

Přehled metod na stanovení volných lehkých řetězců

Tichý M.¹, Vávrová J.¹, Friedecký B.¹, Maisnar V.²

¹Ústav klinické biochemie LF UK a FN Hradec Králové

²II. interní klinika LF UK a FN Hradec Králové

SOUHRN

Práce podává základní informace o lehkých řetězcích imunoglobulinů. V přehledu uvádí vývoj metod používaných v klinické biochemii na jejich stanovení. Upozorňuje na četné limity a problémy stanovení volných lehkých řetězců a na jejich možné klinické využití.

Klíčová slova: volné lehké řetězce, monoklonální imunoglobuliny, gamapatie, index kappa/lambda.

SUMMARY

Tichý M., Vávrová J., Friedecký B., Maisnar V.: Methods for detection of free immunoglobulin light chains

The publication contains basic information about free light chains of immunoglobulins.

In a short review it shows evaluation methods used in clinical biochemistry for the determination of free light chains of immunoglobulins. Authors summarize methodical limitation of determination of free light chains and discuss their clinical utilization.

Key words: free immunoglobulin light chains, immunoassay, monoclonal immunoglobulin, Bence Jones protein.

Úvod

Stanovení volných lehkých řetězců imunoglobulinů (VLŘ) bylo poprvé popsáno před 150 roky a přes obrovské změny, které proběhly v práci klinických laboratoří, zůstává jedním z markerů pro suspektní monoklonální gamapatii. Henry Bence-Jones popsal v r. 1847 termoprecipitaci záhadné bílkoviny v okyselené moči nemocného mnohočetným myelomem. Tato bílkovina dodnes nese jméno svého objevitele a my nyní víme, že tzv. Bence-Jonesova bílkovina je tvořena monoklonálními volnými lehkými řetězci imunoglobulinů. S velmi jednoduchými pomůckami – kyselinou dusičnou a plamenem učinil Henry Bence-Jones objev, který stále poutá naši pozornost a ke kterému se vrací i řada současných publikací [1, 2].

Lehké řetězce imunoglobulinů jsou komponentou protilátek. Imunoglobulinová molekula je složena ze dvou identických těžkých polypeptidických řetězců o mol. hm. kolem 50 kDa a ze dvou identických lehkých polypeptidických řetězců o mol. hm. asi 22 kDa. Lehké řetězce jsou dvojího typu – kappa a lambda – a v molekule imunoglobulinu jsou vždy dva lehké řetězce stejného typu: buď kappa, nebo lambda. Molekul imunoglobulinů s antigenním typem lehkých řetězců kappa je za fyziologických podmínek přibližně dvakrát více než molekul Ig s antigenním typem lehkých řetězců lambda. Každá molekula volného lehkého řetězce obsahuje přibližně 220 aminokyselin v jednom polypeptidickém řetězci, na kterém rozeznáváme část variabilní a část konstantní. Variabilní doména každého lehkého řetězce a párového těžkého řetězce tvoří vazebné místo pro antigen. Pomocí monoklonálních protilátek byly zjištěny 4 podskupi-

ny lehkých řetězců kappa (VK1–VK4) a 6 podskupin lehkých řetězců lambda (VL1–VL6). Specifické strukturální zvláštnosti volných lehkých řetězců vedou ke snadnější polymeraci, jako je tomu např. u amyloidózy, především u podskupin VL6, VK1 a VK4 [1]. Všichni produkujeme malá množství polyklonálních lehkých řetězců jako výsledek fyziologické funkce B-lymfocytů. Koncentrace volných lehkých řetězců je v normálním lidském séru a v moči velmi nízká, jejich denní produkce je asi 500 mg/24 h. Volné lehké řetězce snadno přecházejí přes glomerulární membránu a jsou metabolizovány v proximálních tubulech nefronů.

Normální exkrece polyklonálních volných lehkých řetězců do moče je 1–10 mg/24 h. Volné lehké řetězce kappa jsou odstraňovány 3krát rychleji než dimery volných lehkých řetězců lambda. U nemocných s renálními onemocněními nebo zánětlivými procesy apod. může být produkce nebo exkrece volných lehkých řetězců významně zvýšená, a to až 30–40krát. Poměr kappa/lambda však zůstává nezměněn. Volné lehké řetězce mohou být polyklonální, oligoklonální a monoklonální, ale Bence-Jonesova bílkovina je tvořena jen volnými monoklonálními lehkými řetězci. Neexistuje antisérum, kterým bychom rozlišili monoklonální lehké řetězce od polyklonálních. Volné lehké řetězce můžeme pozorovat poměrně často při imunofixační elektroforéze sér nemocných monoklonálními gamapatiemi jako ostrý gradient, který nekoresponduje s gradientem kompletní molekuly paraproteinu. V posledních letech se zavedením citlivých, vysoce specifických metod na stanovení volných lehkých řetězců v séru nachází tato metoda nová uplatnění a vzrůstá její klinický význam [3, 4, 5].

Metody stanovení

Kvantitativní stanovení VLŘ bylo poprvé popsáno v r. 1965 Tanem a Epsteinem [6] metodou radiální imunodifuze. Od té doby byla použita řada metod ke stanovení VLŘ (tab. 1). Metody stanovení VLŘ jsou radiální imunodifuze, imunonefelometrie, imunoturbidimetrie, RIA a ELISA. Původní metodou pro kvantifikaci VLŘ byla radiální imunodifuze (RID) často ale s použitím antiséra proti volným i vázaným lehkým řetězcům [9, 10, 15, 16]. Tato metoda byla také málo citlivá. Limit detekce byl mezi 5–20 mg/l. Zvratem ve vyšetřování VLŘ byl r. 2001, kdy Bradwell et al. [13] uveřejnili citlivou a automatizovanou imunochemickou metodu na jejich stanovení. V současnosti jsou nejvíce v praxi využívány nefelometrie a turbidimetrie pro svou rychlost a jednoduchost stanovení. Používají se protilátky proti vnitřním epitopům lehkých řetězců, které jsou v kompletní molekule imunoglobulinu nedostupné. Přesto jedním z hlavních problémů stanovení VLŘ je zkřížená reakce s lehkými řetězci vázanými v intaktních imunoglobulinových molekulách. Anti VLŘ antiséra mají průměrnou zkříženou reakci 0,1 % [2], což je příčinou zmíněných obtíží, např. vzorek obsahující 10 mg/l VLŘ a paraprotein IgG-kappa o koncentraci 10 g/l, při 0,1 % zkřížené reakci s vázanými lehkými řetězci poskytne konečný výsledek VLŘ dvojnásobný, tj. 20 mg/l. Protože u monoklonálních gamapatií se většinou jedná o nadprodukcii jen jednoho antigenního typu lehkých řetězců, je výhodné vyjadřovat tuto dediferenciaci v syntéze VLŘ indexem kappa/lambda, který bývá v těchto pozorováních abnormální [3]. Výjimkou jsou ovšem zdvojené monoklonální gamapatie s rozdílným typem lehkých řetězců, u kterých stanovení indexu kappa/lambda nemá význam. Další limitací stanovení VLŘ je, jak jsme se již zmínili, zkrácení výsledku přítomností polyklonálních VLŘ v séru. Významným problémem stanovení VLŘ je standardizace tohoto vyšetření. Dosud chybí mezinárodní referenční materiál. Je těžké validovat kalibrátor pro velkou strukturální heterogenitu lehkých řetězců, která může být ještě modifikována účinkem pH, polymerace a oligomerace. Ke kompenzaci této variability se používají ke kalibraci směsi 3–30 klonálně rozdílných Bence-Jonesových bílkovin (BJB). Tento „BJB koktejl“ poskytuje průměr

z rozdílných antigenních referenčních materiálů. Někteří autoři používají jako referenční materiál polyklonální VLŘ. Carr-Smith et al. [17] připravili monomery molekul VLŘ redukcí a alkylací polyklonálního IgG a použili je jako primární kalibrační materiál. Navzdory vysoké citlivosti metod na stanovení VLŘ v séru existují vzorky sér, ve kterých je stanovena normální (negativní) koncentrace VLŘ, ale imunofixací jsou prokázány monoklonální lehké řetězce. Katzmann [3] to vysvětluje limitovaným počtem antigenních míst specifických pro VLŘ a vysokou incidencí štěpů lehkých řetězců u amyloidózy. Tyto paradoxní výsledky mohou být způsobeny také variabilitou polyklonálních antisér proti VLŘ, která může vyústit v různou imunoreaktivitu jednotlivých monoklonálních VLŘ a je pozorována i mezi jednotlivými šaržemi souprav na stanovení VLŘ. V posledních letech se problémy se stanovením VLŘ zabývá řada prací [2, 17, 18, 19, 20].

Normální referenční rozpětí koncentrací VLŘ kolísá pro VLŘ kappa mezi 1,2–43,5 mg/l a pro VLŘ lambda mezi 3,8–55,2 mg/l. U komerčních souprav nejčastěji v klinických laboratořích používaných „FreeLite“, (the Binding Site Ltd. Birmingham, UK) je uváděno rozpětí referenčních hodnot pro VLŘ kappa 3,3–19,4 mg/l, pro VLŘ lambda 5,7–26,3 mg/l a pro index kappa/lambda jsou to hodnoty 0,26–1,65. Hladina VLŘ v séru zdravých jedinců stoupá s věkem a zřetelné zvýšení hodnot je pozorováno u osob nad 80 let. Hodnoty VLŘ v moči nekolísají tak významně jako v séru. Referenční hodnoty VLŘ v moči se uvádějí pro řetězce kappa 1,25–5,5 mg/l, pro VLŘ lambda 0,51–3,2 mg/l a pro index kappa/lambda 0,82–3,0. Nižší variabilita VLŘ v moči je pravděpodobně výsledkem nižší koncentrace intaktních imunoglobulinů v normální moči. Nejspecifičtější metodou na stanovení VLŘ se zdá ELISA, která kombinuje dvě protilátky proti VLŘ a dosahuje zkřížené reakce s vázanými lehkými řetězci nižší než 0,01 %. Tato metoda by měla být vhodná pro stanovení VLŘ v moči a v cerebrospinální tekutině (pro průkaz intratekální tvorby protilátek).

Od 60. let minulého století byla pro stanovení VLŘ použita různá antiséra, nejčastěji králíčí nebo prasečí. Specifická antiséra se připravují imunizací zvířat Bence-Jonesovou bílkovinou. Připravené antisérum je podrobena absorpci s imunoglobuliny G, A a M nebo

Table 1. Methods for free light chains of immunoglobulins

Publication	Year	Method	Antibody	Sample
Tan and Epstein [6]	1965	RID	polyclonal Ab	Serum/Synovial fluid
Mann et al. [7]	1969	RIA	polyclonal Ab	Culture supernatant
Peterson et al. [8]	1971	Turbidimetry	polyclonal Ab	Urine
Cole et al. [9]	1978	RID	anti total pAb	Serum/Urine
Tichý and Hrnčář [10]	1982	RID	anti total pAb	Serum/Urine
Axiak et al. [11]	1987	Competitiv. EIA	monoclonal Ab	Serum/Urine
Abe et al. [12]	1998	ELISA	monoclonal Ab	Serum/Urine
Bradwell et al. [13]	2001	Nephelometry	polyclonal Ab	Serum/Urine
Nakano et al. [14]	2004	ELISA	mono. + polycl. Ab	Serum/Urine

According to Nakano et al. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006, 44, 5, 522–532 [17].

s Cohnovou frakcí II na odstranění protilátek, které reagují s vázanými lehkými řetězci. Jen velmi málo studií používá monoklonální protilátky proti VLŘ, pravděpodobně pro obtížnost produkce specifických a spolehlivých monoklonálních protilátek proti VLŘ a pro jejich limitovanou použitelnost v imunologických metodách [17].

Katzmann [3] shrnul limitace stanovení VLŘ v podstatě do čtyř bodů:

1. zkřížená reakce s vázanými lehkými řetězci,
2. chybějící standardizace vyšetření,
3. stanovení indexu kappa/lambda u biklonálních gamapatií (asi 2–4 % MG),
4. část vzorků pozitivních na paraprotein imunofixací je při stanovení VLŘ negativní. Bradwell [1] naproti tomu vymezil podmínky, které by měl splnit ideální test na stanovení VLŘ:
 1. Mělo by jít o citlivý test identifikující všechny nemocné monoklonálními gamapatiemi.
 2. Stanovení VLŘ by mělo být opravdu kvantitativní.
 3. Test by měl mít vysokou specifitu bez interferencí s vázanými lehkými řetězci.
 4. Metoda by měla umožňovat stanovení na různých laboratorních přístrojích.

Klinické využití stanovení VLŘ

I když jsme ideálnímu testu v současnosti značně vzdáleni, stanovení VLŘ si nachází v klinické praxi stále širší uplatnění. První klinické studie se stanovením VLŘ v séru byly u nemocných mnohočetným myelomem s paraproteinem z monoklonálních lehkých řetězců (tzv. light chain disease, nemoc z lehkých řetězců, Bence Jones multiple myeloma). Počet těchto nemocných není zanedbatelný, tvoří 15–20 % všech nemocných mnohočetným myelomem. V klinických studiích byla abnormální koncentrace VLŘ prokázána v séru všech těchto nemocných, kdežto při elektroforéze nebyl u některých nemocných M-gradient pozorován. Významným využitím VLŘ je jejich stanovení u primární amyloidózy (AL). Jde o onemocnění, u něhož jsou amyloidová fibrila tvořena monoklonálními lehkými řetězci imunoglobulinů. Depozita těchto amyloidových fibril poškozují některé orgány (např. ledviny, srdce). Asi 28 % nemocných AL-amyloidózou nemá detekovatelný monoklonální protein v séru imunofixací. Stejně jako u nemoci z lehkých řetězců i u těchto nemocných může být prokázána abnormální koncentrace VLŘ v séru a abnormální index kappa/lambda téměř u všech nemocných (v 91 % pozorování). Významným klinickým uplatněním je stanovení VLŘ v séru nemocných nesekretorickým myelomem. Toto onemocnění je poměrně vzácné, tvoří asi 3–4 % nemocných mnohočetným myelomem. U těchto nemocných nelze elektroforetickými metodami prokázat paraprotein v séru a v moči, avšak více než 70 % těchto nemocných má pozitivní VLŘ v séru. Klinické studie prokazují, že VLŘ jsou abnormální v séru až 95 % nemocných mnohočetným myelomem a doutnající myelomem (smoldering myeloma) a ve 30 % sér nemocných monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS).

VLŘ mají v krvi velmi krátký poločas – kappa řetězce 2–4 h a lambda řetězce 3–6 h a z tohoto důvodu slouží jejich monitorování k rychlému hodnocení úspěšnosti terapeutických zásahů u nemocných mnohočetným myelomem. Stanovení VLŘ lze využít také jako potenciální prognostický marker pro určení rizika progresy MGUS v maligní monoklonální gamapatii. V r. 2006 se stalo stanovení VLŘ součástí doporučených metod NACB pro vyšetřování séra a moče u nemocných monoklonálními gamapatiemi [21]. Jde především o diagnostiku a sledování nesekretorického myelomu, AL amyloidózy, MGUS a nemoci z lehkých řetězců. V r. 2006 také přijala IMWG (International Myeloma Working Group) nová kritéria pro hodnocení odpovědi na léčbu u mnohočetného myelomu [22], která stanovení VLŘ a indexu kappa/lambda přímo vyžadují.

Závěr

Přes výrazná klinická uplatnění VLŘ v posledních letech zůstávají i čtené pochybnosti a nejasnosti, jak z hlediska podmínek stanovení, tak z hlediska klinického využití. Z klinického hlediska jsou popisovány jak falešně negativní, tak i falešně pozitivní hodnoty VLŘ a indexu kappa/lambda. Z metodického pohledu je řada limitací, které jsme se snažili v tomto sdělení zmínit a kterým se věnují i další sdělení v tomto čísle časopisu *Klinická biochemie a metabolismus*. Žádný test sám o sobě není ideální pro průkaz paraproteinů v séru a v moči. Hlavními metodami k detekci paraproteinů v séru a v moči zůstávají elektroforéza bílkovin a imunofixační elektroforéza. Stanovení VLŘ je užitečné zatím především u těch nemocných, kteří nemají klasickými metodami měřitelný paraprotein v séru a/nebo v moči. V blízké budoucnosti by měla být objasněna zejména řada metodických nejasností a to umožní zvýšit i klinický význam stanovení VLŘ.

Literatura

1. **Bradwell, A. R.** Serum free light chain analysis. 4th Edition, The Binding Site Ltd., Birmingham: UK, 2006.
2. **Sheldon, J.** Free light chains. *Ann. Clin. Biochem.*, 2007, 44, p. 503–505.
3. **Katzmann, J. A.** Quantitative free light chain assays for the diagnosis and monitoring of monoclonal gammopathies. *Journal of Clinical Ligand Assay*, 2004/2005, 27, 4, p. 246–255.
4. **Rajkumar, S. V., Kyle, R. A., Therneau, T. M., Melton, L. J. et al.** Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 2005, 106, 3, p. 812–817.
5. **Van Gysel, M., Marien, G., Verhoef, G., Delforge, M., Bossuyt, X.** Free light chain testing in follow-up of multiple myeloma. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006, 44, p. 1044–1046.
6. **Tan, M., Epstein, V. W.** A direct immunologic assay of human sera for Bence Jones proteins. *J. Lab. Clin. Med.*, 1965, 66, p. 344–356.
7. **Mann, D., Granger, H., Fahey, J. L.** Use of insoluble antibody for quantitative determination of small amounts of immunoglobulin. *J. Immunol.*, 1969, 102, p. 618–624.

8. **Peterson, P. A., Berggard, I.** Urinary immunoglobulin components in normal, tubular, and glomerular proteinuria: quantities of free light chains, IgG, IgA and Fc-gamma fragment. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1971, 1, p. 255–264.
9. **Cole, P. W., Durie, B. G., Salmon, S. E.** Immunoquantitation of free light chain immunoglobulins: applications in multiple myeloma. *J. Immunol. Methods*, 1978, 19, p. 341–349.
10. **Tichý, M., Hrnčíř, Z.** Diagnostic significance of kappa/lambda and lambda/kappa ratio in paraproteinemias. *Suppl. Sborníku vědeckých prací LF UK v Hradci Králové*, 1982, 25, p. 313–318.
11. **Axiak, S. M., Krishnamoorthy, L., Guinan, J., Raison, R. L.** Quantitation of free kappa light chains in serum and urine using a monoclonal antibody based inhibition enzyme-linked immunoassay. *J. Immunol. Methods*, 1987, 99, p. 141–147.
12. **Abe, M., Goto, T., Kosaka, M., Wolfenbarger, D. et al.** Differences in kappa to lambda ratios of serum and urinary free light chains. *Clin. Exp. Immunol.*, 1998, 111, p. 457–462.
13. **Bradwell, A. R., Carr-Smith, H. D., Mead, G. P., Tang, L. X. et al.** Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin. Chem.*, 2001, 47, p. 673–680.
14. **Nakano, T., Nagata, A.** ELISAs for free human immunoglobulin light chains in serum: improvement of assay specificity antibodies in a sandwich detection method. *J. Immunol. Methods*, 2004, 293, p. 183–189.
15. **Tichý, M.** Paraproteinämien : Diagnostische Relevanz des kappa/lambda – Quotienten. *Laboratoriumsblätter*, 1982, 32, p. 16–18.
16. **Tichý, M., Hrnčíř, Z.** Index of light kappa/lambda and lambda/kappa chains in monoclonal gammopathies. *Neoplasma*, 1990, 37, p. 55–59.
17. **Nakano, T., Miyazaki, S., Takahashi, H., Matsumori, A. et al.** Immunochemical quantification of free immunoglobulin light chains from an analytical perspective. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006, 44, p. 522–532.
18. **Beetham, R., Wassell, J., Wallage, M. J., Whiteway, A., James, J. A.** Can serum free light chains replace urine electrophoresis in the detection of monoclonal gammopathies? *Ann. Clin. Biochem.*, 2007, 44, p. 516–522.
19. **Pattenden, R. J., Rogers, S. Y., Wenham, P. R.** Serum free light chains, the need to establish local reference intervals. *Ann. Clin. Biochem.*, 2007, 44, p. 512–515.
20. **Mecl, J., Benáková, H., Nohejlová, A., Straub, J. et al.** Detekce volných lehkých řetězců („free light chains“) – nová metoda diagnostiky hematologických onemocnění. *Časopis lékařů českých*, 2007, 146, p. 159–162.
21. **Gupta, S., Comenzo, R. L., Hoffman, B. R. et al.** National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumour Markers in Monoclonal Gammopathies. NACB LMPG, www.nacb.org, 2006, Draft Guidelines.
22. **Durie, B. G. M., Harousseau, J. L., Miguel, J. S., Bladé, J. et al.** International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 2006, 20, p. 1467–1473.

Do redakce došlo 12. 2. 2008.

Adresa pro korespondenci:

Prof. RNDr. Miloš Tichý, CSc.

Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové,

Sokolská 581

500 05 Hradec Králové

e-mail: tichy@fnhk.cz