

POUŽITÍ DVOJROZMĚRNÉ ELEKTROFORÉZY K ANALÝZE MONOKLONÁLNÍCH LEHKÝCH ŘETĚZCŮ IMUNOGLOBULINŮ V MOČI

Doc. RNDr. Miloš TICHÝ, CSc., MUDr. Milan STULÍK, RNDr. Hana KOVÁŘOVÁ, ¹MUDr. Petr URBAN

Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové
(rektor: plk. prof. MUDr. Josef Fusek, DrSc.)

¹Oddělení klinické biochemie I., Baťova nemocnice, Zlín
(primář: MUDr. Petr Urban)

Úvod

Monoklonální lehké řetězce imunoglobulinů jsou pravidelně prokazovány v moči (tzv. Bence Jonesova bílkovina, BJB) u nemocných mnohočetným myelomem, primární amyloidózou - zapříčiněnou lehkými řetězci, občas u monoklonálních gamapatií neznámého významu, u chronické lymfatické leukémie a u různých lymfomů (13). U mnohočetného myelomu a jeho variant je průkaz a určení koncentrace monoklonálního imunoglobulinu v séru, v moči, případně v obou biologických tekutinách jedním z diagnostických kritérií tohoto onemocnění.

V posledních 15 letech se při identifikaci a imunologické typizaci paraproteinů jako standardní laboratorní metody zavedly: elektroforéza sérových proteinů, imunoelektroforéza, vysokorozlišovací elektroforéza na agaróze a imunofixace.

Citlivé elektroforetické metody mohou nejen přispět k detekci paraproteinů, ale mohou vést i k dilematům při interpretaci výsledků, jako např. zvýšená detekce paraproteinů o velmi malé koncentraci, detekce volných polyklonálních lehkých řetězců, které mohou být zaměněny s Bence Jonesovou bílkovinou v moči, detekce mnohočetných gradientů v séru apod. (5).

Právě na tyto otázky může do značné míry odpovědět technika vysokorozlišovací dvojrozměrné elektroforézy (dále 2DE). Molekulární mechanismy, které způsobují nefrotoxicitu Bence Jonesovy bílkoviny (dále BJB) nebyly zatím objasněny (12). Vztah k neobvyklé, na teplotě závislé rozpustnosti BJB k její nefrotoxicitě není evidentní. Některé studie svědčí pro to, že nefrotoxicita BJB je způsobena její polymerizací, tendencí vytvářet depozita v tubulech a v bazální membráně nebo k tvorbě amyloidu.

Vhodnou metodou pro zkoumání nefrotoxicity BJB se jeví vysokorozlišovací 2DE.

V současné době je pojem 2DE prakticky synonymní pro kombinaci izoelektrické fokuzace s následující elektroforézou v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (3). 2DE jako jediná z elektroseparačních metod umožňuje optimální rozdělení a mapování proteinů velice složitých směsí, jakými jsou proteiny buněk či tělesných tekutin. Proto jsme se rozhodli využít tuto metodu k průkazu mikro-

heterogenity BJB v moči u nemocných mnohočetným myelomem.

Materiál a metody

Byly analyzovány vzorky sér a moči 5 nemocných mnohočetným myelomem (tab. I). Imunoglobulinová třída a antigenní typ lehkých řetězců paraproteinů byly určeny imunoelektroforeticky s monospecifickými antiséry ÚSOL, Praha. Moč byla sbírána 24 hodin, změřena, konzervována azidem sodným a zahuštěna kolodiovými váčky Sartorius. Biuretovou metodou byla stanovena kvantita bílkoviny v moči. Vzorky moči byly analyzovány elektroforézou na gelu acetylované celulózy Titan III a dvojrozměrnou elektroforézou. Beta-2 mikroglobulin byl v séru stanoven RIA soupravami (Phadebas).

Vysokorozlišovací dvojrozměrná elektroforéza: pro elektroforézu na SDS - PAGE byl použit přístroj Protean II xi 2D Multi - Cell od firmy Bio - Rad (Richmond, CA). Zdroj proudu (2500 V, 250 mA) byl od firmy Pharmacia/LKB (Bromma, Sweden). Izelektrická fokuzace (imobilizovaný pH gradient) byla prováděna přístrojem Ultrophor typ 2217 při 5000 V (zdroj proudu Pharmacie/LKB). Reagencie: akrylamid, piperazindiakrylamid-PDA, tetramethylethylendiamin, ammonium persulfát, sodium-dodecylsulfát-SDS, tris (hydroxymethyl) - aminomethan a dithiothreitol-DTT byly od firmy Bio - Rad (Richmond, CA). 3-([3-cholamidopropyl] dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propan-sulfonát-Chaps, glycin a SPS standardy na určení molekulové hmotnosti byly získány od firmy Sigma (St. Louis, MO). Rehydratační roztok pro imobilinové proužky obsahoval amfolyty Resolytes 4-8 a k určení hodnot pI proteinů byla použita kalibrační souprava pro pI pro denaturované gely Electran s karbamylovanou CK od firmy BDH (Dorset, England).

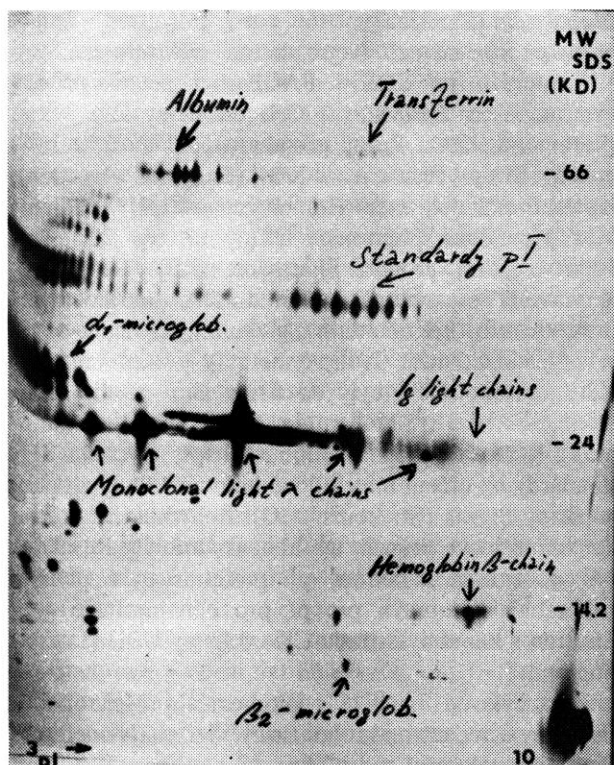
Urea byla od firmy ICN Biomedicals (Mckenheim, Germany), iodacetamid od firmy Serva (Heidelberg, Germany), glycerol a amfolyty Ampholine pH 9-II od firmy Pharmacia/LKB (Bromma, Sweden). Kyselina citronová a dusičnan stříbrný od firmy Lachema (Brno) a Triton X-100 od Koch-Light (Sulfolk, England).

Tabulka 1

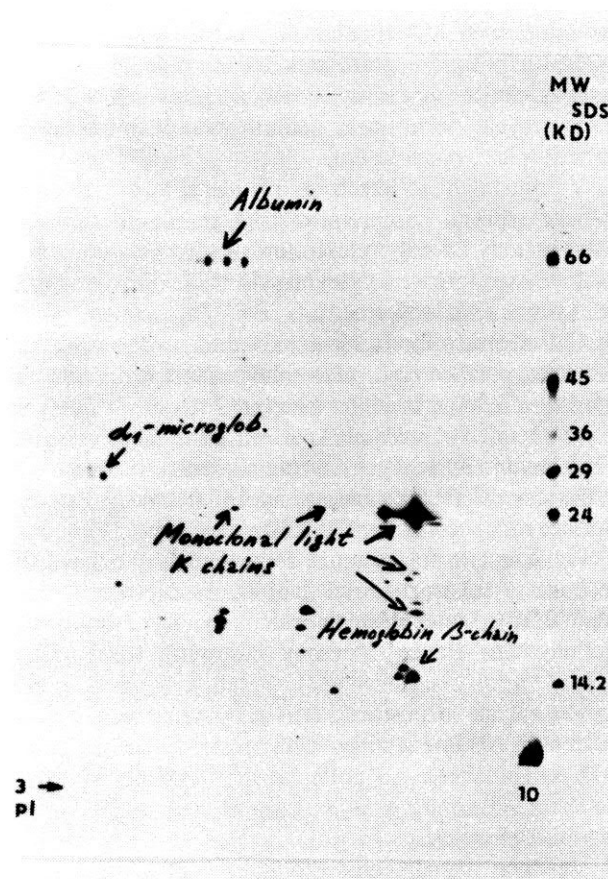
Č.	Pohlaví	Věk	Paraprotein	Dvojrozměrná elektroforéza bílkovin moči						
				Rel. mol. hm.	pI					
1.	muž	***	Lambda	24 000	5,64	5,94	6,14	6,44	7,00	
2.	žena	80,00	Kappa	24 000	6,37	6,81	7,00>7,00			
				20 000			7,00>7,00			
				18 000	6,37	6,71	7,00>7,00			
3.	muž	72,00	IgD-lambda	27 000	6,20	6,10	5,80			
				25 000	6,20	6,10				
4.	muž	58,00	Kappa	26 000	6,20	6,10	5,80			
				24 000	6,20	6,10	5,80			
5.	muž	48,00	IgA-lambda	28 000	6,10					
				25 000	5,40					
				22 000	5,70					
				21 000	6,10					
				18 000	5,30					
				17 000	5,40					

Výsledky

Výsledky 2DE jsou shrnuty v tabulce 1 a na obr. 1-5. Při elektroforéze zahuštěné moči na foliích acetylované celulózy Titan III se u všech nemocných zobrazil výrazný gradient BJB a jen stopa albuminu. Všichni nemocní měli významnou proteinurii: č. 1 - 5,25 g/24 hodin, č. 2 - 1,12 g/24 hodin, č. 3 - 3,34 g/24 hodin, č. 4 - 0,8 g/24 hodin a č. 5 - 2,31 g/24 hodin. Také hodnoty beta-2 mikroglobulinu v séru indikovaly postižení renálních funkcí (myelomová ledvina), byly však stanoveny jen u dvou nemocných: č. 1 - 38,5 mg/l a č. 3 - 9,8 mg/l (normální hodnoty jsou do 3,5 mg/l).



Obr. 1 Dvojrozměrná elektroforéza vzorku moči nemocného č. 1 (v tab. 1) barvená stříbřením



Obr. 2 Dvojrozměrná elektroforéza vzorku moči nemocného č. 2 (v tab. 1) barvená stříbřením

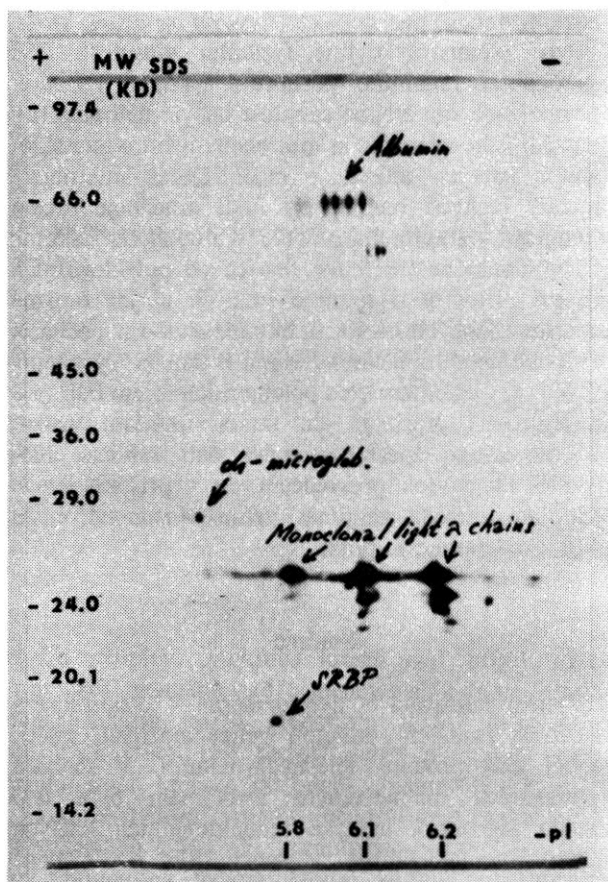
Nemocný č. 1: při 2DE (obr. 1) se zobrazily především "spoty" (skvrny) monoklonálních lehkých řetězců lambda, vedle kterých je možné zřetelně odlišit polyklonální lehké řetězce imunoglobulinů. Dále jsou přítomny spoty albuminu, alfa-1 mikroglobulinu, transferinu a beta-hemoglobinových řetězců.

Nemocný č. 2: spoty monoklonálních lehkých řetězců kappa u této nemocné (obr. 2) dokazují přítomnost řady izoforem těchto řetězců, které se liší jak izoelektrickým bodem, tak i molekulovou hmotností. Kromě toho je přítomen albumin, alfa-1 mikroglobulin a beta-hemoglobinové řetězce.

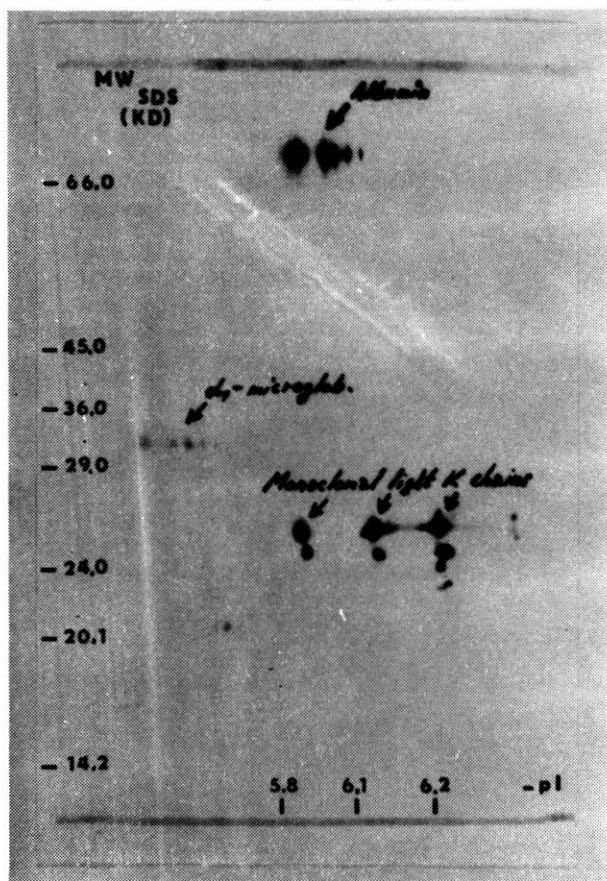
Nemocný č. 3: na elektroforeogramu (obr. 3) jsou zřetelné spoty monoklonálních lehkých řetězců lambda, které se liší jak molekulovou hmotností, tak i hodnotami pI. Dále lze rozeznat linie albuminu, alfa-1 mikroglobulinu a retinol vázajícího proteinu (SRBP).

Nemocný č. 4: při 2DE (obr. 4) byly zjištěny tři izoformy monoklonálních lehkých řetězců kappa lišící se hodnotami pI a další tři s rozdílnou molekulovou hmotností. Zřetelné jsou linie albuminu a alfa-1 mikroglobulinu.

Nemocný č. 5: v moči tohoto nemocného (obr. 5) byla detekována řada výrazných izoforem monoklonálních lehkých řetězců lambda o rozdílných pI a molekulové hmotnosti. Kromě toho jsou přítomny i spoty albuminu, alfa-1 mikroglobulinu a beta-2 mikroglobulinu.



Obr. 3 Dvojměrná elektroforéza vzorku moči nemocného č. 3 (v tab. 1) barvená stříbřením (SRBP = retinol vázající protein)



Obr. 4 Dvojměrná elektroforéza vzorku moči nemocného č. 4 (v tab. 1) barvená stříbřením

Diskuse

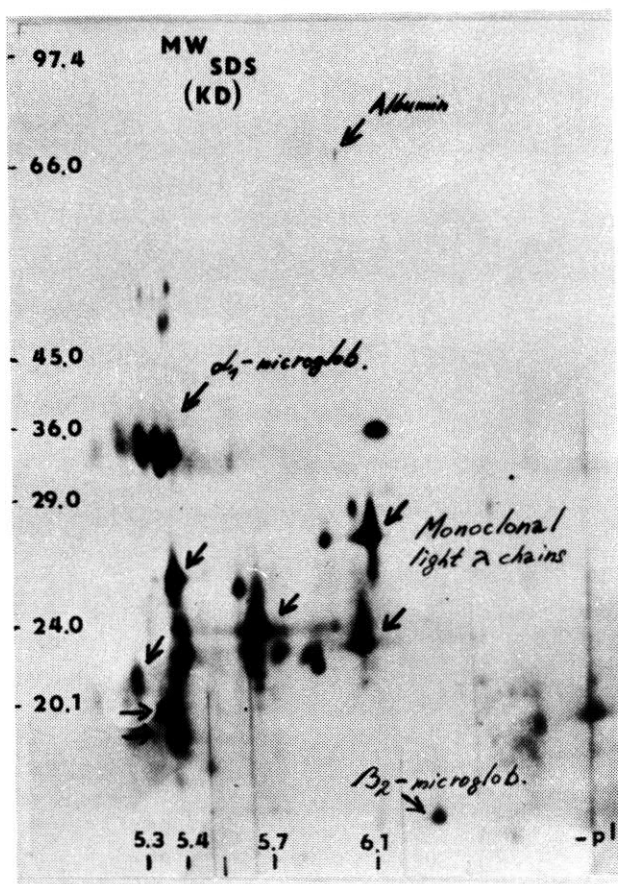
Základní uspořádání pro provedení 2DE v moderním pojetí bylo poprvé zveřejněno Farrelem a Klosem v r. 1975. V současné době se používá několika variant, které se týkají především volby amfolytů nebo imobilizovaných pH gradientů pro izoelektrickou fokuzaci a horizontálního nebo vertikálního provedení.

Důležitá, zejména z hlediska dobré reprodukovatelnosti separací, byla konstrukce přístrojů, které umožňují současnou analýzu více vzorků (až 20) s kontrolou provozních podmínek.

Pro ojedinělou vysokou dělicí schopnost byla tato metoda velice atraktivní brzo po zveřejnění a byla použita v různých oblastech biologického výzkumu, včetně pokusů o klinickou aplikaci.

Její popularita poněkud poklesla kolem r. 1985, a to vzhledem k nedostatku vhodných postupů pro zaznamenání, zpracování a uložení velkého množství dat obsažených v dvojměrných proteinových mapách. Tento nedostatek byl záhy překonán rychlým rozvojem hardwaru a softwaru vhodného pro počítačovou analýzu dvojměrných proteinových profilů.

Počítačová technika umožňuje přesný záznam denzitometrického proměření map, označení jednotli-



Obr. 5 Dvozměrná elektroforéza vzorku moči nemocného č. 5 (v tab. 1) barvená stříbřením

vých proteinů a jejich vzájemné porovnání na různých proteinových mapách i jejich kvantitativní analýzu. Denzitometr snímá všechny spoty z celé plochy, počítač odstraní pozadí a provede zidealizování spotů na kruhový tvar. Tím se podaří oddělit i překrývající se spoty. Všechny proteiny, které počítač sejme, vytvoří tzv. master image (např. z 12 gelů) a k němu se přirovnávají všechny gely a hledají se rozdíly.

Podle polohy lze proteiny srovnat s databází a identifikovat. Důležitým krokem je uspořádání všech získaných informací o proteinech (fyzikálně-chemických, genetických, imunologických atd.) do souhrnných proteinových databází. Je tak postupně vytvářen tzv. "index bílkovin lidského těla".

Předpokládá se, že v lidském těle je více než 50 000 různých bílkovin. V současnosti se počet identifikovaných lidských bílkovin blíží 40 000. Reálná je přímá chemická charakteristika mikrosekvenováním proteinů separovaných 2DE. Vzniká tak třetí dimenze dosavadní dvozměrné techniky a v kombinaci s využitím polymerázové řetězové reakce (PCR) při klonování genů poskytuje přímé vazby mezi proteiny a geny (1). Proteinové mapování se prozatím uplatňuje hlavně v oblasti výzkumu, a to k monitorování složek tkání a tělních tekutin a ke sledování kvalitativních a kvantitativních změn proteinů u genetických, degenerativních, infekčních a jiných chorob nebo

pro sledování účinků léčiv. Stále častěji (8, 14) jsou ale publikována sdělení o přímém klinickém využití 2DE, o které se také pokoušíme.

Z patofyziologického hlediska je průkaz a analýza BJB důležitá u onemocnění spojených se zvýšenou produkcí lehkých řetězců. Tato onemocnění zahrnují myelomovou nefropatii (cast), onemocnění s depozity lehkých řetězců a amyloidózu AL. Renální manifestace těchto onemocnění je charakterizována depozity monoklonálních lehkých řetězců v tubulech, lineárními nebo uzlinkovými precipitáty v základech membrán tubulů, glomerulů a vaskulárních membrán a v mesangialní tkáni nebo fibrilami lokalizovanými ve stěně cév a glomerulů. Tato depozita lehkých řetězců způsobují poškození ledvinových funkcí a mají vliv na morbiditu a mortalitu nemocných (12).

Někteří autoři (10) předpokládají, že BJB s relativně vysokým pI jsou častěji spojeny s renálním poškozením než při nízkém pI, a usuzují, že k tomu vede interakce s kyselým Tamm-Horsfallovým glykoproteinem (pI=3,5) nebo s jinými tubulárními proteiny. Naproti tomu jiní autoři popsali zvýšené poškození ledvinových funkcí zapříčiněné BJB s nízkým pI. Zjištění, že hodnota pI u BJB je důležitá pro poškození ledvinových funkcí, je tedy konfliktní (9, 11). Také my jsme v našem malém souboru nemocných mnohočetným myelomem našli BJB v moči jak s kyselým (č. 1, 3, 4 a 5), tak i s bazickým (č. 2) pI.

Byly zkoumány i jiné fyzikální vlastnosti BJB v patogenezi renálního poškození, jako glykosilace, polymerizace, ale zřejmá spojitost nebyla nalezena (2). Potvrdili jsme významnou mikroheterogenitu monoklonálních lehkých řetězců v moči. Obraz mikroheterogenity lehkých řetězců při 2DE umožňuje určení "klonality" paraproteinů. Podle tvaru spotu můžeme odlišit monoklonální lehké řetězce od polyklonálních (5). Při přítomnosti spotů o různých pI jde o různé izoformy lehkých řetězců, které mohou pocházet z jednoho nebo i z několika klonů B buněk. Významný je i průkaz monomerních a polymerních forem BJB (4).

Předložená práce je jen malou ukázkou využití 2DE na úzkém specializovaném poli klinické biochemie. Jsme však přesvědčeni, že v příštích letech bude tato metoda zaujímat velmi významné místo v klinické laboratorní praxi.

Souhrn

Vysokorozlišovací dvozměrná elektroforéza umožňuje rozdělení proteinů velice složitých směsí, jakými jsou proteiny tělesných tekutin. V souboru 5 nemocných mnohočetným myelomem byla tato metoda použita k analýze monoklonálních lehkých řetězců imunoglobulinů v moči. Šlo o nemocné s významnou proteinurií. Metoda dvozměrné elektroforézy pomohla odlišit monoklonální lehké a těžké řetězce imunoglobulinů od polyklonálních a prokázat výraznou mikroheterogenitu monoklonál-

ních lehkých řetězců. Byla zjištěna řada izoform monoklonálních lehkých řetězců s rozdílnými pI, od kyselých (5,30) až po silně bázičné (>7,0). Také byla prokázána značná variabilita v molekulové hmotnosti monoklonálních lehkých řetězců. V práci je diskutováno o významu pI a rozdílné molekulové hmotnosti monoklonálních lehkých řetězců pro jejich nefrotoxicitu.

Literatura

1. BAUW, G. et al.: Two-dimensional gel electrophoresis, protein electrophoresis and microsequencing: A direct link between proteins and genes. *Electrophoresis*, 11, 1990, č. 7, s. 528-536.
2. GOLDFARB, M. F. - PORTLAND, A. E. P.: Two dimensional electrophoresis analysis of immunoglobulin patterns in monoclonal gammopathies. *Electrophoresis*, 13, 1992, č. 7, s. 440-444.
3. HARRISON, H. H. et al.: Quality assurance and reproducibility of high-resolution two-dimensional electrophoresis and silver staining in polyacrylamide gels. *Am. J. clin. Pathol.*, 97, 1992, č. 1, s. 97-105.
4. HARRISON, H. H.: Patient - specific microheterogeneity patterns of monoclonal immunoglobulin light chains as revealed by high resolution, two-dimensional electrophoresis. *Clin. Biochem.*, 25, 1992, s. 235-243.
5. HARRISON, H. H. et al.: Immunoglobulin clonality analysis. *Am. J. clin. Pathol.*, 100, 1993, č. 5, s. 550-560.
6. HOCHSTRASSER, D. F. et al.: Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 173, 1988, s. 424-435.
7. HOCHSTRASSER, D. F. et al.: Human liver protein map: A reference database established by microsequencing and gel comparison. *Electrophoresis*, 13, 1992, s. 992-1010.
8. HOCHSTRASSER, D. F. - TISSOT, J. D.: Clinical application of highresolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Advanced in Electrophoresis*, 6, 1993, s. 270-361.
9. IGGO, N. - PARSONS, V.: Renal disease in multiple myeloma: current perspectives. *Nephron*, 56, 1990, č. 3, s. 229-233.
10. JOHNS, E. A. et al.: Isoelectric points of urinary light chains in myelomatosis: analysis in relation to nephrotoxicity. *J. clin. Pathol.*, 39, 1986, č. 8, s. 833-837.
11. NORDEN, A. G. W. et al.: Renal impairment in myeloma: negative association with isoelectric point of excreted Bence-Jones protein. *J. clin. Pathol.*, 42, 1989, č. 1, s. 59-62.
12. SOLOMON, A. - WEISS, D. T. - KATTINE, A. A.: Nephrotoxic potential of Bence Jones proteins. *New England J. Med.*, 324, 1991, č. 26, s. 1845-1851.
13. STEVENS, F. J. - SOLOMON, A. - SCHIFFER, M.: Bence Jones Proteins: A powerful tool for the fundamental study of protein chemistry and pathophysiology. *Biochemistry*, 30, 1991, č. 28, s. 6803-6805.
14. STUHLÍK, J. - TICHÝ, M. - KOVÁŘOVÁ, H.: Two-dimensional gel electrophoresis of four serum samples from patients with IgD myeloma. *Clin. Chim. Acta*, 218, 1993, s. 149-158.

Klíčová slova: Dvojrozměrná elektroforéza; Monoklonální lehké řetězce v moči; Nefrotoxická.

Do redakce došlo 23. 5. 1994