

Il contributo di Leonardo Massaro e le sue sollecitazioni mi hanno indotto a dedicare la puntata del Corner all'argomento delle proteinurie, arricchendolo di lavori più o meno recenti in modo da rendere possibile una visione abbastanza generale dell'argomento.

F. Aguzzi

CATENE LEGGERE LIBERE "PSEUDO-OLIGOCLONALI" IN URINE RIFLESSIONI INDOTTE DA RECENTI LAVORI

L. Massaro

New Scientific Company - Cormano (Milano)

Caro Francesco, ho letto con molto interesse l'articolo di altri e tuo finalmente pubblicato su *Clinical Chemistry*, Vol. 37, No. 9, 1991 e il contemporaneo di H. Harrison a proposito dell'aspetto che possono assumere le Catene Leggere Libere (CLL) nelle urine (1) (2). Sarebbe utile pubblicare nella tua rubrica almeno un sommario dei due articoli o meglio, un editoriale. In estrema sintesi in entrambi gli articoli si illustra come campioni di urina di diversi gruppi di soggetti possano presentare CLL con aspetto oligoclonale con la conseguente difficoltà di interpretazione differenziale rispetto alle Proteine di Bence Jones (BJP). I campioni di urina sono stati esaminati con diverse tecniche di separazione elettroforetica, con o senza concentrazione previa, seguite da semplice colorazione o da immunoprecipitazione con opportuni antisieri. Le tecniche utilizzate concordano nell'evidenziare nei campioni di tutti i soggetti dei diversi gruppi esaminati la presenza di 3 o più (fino a 8) bande

ristrette costituita da CLL.

Per comodità e brevità in questo scritto il fenomeno sarà definito: "CLL oligoclonali o pseudo-oligoclonali" essendo però chiaro che tali termini nessun riferimento fanno all'origine delle CLL, ma solo esprimono l'aspetto elettroforetico con cui si manifestano.

Entrambi gli articoli attirano l'attenzione sulla trappola che questo tipo di risultato costituisce nell'ambito della ricerca delle Proteine di Bence Jones. Come sai bene, il reperto di CLL del tipo descritto negli articoli è da anni abituale nei nostri Laboratori e ciò è dovuto alla buona diffusione della IFE delle urine e alla sua ottima esecuzione.

Gli interrogativi che il fenomeno pone sono numerosi e di un certo interesse. Le riflessioni che seguono derivano da valutazioni quasi esclusivamente teoriche e le propongo all'attenzione tua e dei lettori per stimolare la ricerca e il dibattito tra i nostri operatori che, su questo argomento, sono probabilmente all'avanguardia.

Un corretto inquadramento logico del fenomeno delle CLL "pseudo-oligoclonali" non può prescindere da una costante attenzione per quelli che sono le attuali conoscenze sul meccanismo metabolico delle CLL in generale.

Metabolismo delle Catene Leggere Libere

Le Catene Leggere Libere, al pari delle Immunoglobuline, sono prodotte e immesse in circolo dai Linfociti B.

Dato il basso peso molecolare, le CLL, al contrario delle Immunoglobuline, filtrano liberamente attraverso il glomerulo e, in condizioni "normali", vengono quasi interamente riassorbite dalle cellule del tubulo prossimale e qui vengono catabolizzate.

Dal punto di vista renale il comportamento delle CLL è perfettamente sovrapponibile a quello delle altre microglobuline (beta-2-micro, alfa-micro, ecc.) (3).

Nell'urina definitiva del soggetto normale saranno presenti solo tracce di CLL, mentre nel sangue dello

stesso soggetto le CLL non saranno rilevabili.

Emivita delle Catene Leggere Libere

Da quanto detto sopra risulta chiaro che, nel soggetto normale, e comunque nel soggetto con filtrato glomerulare normale, le CLL hanno emivita di pochi minuti se si esclude lo stazionamento e l'accumulo in vescica.

Per contro, le Immunoglobuline hanno emivita di almeno 15 giorni.

Produzione di Immunoglobuline e di Catene Leggere Libere

Sembra dimostrato che solo pochi cloni sono contemporaneamente attivi nel produrre Immunoglobuline (e CLL) e pertanto la "produzione istantanea" di Immunoglobuline (e di CLL) è presumibilmente oligoclonale. Per completezza bisogna aggiungere che fu già formulata l'ipotesi che nel soggetto normale le CLL vengano prodotte solo da pochi cloni plasmacellulari (3).

Relazione tra metabolismo, tipo di campione e risultati analitici

Se vero quanto sopra, ne discende che:

- le Immunoglobuline risultano policlonali all'elettroforesi del siero (e delle urine) perché sono l'espressione della produzione plasmacellulare di almeno 15 giorni.
- Le Catene Leggere Libere nelle urine saranno l'espressione della produzione plasmacellulare avvenuta durante la raccolta.

In linea teorica, più la raccolta di urine è breve, più le CLL in esse presenti saranno espressione della produzione di pochi cloni e avranno all'elettroforesi l'aspetto di piccole bande omogenee.

Il gruppo di MacNamara dichiara esplicitamente di aver utilizzato nella sperimentazione le urine fresche del mattino e, nel caso del blocco tubulare da iniezione endovenosa di arginina, i campioni estemporanei frazionati fino a 2 ore dopo l'inizio dell'infusione.

Harrison non dichiara esplicitamente il tipo di campioni utilizzati ma è presumibile che trattasi anche in questo caso delle urine della prima minzione del mattino.

E' suggestiva l'ipotesi che nei campioni di urina abitualmente utilizzati per la ricerca delle CLL, cioè urina estemporanea del mattino o raccolta di 24 ore, non si possano trovare altro che CLL oligoclonali, poiché esse saranno espressione della produzione plasmacellulare di poche ore.

Questa spiegazione del fenomeno delle CLL oligoclonali, pur essendo dal punto di vista logico ben supportata, contrasta in parte e forse solo apparentemen-

te con alcune osservazioni sperimentali.

Entrambi gli articoli sottolineano che le CLL di tutti i campioni esaminati hanno evidenziato lo stesso pattern elettroforetico, ma contemporaneamente rilevano che il numero di bande di questo pattern comune varia da 3 a 8.

In particolare Harrison afferma che lo stesso pattern si riscontra in un pool di urine con CLL oligoclonali. L'osservazione di un pattern comune sembra in parziale contrasto con l'ipotesi suddetta.

Ma contrasta ancor più l'osservazione alla IFE delle urine della presenza di CLL di aspetto policlonale classico, cioè macchia diffusa.

A titolo di esempio si veda la Figura 3 del lavoro di Martelli et al. apparso su *Biochimica Clinica* 12/88 in questa stessa rubrica (4).

Nella figura si vede, oltre alla evidente banda monoclonale lambda costituita da lambda libere (BJP lambda), una macchia diffusa di Catene Leggere Libere kappa evidenziate chiaramente dall'antisiero anti kappa libere e legate, ma anche evidenti, almeno sull'originale, nel tracciato trattato con antisiero anti kappa libere. D'altra parte, che di kappa libere trattasi, è dimostrato dall'assenza di reazione con gli antisieri anti catena pesante.

Devo precisare che il gruppo del Bellaria utilizza esclusivamente urine delle 24 ore (conservante SodioAzide) anche se è improbabile che una raccolta solo di poco più prolungata rispetto all'urina del mattino comporti sostanziali modifiche delle CLL del campione. E ciò è dimostrato dal fatto che il gruppo del Bellaria trova frequentemente CLL oligoclonali pur utilizzando urine delle 24 ore.

Concludendo questo punto, sarebbe interessante poter escludere che il fenomeno delle CLL oligoclonali sia in relazione al tipo di campione utilizzato e al ritmo di produzione delle Cellule B.

Riassorbimento selettivo del tubulo

Non si può escludere che il fenomeno delle CLL oligoclonali sia determinato da un riassorbimento selettivo del tubulo.

In tal caso le CLL che si ritrovano nelle urine saranno quelle che il tubulo più malvolentieri riassorbe.

Catene Leggere Libere e Nefropatia

Colgo l'occasione per sottolineare ancora una volta l'importanza delle CLL quale sensibile e specifico indicatore di funzionalità tubulare. Tale importanza traspare chiarissima anche dai due articoli in questione.

Nel Diabete Mellito Insulino-Dipendente (IDDM), l'aumento nelle urine delle CLL kappa e del rapporto CLL kappa/albumina è stato indicato come segno di nefropatia diabetica più precoce rispetto alla micro-

albuminuria e alla presenza di beta 2-microglobulina (5).

Comunque, a prescindere dalla tossicità e dall'aspetto mono, oligo, pseudo-oligo e policlonale all'elettroforesi, la presenza di CLL nelle urine è indicatore di insufficienza tubulare primitiva o secondaria ad incremento del carico, sia esso rappresentato da CLL, sia da altro che con queste compete.

Possibilità di distinguere le "pseudo-oligoclonali" dalle BJP

La possibilità di distinguere con certezza le CLL "pseudo-oligoclonali" dalla BJP mi sembra che rimanga affidata all'esperienza del Laboratorista e al colloquio con il Clinico.

Conclusioni

Ritengo che lo studio delle Catene Leggere Libere vada ancora approfondito per gli aspetti sia teorici che pratici che potrebbe riservare anche al di là delle patologie classicamente ad esse collegate quali le malattie immunoproliferative e iperimmuni e simili. Oltre che nelle urine, anche nel liquido cefalo-rachidiano la ricerca delle Catene Leggere Libere sembra meritare una qualche attenzione (6).

Lo scarso successo delle CLL nella pratica di Laboratorio è forse da imputare in parte alla geniale intuizione di Henry Bence Jones che ne relegò lo studio nell'ambito del "mollities ossium", dall'altra alla mancanza di metodi di ricerca e dosaggio specifici, comodi e affidabili.

Sono oggi disponibili kit per il dosaggio quantitativo immunoturbidimetrico e immunonefelometrico delle CLL in urine non concentrate e le applicazioni ai più comuni analizzatori automatici di proteine.

Un nostro kit analogo per il liquido cefalo-rachidiano è in fase di sperimentazione pratica e i primi risultati saranno disponibili nel brevissimo; ma posso anticipare un dato curioso, già da altri rilevato (6): nel liquor quando presenti, le CLL sono prevalentemente lambda.

L'uso di questi kit potrebbe fornire un contributo concreto allo studio delle CLL al di là dell'ambito tradizionale della ricerca delle BJP.

Bibliografia

1. Harrison H.H., The "Ladder Light Chain" or "Pseudo-Oligoclonal" Pattern in Urinary Immunofixation Electrophoresis (IFE) Studies: a Distinctive IFE Pattern and an Explanatory Hypothesis Relating It to Free Polyclonal Light Chains., *Clin Chem.*; 1991; **37**, 1559-64.
2. MacManara E.M., Aguzzi F., Petrini C., Higginson J., Gasparro C., Bergamini M.R., Bianchi G., and Whicher J.T. Restricted Electrophoretic Heterogeneity of Immunoglobulin Light Chains in Urine: a Cause for Confusion with Bence Jones Protein. *Clin Chem*; 1991; **37**, 1570-4.
3. Solling K., Free Light Chains of Immunoglobulins, *Scand.*

J. Clin. Lab. Invest.; Suppl. 1981, 157 pp. 1-83.

4. L. Abate, M. Martelli, R. Zannini, Proteinuria di Bence Jones: sperimentazione di un nuovo metodo immunoturbidimetrico per la determinazione delle Catene Leggere Libere nelle urine non concentrate. *Biochimica Clinica*, 1988, **12**, pp. 1451-1457.
5. Teppo A.M., Groop L., Urinary excretion of plasma proteins in diabetic subjects. Increased excretion of kappa light chains in diabetic patients with and without proliferative retinopathy. *Diabetes*; 1985, **34** (6), pp. 589-594.
6. Fagnart O.C., Sindic C.J.M. and Laterre C., Free kappa and lambda light chain levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. *J. Neuroimmunol.*; 1988; **19**, pp. 119-132.

COMMENTO

Anzitutto ringrazio il vecchio amico Leonardo per il suo intervento, come sempre ricco di intelligenti provocazioni.

Il lavoro pubblicato, non facilmente, anche per la novità della cosa, dal nostro gruppo e riportato in traduzione in questa stessa puntata del *corner* si riferisce alla curiosa ed estremamente comune morfologia elettroforetica presentata da parte o tutte le catene leggere libere urinarie policlonali (CLLP).

C'è subito un problema di terminologia, chi di noi è stato maggiormente impegnato in questa ricerca, durata almeno quattro anni, ossia Concetta Petrini, Elisabeth MacNamara, Chiara Gasparro, John Whicher e me, ha sempre definito, con accenti molto disparati, questo aspetto come "le cinque kappa".

Quando si è arrivati a scrivere il lavoro naturalmente si è dovuto cercare una definizione meno familiare e, alla fine, con scarso entusiasmo si è adottata la parola ladder che significa scala a pioli.

Vorrei proporre di mantenere, sempre con scarso entusiasmo, questo termine, che, almeno, ha il vantaggio di essere completamente nuovo e quindi incapace di provocare confusione. In particolare "oligoclonale", a differenza di monoclonale e policlonale, è un aggettivo molto ambiguo sia come definizione che, a rigore, dovrebbe indicare il prodotto di pochi cloni, senza tuttavia indicare a partire da quanti, sia dal punto di vista clinico, tranne che in neurologia. Massaro sostiene che questo reperto è da anni abituale nei nostri laboratori, personalmente non posso essere d'accordo perché conosco molti, peraltro eccellenti laboratori, che non l'hanno mai visto e questo non mi sembra strano dato che la capacità risolutiva elettroforetica richiesta è molto elevata.

L'ipotesi, affascinante e molto ingegnosa di Massaro, è che, siccome pochi ($\omega\lambda\gamma\omega\iota$) cloni sono contemporaneamente attivi e siccome le CLL, a differenza delle immunoglobuline (Ig) complete, hanno una permanenza nel comparto circolatorio molto breve, e la vescica viene svuotata frequentemente, i ladders rappresenterebbero proprio l'attività di questi cloni. Tuttavia, contro questa ipotesi sta il fatto che la mobilità delle singole bande dei ladders è costante e invariabile non solo nella stessa persona, anche a

l'angolo dell'elettroforesi

distanza di anni, ma anche fra persone diverse. Personalmente non mi sento di azzardare nessuna spiegazione e non trovo molto convincente neanche quella proposta da Harrison "comigrazione di CLLP che, a causa di limitazioni della ricombinazione genetica, migrano in gruppi di superfamiglie" (Harrison H.H., Godsey T., Bedford K., et al. Comparison of microheterogeneity patterns of purified monoclonal light chains (Bence Jones Proteins) and polyclonal free light chains that produce the pseudo-oligoclonal ("ladder light chain") pattern in immunofixation studies of urine. Abstract. Clin. Chem. 1992; **38**, 963).

Francesco Aguzzi