

Stanovení volných lehkých řetězců imunoglobulinů

M. Tichý

Imunoglobulinová molekula je složena ze dvou těžkých řetězců o mol. hm. asi 50 kDa a ze dvou identických lehkých polypeptidových řetězců o mol. hm. asi 22 kDa. Lehké řetězce imunoglobulinů jsou tedy komponentou protilátek, ale mohou také existovat jako volné lehké řetězce v séru a v moči, jako výsledek jejich nadprodukce nad těžkými řetězci. Koncentrace volných lehkých řetězců je v normálním séru nebo moči nízká, v mg/l ale je markantně zvýšená při různých chorobných stavech, zejména u monoklonálních gamapatií.

Volné lehké imunoglobulinové řetězce (FLC) bývají pozorovány i při imunofixační elektroforéze jako ostrý gradient, který nekorresponduje s gradientem kompletní molekuly paraproteinu. Stanovení FLC v moči (Bence Jonesova bílkovina) bylo u mnohočetného myelomu popsáno již před 150 lety, ale v posledních letech se zavedením citlivých, specifických metod na stanovení FLC v séru a v moči nachází tato metoda nové uplatnění a vzrůstá její klinický význam (1). Sérové FLC mají krátký poločas asi 2 – 6 h, přechází snadno přes glomerulární membránu a jsou metabolizovány v proximálních tubulech nefronů. Sérová koncentrace FLC je dána rovnováhou mezi jejich produkcí plazmatickými buňkami a jejich progenitory a renální klírcení.

Metody stanovení FLC jsou radiální imunodifuze (málo citlivá), imunonefelometrie, imunoturbidimetrie, ELISA, RIA a další. Nečastěji se v praxi využívá 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 FLC je zkřížená reakce s lehkými řetězci navázanými v intaktních imunoglobulinových molekulách. Anti FLC antiséra mají průměrnou zkříženou reakci 0,1 % (2), což je příčinou zmíněných obtíží, např. vzorek obsahující 10 mg/l FLC kappa a paraprotein IgG-kappa o koncentraci 10 g/l, při 0,1 % zkřížené reakci s vázanými lehkými řetězci kappa, dává konečný výsledek FLC kappa dvojnásobný, tj. 20 mg/l. Také zvýšená produkce polyklonálních imunoglobulinů nebo poškození funkce ledvin mohou zvýšit koncentraci kappa i lambda FLC až 30 – 40x. Poměr kappa/lambda však v těchto případech zůstává nezměněn.

U monoklonálních gamapatií jde většinou o nadprodukcí jen jednoho typu lehkých řetězců, takže index kappa/lambda je abnormální. Výjimkou jsou ovšem zdvojené paraproteinémie s rozdílným antigenním typem lehkých řetězců, u kterých nemá stanovení indexu kappa/lambda význam.

Dalším problémem stanovení FLC je standardizace tohoto vyšetření. Dosud chybí mezinárodní referenční materiál. Je těžké validovat kalibrátor pro velkou strukturální heterogenitu lehkých řetězců, která může být modifikována působením 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. Navzdory vysoké citlivosti metod na stanovení FLC v séru existují vzorky sér, u kterých imunofixace detekuje paraprotein, ale stanovení FLC je negativní (3).

Normální, referenční rozpětí FLC u různých studií kolísá pro FLC kappa mezi 1,2 – 43,5 mg/l a pro FLC lambda mezi 3,8 – 55,2 mg/l. Index kappa/lambda dosahuje hodnot 0 – 12,5. Tyto rozdíly jsou způsobené různým stupněm zkřížených reakcí a rozdílnými kalibračními materiály. U komerčních souprav nejčastěji používaných v klinických laboratořích „FREELITE“, the Binding Site Ltd. Birmingham, UK, je uváděno rozpětí referenčních hodnot pro FLC kappa 3,3 – 19,4 mg/l, pro FLC lambda 5,7 – 26,3 mg/l a pro index kappa/lambda jsou to hodnoty 0,26 – 1,65. Hladina FLC v séru zdravých jedinců stoupá s věkem, zřetelné zvýšení je pozorováno nad 80 let. Hodnoty FLC v moči nekolísají tak významně jako v séru. Referenční hodnoty FLC v moči se uvádí pro FLC kappa 1,25 – 5,5 mg/l, pro FLC lambda 0,51 – 3,2 mg/l a pro index kappa/lambda 0,82 – 3,0. Nižší variabilita FLC v moči je pravděpodobně výsledkem nižší koncentrace intaktních imunoglobulinů v normální moči. Nejspecifičtější metoda na stanovení FLC je ELISA, kombinující dvě protilátky proti FLC a dosahující zkřížené reakce s vázanými LC nižší než 0,01 %.

Přes uvedené limity stanovení FLC si tato metoda nachází v klinické praxi stále širší uplatnění. První klinické studie se stanovením FLC v séru byly u nemocných s mnohočetným myelomem s paraproteinem z monoklonálních lehkých řetězců imunoglobulinů (tzv. light chain disease, Bence Jones multiple myeloma, nemoc z lehkých řetězců). V klinických studiích byla abnormální koncentrace FLC prokázána v séru u všech těchto nemocných, kdežto při elektroforéze nebyl u některých těchto nemocných pozorován M-gradient. Nemocní s nemocí z lehkých řetězců (LCD) tvoří 15 – 20 %

všech mnohočetných myelomů. Významným využitím FLC 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 (ledviny, srdce apod.). 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 FLC v séru a abnormální index kappa/lambda téměř u všech nemocných (v 91 % pozorování).

Dalším významným klinickým uplatněním FLC v séru je stanovení u tzv. nesekretorického myelomu. Nesekretorický myelom se vyskytuje asi u 3 – 4 % nemocných mnohočetným myelomem. U těchto nemocných nelze elektroforetickými metodami prokázat paraprotein v séru a v moči, avšak více jak 70 % těchto nemocných má pozitivní FLC v séru. Klinické studie prokazují, že FLC jsou abnormální v séru až 95 % nemocných mnohočetným myelomem a doutnajícím (smoldering) myelomem a ve 30 % v séru nemocných monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS). FLC jsou potenciálně nefrotoxicke (cast nephropathy) a ve významné koncentraci pro poškození ledvin se vyskytují u LCD, myelomů IgD a až u 50 % myelomů IgG a IgA. Tito nemocní buď vyžadují již léčbu hemodialýzou nebo je hemodialýza doporučována z důvodů prevence poškození ledvin odstraněním FLC ze séra. Stanovení FLC je vhodné k monitorování úspěšnosti těchto terapeutických zásahů.

Hodnoty FLC v séru slouží také k vyhodnocení odpovědi na chemoterapii. K tomu se využívá krátký poločas FLC v krvi (u kappa řetězců 2 – 4 h, u lambda řetězců 3 – 6 h). To je přibližně 100 – 200x kratší než poločas IgG, který je 21 dní, což umožňuje mnohem rychlejší vyhodnocení efektu terapie.

Stanovení FLC lze využít jako potenciálního prognostického faktoru progresu MGUS v maligní monoklonální gamapatii (asi 1 % ročně). Asi 40 % nemocných MGUS má koncentraci paraproteinu

IgG nižší než 15 g/l a index kappa/lambda normální. Tito nemocní mají 21x nižší riziko progresu onemocnění, než nemocní s paraproteinem nad 15 g/l, s abnormálním indexem kappa/lambda a s paraproteinem jiné třídy než IgG (asi 24 % nemocných MGUS).

Stanovení FLC se v r. 2006 stalo součástí doporučených metod NACB pro vyšetřování séra a moče u nemocných monoklonálními gamapatiemi (4). Jde především o diagnostiku a sledování nesekretorického myelomu, AL amyloidózy, MGUS a nemoci z lehkých řetězců.

V r. 2006 přijala IMWG (International Myeloma Working Group) nová kritéria hodnocení odpovědi na léčbu u mnohočetného myelomu (5), která stanovení FLC a indexu FLC přímo vyžadují. Stanovení FLC má tedy stále zvyšující se význam v průkazu a monitorování průběhu a terapie monoklonálních gamapatií.

LITERATURA

1. Bradwell, A.R.: Serum free light chain analysis. 4th Edition, 2006, The Binding Site Ltd., Birmingham, UK.
2. Nakano, T., Miyazaki, S., Takahashi, H. a spoluprac.: Immunochemical quantification of free immunoglobulin light chains from an analytical perspective. Clin. Chem. Lab. Med., 2006, 44, 5:522-532.
3. Katzmann, J. A.: Quantitative free light chain assays for the diagnosis and monitoring of monoclonal gammopathies. Journal of clinical ligand assay, 2004/2005, vol. 27,4: 246-255.
4. Durie, B. G. M., Harousseau, J. L., Miguel, J. S., Bladé, J. a spoluprac.: International uniform response criteria for multiple myeloma. Leukemia, 2006, 20, 9:1467-1473.
5. Gupta, S., Comenzo, R. L., Hoffman, B. R., a spoluprac.: National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumour Markers in Monoclonal Gammopathies. NACB LMPG, www.nacb.org, 2006, Draft Guidelines.