

# Imunofiksacija seruma pacijenata sa suspektnom monoklonskom vrpcom na eleferogramu serumskih bjelančevina

---

**Brkić, Kristina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split / Sveučilište u Splitu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:629213>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-24**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Kristina Brkić**

**IMUNOFIKSACIJA SERUMA PACIJENATA SA  
SUSPEKTNOM MONOKLONSKOM VRPCOM NA  
ELFEROGRAMU SERUMSKIH BJELANČEVINA**

**Završni rad**

Split, 2019. godina

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Kristina Brkić**

**IMUNOFIKSACIJA SERUMA PACIJENATA SA  
SUSPEKTNOM MONOKLONSKOM VRPCOM NA  
ELFEROGRAMU SERUMSKIH BJELANČEVINA**

**SERUM IMMUNOFIXATION OF PATIENTS' SAMPLES  
WITH THE SUSPECTED MONOCLONAL SPIKE ON SERUM  
PROTEINE ELPHEROGRAM**

**Završni rad/Bachelor's Thesis**

Mentor:

**Doc.dr.sc. Nada Bilopavlović, spec.med.biokem**

Split, 2019. godina

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Monoklonske gamapatije i monoklonski protein .....	1
1.2. Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija .....	4
1.2.1. Elektroforeza proteina u serumu .....	5
1.2.1.1. Kapilarna zonska elektroforeza .....	8
1.2.2. Imunofiksacija serumskih proteina .....	11
1.2.3. Slobodni laki lanci i Bence Jones proteinurija.....	14
1.2.4. Ostale laboratorijske pretrage i specifični proteini .....	15
2. CILJ RADA .....	17
3. MATERIJALI I METODE.....	18
3.1. Ispitanici .....	18
3.2. Metode.....	18
3.2.1. Elektroforeza proteina u serumu .....	18
3.2.2. Imunofiksacija.....	20
4. REZULTATI .....	24
5. RASPRAVA.....	25
6. ZAKLJUČAK.....	27
7. SAŽETAK .....	28
8. SUMMARY .....	29
9. LITERATURA .....	30
10. ŽIVOTOPIS .....	32

# 1. UVOD

## 1.1. Monoklonske gamapatije i monoklonski protein

Monoklonske gamapatije (MG) pripadaju velikoj skupini imunoproliferativnih bolesti, a nazivaju se još i paraproteinemije. Jedno od glavnih obilježja ove skupine bolesti je prisutnost monoklonskog proteina (MP) u serumu ili pak Bence Jonesovog proteina u serumu i urinu koji nastaju kao produkt klona B-limfocita poteklog iz genetički transformiranog B limfocita (1). Monoklonski protein u krvi može biti prisutan i u benignom stanju ili pak kod nekolicine malignih bolesti pa se klinička manifestacija njegove prisutnosti kreće od asimptomatskog neprogresivnog stadija do malignog multiplog mijeloma (MM) ili pak nekog drugog limfoproliferativnog poremećaja kao što je limfom, kronična limfocitna leukemija, Waldenströмова makroglobulinemija i amiloidoza (1). Najčešći monoklonski protein je iz klase G imunoglobulina (60%), nešto rjeđi su IgM (20%) i IgA (10%), a vrlo rijetki IgD i IgE. Prezentacija monoklonskih gamapatija najviše ovisi o stvarnoj transformaciji stanica, ali i o prirodi monoklonske komponente (1).

Benigna monoklonska gamapatija, koja se često naziva i monoklonskom gamapatijom neutvrđenog značenja (MGUS, Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance), karakterizirana je normalnim brojem plazma-stanica u koštanoj srži (<4%) ili pak samo neznatno povećanim (<10%), te umjereno povećanom koncentracijom M-proteina (<20 g/L). Također je očekivana normalna sinteza neuključenih imunoglobulina, negativan nalaz monoklonskih slobodnih lanaca kapa ili lambda tipa u urinu te odsutnost porasta koncentracije M-proteina tijekom nekoliko narednih godina. Nisu prisutna osteolitična žarišta, anemija i bubrežna insuficijencija. Unutar pet godina se kod 10% bolesnika razvije multipli mijelom ili neka druga limfoproliferativna bolest (1).

Maligna monoklonska gamapatija, to jest, multipli mijelom je diseminirani zloćudni tumor koji je građen od monoklonskih plazma-stanica. Multipli mijelom čini 8% svih hematoloških zloćudnih bolesti, odnosno 1% svih zloćudnih tumora (2). Etiologija nije u potpunosti poznata, ali se uz genski faktor kao drugi mogući uzroci navode i izloženost zračenju, benzenu, herbicidima i insekticidima. Genski faktor vjerojatno ima ulogu, to jest, stvara predipoziciju za promjenu čiji je učinak proliferacija prethodnih nezrelih plazma-stanica (2).

Osim karakteristično prisutnog monoklonskog imunoglobulina, odnosno pozitivnog nalaza monoklonskih slobodnih lakih lanaca kapa ili lambda tipa u serumu i/ili urinu, ostala obilježja multiplog mijeloma su odsutnost sinteze ostalih neuključenih imunoglobulina i osteolitičke promjene kostiju, a u nekim slučajevima se kao posljedica nakupljanja monoklonskog proteina javlja i zatajenje bubrega. Multipli mijelom pojavljuje se najčešće u starijih osoba i to češće u muškaraca nego u žena. U posljednjem desetljeću se u terapijski pristup bolesnicima s multiplim mijelomom kao metoda uvela autologna transplantacija krvotvornih matičnih stanica, pa se petogodišnje preživljenje popelo na 30-40% (2). Osim kod multiplog mijeloma, monoklonski protein može se pojaviti i u nekim drugim malignim limfoproliferativnim bolestima kao što je B kronična limfatična leukemija i drugi B stanični limfomi. Stoga klinička slika i simptomatologija koja prati pojavu monoklonskog proteina može biti raznolika i zahtjeva detaljnu dijagnostiku, ali je prvi korak detekcija i potvrda prisutnosti M proteina u krvi.

S obzirom da je monoklonski protein produkt jednog klona limfocita B, predstavlja molekule imunoglobulina koje imaju jednake fizikalno-kemijske osobine. Zbog jednakog ponašanja tih molekula u električnom polju moguća je detekcija prilikom elektroforeze proteina u serumu. Zaustavljaju se na istom mjestu u gelu ili nekom drugom elektroforetskom mediju te čine homogenu usku vrpcu koju je moguće detektirati, odnosno nastaje vršak u elferogramu koji je proporcionalan količini monoklonskog proteina (1). Nakon uočavanja M-vrška prilikom elektroforeze seruma slijedeći korak je potvrda monoklonalnosti i utvrđivanje tipa monoklonskog proteina imunofiksacijskom elektroforezom.

Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamopatija od iznimnog je značenja u otkrivanju bolesti i praćenju tijekom te ujedno neophodna za uspješno liječenje.

**Tablica 1. Temeljne razlike benigne i maligne monoklonske gamapatije**

	<b>Benigna</b>	<b>Maligna</b>
Koncentracija M-proteina	obično < 20 g/L stacionarna	obično > 20 g/L progresivna
Osnovna bolest: mijelom (limfoproliferacija)	nedostaje	prisutna
Osteoliza kostiju	nedostaje	prisutna
Bence-Jonesova proteinurija	nedostaje	prisutna
Plazma-stanice u koštanoj srži	< 10%	> 10%

(izvor: (2))

## 1.2. Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija

Dijagnoza monoklonskih gamapatija osniva se na nalazu klasičnog trijasa: nalaz monoklonskog proteina u serumu i/ili urinu, infiltracija koštane srži plazma-stanicama te nalaz osteolitičkih žarišta (1).

Danas postoje određene smjernice za kliničku i laboratorijsku dijagnostiku bolesnika s monoklonskim gamapatijama, a one se mogu sažeti u osam točaka (1).

1. Elektroforeza proteina u serumu i/ili urinu je indicirana za sve bolesnike kod kojih postoji sumnja na poremećaj plazma-stanica (1).

2. Imunofiksacija je indicirana za definiranje abnormalnog tipa proteina kao i kod pacijenata sa osnovanom kliničkom sumnjom na multipli mijelom i u slučaju izostanka suspektne M vrpce na elferogramu serumskih proteina. Imunofiksacija nije indicirana u slučajevima očitih poliklonalnih gamapatija na elektroforezi visoke rezolucije (1).

3. M-protein je potrebno pratiti denzitometrijski. Imunofiksaciju nije potrebno ponavljati ako se nisu dogodile promjene u migraciji M-proteina prilikom elektroforeze te ako se nije pojavila nova monoklonska vrpca (1).

4. Svim bolesnicima s poremećajem plazma-stanica potrebno je nefelometrijsko određivanje imunoglobulina kako bi se odredila koncentracija ostalih neuključenih imunoglobulina (8).

5. Svim bolesnicima s multiplim mijelomom i srodnim poremećajima treba odrediti prisutnost i dnevno izlučivanje monoklonskih slobodnih lakih lanaca, to jest, Bence-Jonesova proteina.

6. Kod bolesnika s multiplim mijelomom, Waldenströmovom makroglobulinemijom te amiloidozom potrebno je pratiti promjene u koncentraciji M-proteina u redovitim intervalima, odnosno svakih 1-2 mjeseca. Takvo praćenje se preporučuje jednom godišnje u slučaju monoklonskih gamapatija neutvrđenog značenja (8).

7. Sindrom hiperviskoznosti zahtjeva hitnu izmjenu plazme s indikacijama utemeljenim na kliničkim značajkama. Viskozitet i elektroforezu seruma preporučljivo je napraviti prije prve izmjene plazme radi usporedbe koncentracija M-proteina.

8. Krioglobuline treba procijeniti kod svih bolesnika s M-proteinom koji pokazuju osjetljivost na hladnoću, a posebno u onih s monoklonalnim imunoglobulinom M (8).



Prema smjernicama za laboratorijsku dijagnostiku monoklonskih gamopatija prvi korak je svakako detekcija i procjena M-proteina.

Preporučene metode za procjenu M-proteina su: kapilarna zonska elektroforeza serumskih proteina visoke rezolucije i imunofiksacijska elektroforeza za određivanje razreda i tipa M-proteina. Imunosuptrakcija za određivanje razreda i tipa M-proteina je metoda koja bi u budućnosti mogla zauzeti važno mjesto u dijagnostici.

### **1.2.1. Elektroforeza proteina u serumu**

Elektroforeza je postupak kojim se omogućuje razdvajanje i analiziranje smjese različitih električki nabijenih spojeva. Pri procesu elektroforeze brzina putovanja čestica ovisi o veličini, obliku, koncentraciji i električnom naboju molekule, zatim o jakosti električnog polja, viskoznosti, pH, temperaturi i ionskoj jakosti korištenog pufera, osobinama elektroforetskog nosača te o vremenu putovanja (3).

Zonska elektroforeza je putovanje nabijenih čestica unutar granica čvrstog elektroforetskog nosača pri čemu je svaka nabijena čestica nakon odvajanja izolirana u pojedinačnu zonu na elektroforetskom nosaču zbog čega je i dobila naziv zonska elektroforeza. Provodi se u sustavu koji sadrži pufer, katodu, anodu te izvor električne struje koji može biti ispravljač niskog ili visokog napona. U zonskoj elektroforezi koristi se više vrsta nosača. Čestice u agaru, agarozu, škrobu i akrilamidu odvajaju se i prema gustoći naboja i prema veličini, dok se na filter papiru odvajaju samo prema gustoći naboja jer filter papir služi jedino kao potporni elektroforetski nosač koji ne prenosi toplinu i ima mali učinak na sam proces odvajanja nabijenih čestica (3).

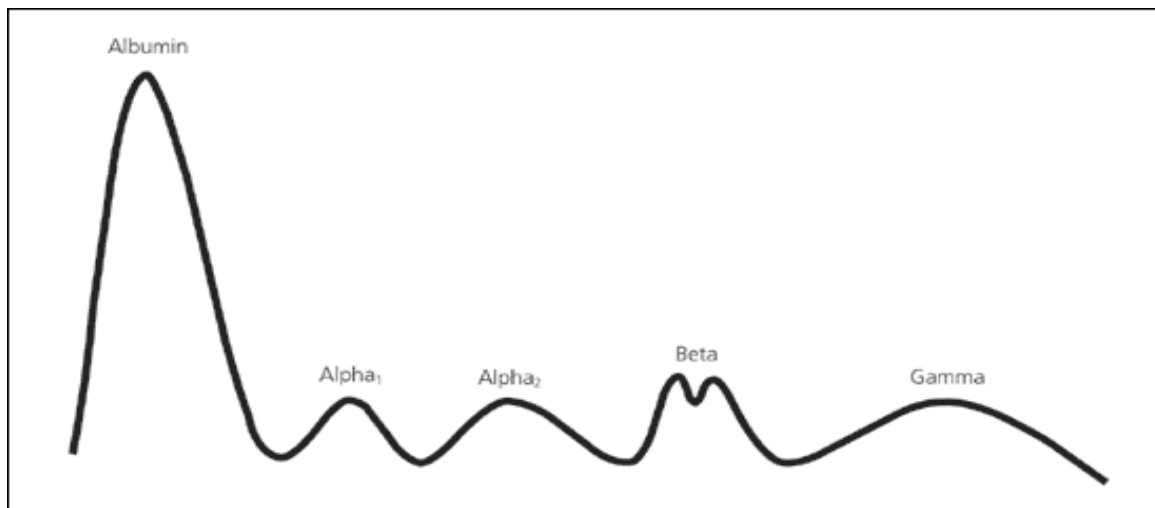
Elektroforeza proteina u serumu jedno je od glavnih laboratorijskih alata za dijagnostiku monoklonskih gamapatija, ali je također korisna i za otkrivanje humoralnih imunodeficijencija, bolesti jetre, nedostatka  $\alpha$ 1-antitripsina, u reakcijama akutne faze te u mnogim drugim stanjima (4).

Ukoliko rezultati elektroforeze serumskih bjelančevina ne pokazuju karakterističnu usku vrpcu, a ipak i dalje postoji sumnja na multipli mijelom, Waldenströmovu makroglobulinemiju, primarnu amiloidozu ili neki drugi srodni poremećaj, izvodi se imunofiksacija jer je ova metoda puno osjetljivija u identificiranju monoklonskog proteina prisutnog u niskoj koncentraciji.

U prošlom stoljeću došlo je do razvoja elektroforeze na papiru, stoga je ta metoda postala dostupna u biomedicini. Kako su se pojavljivale mogućnosti korištenja različitih nosača (acetat celuloza, agaroza, poliakrilamid, otopine pufera) tako je i sama metoda napredovala te se njena rezolucijska moć sve više poboljšavala. Danas je u većini kliničkih laboratorija u upotrebi kapilarna zonska elektroforeza visoke djelotvornosti (3).

Elektroforezom se serumski proteini razdvajaju u pet glavnih frakcija: albumini, alfa-1 globulini, alfa-2 globulini, beta globulini i gama globulini. Albumini su glavna proteinska komponenta u serumu te se u normalnim fiziološkim uvjetima proizvode u jetri. Globulini čine udjelom mnogo manje frakcije u elektroforezi seruma zdravih ljudi.

Albuminska frakcija ima najveći vrh i nalazi se najbliže pozitivnoj elektrodi. Sljedeća je alfa frakcija koja se dijeli u dvije komponente, alfa-1 i alfa-2 globulini. Nakon toga slijedi beta frakcija gdje se, također, mogu identificirati IgA, IgM te ponekad IgG. Gama globulini se nalaze najbliže negativnoj elektrodi (3).



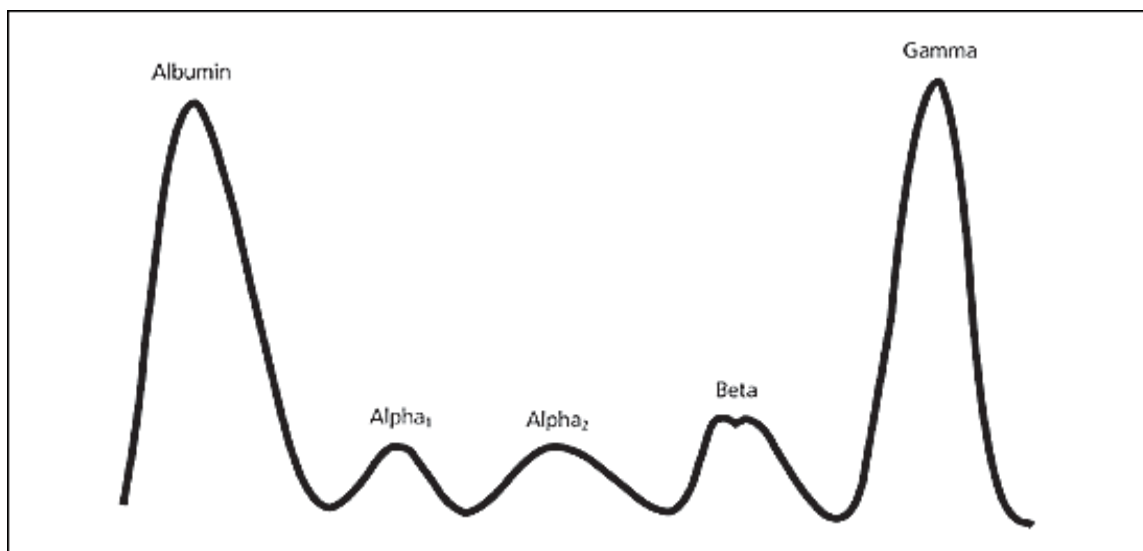
**Slika 1. Normalan elferogram serumskih proteina**

(izvor: <https://www.aafp.org/afp/2005/0101/afp20050101p105-f1.gif>)

Elektroforeza serumskih proteina koristi se kao inicijalna pretraga ako postoje karakteristični simptomi, ili kao dodatna pretraga, ako su već napravljeni laboratorijski testovi pokazali patološke rezultate. Ukoliko je dijagnoza već postavljena, elektroforeza serumskih proteina služi za praćenje tijeka bolesti i učinkovitosti terapije.

U interpretaciji elektroforeze serumskih proteina najviše pažnje usredotočuje se na gama regiju, koja je sastavljena pretežno od protutijela IgG tipa. Povećana razina gama-globulina javlja se kod multiplog mijeloma, Waldenströmove makroglobulinemije, primarne amiloidoze, bolesti jetre i nekih drugih bolesti.

Iako mnoga stanja mogu uzrokovati povećanje u gama regiji, kada se radi o monoklonskoj gamapatiji pojavljuje se karakteristični monoklonski protein, odnosno M-protein, sa izraženim oštrim i uskim šiljkom u gama regiji, što se može vidjeti na slici 2. U većini slučajeva se monoklonski protein pojavljuje u gama regiji, međutim, ponekad se vršak može opaziti i u beta ili alfa-2 regiji. Kada se elektroforezom zamijeti M-vršak potrebno je serum pacijenta podvrgnuti osjetljivijoj, preciznijoj i informativnijoj metodi kakva je imunofiksacija (5).



**Slika 2. Abnormalni elferogram serumskih proteina u bolesnika s monoklonskom gamapatijom. Karakteristično povećanje u gama-regiji.**

(izvor: <https://www.aafp.org/afp/2005/0101/afp20050101p105-f2.gif>)

### **1.2.1.1. Kapilarna zonska elektroforeza**

Danas se u svakodnevnom radu u kliničkim laboratorijima u svrhu provođenja elektroforeze serumskih proteina koristi kapilarna zonska elektroforeza visoke djelotvornosti, dok je elektroforeza na agarozu sve manje zastupljena. Kapilarna elektroforeza još se uvijek smatra novom separacijskom tehnikom. Ima brojne prednosti, a neke od njih su kratko vrijeme analize, visoka učinkovitost, mogućnost analize svih vrsta analita, vrlo male količine uzoraka, iziskuje niske troškove, jednostavna je i ekološki prihvatljiva tehnika (6).

Kapilarna elektroforeza funkcionira na principu putovanja nabijenih čestica u otopini elektrolita pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala u uskoj kapilari prema jednoj od elektroda. Ima veću rezolucijsku moć zahvaljujući elektroosmotskom toku i tlaku pri kojem se uzorak unosi u kapilare.

Kod standardnih elektroforetskih tehnika koristi se alkalni pH pri kojem je većina serumskih proteina negativno nabijena te se djelovanjem elektroforetske sile kreću anodno. Osim elektroforetske sile u svakom elektroforetskom sustavu javlja se i učinak elektroendoosmoze. Elektroosmotski tok je tok čistog pufera u kapilari, a posljedica je površinskog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare (6). Unutarnja površina stijenke kapilare sadrži brojne silanolne grupe koje su pri alkalnom pH u anionskoj formi. Negativno nabijene skupine kapilarnih stijenki privlače pozitivno nabijene ione pufera pa se stvara dvostruki električni sloj mobilnih iona s određenim elektrokinetičkim potencijalom. Primjenom visokog napona u sustav upravo elektrokinetički potencijal mobilnih iona uvjetuje endoosmotski tok u kapilari. Nastali elektroendoosmotski tok usmjerava ione iz ionskog dvosloja prema katodi, a istovremeno povlači i ione vode i nabijene proteinske molekule (16).

Jedna od prednosti elektroosmotskog toka je da uzrokuje kretanje svih analita u istom smjeru, neovisno o njihovom naboju. To kretanje će uvijek, ukoliko je negativno nabijena površina kapilare, ići od pozitivnog prema negativnom naboju, to jest, od anode prema katodi (6). Upravo zbog tog kretanja u istom smjeru moguće je istovremeno analizirati katione, neutralne molekule i anione. Kationi putuju najbrže, neutralne molekule su nošene brzinom elektroosmotskog toka, a anioni putuju najsporije (6). To putovanje od anode prema katodi, to jest elektroosmotski tok, prikazan je na slici 3.



**Slika 3. Elektroosmotski tok**

(izvor: (6))

S obzirom na mehanizme razdvajanja različitih analita postoji više vrsta kapilarno elektroforetskih tehnika, a najpoznatija i najčešće korištena je kapilarna zonska elektroforeza (CZE) ili kapilarna elektroforeza slobodne otopine (6). To je najjednostavniji oblik kapilarne elektroforeze zato što je kapilara ispunjena samo puferom.

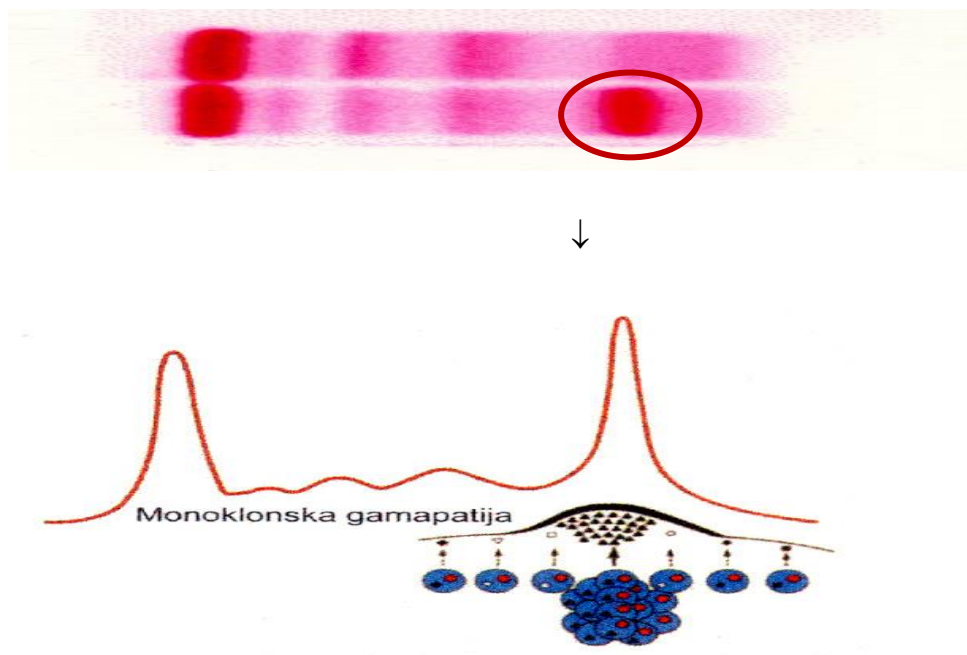
Sustav za kapilarnu zonsku elektroforezu ima više kapilara koje rade paralelno i omogućuju više simultanih razdvajanja (6). Otopljene tvari se razdvajaju zbog njihove različite elektroforetske pokretljivosti u puferu. Razrijeđeni uzorak na anodnom kraju ulazi u kapilare u kojima se odvija visokonaponsko razdvajanje proteina. Proteini se direktno detektiraju na katodnom kraju kapilare mjerenjem apsorpcije u UV području na 200 nm (područje apsorpcije peptidne veze) te se na taj način omogućuje točna kvantifikacija pojedinačnih proteinskih frakcija (7).

Proteini se u svakoj zoni koja sadrži jedan ili više proteina detektiraju prema sljedećem rasporedu: gama ( $\gamma$ ) globulini, beta ( $\beta$ )-2-globulini, beta ( $\beta$ )-1-globulini, alfa ( $\alpha$ )-2-globulini, alfa ( $\alpha$ )-1-globulini i albumin. Homogene zone u elferogramu, a posebno one u  $\beta$  i  $\gamma$  globulinskim zonama, uvijek pobuđuju sumnju na prisutnost monoklonskog proteina (7).

### 1.2.2. Imunofiksacija serumskih proteina

Imunofiksacijom serumskih proteina dokazuje se monoklonski protein. U slučaju nalaza monoklonske vrpce elektroforezom, kao i u slučaju sumnje na postojanje monoklonske gamapatije, potrebno je učiniti imunofiksaciju te definirati razred i tip monoklonskog proteina (2).

Kao što je već navedeno, najraširenija i najčešće korištena elektroforetska tehnika za odvajanje serumskih proteina je kapilarna zonska elektroforeza. Vizualnim pregledom denzitometrijski očitano elferograma postavlja se sumnja na prisutnost M-proteina uočavanjem karakteristične vrpce, odnosno vrška u području gama i beta-globulina (10).



Slika 4. Monoklonski protein kao jače izražena vrpca na elferogramu

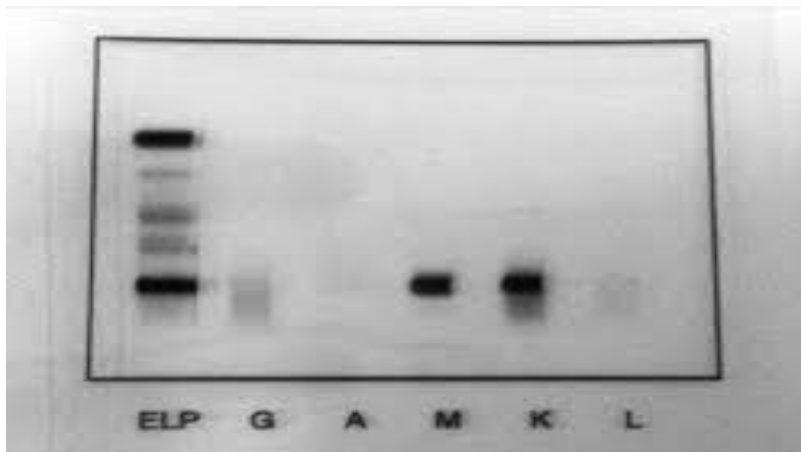
Potvrda monoklonske vrpce, to jest, definiranje razreda i tipa M-proteina vrši se tehnikom imunofiksacije koja je u ovom slučaju i „zlatni standard“ (11). Imunofiksacija je poluautomatizirani postupak koji uključuje elektroforezu serumskih proteina u gelu i imunoprecipitaciju (1).

Elektroforeza proteina provodi se na komercijalnim gelovima koncentracije agaroze 0.5-1.0%. Niska koncentracija otopine agaroze omogućuje nastanak gela velikih pora što rezultira slobodnom migracijom proteina velike molekularne mase (12). Uzorak seruma nanosi se razrijeđen na katodni kraj prema preporučenim razrjeđenjima za svaki imunoglobulin. Ako je unatoč razrjeđenju izrazito povećana koncentracija imunoglobulina može doći do učinka suviška antigena prilikom imunoprecipitacije odgovarajućim antiserumima, koja slijedi nakon elektroforetskog razdvajanja, te izostanka precipitacije imunokompleksa u gelu i nastanka vidljive vrpce. Optimalna precipitacija s komercijalnim antiserumima događa se kod koncentracije imunoglobulina oko 10 g/L (1). Zbog toga je preporučljivo napraviti kontrolnu elektroforezu prije izvođenja same imunofiksacije kako bi se uočila veličina vrpce M-proteina te eventualno dodatno razrijedilo uzorak seruma s ciljem izbjegavanja učinka viška antigena.

Proteini se elektroforetski razdvoje na oštne vrpce u gelu. Svaka linija migracije inkubira se sa specifičnim antiserumom za teške (G, A, M) i lake ( $\kappa$  i  $\lambda$ ) lance imunoglobulina, a rezultat se očitava vizualno i izražava opisno.

Antiserum će reagirati s odgovarajućim imunoglobulinom te će nastati kompleks koji će ostati fiksiran u gelu, dok će se ostali nevezani proteini isprati s gela. Slijedi nespecifično bojanje proteina uslijed kojeg vidljiv ostaje samo fiksirani protein. Monoklonski protein javlja se kao jače izražena vrpca na slabije obojenoj pozadini što je vidljivo na slici 5.





**Slika 5. Imunofiksacija proteina seruma (monoklonski IgM kapa tipa)**

(izvor: (10))

Imunofiksaciju treba napraviti uvijek, usprkos nalazima elektroforeze, kada klinička slika upućuje na multipli mijelom ili neki srodni poremećaj. Ako postoji sumnja na prisutnost M-proteina, a nije uočena reakcija sa anti-IgA, anti-IgM i anti-IgG antiserumima, treba postaviti sumnju i uzorak dodatno testirati sa anti-IgD i anti-IgE antiserumima (12).

Posebnu pozornost treba posvetiti monoklonskim gamapatijama kod kojih je M-protein sastavljen samo od lakih lanaca kapa ili lambda tipa, a pri tom se u elektroforezi serumskih proteina najčešće ne pronalazi karakterističan vršak. Potrebno je napraviti elektroforezu i imunofiksaciju 24-satnog uzorka urina koji je ukoncentriran sto puta kako bi se utvrdila prisutnost monoklonskih slobodnih lakih lanaca u mokraći, to jest, Bence-Jonesov protein (1).

### 1.2.3. Slobodni laki lanci i Bence Jones proteinurija

Laki lanci su sastavni dio imunoglobulina pa tako i M proteina. Sastoje se od 220 aminokiselina te se mogu svrstati u dva tipa, kapa i lambda. Oba lanca su zastupljena u svim razredima i podrazredima imunoglobulina, ali uvijek tako da su u istoj molekuli imunoglobulina oba laka lanca jednaka, ili dvije kape ili dvije lambde, a nikada kapa i lambda zajedno (13). Laki lanci se također nalaze u slobodnom, nevezanom obliku. Slobodni laki lanci se uobičajeno nalaze u serumu u niskim koncentracijama, a izlučuju se bubrezima u mokraću. Nastaju u plazma stanicama gdje su potrebni za sintezu intaktnih imunoglobulina, a ono što ostane u suvišku izluči se bubrezima. Kad sinteza slobodnih lakih lanaca premaši 10 – 30g/l dolazi do proteinurije te zbog suviška raste koncentracija i u mokraći. Povišene koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu su znak maligne transformacije i proliferacije plazma stanica, a u tom slučaju radi se o monoklonskim slobodnim lancima, nazvanim po doktoru koji ih je prvi opisao, Bence Jonesovi proteini (BJP). Njihova povišena koncentracija također može biti znak bubrežnog zatajenja uslijed smanjenog izlučivanja lakih lanaca urinom. Detekcija slobodnih monoklonskih lakih lanaca i u krvi i u mokraći neizostavni su dio laboratorijske dijagnostike monoklonskih gamopatija.

Serumska koncentracija slobodnih monoklonskih lakih lanaca korelira s aktivnošću koštane srži pa njihov nalaz može biti i neovisan biljeg multiplog mijeloma. Slobodni laki lanci u krvi imaju kratak poluživot: 2-3 sata kapa, a 5-6 sati lambda, što je 150x kraće od 21 dan koliki je poluživot, na primjer, IgG-a. Stoga praćenje koncentracije slobodnih lakih lanaca omogućuje vrlo brzu procjenu kemoterapije i raniju procjenu relapsa bolesti (2).

Bence Jonesova proteinurija, odnosno nalaz slobodnih lakih lanaca kapa ili lambda u mokraći, u većini slučajeva znak je malignog procesa iako se pozitivan nalaz može opaziti i kod reumatoidnog artritisa, sistemskog eritematoznog lupusa i kroničnog bubrežnog zatajenja. Lažno negativan nalaz može uslijediti iz mokraće skupljane tijekom primjene visokih doza penicilina i aspirina (1).

Kada je riječ o multiplom mijelomu, normalan omjer kapa i lambda lanaca se mijenja zato što se povećava sinteza samo jedne vrste lakog lanca. Patološki omjer kapa i lambda lakih lanaca je dobar biljeg monoklonske sinteze lakih lanaca. Taj omjer je povišen kod monoklonske sinteze kapa lanaca, a nasuprot tome, snižen kod monoklonske sinteze lambda lakih lanaca (1). Određivanjem ovog omjera uvelike se povećala dijagnostička osjetljivost u početnom dijagnostičkom probiru na multipli mijelom te se smanjila potreba za uzorkovanjem 24-satnog urina predviđenog dokazivanju Bence Jonesove proteinurije prilikom dijagnostike monoklonskih gamapatija. Međutim, u slučaju dokazane proliferativne bolesti plazma stanica poželjno je odrediti monoklonski slobodne lake lance u urinu odnosno Bence Jonesov protein metodom imunofiksacije (1). Slično kao i u serumu prvi korak je zonska elektroforeza 100x ukoncentrirane mokraće na acetat celulozi ili agarozu. BJP se na elferogramu može naći od alfa do gama frakcije što je rezultat različite molekularne mase.

Određivanje slobodnih lakih lanaca od velikog je prognostičkog značaja u gotovo svim proliferativnim bolestima plazma stanica, a normalizacija njihovog omjera uključena je u kriterije za definiciju potpune remisije bolesti. U rutinskoj laboratorijskoj praksi koncentracija slobodnih lakih lanaca u krvi i u mokraći određuje se osjetljivom imunokemijskom metodom kakva je imunonefelometrija.

#### **1.2.4. Ostale laboratorijske pretrage i specifični proteini**

Laboratorijska obrada pacijenta s otkrivenom i dokazanom monoklonskom gamapatijom uključuje, osim prethodno opisanih pretraga, i druge laboratorijske parametre koji služe kako procjeni stanja tako i daljnjem praćenju tijeka i prognoze bolesti.

Potrebno je kvantitativno određivanje svih imunoglobulina, a posebno u slučajevima kada je M-protein male koncentracije i/ili migrira u područje beta-globulina. Koncentracija svih imunoglobulina određuje se imunonefelometrijski ili imunoturbidimetrijski u sklopu ukupne procjene stanja pacijenta (10).

Osim specifičnih testova kojima se određuje vrsta i koncentracija M-proteina, potrebno je provesti testove kojima će se dobiti cjelokupna slika općeg stanja pacijenta te utvrditi zahvaćenost drugih organa i organskih sustava. Jedna od osnovnih pretraga koja se radi je kompletna krvna slika s diferencijalnom krvnom slikom. Kod bolesnika s monoklonskom gamapatijom kompletna krvna slika najčešće pokazuje snižen broj eritrocita i leukocita, dok je broj trombocita normalan ili snižen. Sedimentacija je obično vrlo ubrzana. U krvnom razmazu eritrociti se nalaze u rouleaux-formacijama na tamno obojenoj podlozi, a može biti prisutno i nešto plazma-stanica i leukoeritroblastična reakcija (9). Od biokemijskih pretraga prate se ukupni proteini i globulini koji mogu biti izrazito povišeni, posebice monoklonski, dok su koncentracije normalnih imunoglobulina u tom slučaju snižene. Povišen je također  $\beta$ 2-mikroglobulin, koncentracija kalcija, kreatinina i kalija u serumu, kao i ureja. Vrijednosti enzima alkalne fosfataze su unutar referentnih intervala. U mokraći su pozitivni proteini, a među njima je posebno zastupljen Bence-Jonesov protein.

Određivanje stadija bolesti temelji se na procjeni ukupne tumorske mase. Glavni kriteriji u toj procjeni su litičke lezije u kostima, razina M-proteina u serumu i/ili mokraći, koncentracija hemoglobina u krvi i kalcija u serumu. Drugi način određivanja stadija bolesti temelji se na koncentraciji  $\beta$ 2-mikroglobulina i serumskog albumina (9).

Kod bolesnika s monoklonskom gamapatijom neutvrđenog značenja potrebno je periodično pratiti koncentraciju M-proteina i druge laboratorijske pokazatelje kojima se utvrđuje prisutnost poremećaja vezanih uz multipli mijelom, a glavne od njih su hiperkalcemija, zatajenje bubrega, anemija te litičke lezije kostiju (9).

## **2. CILJ RADA**

Cilj ovog rada je ispitati prisutnost monoklonskog proteina (M proteina) i odrediti njegov tip u serumu pacijenata kojima je nakon prethodno provedene elektroforeze serumskih proteina na eleferogramu uočena suspektna monoklonska vrpca.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Ispitanici**

U ovom istraživanju obrađena su četiri uzorka pacijenata zaprimljena u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Split. Izabrani su serumski pacijenata kod kojih postoji sumnja na prisutnost M proteina s obzirom na uočenu suspektu monoklonsku vrpcu na elferogramu serumskih proteina dobivenu prethodnom kapilarnom elektroforezom.

### **3.2. Metode**

Za sva četiri uzorka nakon urađene elektroforeze serumskih proteina, na kojima je uočeno karakteristično povećanje u gama regiji, rađena je imunofiksacija kao potvrdna metoda za prisutnost M-proteina, a jednako tako i za određivanje razreda i tipa monoklonskog proteina.

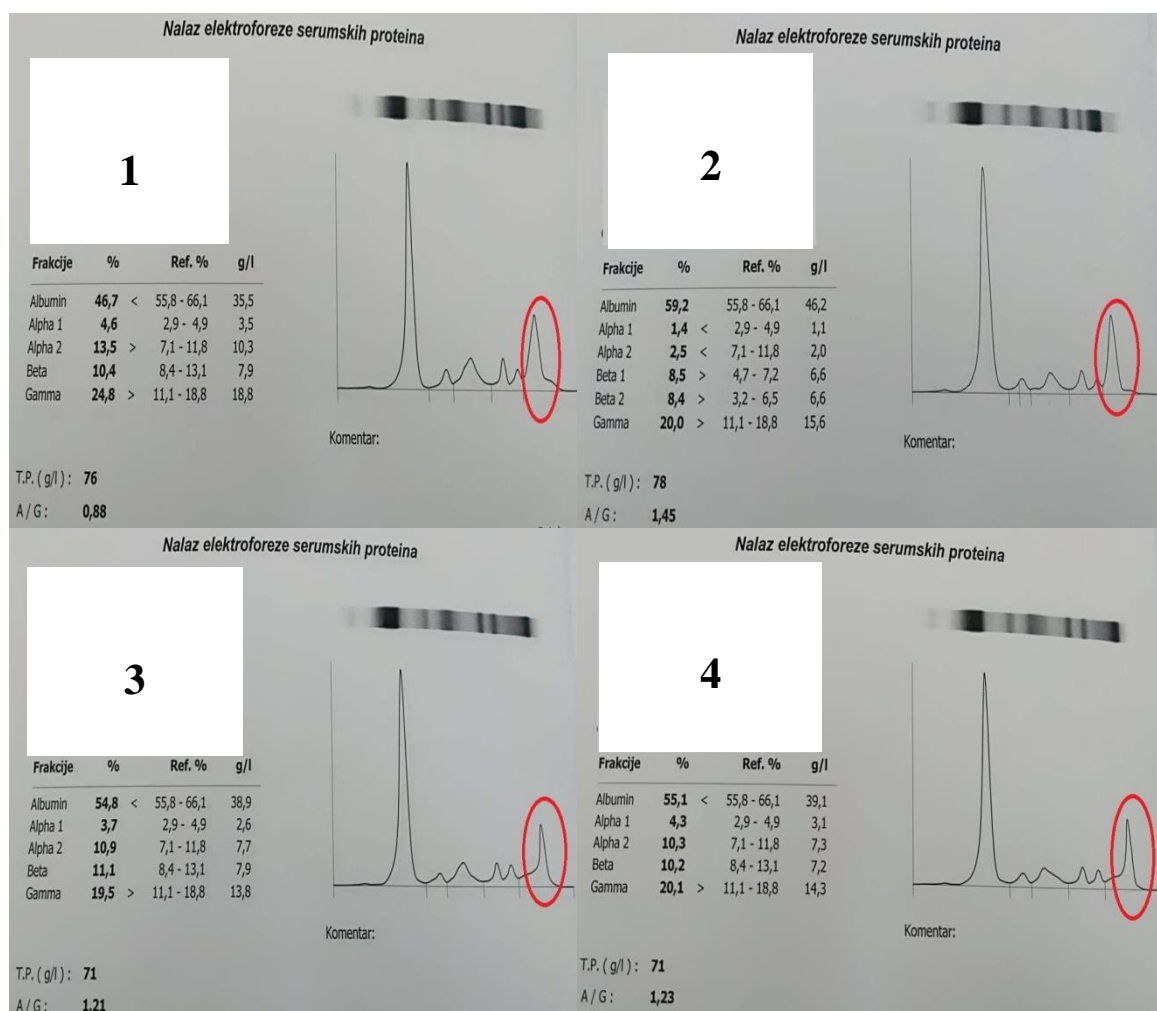
Elektroforeza serumskih proteina rađena je metodom kapilarne zonske elektroforeze na uređaju Sebia Capillarys 2, a nakon toga je provedena imunofiksacija na agaroznom gelu koristeći uređaj Sebia Hydrasys sa reagensimakoje je proizvela tvrtka Sebia.

#### **3.2.1. Elektroforeza proteina u serumu**

Provedena je kapilarna zonska elektroforeza s direktnom detekcijom razdvojenih proteina. Ova metoda omogućuje razdvajanje nabijenih čestica u otopini elektrolita pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala u uskoj kapilari prema jednoj od elektroda (7).

Elektroforeza proteina u serumu je provedena na uređaju Sebia Capillarys 2. To je višeparametrijski uređaj koji razdvaja proteine seruma u osam paralelnih kapilara. Uzorci se usisavaju na anodnom kraju kapilara te se u njima odvija razdvajanje proteina. Zatim se tako razdvojeni proteini detektiraju na katodnom kraju kapilare mjerenjem apsorpcije u UV području pri 200 nm (7).

Nakon što su urađene elektroforeze serumskih proteina, na elferogramima sva četiri uzorka uočen je porast u obliku visokog i uskog šiljka u gama-regiji kao što je vidljivo na slici 6, odnosno postavljena je sumnja na prisutnost M-proteina. Dobiveni su i udjeli pojedinih frakcija proteina te vrijednosti ukupnih proteina koji su uglavnom bili unutar granica referentnih vrijednosti. S obzirom na prisutnost suspektnog M-proteina u gama-regiji elferograma, sva četiri uzorka smo podvrgnuli imunofiksaciji kako bi dokazali prisutnost te odredili razred i tip monoklonskih proteina.



**Slika 6. Nalazi elektroforeze serumskih proteina četiri uzorka sa suspektim M-proteinom u gama-regiji.**

### 3.2.2. Imunofiksacija

Tehnika imunofiksacije primjenjuje se kako bi se ispitale abnormalne vrpce u elferogramu seruma i urina svojstvene M proteinu. Imunofiksacijska elektroforeza je jednostavna tehnika pomoću koje se protein fiksira *in situ* te potom provodi imunoprecipitacija sa odgovarajućim protutijelom. Imunofiksacija se provodi u četiri koraka i jednostavna je za interpretaciju.

Prvi i osnovni korak je separacija proteina elektroforezom na agaroznom gelu pri alkalnom pH. Zatim se u idućem koraku događa fiksacija i imunoprecipitacija razdvojenih imunoglobulina sa specifičnim antiserumima. U trećem koraku se ispiru s gela svi neistaloženi proteini, a talog ili precipitat kompleksa antigen-protutijelo ostaje u gelu. U posljednjem koraku se bojaju precipitirani proteini te se imunoprecipitirane vrpce uspoređuju sa odgovarajućim abnormalnim vrpcoma elferograma (14).

Imunofiksacija je poluautomatizirani postupak što znači da se pojedine faze u tom postupku izvode ručno, a ostale obavlja uređaj.

Uzorak koji se koristi u procesu imunofiksacije je serum. Prije same aplikacije seruma na agarozni gel, serum je potrebno razrijediti prema razrjeđenjima preporučenim od strane proizvođača. Serum razrjeđujemo kako bi spriječili prozonski učinak uzrokovan velikom količinom antigena iz seruma. Bromfenol blue boja, kao glavni sastojak diluenta, služi kao pogodan marker za aplikaciju i migraciju.

**Tablica 2. Preporučena razrjeđenja seruma za imunofiksaciju**

TRAKA	SERUM ( $\mu$ l)	DILUENT ( $\mu$ l)
IgG imunofiksacijska traka	20	100
ELP referentna traka i druge imunofiksacijske trake	30	60

(izvor: (14))

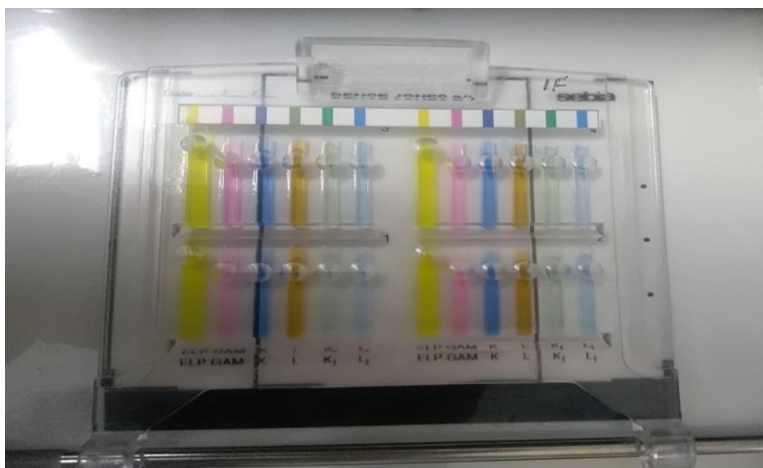


Nakon što smo napravili razrjeđenja seruma dodajemo po 10  $\mu$ l pravilno pripremljenog uzorka u jažice aplikatora, obično na 6 pozicija za svaki uzorak, te aplikatore stavimo u vlažnu komoru 5 minuta.



**Slika 7. Aplikatori s razrijeđenim serumima u vlažnoj komori**

U međuvremenu pripreмимо agaroznu ploču s gelom gdje će se proteini razdvojiti. Tankim filter papirom apsorbiramo višak tekućine s agaroznog gela, a na površinu nosača aplikatora dodamo 120  $\mu$ l destilirane vode kakobi se konstantno održavala vlažnost. Ploču s gelom lagano spustimo u vodu te namjestimo aplikatore s uzorcima na odgovarajuća mjesta iznad gela. Puferirane spužvice će osigurati kontakt između gela i elektroda. Postupak elektroforeze provodi se automatizirano na 20°C 9 minuta. Nakon elektroforeze, na pozicije uzoraka na gelu se dodaje otopina za fiksaciju čija je uloga fiksiranje elektroforetski razdvojenih proteina na referentnoj traci (ELP). Zatim se na ostale pozicije na gelu dodaju antiserumi: anti  $\gamma$  (za IgG), anti  $\alpha$  (za IgA), anti  $\mu$  (za IgM), anti  $\kappa$  (za laki lanac kapa) i anti  $\lambda$  (za laki lanac lambda). Ako su prisutni neki od monoklonskih teških ili lakih lanaca u uzorku doći će do imunoreakcije antigena iz uzorka pacijenta i antitijela iz antiseruma te će nakon bojanja taj kompleks biti vidljiv.



**Slika 8. Aplicirani antiserumi na površini gela**

Svi antiserumi su anti-humani imunoglobulini sisavaca. Kako bi se postigla lakša identifikacija te osigurala lakša aplikacija antiseruma, svaki antiserum je obojan različitim neškodljivim bojama. Boja naljepnice na bočicama odgovara boji antiseruma.



**Slika 9. Bočice s antiserumima u različitim bojama**

Slijedi inkubacija antiseruma te se pomoću debelog češljastog filter papira uklanja višak fiksacijske otopine i antiseruma sa površine gela nakon imunofiksacije. Naposljetku, nakon što smo sigurni da je apsorpcija reagensa kompletna, postavljamo debeli filter papir koji upija neprecipitirane proteina sa gela nakon imunofiksacije.

Gel je potrebno u potpunosti osušiti u inkubatoru, a nakon toga postupka slijedi bojanje. Postupak bojanja je u potpunosti automatiziran, a odvija se u nekoliko koraka. Za bojanje gela se koristi acid violet boja koju je potrebno razrijediti do 300 mL sa destiliranom vodom. Faza bojanja odvija se kroz četiri minute. Zatim slijedi uklanjanje viška boje i pozadinskog obojenja s gela kroz tri ispiranja. Prvo ispiranje se vrši kroz 3 minute, potom 2 minute te zadnje ispiranje traje 6 minuta. Zadnji korak je sušenje gela na 80°C.

Nakon ovih procesa slijedi očitavanje uzoraka, to jest, detekcija monoklonske vrpce. Očitavanje uzoraka vrši se vizualno.

Proces elektroforeze i imunofiksacije u KBC-u Split provodi se na uređaju Sebia Hydrasys. To je poluautomatski sustav koji se sastoji od dva modula: elektroforetski modul i modul za vizualizaciju. U elektroforetskom modulu nalazi se temperirana ploča na koju se postavlja agarozni gel te se u alkalnom pH pomoću tris-barbitalnog pufera razdvajaju proteini seruma. Također se u ovom modulu odvija i ručno nanošenje antiseruma na agarozni gel s razdvojenim proteinima te se odvija imunoprecipitacija. Elektroforetski modul ima sposobnost podizanja i spuštanja temperature u vrlo kratkom vremenskom intervalu. U modulu za vizualizaciju odvijaju se tri procesa: bojanje gela, otklanjanje boje te sušenje gela. Sastoji se od komorice za bojanje gdje se gel postavi okomito te se sva tri procesa odvijaju automatizirano, jedan za drugim.

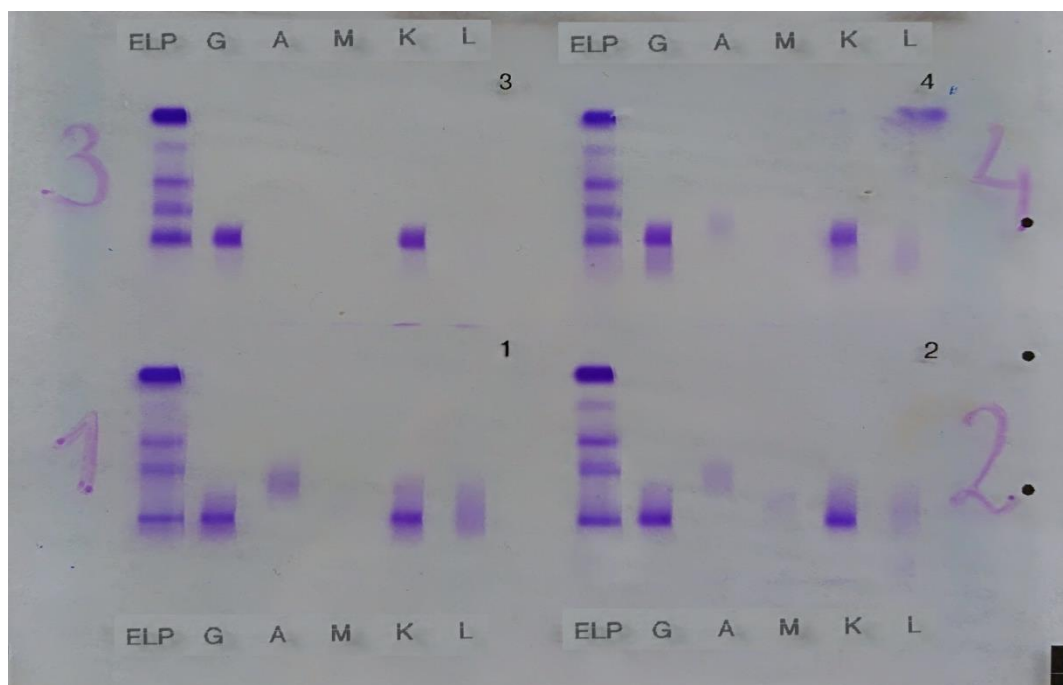


**Slika 10. Uređaj Sebia Hydrasys**

## 4. REZULTATI

Prisustvo monoklonskih proteina karakterizira monoklonskavrpca otkrivena s jednim od antiseruma anti-teških lanaca (IgG, IgA, IgM) i jednim od anti-lakih lanaca (kapa ili lambda). Detekcija monoklonske oštre vrpce mora biti locirana na istom migracijskom razmaku kao i sumnjiva monoklonska vrpca u referentnoj traci koja predstavlja elektroforetski razdvojene serumske proteine (ELP) (14).

U sva četiri ispitivana uzorka dokazana je prisutnost monoklonskog proteina postupkom imunofiksacije. Kod sva četiri pacijenta uočene su monoklonske oštre vrpce u gama području. Dodatkom antiseruma anti  $\gamma$  (za teški lanac IgG) i anti  $\kappa$  (za laki lanac kapa) dogodila se imunoreakcija u kojoj su reagirala antitijela iz antiseruma sa antigenima koji su bili prisutni u serumima pacijenata. Na ovaj način su dokazani monoklonski proteini isključivo IgG kapa tipa u sva četiri ispitivana seruma kao što je prikazano na slici 11.



**Slika 11. Imunofiksacija uzoraka seruma ispitivanih pacijenata. Dokazano prisustvo monoklonskog proteina IgG kapa tipa.**

## 5. RASPRAVA

Jedno od glavnih obilježja skupine bolesti koje se svrstavaju pod monoklonske gamopatije je prisutnost monoklonskog imunoglobulina u serumu. Laboratorijska dijagnostika pruža moćan alat u otkrivanju ove bolesti, a odnosi se prvenstveno na detekciju i određivanje razreda i tipa monoklonskog proteina u što ranijoj fazi bolesti jer se na taj način može doprinijeti liječenju i boljoj kvaliteti života, a moguće i ishodu same bolesti.

Monoklonski protein uočava se elektroforezom serumskih proteina. Tom metodom se razdvajaju pacijenti kod kojih postoji klinička sumnja za postojanje monoklonske gamopatije od onih pacijenata čiji su rezultati elektroforeze serumskih proteina ili uredni ili pak bez uske i oštre vrpce karakteristične za monoklonski protein. Serume pacijenata, u čijem nalazu elektroforeze serumskih proteina pronađemo usku i oštru vrpcu, podvrgavamo metodi imunofiksacije kako bi potvrdili prisutnost monoklonskog proteina te odredili razred i tip M-proteina.

U pojedinim slučajevima može se dogoditi da u nalazu elektroforeze serumskih proteina nije uočljiva vrpca karakteristična za monoklonski protein, a klinička slika ipak ukazuju na monoklonsku gamopatiju. Serumi tih pacijenata uvijek se podvrgavaju imunofiksaciji kako bi bili sigurni je li prisutan monoklonski protein. Naime, u slučajevima niske serumske koncentracije monoklonskog proteina karakteristična oštra i uska vrpca ne mora biti uočljiva na elferogramu serumskih proteina.

Osim toga suspektan M-vršak na elferogramu nije u svakom slučaju rezultat prisustva monoklonskog proteina, što je ujedno i objašnjenje zašto se zonskom elektroforezom serumskih proteina samo postavlja sumnja, a onda provodi imunofiksacija sumnjivih uzoraka u svrhu dokazivanja prisustva M-proteina.

Tehnički inducirani artefakti, kao i takozvani pseudo-M-proteini, mogu oponašati prisutnost monoklonskog proteina u nalazu elektroforeze serumskih proteina (15). Pseudo-M-protein se u  $\alpha_2$ -frakciji može pojaviti kao posljedica povećane koncentracije  $\alpha_2$ -makroglobulina u slučajevima nefrotskog sindroma, izražene reakcije akutne faze ili hiperlipoproteinemije (15). Pseudo-M-protein može se još pojaviti u području između  $\alpha_2$  i  $\beta$  frakcije gdje se javlja kao posljedica prisutnosti haptoglobin-hemoglobin kompleksa.

Ukoliko se koristi plazma kao uzorak za elektroforezu serumskih proteina doći će do pojave pseudo-M-proteina u  $\beta$ - $\gamma$  frakciji. Na tom položaju M protein oponaša u plazmi prisutni fibrinogen. Stoga se kao uzorak za elektroforezu serumskih bjelančevina uvijek upotrebljava serum. Pojavu pseudo-M-proteina u  $\beta$ - $\gamma$  frakciji, također, može uzrokovati i bakterija koja je prisutna u uzorku. Lažni uski visoki šiljci javljaju se u  $\gamma$  frakciji u slučajevima kada je prisutan reumatoidni faktor, kada je uzorak star ili uremičan te kada je prisutna velika koncentracija enzima lizosoma (15).

Prema tome zonska elektroforeza serumskih bjelančevina nema potrebnu analitičku osjetljivost niti specifičnost za identifikaciju monoklonskog proteina (15).

Uzorke seruma sumnjive na prisutnost M proteina potrebno je ispitati metodom imunofiksacije koja je ujedno i „zlatni standard“ za određivanje razreda i tipa monoklonskog proteina. Iako metoda imunofiksacije nije u potpunosti automatizirana metoda, osigurava točne i pouzdane rezultate u laboratorijskoj dijagnostici monoklonskih gamapatija.

Uzorci koji su se ispitivali na prisutnost M-proteina u ovom radu svakako su bili predviđeni za postupak imunofiksacije s obzirom na suspektan vršak uočen u nalazu elektroforeze serumskih proteina. Svaki vršak opažen je u gama frakciji, a imunofiksacijom je potvrđeno također za svaki monoklonsko porijeklo. Osim toga za svaki uzorak je nađen IgG kapa tip monoklonskog proteina.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Monoklonski protein dokazan je metodom imunofiksacije u sva četiri serumska uzorka s prethodno uočenom suspektnom monoklonskom vrpcom u nalazu elektroforeze serumskih proteina.
2. Nijedna se od četiri postavljene sumnje na prisutnost M-proteina nalazom elektroforeze serumskih proteina nije pokazala lažnom nakon provođenja potvrdne metode.
3. U sva četiri odabrana suspektna seruma imunofiksacijom je dokazan monoklonski protein IgG kapa tipa.

## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Monoklonska gamopatija je imunoproliferativna bolest koju karakterizira prisutnost monoklonskog proteina u serumu ili urinu, a nastaje kao produkt klona limfocita B koji je genetički promijenjen. Najčešći monoklonski protein je iz klase G imunoglobulina. Maligna monoklonska gamopatija očituje se kao multipli mijelom, to jest, diseminirani zloćudni tumor građen od monoklonskih plazma stanica. Bence-Jonesovi proteini su monoklonski slobodni laki lanci imunoglobulina, kapa i lambda, koje stvara maligni klon B-limfocita te su kao takvi važan tumorski biljeg u dijagnostici multiplog mijeloma. Elektroforeza serumskih proteina je prvi korak u laboratorijskoj dijagnostici monoklonskih gamopatija, a danas je najzastupljenija u praksi kapilarna zonska elektroforeza. Serumski proteini razdvajaju se u pet glavnih frakcija: albumini, alfa-1 globulini, alfa-2 globulini, beta globulini i gama globulini. U slučaju nalaza sumnjive monoklonske vrpce u nalazu elektroforeze serumskih proteina, potrebno je učiniti imunofiksaciju seruma kako bi potvrdili prisutnost te odredili razred i tip monoklonskog proteina.

**Cilj rada:** Svrha rada bila je metodom imunofiksacije ispitati prisutnost monoklonskih proteina u serumima pacijenata sa suspektnim M-vrškom u nalazu elektroforeze serumskih proteina.

**Materijali i metode:** Izabrana su četiri uzorka pacijenata zaprimljena u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split. Kapilarnom elektroforezom serumskih proteina, u sva četiri uzorka, uočena je oštra vrpca u gama regiji što je upućivalo na prisutnost M-proteina. Odabrani uzorci seruma podvrgnuti su imunofiksaciji.

**Rezultati:** U sva četiri ispitivana uzorka dokazana je prisutnost monoklonskog proteina. Metodom imunofiksacije dokazani su monoklonski proteini IgG kapa tipa u sva četiri ispitivana seruma.

**Zaključak:** Metoda imunofiksacije potvrdila je prisustvo M-proteina IgG kapa tipa u sva četiri seruma sa prethodno postavljenom sumnjom na temelju uočenog karakterističnog vrška na elferogramu serumskih proteina.

**Ključne riječi:** monoklonska gamopatija, monoklonski protein, elektroforeza, imunofiksacija



## 8. SUMMARY

**Introduction:** Monoclonal gammopathy is an immunoproliferative disease characterized by the presence of monoclonal protein in serum or urine, produced by the clone of lymphocyte B that is genetically transformed. The most common monoclonal protein is class of immunoglobulin G. Malignant monoclonal gammopathy is manifested mostly as a multiple myeloma, disseminated malignant tumor composed of monoclonal plasma cells. Bence-Jones proteins are monoclonal free light chains of immunoglobulins, kappa or lambda, which are produced by the malignant clone of B lymphocytes as a part of monoclonal immunoglobulin. Bence Jones proteins are an important tumor marker in the diagnosis of multiple myeloma. Serum protein electrophoresis is a method for detection of monoclonal protein. Today the most common method for serum electrophoresis is capillary zone electrophoresis. Serum proteins are separated into five major fractions: albumin, alpha-1 globulin, alpha-2 globulin, beta globulin and gamma globulin. If the monoclonal spike is found by electrophoresis, immunofixation should be performed to confirm the presence and determine the class and type of monoclonal protein.

**Objective:** The purpose of the study was to confirm the presence of monoclonal proteins in the serum of the patients with M spike by the immunofixation electrophoresis as well as to define the class and type of monoclonal protein.

**Materials and methods:** Samples of four patients accepted at the Department of Medical Laboratory Diagnosis, UHC Split were selected for immunofixation testing considering the suspected M spike found by serum proteine electrophoresis.

**Results:** In all four samples the presence of monoclonal proteine was confirmed. The monoclonal IgG kappa type was determined in all four samples.

**Conclusion:** Immunofixation testing confirmed the presence of monoclonal proteine IgG kappa type in every selected sample with M spike found by serum electrophoresis.

**Key words:** monoclonal gammopathy, monoclonal protein, electrophoresis, immunofixation

## 9. LITERATURA

1. Matišić D. Laboratorijska dijagnostika gamapatija: Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Medicinska naklada, Zagreb; 2015:475-85.
2. Boris Labar i suradnici, Hematologija, Školska knjiga, Zagreb, 2017:445-462.
3. Štraus B., Stavljenić-Rukavina A., Plavšić F. i sur. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju, Medicinska naklada, Zagreb.
4. David F. Keren, Capillary Zone Electrophoresis in the Evaluation of Serum Protein Abnormalities.
5. O'Connell TX, Horita TJ, Kasravi B. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. Am Fam Physician. 2005;71:105-112.
6. Damić M, Nigović B. Kapilarna elektroforeza u farmaciji. Farmaceutski glasnik 2010;4:195-207.
7. Sebia Capillarys Protein(e) 6, ref. 2003, upute za korištenje ver. 2014/11. Sebia; 2014, 64-70.
8. Keren DF, Alexanian R, Goeken J, Gorevic P, Kyle RA, Tomar RH. Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies. Arch Pathol Lab Med. 1999;123:106-7.
9. Mira Premužić Lampič: Hematologija, klinička i laboratorijska, Medicinska naklada, Zagreb, 2000:167-175.
10. Jelena Vlašić Tanasaković: Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija. Pregledni rad: 14-19.
11. Dimopoulos M, Kyle R, Femand JP, Rajkumar SV, San Miguel J, Khan AC i sur. Consensus recommendations for standard investigative workup: Report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. Blood 2011;117(18):4701-5.
12. LeCarrerD. Serum protein electrophoresis & immunofixation: illustrated interpretations. Opag; 2005; 11-15, 31-52.
13. Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M. i sur. Imunologija: Građa protutijela i antigenskih receptora limfocita B, 7.izdanje, Zagreb: Medicinska naklada, 2010.:59-79.
14. Sebia Hydragel IF K20, ref. 3031, upute za korištenje ver. 2006/12;64-70.
15. Lothar Thomas: Proteins in Clinical and Laboratory Medicine, Use and Assessment of Clinical Laboratory Results, Siemens, 2008.

16. Debeljak Ž: Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju: elektroforetske i kromatografske separacije, priručnik za trajno usavršavanje, HKMB, Medicinska naklada, 2018.

## 10. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODACI

**Ime i prezime:** Kristina Brkić

**Datum rođenja:** 27.11.1997.

**Adresa stanovanja:** Primorski Dolac, Bakovići 12, 21227

**Država:**Hrvatska

**Telefon:** 098 / 966 8769

**E-mail:** kristinabrkić82@gmail.com

### OBRAZOVANJE

**2004.-2012.** Osnovna škola dr. Franje Tuđmana, Knin

**2012.–2016.** Opća gimnazija, Knin

**2016.–2019.** Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu, Medicinsko laboratorijska dijagnostika

**Jezici:** engleski, njemački