiej jest wychwycić w

moczu niż w surowicy. Jest to związane z faktem, iż wolne łańcuchy lekkie są z łatwością wydzielane do moczu. Wolne łańcuchy lekkie szybko opuszczają krew, dzięki filtracji nerkowej. Mogą więc być łatwo wykrywane w moczu technikami elektroforetycznymi, często można je jednak także wykryć w surowicy techniką immunofiksacji [122].

Już w latach 80-tych Robinson i wsp. [123] zauważyli, że stosunek stężenia łańcuchów lekkich kappa do lambda w próbkach moczu zawierających białko Bence-Jonesa znacząco wzrasta lub znacząco spada. Podczas gdy u pacjentów z ogólną proteinurią stosunek kappa/lambda pozostaje w granicach normy.

W pracy z 2004 roku Nakano i wsp. [122] ocenili użyteczność diagnostyczną wartości stosunku wolnych łańcuchów lekkich kappa do lambda w wykrywaniu obecności białka Bence-Jonesa w moczu. Uzyskane przez nich wyniki sugerują użyteczność kliniczną stosunku wolnych łańcuchów lekkich kappa/lambda w moczu jako markera w proteinurii Bence-Jonesa. Ponadto uznali, że wartość stosunku FLCr kappa/lambda w moczu stanowi uzupełnienie do elektroforezy białek moczu.

W niniejszej pracy wykazano znaczne zawyżanie wyników ilościowego oznaczania FLC w moczu techniką nefelometryczną, w porównaniu z nefelometrycznym pomiarem całkowitych łańcuchów lekkich (TLC). Ponadto wykorzystując mocze pacjentów, w których główną komponentą białkową były wolne łańcuchy lekkie przeprowadzono dodatkową weryfikację techniki FreeLite® oznaczeniem białka całkowitego metodą Bradforda. Stężenie białka całkowitego było w ponad 50% przypadków niższe od stężenia FLC. Przedstawione wyniki wskazują na fakt, że ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich w moczu jest obarczone znacznym błędem. Nie bez przyczyny ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich w moczu nie jest badaniem rekomendowanym w monitorowaniu leczenia chorych na szpiczaka mnogiego [124, 125].

Według A. Bradwell'a i wsp. [126] na kliniczną użyteczność ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich składają się dwa czynniki: wysoka

czułość i specyficzność cechująca techniki immunologiczne w porównaniu z technikami elektroforetycznymi oraz większa użyteczność numerycznego wyrażenia stosunku wolnych łańcuchów lekkich kappa/lambda (FLCr) od techniki densytometrycznej w ocenie monoklonalności.

Kolejnym aspektem dotyczącym ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin jest polimeryzacja. Wolne łańcuchy lekkie występujące głównie w postaci monomerów i dimerów, mogą także tworzyć większe polimery [127, 128, 129]. Polimery stanowią wieloantygenowe cele w technikach immunoprecypitacyjnych, co powoduje tworzenie agregatów i w rezultacie znaczne zawyżenie wyniku [25]. Sölling i wsp. [130, 131] wykazali w swoich pracach, że przeciwciała stosowane w ilościowym oznaczaniu całkowitych łańcuchów lekkich wykrywają w równym stopniu formy monomerów jak i dimerów. Natomiast Heino i wsp. [132] w swojej pracy zasugerowali, że przeciwciała skierowane przeciwko antygenom na wolnych łańcuchach lekkich mogą preferencyjnie wykrywać formy dimeryczne.

The Binding Site - producent testu FreeLite®, którym oznacza się stężenie wolnych łańcuchów lekkich tłumaczy zjawisko znacznego zawyżania wyników tworzeniem przez wolne łańcuchy lekkie frakcji oligomerów, które interferują z wynikiem [25]. W niniejszej pracy podjęto próbę weryfikacji wspomnianego zjawiska polimeryzacji wolnych łańcuchów lekkich. Z zastosowaniem wysokorozdzielczej chromatografii cieczowej (HPLC) przeprowadzono rozdziały moczu, w których wcześniej uzyskano zawyżone wyniki poziomu wolnych łańcuchów lekkich i jednocześnie wolne łańcuchy lekkie stanowiły główną komponentę białek moczu. W uzyskanych rozdzielach wykryto wyłącznie monomery i dimery łańcuchów lekkich immunoglobulin odpowiednio o masach cząsteczkowych 22 i 44 kDa. Nie wykryto form oligomerycznych łańcuchów lekkich immunoglobulin. Tym samym wykluczono oligomeryzację, jako przyczynę zawyżania wyników ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich.

Niespójności wyników pomiędzy różnymi rozcieńczeniami próbki, brak liniowości oraz efekt nadmiaru antygeny mogą wprowadzać w błąd i komplikować interpretację wyników ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów

lekkich u niektórych pacjentów, a nawet błędnie wskazywać na remisję choroby. Dlatego też zaleca się zachowanie porównywalnych warunków analitycznych podczas oznaczania stężenia wolnych łańcuchów lekkich zarówno w trakcie stawiania diagnozy oraz później podczas monitorowania choroby. Zaleca się także oznaczanie więcej niż jednego rozcieńczenie próbki przy użyciu jednego analizatora.

Ilościowe oznaczenie wolnych łańcuchów lekkich należy wykonywać w jednym laboratorium, w połączeniu z innymi testami laboratoryjnymi. Ponadto pracownicy laboratorium powinni być w ciągłym kontakcie z lekarzami, aby zapobiegać błędnej interpretacji wyników badań laboratoryjnych [87].

5 PODSUMOWANIE

Diagnostyka laboratoryjna jak wiele innych dziedzin medycznych ulega nieustannym zmianom. Zmiany te polegają na wdrażaniu do działań praktycznych wyników badań opartych na dowodach naukowych (Evidence Based Medicine). Analiza doświadczeń wielu ośrodków związanych z rozwiązywaniem konkretnego problemu pozwala na optymalizację procedur medycznych oraz weryfikację często rozbieżnych hipotez.

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny testu Freelite® - ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin do wykrywania i monitorowania gammapatii monoklonalnych a także zestawienie parametrów użyteczności testu FreeLite® z powszechnie stosowanymi metodami biochemicznymi.

Wprowadzony w roku 2001 immunologiczny test lateksowy pozwalający na ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w niskim zakresie stężeń budził wielkie nadzieje. W piśmiennictwie fachowym w krótkim czasie ukazało się szereg doniesień dotyczących użyteczności testu w procesie diagnostyki gammapatii monoklonalnych a także w procesie monitorowania procesu leczenia. Nieustająco rośnie także lista prac podnoszących użyteczność oznaczania wolnych łańcuchów lekkich diagnostyce chorób niezwiązanych z gammapatiami monoklonalnymi. Niewątpliwie krótki okres półtrwania wolnych łańcuchów lekkich w surowicy wynoszący kilka godzin w porównaniu z trzytygodniowym okresem półtrwania dla kompletnej cząsteczki immunoglobuliny stwarza możliwości oceny aktywności plazmocytów nieobarczone bezwładnością czasową związaną ze stosunkowo długim okresem półtrwania kompletnych cząsteczek immunoglobulin. Przedstawiono wiarygodne dane wskazujące na to, że wartości stosunku wolnych łańcuchów lekkich szybciej odzwierciedlają skuteczną terapię antynowotworową normalizując się w okresie remisji i szybciej przekraczają wartości referencyjne w okresie wznowienia choroby. Jest to szczególnie istotne w przypadku szpiczaka mnogiego, który jak dotąd jest chorobą nieuleczalną i najczęściej po okresie cofnięcia objawów choroby pojawia się kolejny nawrót. Tak więc chorzy

na szpiczaka wymagają nieustannej kontroli a parametry białkowe związane z pojawianiem się białka monoklonalnego są jednym z najczulszych narzędzi do wykrywania i monitorowania choroby. Metody elektroforetyczne służące do wykrywania białka monoklonalnego cechuje wiele ograniczeń (problemy z automatyzacją, niska czułość, arbitralna interpretacja oraz brak danych ilościowych wyników immunofiksacji). Ze względu na trudności metodyczne i znaczną pracochłonność w niewielu ośrodkach laboratoryjnych wykonuje się elektroforezę białek moczu. Test FreeLite® otworzył nową jakość w wykrywaniu i monitorowaniu gammadatii monoklonalnych. Jest testem w pełni zautomatyzowanym, ilościowym a także bardzo czułym. W oparciu o wyniki testu FreeLite® wprowadzono do diagnostyki laboratoryjnej nowe pojęcia – szpiczak niewydzielający (NSMM) i szpiczak niewytwarzający (NPMM). W przypadku tego pierwszego mimo niewykrycia obecności białka monoklonalnego metodami elektroforetycznymi stosunek wolnych łańcuchów lekkich wykroczał poza obszar wartości referencyjnych. Entuzjastyczne doniesienia dotyczące użyteczności testu FreeLite® w diagnozowaniu i monitorowaniu gammadatii monoklonalnych były umiejętnie eksponowane przez producenta testu, który prezentował szeroką, ale dość selektywnie wybraną literaturę dotyczącą tego zagadnienia.

Klinika Hematologii i Zakład Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego były jednym z pierwszych polskich ośrodków, które wprowadziły test FreeLite® do praktyki diagnostycznej. Już w początkowym okresie oceny testu okazało się, że w niektórych przypadkach sprawia on pewne trudności i daje wyniki niespójne z wynikami innych badań laboratoryjnych. Jest to dla laboratorium diagnostycznego sytuacja trudna, ponieważ jednym z możliwych wytłumaczeń tego zjawiska jest niewłaściwa praca personelu laboratorium, błędy w obsłudze aparatury itp. Tym bardziej, że w dostępnym piśmiennictwie pojawiały się informacje podające współczynnik zmienności testu na poziomie poniżej 8% a jednym z warunków osiągnięcia takich wyników miało być zapewnienie właściwych technik laboratoryjnych, doświadczony personel i właściwie utrzymana baza sprzętowa. Dzięki kontaktom naukowym z nielicznymi innymi ośrodkami w Polsce ustalono, że z podobnymi problemami stykają się również

inne laboratoria kliniczne. Mimo zgłaszanych zastrzeżeń problem był bagatelizowany przez producenta testu, który, podawał prawdopodobne przyczyny tego zjawiska (oligomeryzacja łańcuchów lekkich), lecz nie podawał metod pozwalających na weryfikację wyników. Ostatecznie jednak opublikowane w ostatnich miesiącach dane dotyczące doświadczeń wielu ośrodków laboratoryjnych na temat wiarygodności wyników testu FreeLite® w całości potwierdziły omówione w niniejszej pracy zastrzeżenia. Wykazano, że w trakcie monitorowania procesu leczenia zmiana serii odczynnika może spowodować znaczące różnice wyników ilościowych. Niektóre serie odczynników zupełnie nie reagowały z wolnymi łańcuchami lekkimi określonych pacjentów. Jest to poważny problem w sytuacji, kiedy pacjenci z rozpoznaniem szpiczakiem mnogim powinni być monitorowani przez wiele lat a wyniki powinny być ze sobą porównywalne. Potwierdzone zostały informacje dotyczące niespójności diagnostycznych jak i analitycznych testu a wyniki programu kontroli można uznać za porażające.

Czy zatem Test FreeLite® jest testem bezwartościowym? Oczywiście nie. Dane dotyczące użyteczności testu są przekonujące i w większości przypadków nie występują problemy niespójności wyników. Potwierdzają to także wysokie współczynniki czułości testu przedstawione w niniejszej pracy. Wydaje się, że podstawową przyczyną zaobserwowanych rozbieżności jest problem „odwróconej awidności” polegający na tym, że monoklonalne łańcuchy lekkie posiadające unikalne kombinacje epitopów różnie reagują z przeciwciałami poliklonalnymi używanymi do produkcji testu. Wyniki kalibracji przeprowadzone na poliklonalnych łańcuchach lekkich często nie mogą mieć zastosowania do antygenu monoklonalnego.

Istnieje powszechna zgodność, że wyniki testu FreeLite® powinny być interpretowane wspólnie przez lekarzy klinicystów i diagnostów laboratoryjnych z uwzględnieniem indywidualnej klinicznej i biologicznej charakterystyki określonego pacjenta. Do właściwej interpretacji wyników testu potrzebna jest obiektywna wiedza dotycząca jego ograniczeń i rzetelna dyskusja dotycząca np. laboratoryjnej kontroli jakości.

Zalety testu FreeLite® przeważały bagatelizowane w początkowym etapie jego funkcjonowania ograniczenia i jest on obecnie stosowany w praktyce klinicznej. Jest on uznanym markerem diagnostycznym, prognostycznym i terapeutycznym. Jest elementem zalecanych strategii leczenia szpiczaka i AL Amyloidozy. Jego rola będzie prawdopodobnie rosła. Badania stężeń wolnych łańcuchów lekkich zaowocowały stworzeniem nowych jednostek chorobowych LC-MGUS, w trakcie której istnieje wysokie prawdopodobieństwo przekształcenia się do choroby łańcuchów lekkich i chorób pochodnych. Trzeba pamiętać, że wolne łańcuchy lekkie są znaczącym postępem w stosunku do wykrywania białka Bence-Jonesa testu jeszcze tak niedawno wykonywanego w laboratoriach diagnostycznych. W przypadkach, kiedy w procedurze elektroforetycznej immunoglobulina monoklonalna zlokalizowana jest w wąskiej strefie beta globulin ilościowe określanie białka monoklonalnego na podstawie pomiarów densytometrycznych jest często niemożliwe.

6 WNIOSKI

- Spośród czterech testów laboratoryjnych najszerzej stosowanych w diagnostyce i monitorowaniu zaburzeń o charakterze gammapatii monoklonalnych (rozdział elektroforetyczny białek surowicy i moczu, immunofiksacja surowicy oraz stosunek stężenia wolnych łańcuchów lekkich kappa/lambda) zarówno w grupie ze świeżo postawioną diagnozą jak i w grupie z gammapatią objawową największą czułością charakteryzowała się immunofiksacja (IFE).
- Najmniejszą czułością we wszystkich grupach badanych charakteryzował się elektroforetyczny rozdział białek moczu (UPE). Mimo, iż przy zastosowaniu nowocześniejszych metod diagnostycznych wykorzystujących ilościowe oznaczenie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy, elektroforeza białek moczu nie podnosi czułości rozpoznania gammapatii monoklonalnych to jest najlepszym narzędziem pozwalającym łatwo i szybko określić profil białek moczu i ocenić zagrożenie zaburzenia funkcjonowania nerki a więc jeden z podstawowych parametrów prognostycznych.
- Analiza czułości różnych konfiguracji ocenianych testów diagnostycznych wykazała, iż połączenie immunofiksacji o charakterze jakościowym z FLCr (parametr ilościowy) pozwala na wykrycie 98,6% (73/74) zaburzeń w grupie z gammapatią objawową. Dodatkowym atutem połączenia IFE z FLCr jest fakt, iż testy te wzajemnie się weryfikują.
- Wykazana dodatnia korelacja między stężeniem beta-2-mikroglobuliny i stężeniem wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin może być związana z faktem, iż oba parametry są w pewnym sensie miarą masy guza. Nie można jednak zapominać o tym, że zarówno beta-2-mikroglobulina jak i wolne łańcuchy lekkie są białkami drobnocząsteczkowymi, więc na ich stężenie w surowicy duży wpływ ma filtracja kłębuszkowa, która z kolei w przebiegu szpiczaka mnogiego bardzo często spada.
- Test FreeLite® podnosi czułość wykrywania dyskrazji plazmocytowych, jednak posiada ograniczenia związane z niespójnością analityczną

ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich i innych testów laboratoryjnych.

- Do ograniczeń ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich techniką nefelometryczną (FreeLite®) należą: brak liniowości oraz podatność na efekt nadmiaru antygeny.
- Interpretacja wyników ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich testem FreeLite® w diagnostyce i monitorowaniu szpiczaka mnogiego wymaga dużej ostrożności oraz kontaktu pomiędzy lekarzem a pracownikami laboratorium w celu wzajemnej weryfikacji informacji o pacjencie i zapobieżeniu błędów interpretacji wyników testu FreeLite®.

7 STRESZCZENIE

Gammapatie monoklonalne jest to grupa chorób spowodowanych nowotworowym rozrostem komórek plazmatycznych produkujących i wydzielających do osocza immunoglobuliny lub fragmenty immunoglobulin. Proces ten manifestuje się obecnością w osoczu jednorodnej charakterystycznej frakcji białkowej najczęściej lokalizującej się w rozdzielach elektroforetycznych w obszarze gammaglobulin, zwanej białkiem monoklonalnym. Zróżnicowanie form gammapatii monoklonalnych, a co za tym idzie różnorodna manifestacja zmian białkowych w przebiegu choroby powoduje, iż diagnostyka szpiczaka wymaga wykonania całego panelu wzajemnie uzupełniających się testów diagnostycznych.

Podejrzanie występowania gammapatii monoklonalnej opiera się na wynikach rutynowych badań diagnostycznych (morfologia, OB, białko całkowite), które nie są swoiste i muszą być uzupełnione przez panel badań specjalistycznych, na które składają się elektroforeza białek surowicy i immunofiksacja określające rodzaj białka monoklonalnego i ocenę stężenia tego białka. Istnieją różne algorytmy diagnostyczne dotyczące wykrywania gammapatii monoklonalnych. Natomiast nie ma jak dotąd, standardowej procedury badania. Zwłaszcza przedmiotem kontrowersji jest potrzeba równoczesnego badania obecności białka monoklonalnego w moczu i w surowicy. W ostatnich latach do diagnostyki zaburzeń o charakterze gammapatii monoklonalnych wprowadzono test ilościowego oznaczenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy (FreeLite®). Ilościowe oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich jest użyteczne w diagnostyce i monitorowaniu leczenia szpiczaka niewydzielającego, amyloidozy i choroby łańcuchów lekkich. Oznaczanie stosunku stężeń wolnych łańcuchów lekkich kappa/lambda ma istotne znaczenie prognostyczne w przebiegu gammapatii monoklonalnej o nieustalonym znaczeniu (MGUS), szpiczaku odosobnionym i szpiczaku bezobjawowym (smouldering myeloma).

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki dotyczące problemów metodologicznych związanych z oznaczaniem wolnych łańcuchów lekkich.

Stwierdzono, że test FreeLite® zawyża wyniki ilościowego oznaczania FLCs oraz często wykazuje brak spójności wyników z wynikami innych testów diagnostycznych (niespójności diagnostyczne i analityczne). Wyniki uzyskane w tej pracy są zgodne z opublikowanymi ostatnio rezultatami prac innych ośrodków. Wskazuje to na ograniczenia metody ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich. Zwłaszcza w monitorowaniu leczenia szpiczaka. Przyczyną tych ograniczeń jest brak liniowości metody wynikający z podatności na efekt nadmiaru antygeny.

W pracy oceniono też wzajemne relacje pomiędzy stężeniem beta-2-mikroglobuliny i wartością stosunku wolnych łańcuchów lekkich κ/λ (FLCr) w grupie 98 chorych ze zdiagnozowanymi zaburzeniami o charakterze gammapatii monoklonalnych. W grupie badanej znajdowało się 73 chorych ze zdiagnozowanych szpiczakiem mnogim (MM), 8 chorych ze zdiagnozowaną chorobą łańcuchów lekkich (LCMM), 7 chorych ze zdiagnozowanym guzem plazmacytoma solitare, 6 chorych ze zdiagnozowanym MGUS-em (gammapatia monoklonalna o nieustalonym znaczeniu) oraz 6 chorych ze zdiagnozowanym szpiczakiem tłącym się (SMM). Stwierdzono istotną statystycznie, choć nie zbyt silną współzależność stężenia beta-2-mikroglobuliny i logarytmu stosunku stężenia wolnych łańcuchów lekkich (kappa/lambda lub lambda/kappa) (test korelacji rang Spearmana) dla wartości $p=0,000859$; $r=0,333$. Przeprowadzono analizę zależności między stężeniem beta-2-mikroglobuliny a stosunkiem stężeń wolnych łańcuchów lekkich surowicy (test korelacji rang Spearmana) uwzględniającą typ wolnych łańcuchów lekkich o charakterze monoklonalnym. U 72 spośród 98 pacjentów monoklonalne łańcuchy lekkie były typu kappa. W grupie tej stwierdzono istnienie znamiennej korelacji ($p=0,0113$; $r=0,298$). Badanie zależności stężenia beta-2-mikroglobuliny i stężenia monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich typu lambda (testem korelacji rang Spearmana) wykazało obecność istotnej statystycznie silnej współzależności ($p=0,0000295$; $r=0,703$). Dodatnia korelacja między stężeniem beta-2-mikroglobuliny i stężeniem wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin może być związana z faktem, iż oba parametry są częściowo zależne od masy guza.

Uzyskane wyniki wskazują, że niespójności wyników pomiędzy różnymi rozcieńczeniami próbki, brak liniowości oraz efekt nadmiaru antygeny mogą wprowadzać w błąd i komplikować interpretację wyników ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich, a nawet błędnie wskazywać na remisję choroby. Zatem korzystanie z ilościowych oznaczeń wolnych łańcuchów lekkich należy wykonywać w jednym laboratorium, w połączeniu z innymi testami laboratoryjnymi. Ponadto pracownicy laboratorium powinni być w ciągłym kontakcie z prowadzącym lekarzem, aby zapobiegać błędnej interpretacji wyników badań laboratoryjnych.

8 SUMMARY

Monoclonal gammopathies are a group of disorders characterized by clonal expansion of B cells that usually secrete intact monoclonal immunoglobulins or monoclonal free light chains (FLCs) or both. Monoclonal gammopathy is usually demonstrated by the presence in the plasma a homogeneous characteristic protein fraction called monoclonal protein (M-protein). An M-protein is usually seen as a narrow peak in the densitometer tracing or as a dense, discrete band on the agarose gel. Because of the wide range of clinical presentation, the identification of the monoclonal protein is the first clue to the diagnosis. The recognition of monoclonal protein may require multiple approaches and the use of many different diagnostic tests.

The suspicion of monoclonal gammopathy is based on the results of routine laboratory diagnostic tests (blood count, total protein) which are not intrinsic and must be supplemented by a panel of specialist tests (serum protein electrophoresis, immunofixation). There are various screening algorithm panels for the detection of monoclonal gammopathies but so far there is no standard test procedure. The subject of controversy is especially the need for examination of the presence of monoclonal protein in both serum and urine. In recent years new automated immunoassay measuring serum free light chains (FreeLite®) have been developed. The assay is useful for the diagnosis and follow-up of primary amyloidosis, light chain disease, and oligosecretory plasma cell disorders and for the prognosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering myeloma.

In the current study the results concerning methodological difficulties with the FLC assay were presented. It was found that the FLCs concentration evaluated by FreeLite® assay might be overestimated and that there are some inconsistencies in relation to the results of another diagnostic test (analytical and diagnostic discrepancies). The results achieved in this work are in accordance with published recently results of the work of other centers. Results of this investigations shows the limits of FreeLite® assay. The cause of these

restrictions may be sample dilution anomalies (non-linearity) or failure of antigen excess detection and immunological free light chains properties.

In presented study the correlation of free light chains serum levels (kappa and lambda) and their relation (FLCr) and serum level of beta-2-microglobulin of patients with monoclonal gammopathy was evaluated. A significant correlation (Spearman Rank Correlation Coefficient test) of serum levels of the lambda dominant chain and serum levels of beta-2-microglobulin ($p=0,0000295$; $r=0,703$) was found.

Laboratory professionals and clinicians should be alert to analytical difficulties with the FLC assay. The limitations of FreeLite® assay can mislead and complicate clinical interpretation of a FLC result in some patients and even give the wrong impression of disease remission. Therefore it is advisable to perform FLC analysis of diagnostic and follow-up samples under the same analytical conditions, using more than one dilution on the same instrument. The assay should be performed in the same laboratory in good dialogue between biologist and clinician, and in combination with other diagnostic tests.

9 PIŚMIENICTWO

1. Kendziorek A., Bobilewicz D.M.: Badania laboratoryjne w różnych stadiach rozwoju gammapatii monoklonalnych. *In Vitro Explorer – Przegląd Medycyny Laboratoryjnej* 2007; 1(6): 3-8.
2. Rajkuman S.V., Kyle R.A, Therneau T.M., Melton L.J., Bradwell A.R., Clark R.J., Larson D.R., Plevak M.F., Dispenzieri A., Katzmann J.A.: Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005; 106: 812-817.
3. Jones H.B.: Papers on Chemical Pathology, Lecture III. *Lancet* 1847;II:88-92.
4. Von Rustizky J.: Multiple myeloma. *Dtsch. Z. Chir.* 1873; 3: 162-172.
5. Fleischer R XXIV. Ueber das Vorkommen des sogenannten Bence Jones'schen Eiweisskörpers im normalen Knochenmark. *Arch Pathol Anatom Physiol Klin Med* 1880; 80: 842-849.
6. Bayne-Jones S., Wilson D.W.: Immunological reactions of Bence-Jones proteins II. Differences between Bence-Jones proteins from various sources. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1922; 33: 119-125.
7. Korngold L., Lipari R.: Multiple-myeloma proteins III. The antigenic relationship of Bence Jones proteins to normal gamma-globulin and multiple-myeloma serum proteins. *Cancer.* 1956; 9: 262-272.
8. Jurchyszyn A., Skotnicki A.B.: Historia odkrycia szpiczaka mnogiego. *Epidemiologia, patogeneza, przebieg, kryteria rozpoznania, czynniki prognostyczne i klasyfikacje zaawansowania choroby. Szpiczak mnogi. Kompleksowa diagnostyka i terapia.* Pod red. A. Jurchyszyna i A.B. Skotnickiego. WM Górnicki Wrocław 2010.
9. Korbet S.M., Schwartz M.M.: Multiple myeloma. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3533-3545.
10. Kyle R.A.: The monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 1994; 40(11B): 2154-2162.
11. Walter-Croneck A.: Łagodna gammapatia – podstawy diagnostyki i różnicowania. *Bliżej Diagnostyki* 2006; 10: 3-9.

-
- 12.** Cesana C., Klersy C.: Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1625-1634.
- 13.** Kyle R.A., Rajkuman S.V.: Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 2006; 134: 573-589.
- 14.** Alexanian R., Weber D., Liu F.: Differential diagnosis of monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 108-113.
- 15.** Kyle R.A.: Multiple Myeloma and Other Plasma Cell Disorders. *Haematology: Basic Principles & Practice* 1995, 2nd edition New York: Churchill Livingstone: 1354-1374.
- 16.** Brenner H., Gonds A., Pulte D.: Recent major improvement In long-term survival of younger patients with multiple myeloma. *Blood* 2008; 111:2521-2526.
- 17.** Kristinsson S.Y., Landgren O., Dickman P.W., Derolf A.R., Björkholm M.: Patterns of survival In multiple myeloma: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2003. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1993-1999.
- 18.** Kraj M.: Zespoły chorobowe przebiegające z gammopatią monoklonalną. W: Janicki K. (red.): *Hematologia kliniczna*. PZWL, Warszawa 1991.
- 19.** Walker R., Barlogie B., Haessler J., Tricot G., Anaissie E., Shaughnessy J.D. Jr, Epstein J., van Hemert R., Erdem E., Hoering A., Crowley J., Ferris E., Hollmig K., van Rhee F., Zangari M., Pineda-Roman M., Mohiuddin A., Yaccoby S., Sawyer J., Angtuaco E.J.: Magnetic resonance imaging in multiple myeloma: diagnostic and clinical implications. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1121-1128.
- 20.** Kyle R.A., Therneau T.M., Rajkuman S.V., Larson D.R., Plevak M.F., Melton L.J. 3rd: Incidence of multiple myeloma In Olmsted County, Minnesota: trend over 6 decades. *Cancer* 2004; 101: 2667-2674.
- 21.** Komarnicki M.A.: Przebieg choroby i kryteria rozpoznania. Szpiczak mnogi. Najnowsze metody rozpoznawania i leczenia. Pod red. A. Dmoszyńskiej.
- 22.** Hobbs J.R.: Immunochemical classes of myelomatosis. Including data from a therapeutic trial conducted by a Medical Research Council working party. *Br J Haematol* 1969; 16: 599-606.

-
- 23.** Drayson M., Tang L.X., Drew R., Mead G.P., Carr-Smith H., Bradwell A.R.: Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood* 2001; 97: 2900-2902.
- 24.** Katzmann J., Abraham R .S., Dispenzieri A., Lust J.A., Kyle R.A.: Diagnostic performance of quantitative kappa and lambda free light chain assays in clinical practice. *Clin.Chem.* 2005; 52; 878-881.
- 25.** Bradwell A.R.: Serum free light chain analysis (plus Hevylite) 5th Edition. 2008. Published by The Binding Site Ltd.
- 26.** Le Bricon T., Bengoufa D., Benlakehal M., Bousquet B., Erlich D.: Urinary free light chain analysis by the freelite immunoassay: a preliminary study in multiple myeloma. *Clin Biochem* 2002; 35: 565-7.
- 27.** Palladini G., Russo P., Bosoni T., Verga L., Sarais G., Lavatelli F., Nuvolone M., Obici L., Casarini S., Donadei S., Albertini R., Righetti G., Marini M., Graziani M.S., Melzi D'Eril G.V., Moratti R., Merlini G.: 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.
- 28.** Daval S., Tridon A., Mazon N., Ristori J.M., Evrard B.: Risk of antigen excess in serum free light chain measurements. *Clin Chem* 2007; 53: 1985-1986.
- 29.** Hill P.G., Forsyth J.M., Rai B., Mayne S.: Serum Free Light Chains: An Alternative to the Urine Bence Jones Proteins Screening Test for Monoclonal Gammopathies. *Clin Chem* 2006; 52 (9): 1743–1748.
- 30.** Dispenzieri A., Kyle R., Merlini G., Miguel J.S., Ludwig H., Hajek R., Palumbo A., Jagannath S., Blade J., Lonial S., Dimopoulos M., Comenzo R., Einsele H., Barlogie B., Anderson K., Gertz M., Harousseau J.L., Attal M., Tosi P., Sonneveld P., Boccadoro M., Morgan G., Richardson P., Sezer O., Mateos M.V., Cavo M., Joshua D., Turesson I., Chen W., Shimizu K., Powles R., Rajkumar S.V., Durie B.G., International Myeloma Working Group: International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chains analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009 Feb ;23(2): 215-224.
- 31.** Katzmann J.A.: Serum free light chain specificity and sensitivity: A Reality Check. *Clin Chem* 2006; 52(9): 1638-1639.

-
- 32.** Piehler A.P., Gulbrandsen N., Kierulf P., Urdal P.: Quantitation of serum free light chains in combination with protein electrophoresis and clinical information for diagnosing multiple myeloma in a general hospital population. *Clin Chem* 2008; 54(11): 1823-1830.
- 33.** Katzmann J.A., Dispenzieri A., Kyle R.A., Snyder M.R., Plevak M.F., Larson D.R., Abraham R.S., Lust J.A., Melton L.J. 3rd, Rajkumar S.V.: Elimination of the need for urine studies in the screening algorithm for monoclonal gammopathies by using serum immunofixation and free light chain assays. *Mayo Clin Proc* 2006; 81(12): 1575-1578.
- 34.** International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003; 121: 749-757.
- 35.** Pratt G.: The evolving use of serum free light chain assays in haematology. *Br J Haematol* 2008; 141(4): 413-422.
- 36.** Vermeersch P., Mariën G., Bossuyt X.: More studies are needed to assess the performance of serumfree light chain measurement for the diagnosis of B-celldisorders in routine clinical practice. *Br J Haematol* 2008; 143(1):143-145.
- 37.** Abraham R.S., Clark R.J., Bryant S.C., Lymp J.F., Larson T., Kyle R.A., Katzmann J.A.: Correlation of serum immunoglobulin free light chain quantification with urinary Bence Jones protein in light chain myeloma. *Clin Chem* 2002; 48: 655-657.
- 38.** Singhal S., Stein R., Vickrey E., Mehta J.: The serum-free light chain assay cannot replace 24-hour urine protein estimation in patients with plasma cell dyscrasias. *Blood* 2007; 109: 3611-3612.
- 39.** Wolff F., Willems D.: Immunonephelometric quantification of specific urinary proteins versus a simple electrophoretic method for characterizing proteinuria. *Clin Bioch* 2008; 41: 418-422.
- 40.** Smith A., Wisloff F., Samson D.: Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. *Br J Haematol* 2006; 132: 410-451.
- 41.** Bradwell A.R., Carr-Smith H.D., Mead G.P., Tang L.X., Showell P.J., Drayson M.T., Drew R.: Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001; 47: 673-680.

-
- 42.** Katzmann J.A., Clark R.J., Abraham R.S., Bryant S., Lymp J.F., Bradwell A.R., Kyle R.A.: Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem* 2002; 48(9): 1437-1444.
- 43.** Harousseau J.L., Dreyling M.: Multiple myeloma: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2009; 20(4): 97-99.
- 44.** Durie B.G., Harousseau J.L., Miguel J.S., Bladé J., Barlogie B., Anderson K., Gertz M., Dimopoulos M., Westin J., Sonneveld P., Ludwig H., Gahrton G., Beksac M., Crowley J., Belch A., Boccadaro M., Cavo M., Turesson I., Joshua D., Vesole D., Kyle R., Alexanian R., Tricot G., Attal M., Merlini G., Powles R., Richardson P., Shimizu K., Tosi P., Morgan G., Rajkumar S.V.; International Myeloma Working Group.: International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006; 20: 1467-1473.
- 45.** Walker J.M.: The protein protocols handbook. Second Edition 2002 Humana Press.
- 46.** Dati F., Lammers M., Adam A., Sondag D., Stienen L.: Referenzwerte für 18 Plasmaproteine am Behring-Nephelometer-System. *Lab Med* 1989; 13: 87-90.
- 47.** Lievens M.M.: Medical and technical usefulness of measurements of kappa and lambda immunoglobulin light chains in serum with an M-component. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27: 519-523.
- 48.** Brouwer J., Otting van de Ruit M., Busking van derLely H. Estimation of free light chains of immunoglobulins by enzyme immunoassay. *Clin Chim Acta* 1985; 150: 267-274.
- 49.** Dati F., Schuman G., Thomas L., Aguzzi F., Baudner S., Bienvenu J., Blaabjerg O., Bllirup-Jensen S., Carlström A., Petersen P.H., Johnson A.M., Milford-Ward A., Ritchie R.F., Svendsen P.J., Whicher J.: Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim references ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/BCR/CAP Reference Material (CRM 470). International Federation of Clinical Chemistry. Community Bureau of Reference of the Commission of the European Communities. College of American Pathologist. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 517-520.

-
- 50.** Pika T., Minarik J., Schneiderka P., Budikova M., Langova K., Lochman P., Bacovsky J., Farbiakova V., Scudla V.: The correlation of serum immunoglobulin free light chain levels and selected biological markers in multiple myeloma. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2008; 152(1): 61-64.
- 51.** Katzmann J.A., Dispenzieri A.: Screening algorithms for monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2008; 54(11): 1753-1755.
- 52.** Jenkins M.A.: Serum and urine electrophoresis for detection and identification of monoclonal proteins. *Clin Biochem Rev* 2009 Aug; 30(3): 119-122.
- 53.** Nowrousian M.R., Brandhorst D., Sammet C., Kellert M., Daniels R., Schuett P., Poser M., Mueller S., Ebeling P., Welt A., Bradwell A.R., Buttkereit U., Opalka B., Flasshove M., Moritz T., Seeber S.: Serum free light chain analysis and urine immunofixation electrophoresis in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2005 Dec 15; 11(24 Pt 1): 8706-8714.
- 54.** Katzmann J.A.: Screening panels for monoclonal gammopathies: time to change. *Clin Biochem Rev* 2009; 30: 105-111.
- 55.** Kyle R.A., Gertz M.A., Witzig T.E., Lust J.A., Lacy M.Q., Dispenzieri A., Fonseca R., Rajkumar S.V., Offord J.R., Larson D.R., Plevak M.E., Therneau T.M., Greipp P.R.: Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proceedings* 2003; 78(1): 21-33.
- 56.** Kyle R.A., Remstein E.D., Therneau T.M., Dispenzieri A., Kurtin P.J., Hodnefield J.M., Larson D.R., Plevak M.F., Jelinek D.F., Fonseca R., Melton L.J. 3rd, Rajkumar S.V.: Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2007; 356(25): 2582-2590.
- 57.** Weiss B.M., Abadie J., Verma P., Howard R.S., Kuehl W.M.: A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009; 28; 113(22): 5418-5422.
- 58.** Shaheen S.P., Levinson S.S.: Serum free light chain analysis may miss monoclonal light chains that urine immunofixation electrophoreses would detect. *Clin Chim Acta* 2009; 406: 162-166.

-
- 59.** Levinson S.:Urine immunofixation electrophoresis remains important and is complementary to serum free light chain. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(11): 1801–1804.
- 60.** Holding S., Spradbery D., Hoole R., Wilmot R., Shields M.L., Levoguer A.M., Doré P.C.: Use of serum free light chain analysis and urine protein electrophoresis for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 83–88.
- 61.** Viedma J.A., Garrigos N., Morales S.: Comparison of the sensitivity of 2 automated immunoassays with immunofixation electrophoresis for detecting urine Bence Jones proteins. *Clin Chem* 2005; 51:1505–1507.
- 62.** Palladini G., Russo P., Bosoni T., Verga L., Sarais G., Lavatelli F., Nuvolone M., Obici L., Casarini S., Donadei S., Albertini R., Righetti G., Marini M., Graziani M.S., Melzi D'Eril G.V., Moratti R., Merlini G.: 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.
- 63.** Merlini G.: Serum-free light chain analysis: works in progress. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 1021–1022.
- 64.** Pratt G., Holding S.: More studies are needed to assess the performance of serum free light chain measurement for the diagnosis of B-cell disorders in routine clinical practice – response to Vermeersch et al.*Br J Haematol* 2008; 143(1): 145-146.
- 65.** Mollee P.: Current trends in the diagnosis, therapy and monitoring of the monoclonal gammopathies. *Clin Biochem Rev* 2009 August; 30(3): 93-103.
- 66.** San Miguel J.F., Gutierrez N.C., Mateo G., Orfao A.: Conventional diagnostics in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006; 42(11): 1510-1519.
- 67.** Dogaru M., Lazăr V., Coriu D.: Assessing the efficiency of free light chain assay in monitoring patients with multiple myeloma before and after autologous stem cell transplantation along with serum protein electrophoresis and serum protein immunofixation. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2011 Jan-Mar; 70(1):15-22.
- 68.** Katzmann J.A., Kyle R.A., Benson J., Larson D.R., Snyder M.R., Lust J.A., Rajkumar S.V., Dispenzieri A.: Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009 Aug; 55(8):1517-1522.

-
- 69.** Chan D.T., Craig K., Donovan K., Philips A.: Myeloma Renal Disease: Presentation and outcome. *Nephron Clin Pract* 2006; 104(3): 126-131.
- 70.** Doyle A., Soutar R., Geddes C.C.: Multiple myeloma in chronic kidney disease. Utility of discretionary screening using serum electrophoresis. *Nephron Clin Pract* 2009; 111(1): 7-11.
- 71.** Kraj M.: Gammapatie monoklonalne. Podstawy hematologii, red. A. Dmoszyńska i T.Robak, wyd. Czelej; Lublin 2003; 285-319.
- 72.** Haubitz M., Peset D.: Myeloma-new approaches to combined nephrological-haematological management. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 582-590.
- 73.** Majdan M.: Powikłania nerkowe. Szpiczak mnogi. Najnowsze metody rozpoznawania i leczenia. Praca zbiorowa pod red. A. Dmoszyńskiej. Wyd. ANmedia 2009.
- 74.** Greipp P.R., Raymond N.M., Kyle R.A., O'Fallon W.M.: Multiple Myeloma: significance of plasmablastic subtype in morphological classification. *Blood* 1985; 65: 305-310.
- 75.** Mead G.P., Reid S., Auguston B., Drayson M.T., Bradwell A.R., Child J.A.: Correlation of serum free light chains and bone marrow plasma cell infiltration in multiple myeloma. *Blood* 2004; 104: 4865, p299b.
- 76.** Tang G., Snder M., Rao L.V.: Assesment of serum free light chain (FLC) assays with immunofixation electrophoresis (IFE) and bone marrow (BM) immunophenotyping In the diagnosis of plasma cell disorders. *Clin Chem* 2008; 54; A33: Abstr A-96.
- 77.** Blade J., Rozman C., Cervantez F., Reverter J.C., Montserrat E.: A new prognostic system for multiple myeloma based on easily available parameters. *Br J. Haematol.* 1989; 72: 507-511.
- 78.** Ludwig H., Durie B.G.M., Bolejack V., Turesson I., Kyle R.A., Blade J., Fonseca R., Dimopoulos M., Shimizu K., San Miguel J., Westin J., Harousseau J.L., Beksac M., Boccadoro M., Palumbo A., Barlogie B., Shustik C., Cavo M., Greipp P.R., Joshua D., Attal M., Sonneveld P., Crowley J.: Myeloma in patients younger than 50 years with

more favorable features and shows better survival: an analysis of 10549 patients from the International Myeloma Working Group. *Blood* 2008; 111: 4039-4047.

79. Merlini G., Waldenstrom J.G., Jayakar S.D.: A new improved clinical staging system for multiple myeloma based on analysis of 123 treated patients. *Blood* 1980; 55: 1011-1019.

80. Rajpal R., Dowling P., Meiller J., Clarke C., Murphy W.G., O'Connor R., Kell M., Mitsiades C., Richardson P., Anderson K.C., Clynes M., O'Gorman P.: A novel panel of protein biomarkers for predicting response to thalidomide-based therapy in newly diagnosed multiple myeloma. *Proteomics* 2011; 11: 1391-1402.

81. Dispenzieri A., Kyle R.A., Katzmann J.A., Therneau T.M., Larson D., Benson J., Clark R.J., Melton L.J. 3rd, Gertz M.A., Kumar S.K., Fonseca R., Jelinek D.F., Rajkumar S.V.: Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood* 2008; 111: 785-789.

82. Snozek C.L., Katzmann J.A., Kyle R.A., Dispenzieri A., Larson D.R., Therneau T.M., Melton L.J. 3rd, Kumar S., Greipp P.R., Clark R.J., Rajkumar S.V.: Prognostic value of the serum free light chain ratio in newly diagnosed myeloma and proposed incorporation into the international staging system. *Leukemia* 2008; 22: 1933-1937.

83. van Rhee F., Bolejack V., Hollmig K., Pineda-Roman M., Anaissie E., Epstein J., Shaughnessy J.D. Jr, Zangari M., Tricot G., Mohiuddin A., Alsayed Y., Woods G., Crowley J., Barlogie B.: High serum-free light chain levels and their rapid reduction in response to therapy define an aggressive multiple myeloma subtype with poor prognosis. *Blood* 2007; 110: 827-32.

84. Kyrtsolis M.C., Vassilakopoulos T.P., Kafasi N., Sachanas S., Tzenou T., Papadogiannis A., Galanis Z., Kalpadakis C., Dimou M., Kyriakou E., Angelopoulou M.K., Dimopoulou M.N., Siakantaris M.P., Dimitriadou E.M., Kokoris S.I., Panayiotidis P., Pangalis G.A.: Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007; 137(3): 240-243.

85. Dingli D., Kyle R.A., Rajkumar S.V., Nowakowski G.S., Larson D.R., Bida J.P., Gertz M.A., Therneau T.M., Melton L.J. 3rd, Dispenzieri A., Katzmann J.A.:

Immunoglobulin free light chains and solitary plasmacytoma of bone. *Blood* 2006; 108(6): 1979-1983.

86. Dispenzieri A., Lacy M.Q., Katzmann J.A., Rajkumar S.V., Abraham R.S., Hayman S.R., Kumar S.K., Clark R., Kyle R.A., Litzow M.R., Inwards D.J., Ansell S.M., Micallef I.M., Porrata L.F., Elliott M.A., Johnston P.B., Greipp P.R., Witzig T.E., Zeldenrust S.R., Russell S.J., Gastineau D., Gertz M.A.: Absolute values of immunoglobulin free light chains are prognostic in patients with primary systemic amyloidosis undergoing peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2006; 107(8): 3378-3383.

87. Vercammen M., Meirlaen P., Broodtaerts L., Vande Broek I., Bossuyt X.: Effect of sample dilution on serum free light chain concentration by immunonephelometric assay. *Clin Chim Acta* 2011 Sep 18; 412(19-20): 1798-804. Epub 2011 Jun 29.

88. Abraham R., Charlesworth M., Owen B., Benson L.M., Katzmann J.A., Reeder C.B., Kyle R.A.: Trimolecular complexes of lambda light chain dimers in serum of a patient with multiple myeloma. *Clin Chem* 2002; 48: 1805–1811.

89. Tate J., Devinder G., Cobcroft R., Hickman P.: Practical considerations for the measurement of free light chains in serum. *Clin Chem* 2003; 49: 1252–1257.

90. de Kat Angelino C.M., Raymakers R., Teunesen M.A., Jacobs J.F., Klasen I.S.: Overestimation of serum kappa free light chain concentration by immunonephelometry. *Clin Chem* 2010; 56: 1188–1190.

91. Murray D.L., Ryu E., Snyder M.R., Katzmann J.A.: Quantitation of serum monoclonal proteins: relationship between agarose gel electrophoresis and immunonephelometry. *Clin Chem* 2009; 55(8): 1523-1529.

92. Schroers R., Baraniskin A., Heute C., Kuhnhen J., Alekseyev A., Schmiegel W., Schlegel U., Pels H.J.: Detection of free immunoglobulin light chains in cerebrospinal fluids of patients with central nervous system lymphomas. *Eur J Haematol* 2010 Sep; 85(3): 236-242.

93. Presslauer S, Milosavljevic D., Brücke T., Bayer P., Hübl W.: Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol* 2008 Oct; 255(10): 1508-14.

-
- 94.** Kaplan B., Aizenbud B.M., Golderman S., Yaskariev R., Sela B.A.: Free light chain monomers in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010; 229(1-2): 263–271.
- 95.** Martin W., Abraham R., Shanafelt T., Clark R.J., Bone N., Geyer S.M., Katzmann J.A., Bradwell A., Kay N.E., Witzig T.E.: Serum-free light chain-a new biomarker for patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Transl Res* 2007 Apr; 149(4): 231-235.
- 96.** Kayserova J., Capkova S., Skalicka A., Vernerova E., Polouckova A., Malinova V., Bartunkova J., Sediva A.: Serum immunoglobulin free light chains in severe forms of atopic dermatitis. *Scand J Immunol* 2010 Apr; 71(4): 312-316.
- 97.** Dispenzieri A., Lacy M.Q., Greipp P.R.: Multiple Myeloma. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Wyd. Lippincott Williams and Wilkins 2009: 2372-2438.
- 98.** Usnarska-Zubkiewicz L., Hołojda J, Kuliczowski K: Wolne łańcuchy lekkie w surowicy - znaczenie diagnostyczne i prognostyczne w dyskracjach plazmocytowych. *Acta Haematologica Polonica* 2009; 40(2): 349-361.
- 99.** Sölling K, Lanng Nielsen J, Ellegaard J: Free light chains of immunoglobulins in serum from patients with leukaemias and multiple myeloma. *Scand J Hematol* 1982; 28: 309-318.
- 100.** Dispenzieri A., Zhang L., Katzmann J.A., Snyder M., Blood E., Degeoy R., Henderson K., Kyle R.A., Oken M.M., Bradwell A.R., Greipp P.R.: Appraisal of immunoglobulin free light chain as a marker of response. *Blood* 2008; 111(10): 4908–4915.
- 101.** Bradwell A.R., Carr-Smith H.D., Mead G.P., Harvey T.C., Drayson M.T.: Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* 2003; 361: 489-491.
- 102.** Lachmann H.J., Gallimore R., Gillmore J.D., Carr-Smith H.D., Bradwell A.R., Pepys M.B., Hawkins P.N.: Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating free immunoglobulin light chains following chemotherapy. *Br J Haematol* 2003; 122(1): 74-84.

-
- 103.** Neeravari A., Netravati P., Mohammed R., Ragupathi A.R., Nagarajappa A.H.: Atypical imaging feature of non-secretory multiple myeloma. *Ann Diagn Pathol* 2011 Aug; 15(4): 268-272.
- 104.** Hutchinson C.A., Mead G., Chandler K., Harper J., Bradwell A., Cockwell P.: Free light chain abnormalities in patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 899a.
- 105.** Gerth J., Sachse A., Busch M., Illner N., Muegge L.O., Gröne H.J., Wolf G.: Screening and Differential Diagnosis of Renal Light Chain-Associated Diseases. *Kidney Blood Press Res.* 2011 Nov 1; 35(2): 120-128.
- 106.** Alexanian R., Barlogie B., Dixon D.: Renal failure in multiple myeloma; pathogenesis and prognostic implications. *Arch Intern Med* 1990; 150(8): 1693-1695.
- 107.** Torra R., Blade J., Cases A., López-Pedret J., Montserrat E., Rozman C., Revert L.: Patients with multiple myeloma requiring long term dialysis. Presenting features, response to therapy and outcome in series of 20 cases. *Br J Haematol* 1995; 91(4): 854-859.
- 108.** Knudsen L.M., Hjorth M., Hippe E.: Renal failure in multiple myeloma: reversibility and impact on the prognosis. Nordic Myeloma Group. *Eur J Haematol* 2000; 65: 175-181.
- 109.** Knudsen L.M., Hippe E., Hjorth M., Holmberg E., Westin J.: Renal function in newly diagnosed multiple myeloma a demographic study of 1353 patients. *Eur J Haematol* 1994; 53: 207-212.
- 110.** Peters N.O., Laurain E., Cridlig J., Hulin C., Cao-Huu T., Frimat L.: Impact of free light chain hemodialysis in myeloma cast nephropathy: a case-control study. *Hemodial Int* 2011; 15(4): 538–545.
- 111.** Hutchison CA.: Reduction of serum free light chains predict renal recovery. *Ann Hematol* 2010; 89: 627–628.
- 112.** Abraham R.S., Clark R.J., Bryant S.C., Lymp J.F., Larson T., Kyle R.A., Katzmann J.A.: Correlation of Serum Immunoglobulin Free Light Chain Quantification with Urinary Bence Jones Protein in Light Chain Myeloma. *Clin Chem* 2002; 48(4): 655-657.

-
- 113.** Briand P.Y., Decaux O., Caillon H., Grosbois B., Le Treut A., Guenet L.: Analytical performance of the serum free light chain assay. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48(1): 73–79.
- 114.** Davids MS, Murali MR, Kuter DJ.: Serum free light chain analysis. *Am J Hematol.* 2010 Oct; 85(10): 787-790.
- 115.** Tate J., Mollee P., Dimeski G., Carter A., Devinder G.: Analytical performance of serum free light chain assay during monitoring of patients with monoclonal free light chain diseases. *Clin Chim Acta* 2007; 376 : 30–36.
- 116.** Bosmann M., Kössler J., Stolz H., Walter U., Knop S., Steigerwald U.: Detection of serum free light chains: the problem with antigen excess. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48(10): 1419–1422.
- 117.** Murata K., Clark R.J., Lockington K.S., Tostrud L.J., Greipp P.R., Katzmann J.A.: Sharply increased serum free light-chain concentration after treatment for multiple myeloma. *Clin Chem* 2010; 56: 16–18.
- 118.** Pepperkok B., Zeuch A., Jehlicka-Rose R., Bartel J.: Incidence and handling of antigen excess when measuring free light chains. *Hematol Rep* 2010; 2(s2):A2.
- 119.** Gertz M., Comenzo R., Falk R., Fermand J.P., Hazenberg B.P., Hawkins P.N., Merlini G., Moreau P., Ronco P., Santhorawala V., Sezer O., Solomon A., Griteau G.: Definition of organ involvement and treatment response in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): a consensus opinion from the 10th International Symposium on Amyloid and Amyloidosis. *Am J Hematol* 2005; 79(4): 319–328.
- 120.** Solanski M., Matters D.: Evaluation of parameters for measuring free immunoglobulin light-chains with automated antigen excess detection on the Siemens BNII analyser. *Hematol Rep* 2010; 2(s2): A4.
- 121.** Mori S., Crawford B.S., Roddy J.V., Phillips G., Elder P., Hofmeister C.C., Efebera Y., Benson D.M. Jr.: Serum free light chains in myeloma patients with an intact M protein by immunofixation: potential roles for response assessment and prognosis during induction therapy with novel agents. *Hematol Oncol.* 2011 Oct 26. doi: 10.1002/hon.1019. [Epub ahead of print]

-
- 122.** Nakano T., Nagata A., Takahashi H.: Ratio of urinary free immunoglobulin light chain k to l in the diagnosis of Bence Jones proteinuria. *ClinChem Lab Med* 2004; 42(4): 429–434.
- 123.** Robinson E.L., Gowland E., Ward I.D., Scarffe J.H.: Radioimmunoassay of free light chains of immunoglobulins in urine. *Clin Chem* 1982; 28: 2254–2258.
- 124.** Snyder M.R., Clark R., Bryant S.C., Katzmann J.A.: Quantification of urinary light chains. *Clin Chem* 2008; 54:1744-1746.
- 125.** Ozsan G.H., Dispenzieri A.: Serum free light chain analysis in multiple myeloma and plasma cell dyscrasias. *Expert Rev Clin Immunol* 2011 Jan; 7(1): 65-73.
- 126.** Bradwell A.R., Harding S.J., Fourrier N.J., Wallis G.L., Drayson M.T., Carr-Smith H.D., Mead G.P.: Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin kappa/lambda ratios. *Clin Chem* 2009 Sep; 55(9):1646-1655.
- 127.** Berggard I., Peterson P.A.: Polymeric forms of free normal k and l chains of human immunoglobulin. *J Biol Chem* 1969; 244: 4299-4307.
- 128.** Abraham R.S., Charlesworth M.C., Owen B.A.L., Benson L.M.,Katzmann J.A., Kyle R.A.: Trimolecular complexes of l light chain dimers in serum of a patient with multiple Myeloma.*Clin Chem* 2002; 48: 1805-1811.
- 129.** Diemert M.C., Musset L., Gaillard O., Escolano S., Baumelou A.,Rousselet F., Galli J.: Electrophoretic study of the physicochemical characteristics of Bence-Jones proteinuria and its association with kidney damage. *J Clin Pathol* 1994; 47: 1090-1097.
- 130.** Sölling K.: Polymeric forms of free light chains in serum from normal individuals and from patients with renal diseases. *Scand J Clin Invest* 1976; 36: 447-452.
- 131.** Sölling K., Sölling J., Nielsen L.J.: Polymeric Bence Jones proteins in myeloma patients with renal insufficiency. *Acta Med Scand* 1984; 216: 495-502.
- 132.** Heino J., Rajamaki A., Irjala K.: Turbidimetric measurement of Bence Jones proteins using antibodies against free light chains of immunoglobulins. *Scand J Clin Lab Invest* 1984; 44: 173-176.