

NOTE DE CURS

Metode de analiză a lanțurilor ușoare libere

Methods of analysis of the free light chains

Ileana Funduc *

Rezumat

Proteinele Bence-Jones sau lanțurile ușoare libere - fragmente ale imunoglobulinelor - sunt markeri importanți pentru identificarea și monitorizarea tumorilor cu celule B. Se descriu modalitățile posibile de analiză a acestora în laboratorul clinic. Se discută astfel: metodele biochimice (proteinuria, electroforeza), metodologia imunochimică (dubla difuzie Ouchterlony, imunofixarea, turbidimetria și nefelometria), compararea acestora, limite și erori. În încheiere se descrie metoda de abordare modernă a analizei lanțurilor ușoare libere.

Cuvinte cheie: imunoglobuline, electroforeză, imunofixare, turbidimetrie, nefelometrie.

Abstract

Free light chains or Bence-Jones proteins, fragments of immunoglobulins, are important markers both for the identification and monitoring of B cells tumors. The possible means of analysis in the clinical laboratory are described. The biochemical methods (proteinuria, electrophoresis), immunochemical methodology (Ouchterlony double diffusion, electrophoresis with immunofixation, turbidimetry and nephelometry), comparison among them, their limits and errors are reviewed. Finally, the modern approach of the free light chains analysis is described.

Keywords: immunoglobulins, electrophoresis, immunofixation, turbidimetry, nephelometry.

* **Adresa pentru corespondență:** Aleea Barajul Uzului 2, Bl.Y16, Sc. A, Apt.18, Sector 2, 032796, București, România.
Tel.0724210670, Fax 0213407668, E-mail fmzg@xnet.ro

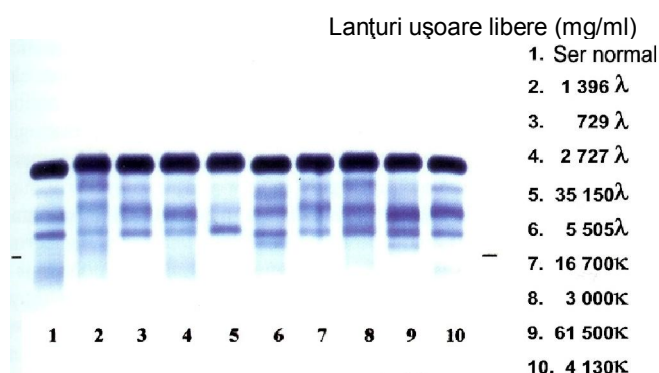


Figura 1. Electroforeza proteinelor serice a unui ser martor normal și a serurilor provenind de la 9 bolnavi având mielom multiplu cu lanțuri ușoare.
Sunt redată în imagine și concentrațiile de lanțuri ușoare libere măsurate imunochimic. Unele probe par relativ normale electroforetic, dar concentrațiile de lanțuri ușoare libere sunt semnificativ crescute în toate cazurile cu mielom⁴.

Lanțurile ușoare libere - sinonime cu proteinele Bence Jones - au fost semnalate prima dată în 1845 de către Prof. Bence Jones într-o probă de urină trimisă de către fizicianul Watson pentru a fi studiată din punct de vedere al compoziției. Ele sunt proteine cu proprietăți termice aparte: sunt solubile la temperatura camerei și a corpului, precipită la 60°C, se dizolvă la fierbere, dar reprecipită prin răcire.

Din punct de vedere structural, lanțurile ușoare libere sunt fragmente de imunoglobuline, (ceea ce rămâne după îndepărtarea lanțurilor grele).

În timpul sintezei normale a imunoglobulinelor apare un exces de lanțuri ușoare dintre care o parte trec în rinichi și o alta rămâne sub formă liberă.

Lanțurile ușoare libere se găsesc în ser sub formă de tetrameri, iar în urină ca monomeri, dimeri, polimeri sau fragmente. Ele constituie cheia diversității imunoglobulinelor, piatra de încercare pentru înțelegerea structurii anticorpilor. Evaluate ca proteine de „supraîncărcare”, ele sunt asociate cel mai des cu tulburări imunoproliferative (exces de lanțuri ușoare libere monoclonale în urină).

Fiind considerate un marker al

remisiei / recăderii bolii și al eficienței terapiei, lanțurile ușoare libere pot fi prezente în:

- boala lanțurilor ușoare sau mielomul Bence-Jones;
- amiloidoza primară sistemică;
- boala depozitelor de lanțuri ușoare;
- mielomul multiplu cu imunoglobulină intactă;
- mielomul multiplu nesecretor;
- mielomul multiplu de semnificație nedeterminată și lista nu se încheie aici.

Metode de determinare

Metode biochimice

Proteinuria este o metodă de screening care semnalează, calitativ sau cantitativ, prezența unor proteine în urină, dar nu le selectează. Identificarea proteinelor prin această modalitate implică reacții de culoare ca: reacția biuretului, reacția cu roșu pirogalol, albastru Coomassie Brilliant sau reacții de precipitare cu acid tricloracetic sau acid tanic.

Electroforeza proteinelor

A. Electroforeza proteinelor în gel

a. *Electroforeza serică* este o metodă calitativă și cantitativă. Ea nu detectează lanțurile ușoare libere în concentrație mică, interpretarea rezultatelor este parțial subiectivă, este negativă în mielomul multiplu nesecretor, uneori chiar în amiloidoză sau în mielomul Bence-Jones (Figura 1).

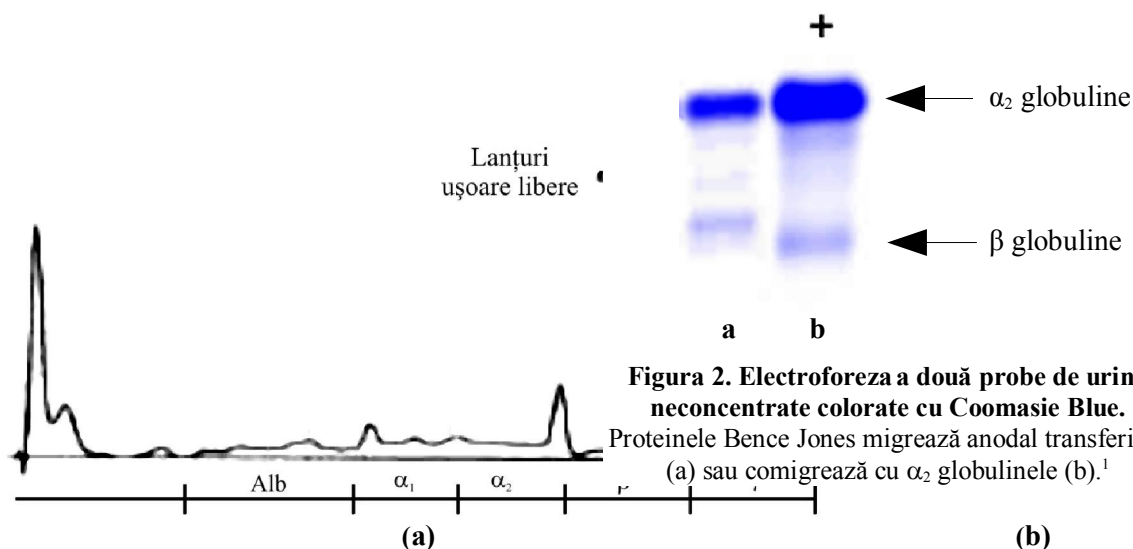


Figura 2. Electroforeza a două probe de urină neconcentrate colorate cu Coomassie Blue. Proteinele Bence Jones migrează anodal transferinei (a) sau comigrează cu α_2 globulinele (b).¹

Figura 3. Model de electroforeză capilară (a) și în gel de agaroză-sodiu dodecil sulfat (b) a unei probe de proteinurie Bence-Jones. Săgeata arată peak-ul lanțului ușor liber, iar numerele din dreapta reprezintă masele moleculare exprimate în kD.¹⁰

b. Electroforeza urinară⁹ este mai sensibilă decât cea serică, întrucât utilizează urina de dimineață concentrată, astfel încât concentrația proteinelor să fie aproximativ 1 g/l (*Figura 2*).

Utilizarea electroforezei în agaroză sau pe poliacrilamidă în prezență de sodiu dodecil sulfat (separare care are loc pe baza sarcinii electrice și a masei moleculare) permite obținerea de dimeri, monomeri și / sau fragmente de lanțuri ușoare libere.

B. Electroforeza capilară^{2,5,6,7} este automată, cantitativă, mai puțin sensibilă decât imunofixarea (metodă imunochimică). Această metodă utilizează capilare de silice topită, nu are suport solid, elimină fazele de fixare, colorare, decolorare, detectarea făcându-se în UV la 200-220 nm (*Figura 3*).

Metode imunochimice

Dubla difuzie Ouchterlony - metodă imunochimică calitativă care se bazează pe formarea unei linii de precipitare ca urmare a interacției antigen-anticorp.

Imunofixarea⁶ deși nu este o metodă

cantitativă, este mai sensibilă ca electroforeza; cea urinară este superioară celei serice datorită posibilității concentrării urinei. Limita de detecție este până la 0,25g/l proteine Bence Jones. Cu ajutorul acestei metode, la urini suficient de concentrate se poate detecta microheterogenitatea lanțurilor ușoare libere monoclonale, când se obțin imagini de tip scară sau tigrat, compuse din 3-6 benzi de tip κ sau λ egal distanțate (*Figura 4*).

Imunoturbidimetria, imunonefelometria, tehnicile radioimune și imunoenzimatică^{1,3} efectuează determinări cantitative, automate și sunt preferate datorită preciziei, sensibilității și rapidității lor. Aceste metode folosesc anticorpi monoclonali, antiseruri îmbogățite cu anticorpi specifici lanțurilor ușoare libere.

În cercetare se utilizează o serie de metode care nu fac obiectul analizelor de rutină:

- focalizarea izoelectrică, unde separarea fracțiunilor se face în funcție de pH-ul izoelectric (mai eficient, se continuă cu immunoblotting);
- electroforeza bidimensională, care combină focalizarea izoelectrică cu electroforeza în poliacril amidă cu sodiu dodecil sulfat;

Compararea diverselor metode, limite, erori

Deși nu este cantitativă, imunofixarea este socotită „*standardul de aur*” al identificării lanțurilor ușoare monoclonale urinare. Metodele imunochimice, cu toate avantajele lor, prezintă totuși și erori.

Erori calitative

- datorate anticorpilor

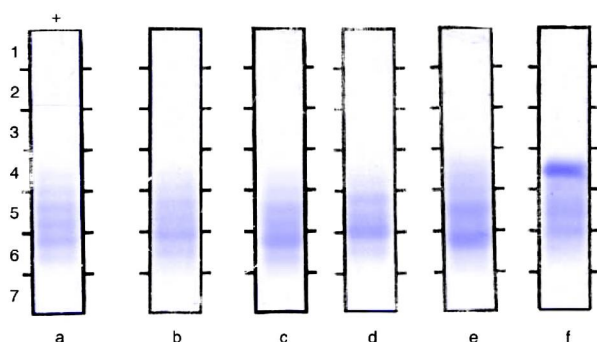


Figura 4. Exemple de lanțuri ușoare „în scară” (a-e), comparativ cu proteine Bence Jones adevărate (f). Urinile au fost concentrate de 40 ori. Electroforeza s-a efectuat în agaroză, urmată de imunofixare cu antiser anti-lanț ușor κ îmbogățit față de lanțuri ușoare legate. Colorarea s-a făcut cu *Amido Black*.¹

- nu sunt specifici și pot reacționa încrucișat cu imunoglobulinele intacte sau cu alte proteine, ceea ce conduce la bandări fals pozitive;

- nu disting lanțurile monoclonale de cele policlonale; se pare de multe ori, că aceasta nu are importanță, deoarece în mielomul multiplu Bence-Jones, sinteza lanțurilor ușoare policlonale este deprimată; în alte boli însă, când lanțurile ușoare monoclonale sunt legate de amiloidoză sau în boala depunerii de lanțuri ușoare, concentrația lanțurilor ușoare libere în urină poate fi semnificativă și variabilă în timpul bolii;

- datorate aspectului de „ladder banding” sau „pseudo-oligoclonal” ce implică lanțuri ușoare libere policlonale care dau impresia de monoclonalitate – rezultat fals pozitiv, sau când o bandare caracteristică de lanț ușor monoclonal comigrează cu una din bandările ce formează scara – rezultat fals negativ;

- după transplant, o lungă perioadă de timp apar componenți oligoclonali în urină care se manifestă sub formă de bandări monoclonale (nu proteine Bence Jones) – rezultat fals pozitiv.

Erori cantitative

Evaluarea cantitativă a proteinelor Bence-Jones este limitată, în primul rând din punct de vedere **clinic**: excreția lor este dependentă de gradul lor de polimerizare, de funcția renală și de rata de depozitare în diferitele țesuturi. În consecință, cantitatea de proteine Bence-Jones nu este legată direct de masa celulară a tumorii.

Din punct de vedere **metodologic**:

- valorile lanțurilor ușoare monoclonale serice și urinare apar mai mici, când sunt determinate electroforetic, față de cele imunologice, probabil datorită polimerizării acestora. Legat strict de metode, erorile sunt legate de afinitatea fiecărei proteine față de diferiții coloranți electroforetici, ceea ce conduce la un răspuns densitometric nelinear;

- delimitarea incorectă densitome-

trică a proteinelor Bence-Jones când comigrează cu alte proteine;

- pierderea de proteine prin concentrarea urinei;
- calibrantul, de obicei, neținând seama de diferențele de structură, nu distinge lanțurile ușoare monoclonale de cele policlonale;
- valorile la extreme nu sunt precise, ele fiind, însă, foarte relevante clinic (nivel scăzut – remisie, nivel crescut – progres);
- starea de agregare / fragmentare variabilă și imprezvizibilă a lanțurilor ușoare libere urinare face să fie slab recunoscute sau chiar omise de către antiser;
- nu există substanțe de referință pentru lanțurile libere monoclonale, nu sunt standardizate metodele de cuantificare a lor, rezultatele efectuate cu diferite metode diferă.

Toate aceste comentarii au fost emise de Grupul de Lucru IFCC pentru Studiul Proteinelor Plasmatică și de grupul de Studiu SIBioC asupra Proteinelor, grup care a conlucrat cu Colegiul American de Patologie⁶.

Concepția modernă de abordare a determinării lanțurilor ușoare libere

Evaluarea lanțurilor ușoare libere se recomandă în prezent să se facă cu ajutorul metodologiei exclusiv serice. Motivele sunt următoarele:

- Când lanțurile ușoare libere serice sunt normale, excreția urinară, în majoritatea cazurilor se consideră fără importanță. Imunofixarea în acest caz se efectuează doar când: există o leziune ce izolează nefronul și lanțurile ușoare libere se scurg în urină sau există o diferență de timp între colectarea urinei și a serului și rezultatele nu sunt fidele datorită timpului scurt de înjumătățire a lanțurilor ușoare libere.
- În mielomul Bence-Jones cuantificarea imunologică (nefelometrică) a lanțurilor ușoare libere serice se corelează cu cea urinară.
- Urina este un mediu sărac de lan-

țuri ușoare libere, aceasta depinzând de capacitatea de reabsorbție a tubulilor renali. Producția plasmocitelor este în schimb mult mai mare decât rata de metabolizare a rinichilor. Deci în urină nu pot apărea cantități mari de lanțuri ușoare libere dacă concentrația lor nu este considerabil crescută.

- Recoltarea urinei este dificilă la persoane fragile, bătrâni.

În afară de determinările individuale de lanțurile ușoare libere κ și λ , se folosește și raportul κ / λ care are valoare diagnostică, dar monitorizează și tulburările plasmatică (expansiunea plasmocitelor)^{3, 8}. Raportul κ / λ în ser este invers decât cel din urină, unde κ este în cantitate mai mare decât λ . Explicația este că moleculele κ (25 kD), care în ser sunt prezente ca monomeri, sunt filtrate prin rinichi cu o rată de 3 ori mai mare decât cea a moleculelor λ (50 kD) ce sunt prezente ca dimeri. Astfel, deși rata producerii de lanțuri λ la normali este mai mică ca a lanțurilor κ , concentrația serică a lanțurilor λ este mai mare datorită clearance-ului renal mai lent. Așa se explică de ce în urină lanțurile κ sunt prezente de două ori mai mult față de lanțurile λ .

Concentrația lanțurilor ușoare libere crește ușor cu vârsta, în special peste 70 ani, datorită deteriorării funcției renale, raportul κ / λ rămânând, însă, normal. Un raport κ / λ normal, dar cu o creștere a lanțurilor ușoare libere, sugerează fie o afectare renală, fie o expansiune policlonală a plasmocitelor.

Tabel 1. Concentrațiile lanțurilor κ și λ libere determinate cu kitul Freelite Binding Site⁸

Ser de adult normal	Domeniul de valori (mg/L)
κ liber	3,30 – 19,40
λ liber	5,71 – 26,30
raportul κ / λ	0,26 – 1,65

Tabel 2. Limitele de detecție ale lanțurilor ușoare libere determinate prin diverse metode⁸

Test	Limitele de detecție ale lanțurilor ușoare libere
Electroforeza proteinelor serice	500 – 2000 mg/L
Imunofixare serică	100 – 500 mg/L
Electroforeză urinară	20 – 50 mg/L
Imunofixare urinară	10 – 50 mg/L
Determinarea nefelometrică și turbidimetrică cu Freelite - Latex	< 2 mg/L

Domeniile normale ale lanțurilor ușoare libere serice și a raportului κ / λ efectuate la Mayo Clinic USA folosind kitul **Freelite Binding Site** – unicul kit imunochimic care efectuează cu precizie aceste determinări - sunt redate în tabelul de mai jos⁸.

Kitul **Freelite Binding Site** se bazează pe determinare imunochimică – turbidimetrică sau nefelometrică – folosind anticorpi policlonali purificați prin afinitate, precăpușiți cu particule de latex. Sensibilitatea sa întrece metodele existente (peste 500 ori mai sensibil ca electroforeza proteinelor) după cum se poate vedea din tabelul următor .

Utilizarea acestui kit elimină recoltarea probelor de urină, permite un rezultat în mai puțin de 20 minute, obținându-se astfel o decizie clinică promptă.

Bibliografie

1. Beetham R. – Detection of Bence-Jones protein in practice – Ann.Clin.Biochem 2000; 37; 563-570.
2. Bossuyt X. – Separation of serum proteins by automated capillary zone electrophoresis – Clin.Chem.Lab.Med. 2003; 41(6); 762-772.
3. Bradwell A.R., Carr-Smith H.D., Mead G.P, et al.- Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum

- and urine – Clin. Chem. 2001; 47; 673–80.
4. Bradwell A.R., Mead G.P., Carr-Smith H.D. – Comparison of clinical assays for free light chains. In: Serum free light chain analysis, 3rd edition, Binding Site Ltd., P.O Box 11712, Birmingham, B14 4ZB, UK, 2005, 53.
 5. Dolink V. – Recent developments in capillary zone electrophoresis of proteins – Electrophoresis 1999; 20; 3106-15.
 6. Graziani M., Merlini G., Petrini C. – Guidelines for the analysis of Bence Jones protein – Clin.Chem.Lab.Med.2003; 41(3); 338-346.
 7. Henskens Y.M.C., van Dieijen-Visser M.P. – Capillary zone electrophoresis as a tool to detect proteins in body fluids: reproductibility, comparison with conventional methods and a review of the literature – Ned. Tijdschr.Klin.Chem. 2000; 25; 219-29.
 8. Katzmman J.A., Clark R.J., Abraham R.S. et al. - Serum reference intervals and diagnostic ranges for free κ and free λ immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains - Clin. Chem. 2002; 48; 1437-1444.
 9. Keren D.F., Alexanian R., Goeken J.A. et al.- Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies - Arch.Pathol.Lab.Med.1999; 123; 106-107.
 10. Kolios G., Bairaktari E., Tsolas O. et al. – Routine differential diagnosis of proteinurias by capillary electrophoresis - Clin.Chem.Lab.Med. 2001; 39; 784-88.