

# Određivanja paraproteina u serumu i mokraći bolesnika s multiplim mijelomom

---

**Bogović, Lana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*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:176:199634>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**

*Repository / Repozitorij:*



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Lana Bogović**

**ODREĐIVANJE PARAPROTEINA U SERUMU I  
MOKRAĆI BOLESNIKA S MULTIPLIM  
MIJELOMOM**

**Završni rad**

Split, 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Lana Bogović**

**ODREĐIVANJE PARAPROTEINA U SERUMU I  
MOKRAĆI BOLESNIKA S MULTIPLIM  
MIJELOMOM**

**ASSESSMENT OF PARAPROTEIN IN SERUM AND  
URINE OF PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA**

**Završni rad/ Bachelor's thesis**

Mentor:

**Doc. dr. sc. Nada Bilopavlović**

Split, 2023.

**Sveučilište u Splitu**

**Sveučilišni odjel zdravstvenih studija**

**Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Znanstveno područje:** Biomedicina i zdravstvo

**Znanstveno polje:** Kliničke medicinske znanosti

**Mentor:** Doc. dr. sc. Nada Bilopavlović

**ODREĐIVANJE PARAPROTEINA U SERUMU I MOKRAĆI BOLESNIKA S MULTIPLIM MIJELOMOM**

**Lana Bogović**

**Sadržaj**

**Uvod:** Multipli mijelom je maligna hematološka bolest koja se javlja kao posljedica nekontrolirane klonalne proliferacije plazma stanica. Najčešće se javlja kod starijih pacijenata i karakterizira je prisutnost paraproteina odnosno monoklonskog imunoglobulina ili njegovih fragmenata slobodnih lakih lanaca u serumu i/ili urinu. Bence Jones proteini su monoklonski slobodni laki lanci imunoglobulina, kapa i lambda koji se koriste kao važan biljeg u dijagnostici multiplog mijeloma. Laboratorijska dijagnostika multiplog mijeloma obuhvaća razne laboratorijske pretrage, uključujući elektroforezu proteina seruma, imunofiksaciju seruma, imunofiksaciju urina i određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca imunoglobulina u serumu.

**Cilj rada:** Svrha ovog rada bila je odrediti paraprotein u serumu i mokraći odabranih pacijenata s uputnom dijagnozom multiplog mijeloma koristeći različite laboratorijske metode i tehnike.

**Materijali i metode:** Izabrani su uzorci seruma i 24-satnog urina četiri pacijenata s uputnom dijagnozom multiplog mijeloma upućena u Zavod za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split na laboratorijsku obradu koja je uključivala elektroforezu proteina u serumu, imunofiksaciju seruma i urina te određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu.

**Rezultati:** Kod trojice pacijenata uočen je suspektan monoklonski vršak na elferogramu serumskih proteina te je metodom imunofiksacije seruma dokazan monoklonski proteina IgG kapa tipa. Imunofiksacijom urina dokazana je prisutnost Bence Jones proteina u jednom od četiri uzorka. Povišena koncentracija slobodnih lakih lanaca dokazana je u jednom od četiri uzoraka, a povišeni omjer koncentracija slobodnih lakih lanaca kapa/lambda u dva od četiri uzoraka.

**Zaključak:** Paraprotein ili M-protein je dokazan trojici od četiri pacijenta s uputnom dijagnozom multiplog mijeloma.

**Ključne riječi:** multipli mijelom; monoklonski protein; elektroforeza; imunofiksacija

**Rad sadrži:** 35 stranica, 17 slika, 2 tablice, 20 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## BACHELOR THESIS

**University of Split**

**University Department of Health Studies**

**University undergraduate study medical laboratory diagnostics**

**Scientific area:** Biomedicine and health

**Scientific field:** Clinical medical sciences

**Supervisor:** Assistant professor Nada Bilopavlović

### **ASSESSMENT OF PARAPROTEIN IN SERUM AND URINE OF PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA**

**Lana Bogović**

**Introduction:** Multiple myeloma is a malignant hematological disease that occurs as a result of uncontrolled clonal proliferation of plasma cells. It occurs most often in elderly patients and is characterized by the presence of monoclonal immunoglobulin and free light chains in serum and/or urine. Bence Jones proteins are monoclonal free immunoglobulin light chains, kappa and lambda, which are used as an important marker in the diagnosis of multiple myeloma. Laboratory diagnosis of multiple myeloma includes various laboratory tests, including serum protein electrophoresis, serum immunofixation, urine immunofixation, and measurement of serum free light chain concentration.

**Objective:** The purpose of the study was to examine paraprotein in the serum and urine of selected patients with a referral diagnosis of multiple myeloma using different laboratory methods and techniques.

**Materials and methods:** Serum and 24-hour urine samples of four patients with a referral diagnosis of multiple myeloma received at the Department of Medical Laboratory Diagnostics of UHC Split were selected for laboratory testing, which included serum protein electrophoresis, serum and urine immunofixation, and measurement of the concentration of free light chains in serum.

**Results:** A suspected monoclonal peak was observed in serum protein electrophoresis for three of four patients, and using the serum immunofixation method, a monoclonal IgG kappa type protein was identified. Urine immunofixation proved the presence of Bence Jones protein in one of the four samples. An elevated concentration of free light chains was demonstrated in one of four samples, and an elevated concentration ratio of free light chains kappa/lambda was observed for two of the four samples.

**Conclusion:** Paraprotein or M-protein was demonstrated for three out of four patients with a referral diagnosis of multiple myeloma.

**Key words:** multiple myeloma; monoclonal protein; electrophoresis; immunofixation

**Thesis contains:** 35 pages, 17 figures, 2 tables, 20 references

**Original in:** Croatian

# SADRŽAJ

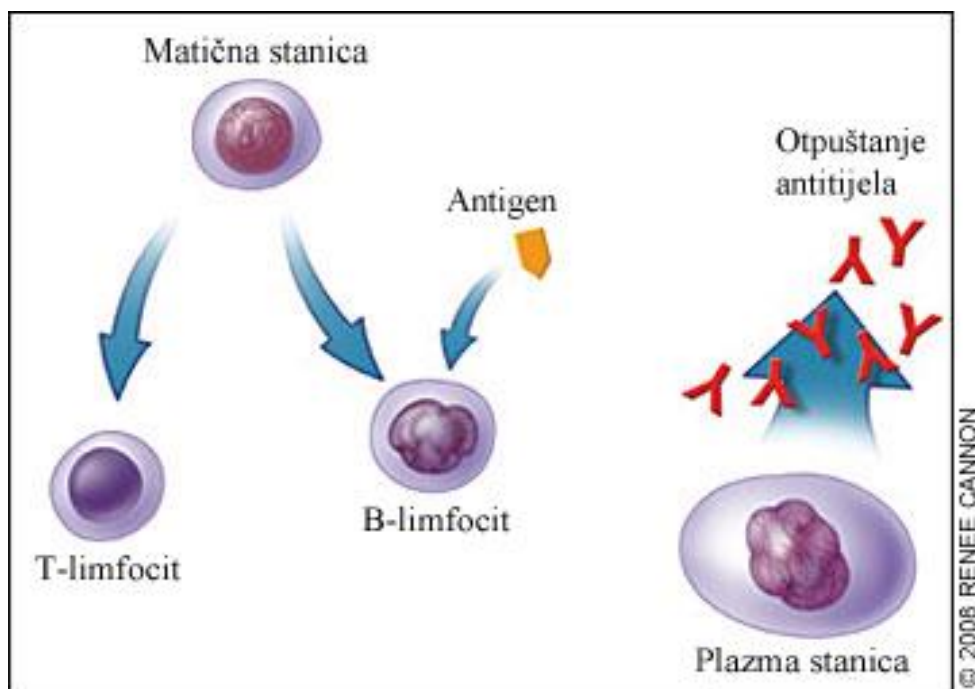
1. UVOD .....	1
1.1. MONOKLONSKI IMUNOGLOBULINI .....	1
1.2. BENICE JONES PROTEIN .....	3
1.3. MULTIPLI MIJELOM .....	5
1.3.1. Etiologija i patogeneza .....	5
1.3.2. Dijagnostički kriteriji.....	6
1.3.3. Laboratorijska dijagnostika multiplog mijeloma.....	7
1.4. METODE ODREĐIVANJA PARAPROTEINA .....	8
1.4.1. Elektroforeza proteina u serumu.....	8
1.4.2. Imunofiksacija .....	11
1.4.3. Kvantitativno određivanje slobodnih lakih lanaca imunonefelometrijom	12
2. CILJ .....	13
3. ISPITANICI I METODE .....	14
3.1. ISPITANICI .....	14
3.2. METODE .....	14
3.2.1. Kapilarna zonska elektroforeza serumskih proteina.....	14
3.2.2. Imunofiksacija seruma.....	15
3.2.3. Imunofiksacija urina.....	19
3.2.4. Određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca imunoglobulina u serumu	21
4. REZULTATI.....	22
4.1. REZULTATI ELEKTROFOREZE PROTEINA U SERUMU .....	22
4.2. REZULTATI IMUNOFIKSACIJE SERUMA.....	24
4.3. REZULTATI IMUNOFIKSACIJE URINA.....	25
4.4. REZULTATI ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE SLOBODNIH LAKIH LANACA IMUNOGLOBULINA U SERUMU .....	26
5. RASPRAVA .....	27
6. ZAKLJUČAK .....	30

7.	SAŽETAK.....	31
8.	SUMMARY .....	32
9.	LITERATURA.....	33
10.	ŽIVOTOPIS .....	35

# 1. UVOD

## 1.1. MONOKLONSKI IMUNOGLOBULINI

Plazma stanice proizvode imunoglobuline (antitijela) u svrhu borbe protiv infekcija i bolesti. Kao i ostale krvne stanice, plazma stanice počinju razvoj iz hematopoetskih matičnih stanica u koštanoj srži. Matične stanice se diferenciraju u limfoidne progenitorske stanice, koje tijekom prve (antigen neovisne) faze limfopoeze sazrijevaju u tri tipa morfološki sličnih ali funkcionalno različitih stanica, T i B-limfocite te NK stanice. Takvi djevičanski ili naivni B-limfociti dalje putuju do sekundarnih limfnih organa, limfnih čvorova, slezene i drugih, gdje se odvija susret sa stranim antigenom te započinje složen proces proliferacije i transformacije u plazma stanice. (1)

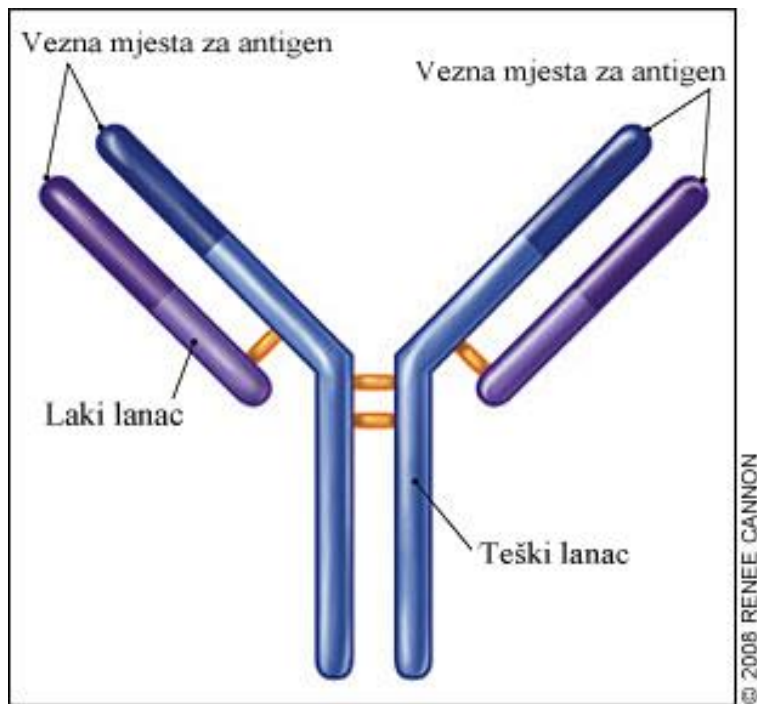


Slika 1. Podrijetlo plazma stanica i proizvodnja imunoglobulina kao odgovor na strani antigen. (1)

Molekule imunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgD i IgE sastoje se od dva teška (H - heavy) polipeptidna lanca gama, alfa, mu, delta ili epsilon te dva laka (L - light) polipeptidna lanca tipa kapa ( $\kappa$ ) ili lambda ( $\lambda$ ). Svaki klon plazma stanica proizvodi samo jedan tip teškog i lakog lanca koji je jednolik s obzirom na strukturu i funkciju., što znači da je imunoglobulin specifičan za samo jedan antigen. Kada dođe do maligne pretvorbe



javlja se klonalna proliferacija jednog ili više klonova diferenciranih B-limfocita, od kojih svaki stvara imunološki homogeni imunoglobulin (M-protein). (1,2,3)



Slika 2. Građa imunoglobulina. (1)

M-proteini ili paraproteini su izrazito raznovrsni te svaki od njih ima jedinstvenu varijabilnu regiju. Mogu se javiti u raznim oblicima, od pentamernih IgM molekula (~900,000 Daltona) do monomernih slobodnih lakih lanaca (~24,000 Daltona). Bolesti koje se povezuju s pojavom M-proteina ili paraproteina nazivaju se monoklonske gamapatije ili plazmastične diskrazije. Maligne monoklonske gamapatije uzrokovane diskrazijama plazma stanica su multipli mijelom, solitarni koštani plazmocitom i ekstramedularni mijelom. (3,4)

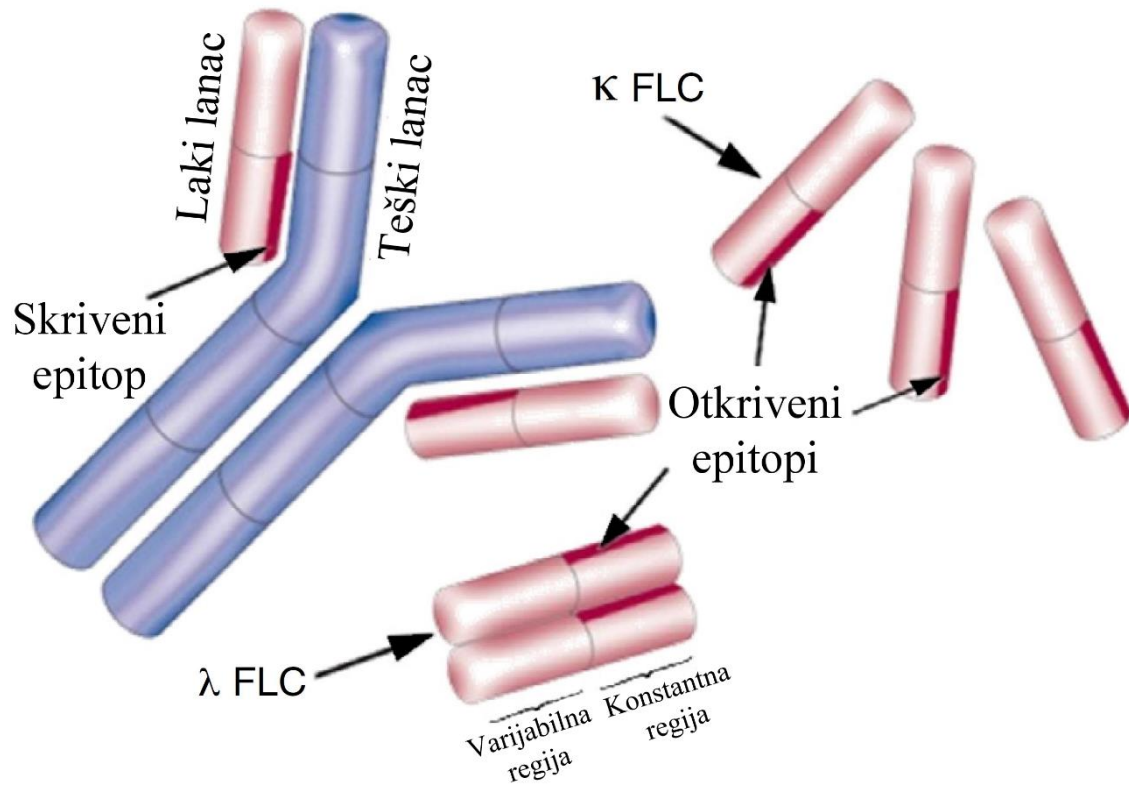
## 1.2. BENCE JONES PROTEIN

Bence Jones protein (BJP) ili monoklonski slobodni laki lanci su homogena populacija kapa ( $\kappa$ ) ili lambda ( $\lambda$ ) lakih lanaca imunoglobulina nevezanih za teški lanac.

(2) Sinteza BJP prilično je slična sintezi drugih imunoglobulina, čiji se teški lanci (H) i laki lanci (L) sintetiziraju na odvojenim poliribosomima i zatim spajaju u cisternama endoplazmatskog retikuluma. U normalnim uvjetima jedan teški i jedan laki lanac tvore HL međuproizvod koji se kombinira s drugom HL molekulom u potpuni imunoglobulin (H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>). (5)

Maligne plazma stanice mogu sintetizirati imunoglobuline prema tri osnovna obrasca a to su: (a) proizvodnja samo lakih lanaca, (b) uravnotežena sintezu teških i lakih lanaca i (c) neuravnotežena sintezu u kojoj se stvaraju i izlučuju intaktne molekule imunoglobulina i višak lakih lanaca. Prisutnost Bence Jones proteina u urinu ovisi o brzini sinteze te o količini sintetiziranih slobodnih lakih lanaca i bubrežnom statusu pacijenta. (5)

U serumu i urinu se nalaze kao monomeri niske molekularne mase, dimeri, ponekad tetrameri a moguće i polimeri visoke molekularne mase. Molekularna masa monomera je ~22,000 Daltona i sadrži 210-220 aminokiselina koje čine varijabilnu i konstantnu domenu. Bubrezi ih uklanjaju na sličan način kao i ostale proteine niske molekularne mase, procesom glomerularne filtracije, proksimalne renalne tubularne apsorpcije i katabolizmom unutar bubrežnih tubularnih stanica. Proteinurija se javlja tek nakon što je zasićen kapacitet tubularne apsorpcije (>10-30 g/dan). Nalaz BJP u urinu je gotovo uvijek znak malignog procesa. (2,6)



Slika 3. Intaktni imunoglobulin i slobodni laki lanci. (7)

### **1.3. MULTIPLI MIJELOM**

Multipli mijelom je maligna hematološka bolest koja se javlja kao posljedica nekontrolirane klonalne proliferacije plazma stanica. World Health Organization (WHO) svrstava multipli mijelom pod limfoproliferativne bolesti B-stanica. To je druga najčešća maligna hematološka bolest nakon non-Hodgkin limfoma. Najčešće se javlja kod starijih pacijenata i karakterizira je prisutnost intaktnih monoklonskih imunoglobulina i slobodnih lakih lanaca u serumu i/ili urinu. (4,8)

#### **1.3.1. Etiologija i patogeneza**

Točna etiologija multiplog mijeloma je nepoznata. Promjene i translokacije u promotorskim regijama gena, posebno na kromosomu 14, često se nalaze u multiplom mijelomu i vjerojatno doprinose razvoju bolesti. Translokacija t(4;14)(p16.3;q32.3) u promotorskim regijama gena FGFR3 i MMSET (Multiple Myeloma SET domain) nalazi se u otprilike 25% slučajeva multiplog mijeloma i ima onkogenu ulogu. (9) Drugi onkogeni kao što su NRAS, KRAS i BRAF također mogu sudjelovati u proliferaciji plazma stanica. Ostali čimbenici koji pridonose pojavi bolesti uključuju pretilost, konzumaciju alkohola, te okolišne uzroke kao što su insekticidi, organska otapala i izloženost zračenju. (10)

Multipli mijelom razvija se iz premalignog stadija koji se naziva monoklonska gamopatija neodređenog značaja (MGUS - monoclonal gammopathy of undetermined significance). MGUS ima nizak rizik maligne konverzije, s tim da rizik progresije nije vremenski ograničen. Mala podskupina pacijenata ima srednji klinički fenotip između MGUS-a i MM-a pa se smatra da imaju tinjajući multipli mijelom (SMM – Smoldering Multiple Myeloma). Oba stanja su često asimptomatska i otkrivaju se slučajno pronalaskom paraproteina odnosno monoklonskog proteina (M-proteina) u serumu ili Bence Jones proteina u urinu pacijenata sa širokim spektrom kliničkih stanja. (11)

Višak monoklonskih imunoglobulina može uzrokovati hiperviskoznost krvi, disfunkciju trombocita i oštećenje bubrežnih tubula, što može dovesti do neuroloških poremećaja, krvarenja i zatajenja bubrega. Zauzimanje koštane srži širenjem klona plazma stanica obično se manifestira kao anemija, trombocitopenija i leukopenija. Interakcija između stanica mijeloma i koštanog mikrokruženja u konačnici dovodi do aktivacije osteoklasta i supresije osteoblasta, što rezultira gubitkom koštane mase. (10)

### 1.3.2. Dijagnostički kriteriji

IMWG (International Myeloma Working Group) je 2014. redefinirao dijagnostičke kriterije za multipli mijelom kako bi se u svrhu dijagnostike i klasifikacije mogli koristiti specifični biomarkeri zajedno s već uspostavljenim CRAB kriterijima. (11)

U monoklonskoj gamapatiji neodređenog značaja (MGUS) koncentracija monoklonskog proteina je  $<30$  g/l, s postotkom monoklonskih plazma stanica  $<10\%$  bez dokaza multiplog mijeloma, drugih B-staničnih proliferativnih poremećaja ili amiloidoza. U asimptomatskom (tinjajućem) mijelomu M-protein je  $\geq 30$  g/l, a postotak klonalnih stanica  $\geq 10\%$ , ali nema povezanog oštećenja organa ili tkiva (ROTI - Related Organ or Tissue Impairment), što se obično očituje povišenom koncentracijom kalcija, bubrežnom insuficijencijom, anemijom ili koštanim lezijama (CRAB – Calcium, Renal insufficiency, Anemia, Bone lesions). (12)

Povijesno se dijagnoza multiplog mijeloma postavljala ako je postotak klonalnih plazma stanica u bioplatu koštane srži bio  $10\%$  ili veći, ili ako je biopsijom dokazan plazmocitom uz barem jedan od sljedećih CRAB kriterija:

- Povišena koncentracija kalcija u krvi - koncentracija kalcija u serumu  $0,25$  mmol/L iznad gornje granice normale ili veća od  $2,75$  mmol/L.
- Bubrežna insuficijencija – koncentracija kreatinina u serumu viša od  $176.8$   $\mu\text{mol/L}$  ili klirens kreatinina manji od  $40$  ml u minuti.
- Anemija – koncentracija hemoglobina manja od  $100$  g/L ili  $20$  g/L ispod donje granice normale.
- Koštane lezije - jedna ili više osteolitičkih lezija na radiografiji skeleta, CT-u ili PET-CT-u. Često se opisuju kao izbušene, okrugle, radiolucetne lezije. (10)

### 1.3.3. Laboratorijska dijagnostika multiplog mijeloma

Ne postoji jedinstveni test kojim se efektivno mogu dijagnosticirati i pratiti sve proliferativne bolesti plazma stanica, stoga je važno definirati strategiju kojom je moguće obuhvatiti cijeli spektar prezentacije bolesti. Tradicionalno se detekcija M-proteina bazira na razlikovanju monoklonskih od poliklonskih imunoglobulina koristeći elektroforezu na agaroznom gelu ili kapilarnu zonsku elektroforezu. Dodatno se za određivanje tipa teških i/ili lakih lanaca imunoglobulina može koristiti imunofiksacija i imunosubtraksijska elektroforeza. Imunonefelometrijskim metodama mogu se također detektirati i kvantificirati M-proteini, a i premostiti neke od nedostataka elektroforetskih metoda, kao što su poteškoće u detekciji niskih koncentracija monoklonskih proteina, nemogućnost identifikacije razreda i tipa M-proteina i moguća pojava interferencija drugih proteina seruma. (4)

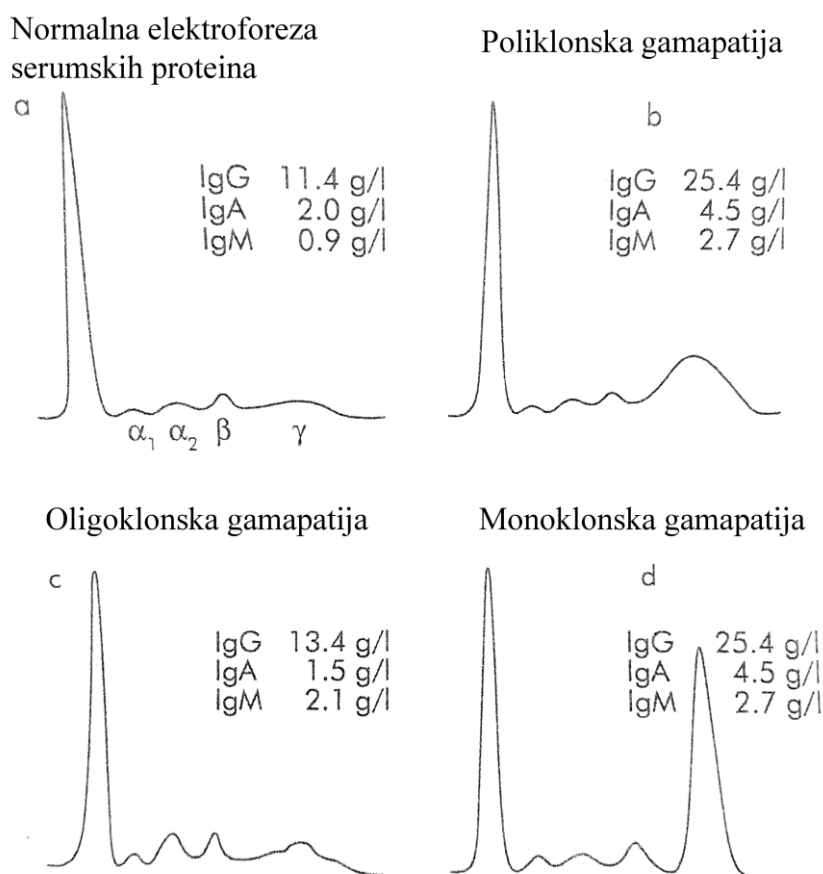
Sumnja na monoklonsku gamapatiju se javlja kod svih pacijenata koji imaju neobjašnjenu bol u leđima, osteolitičke lezije, osteopeniju, slabost, umor, anemiju, hiperkalcemiju, bubrežnu insuficijenciju, Bence Jones proteinuriju, učestale bakterijske infekcije, neobjašnjenu senzomotoričku perifernu neuropatiju, paresteziju te značajan gubitak tjelesne težine, posebno ako pacijent ima više od 50 godina. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) za dijagnostiku preporučuje sljedeće testove:

- Kompletna krvna slika (KKS) s diferencijalom krvnom slikom (DKS)
- Koncentracija ureje, kreatinina, elektrolita, albumina, kalcija u krvi
- LDH i beta-2 mikroglobulin u serumu
- Koncentracija serumskih imunoglobulina, elektroforeza serumskih proteina (SPEP), imunofiksacija seruma (SIFE)
- Proteini u 24-satnom urinu, elektroforeza proteina u urinu (UPEP), imunofiksacija urina (UIFE), laki lanci u serumu (FLC)
- CT cijelog tijela ili PET CT
- Aspirat i biopsija koštane srži, uključujući imunohistokemiju i/ili protočnu citometriju i citogenetiku
- FISH plazma stanica [del 13, del 17p13, t(4;14), t(11;14), t(14;16), amplifikacija 1q21, abnormalnost 1p] (3,10)

## 1.4. METODE ODREĐIVANJA PARAPROTEINA

### 1.4.1. Elektroforeza proteina u serumu

Elektroforeza serumskih proteina je tehnika separacije kod koje se proteini razdvajaju na agaroznom ili celuloza-acetatnom gelu prema njihovoj izoelektričnoj točki. M-protein se na acetatu javlja u vidu guste, oštre vrpce („band“), a nakon denzitometrijskog očitavanja kao uski vršak na elferogramu. Najčešće se javlja u gama frakciji serumskih proteina, no može se rjeđe pronaći i u beta te alfa frakciji. Limit detekcije ove metode ovisi o poziciji M-proteina u gradijentu serumskih proteina, posebno kod niskih koncentracija. Ako je M-protein IgE ili IgD tipa, ili se radi o lakim lancima, na elferogramu serumskih bjelančevina ne mora biti uočljiv oštri monoklonski vršak. (3)



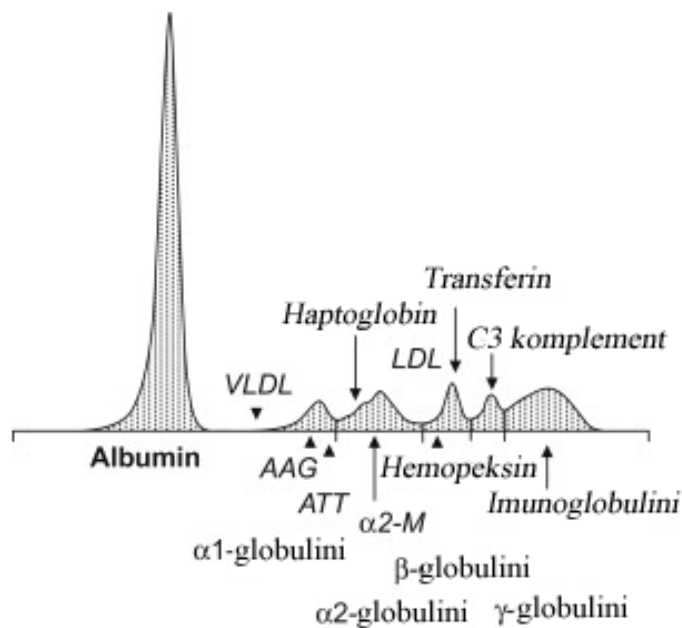
Slika 4. Elferogram serumskih proteina kod: a) zdrave osobe, b) poliklonske gamapatije c) oligoklonske gamapatije d) monoklonske gamapatije. (3)

Moguće je da se na elferogramu pojave vršci nalik na monoklonski imunoglobulin, odnosno artefakti prouzrokovani izvedbom analize ili takozvani „pseudo-M-gradijenti“ te ih je potrebno razlikovati od M-proteina. Pseudo-M-protein može se javiti u alfa-2 frakciji kao posljedica povećane koncentracije  $\alpha_2$ -makroglobulina u nefrotičkom sindromu, jako izraženim reakcijama akutne faze ili hiperlipoproteinemiji, dok se u alfa-2/beta frakciji može javiti zbog hemoglobin-haptoglobin kompleksa. (3)

Vršak se kao artefakt može javiti u beta-frakciji zbog hemolize, a u beta/gama frakciji na račun fibrinogena ako se za izvedbu metode koristi plazma umjesto seruma ili zbog bakterijske kontaminacije uzorka. U gama frakciji se može javiti zbog reumatoidnih faktora, ostarjelog ili uremičnog seruma, te kao posljedica visoke koncentracije lizozima u uzorku. (3)

Za određivanje paraproteina se ipak preporučuju visokorezolutne tehnike elektroforeze, budući da omogućuju bolje razdvajanje transferina i C<sub>3</sub> u beta području te bolje uočavanje niskih koncentracija M-proteina od  $\alpha_2$  do gama područja. Metodom izbora se smatra kapilarna zonska elektroforeza. (2)

Na slici 6 prikazan je elferogram s frakcijama serumskih proteina dobiven visoko rezolutnom elektroforetskom tehnikom kakva je kapilarna zonska elektroforeza.

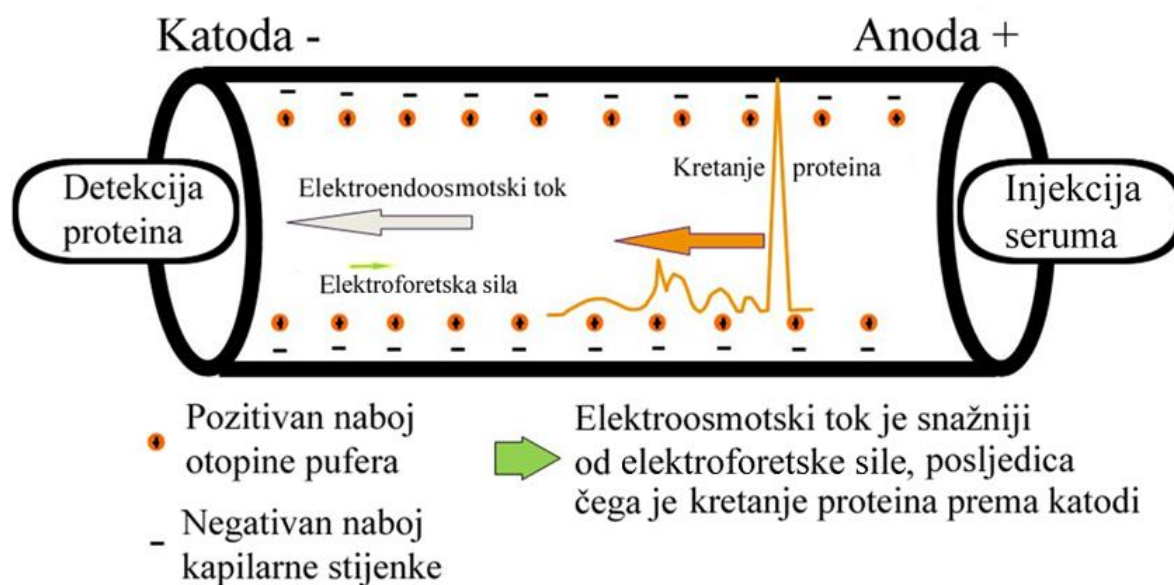


Slika 5. Elferogram proteina u serumu visoko rezolutne elektroforeze. (13)



Kapilarna zonska elektroforeza izvodi se u puferima visokog pH i visoke ionske jakosti kako bi se postigao negativan naboj na proteinima i smanjila njihova interakcija sa stijenkama kapilare. Odvija se unutar tekućeg sustava u kapilarama od topljenog silikata koje na svojoj unutarnjoj površini imaju negativan naboj. Separacija proteina se postiže na osnovi njihove elektroforetske mobilnosti, pH elektrolita i elektroosmotskog toka. (3,14)

Uzorak se aplicira na anodnom kraju kapilare i počinje postupak separacije pod visokim naponom. Međutim, negativno nabijeni proteini putuju prema negativno nabijenom polu (katodi) učinkom elektroendoosmoze uslijed vezivanja iona pufera za negativno nabijene silanolne skupine u stjenci kapilare, čime nastaje dvostruki sloj pokretnih iona. Elektroosmotski tok usmjerava ione ionskog dvosloja prema katodi, a u isto vrijeme povlači i ione vode i nabijene proteinske čestice. Kada se postigne separacija proteina, proteinske frakcije se određuju izravno mjerenjem absorbancije UV svjetla na 200-220 nanometara. Analitička osjetljivost metode je 0.6 g/L. (3,14)

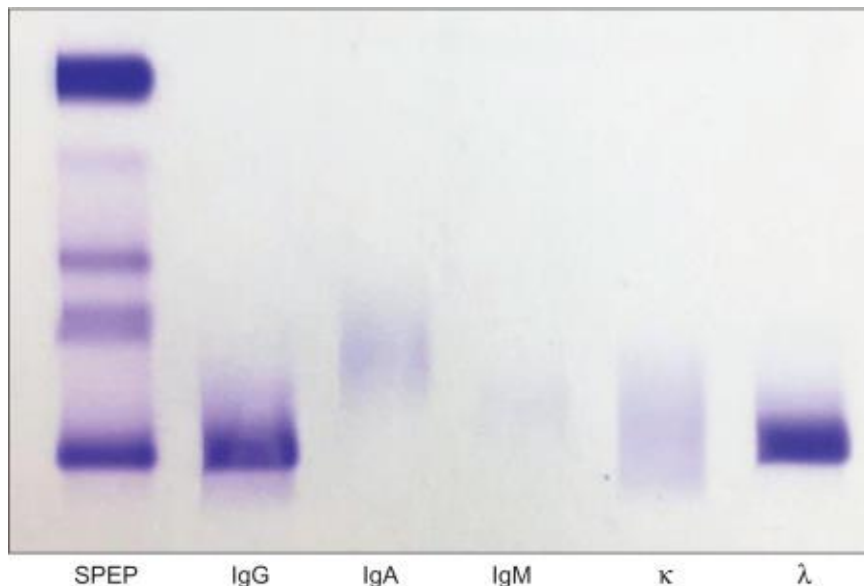


Slika 6. Kapilarna zonska elektroforeza. (2)

### 1.4.2. Imunofiksacija

Imunofiksacija (IFE – Immunofixation Electrophoresis) je kvalitativna metoda koja omogućuje ne samo detekciju već i klasifikaciju (identifikacija izotipa) te tipizaciju (određivanje tipa lakih lanaca) M-proteina. IFE je kombinacija elektroforeze i imunoprecipitacije. Nakon što se proteini na agaroznom gelu elektroforetski odvoje slijedi imunoprecipitacija dodavanjem odgovarajućih monovalentnih imunoglobulinskih antiseruma koji su specifični za konstantne regije teških ili lakih lanaca. Nastali imunokompleksi zaostaju na porama agaroznog gela. Nakon ispiranja viška neprecipitiranih proteina gelovi se boje bojom koja se veže za proteinske komplekse kako bi se mogle uočiti precipitacijske linije. Analitička osjetljivost metode je 0.6 g/L. (3)

U praksi se prvo izvodi imunofiksacija sa antiserumima na IgG, IgA i IgM te na lake lance  $\kappa$  i  $\lambda$ . Ako se nađu samo laki lanci bez odgovarajućeg teškog lanca izvodi se dodatna imunofiksacija s antiserumima na IgE i IgD. IFE serumskih proteina i urina se preporuča kod sumnje na multipli mijelom bez obzira na rezultate elektroforeze serumskih proteina, budući da M-protein može biti neuočljiv na elferogramu serumskih bjelančevina kod mijeloma lakih lanaca, IgD i IgE tipa mijeloma i ne-sekretornih mijeloma. (3,4)



Slika 7. Primjer imunofiksacije seruma s elektroforezom serumskih proteina (SPEP). M-protein IgG s  $\lambda$  lakim lancima. (15)

### **1.4.3. Kvantitativno određivanje slobodnih lakih lanaca imunonefelometrijom**

Imunonefelometrijska kvantifikacija imunoglobulina je jednostavna automatizirana metoda kojom je moguće mjeriti koncentraciju monoklonskih i poliklonskih imunoglobulina. Nije preporučena za prvotnu identifikaciju monoklonskih imunoglobulina budući da se kod manjih koncentracija javlja znatna količina poliklonske pozadine, no ima ulogu u detekciji i praćenju koncentracije lakih lanaca te visokih koncentracija IgG M-proteina (>30 g/L). Također je korisna kod mjerenja IgA M-proteina u slučaju kad je taj imunoglobulin migrirao u beta frakciju serumskih proteina. (4)

Načelo metode bazira se na miješanju uzorka sa reagensom koji sadrži polistirenske čestice obložene antitijelima za humane lake lance tipa  $\kappa$  ili  $\lambda$ . U uzorcima koji sadrže slobodne lake lance dolazi do aglutinacije skupina polistirenskih čestica i stvaranja zamućenja, što uzrokuje raspršivanje zrake svjetlosti koja prolazi kroz uzorak. Intenzitet raspršenog svijetla proporcionalan je koncentraciji slobodnih lakih lanaca u uzorku. (16)

Imunonefelometrijski testovi za kvantitativno određivanje slobodnih lakih lanaca koriste antiserume na epitope koji su otkriveni samo kada su laki lanci slobodni. Takvi antiserumi imaju otprilike 10,000 puta veći aviditet za slobodne lake lance u usporedbi s intaktnim imunoglobulinima, što znači da se koncentracija lakih lanaca može odrediti i u prisutnosti poliklonske pozadine. Određuje se koncentracija  $\kappa$  i  $\lambda$  slobodnih lakih lanaca te potom omjer koncentracija kako bi se mogla detektirati nebalansirana sinteza slobodnih lakih lanaca. Omjer sinteze  $\kappa:\lambda$  je otprilike 1.8:1, no zbog pojačanog klirensa  $\kappa$  lanaca medijan omjera je oko 0.9 (0.26-1.65). (4)

## **2. CILJ**

Cilj ovog rada je odrediti paraprotein u serumu i mokraći odabranih pacijenata s uputnom dijagnozom multiplog mijeloma koristeći različite laboratorijske metode i tehnike.

## **3. ISPITANICI I METODE**

### **3.1. ISPITANICI**

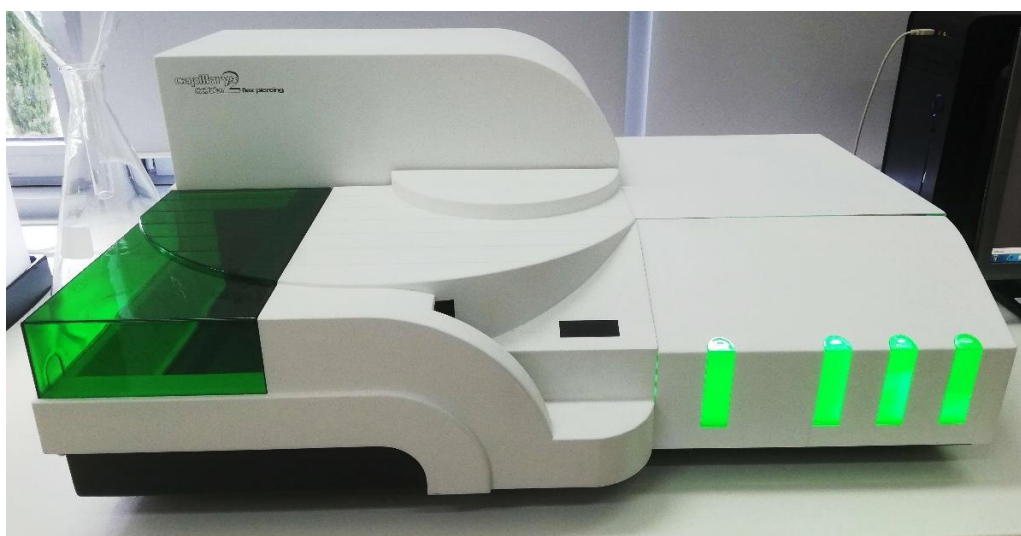
Izabrana su četiri pacijenta u dobi od 64-79 godina upućena u Zavod za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Split s uputnom dijagnozom multiplog mijeloma i zahtjevom za određene laboratorijske pretrage koje su uključivale elektroforezu serumskih proteina, imunofiksaciju serumskih proteina, određivanje Bence Jones proteina u urinu imunofiksacijom te određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu.

### **3.2. METODE**

Od pacijenata je postupkom venepunkcije prikupljen uzorak krvi. Uzorak venske krvi je neposredno nakon prikupljanja centrifugiran te je u svrhu ispitivanja odvojen i korišten serum. Također je prikupljen uzorak 24-satne mokraće. Alikvot uzorka 24-satne mokraće je centrifugiran te je u svrhu ispitivanja odvojen i korišten supernatant. Svi laboratorijski testovi su izvedeni u Zavodu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split.

#### **3.2.1. Kapilarna zonska elektroforeza serumskih proteina**

Kapilarna zonska elektroforeza je izvedena na analizatoru Capillarys 2 Flex Piercing proizvođača Sebia. (17)



Slika 8. Analizator Capillarys 2 Flex Piercing proizvođača Sebia.

**Uzorak:** Za analizu je korišten uzorak seruma.

**Postupak:** Elektroforeza serumskih proteina izvedena je automatiziranom metodom kapilarne zonske elektroforeze na analizatoru Capillarys 2 Flex Piercing. Radi se o više-parametarskom uređaju koji proteine seruma razdvaja koristeći osam paralelnih kapilara. Uzorci se apliciraju na anodnom kraju kapilara, u kojima se potom odvija razdvajanje proteina. Razdvojeni proteini se detektiraju na katodnom kraju kapilara mjerenjem absorbancije u UV području pri 200 nm. (17)

### 3.2.2. Imunofiksacija seruma

Kvalitativna detekcija i identifikacija monoklonskih proteina u serumu izvedena je metodom elektroforetske imunofiksacije na analizatoru Hydrasis 2 Scan Focusing proizvođača Sebia koristeći Hydragel 4 IF komplet reagenasa. Imunofiksacija je poluatomatizirani postupak, pojedine korake u postupku izvodimo ručno, a ostale obavlja uređaj. (18)

**Uzorak:** Za analizu je korišten uzorak seruma.

**Postupak:** Uzorak seruma je potrebno razrijediti prije aplikacije kako bi se izbjegao učinak visoke koncentracije antigena na postupak. Ako je ukupna koncentracija imunoglobulina >20 g/L preporučeno je koristiti veće razrjeđenje (osim za ELP traku). Ako je ukupna razina imunoglobulina <50 g/L preporučeno je koristiti manje razrjeđenje uzorka.

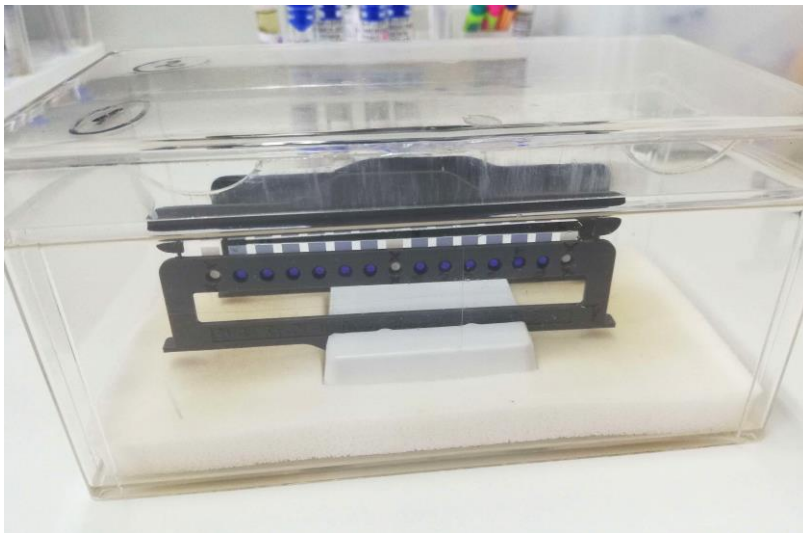
<b>TRAKE</b>	<b>SERUM (µL)</b>	<b>DILUENT (µL)</b>
IgG IF	20	100
ELP, IgA, IgM, κ i λ IF	30	60

Tablica 1. Preporučena razrjeđenja seruma za imunofiksaciju. (17)



Slika 9. Aplikatori s nanesenim uzorcima za imunofiksaciju.

Nakon razrjeđivanja seruma, u jažice aplikatora nanosi se 10  $\mu\text{L}$  odgovarajuće razrijeđenog uzorka. Aplikator se nakon punjenja postavlja u vlažnu komoru, zupcima okrenutim prema gore, te se pusti da uzorak difundira u zupce 5 minuta.



Slika 10. Aplikatori s nanesenim uzorcima u vlažnoj komori.

Za vrijeme difuzije uzorka postavljamo puferirane spužvice na nosač elektrode s plastičnom površinom okrenutom prema nosaču. Višak tekućine s gela lagano apsorbirano tankim filter papirom. Na ploču migracijskog modula ulijevamo 200  $\mu\text{L}$  destilirane vode te spuštamo gel i postavljamo aplikatore. Postupak elektroforeze je

automatizirani proces koji se izvodi na 20°C 9 minuta. Nakon što završi proces migracije vadimo i bacamo aplikatore, uklanjamo puferirane trake i namještamo predložak za aplikaciju antiseruma na gel.

Pomoću predloška na gel nanosimo 40  $\mu$ L otopine za fiksaciju na referentnu traku (ELP), a na ostale pozicije po 25  $\mu$ L odgovarajućeg antiseruma: anti- $\gamma$  (za IgG), anti- $\alpha$  (za IgA), anti- $\mu$  (za IgM), anti- $\kappa$  (za laki lanac kapa) i anti- $\lambda$  (za laki lanaca lambda) (slika 11).



Slika 11. Predložak na površini gela s nanesenim antiserumima.

Otopina za fiksaciju će fiksirati elektroforetski razdvojene proteine na referentnoj traci (ELP). Naneseni antiserumi reagirati će s odgovarajućim imunoglobulinima i lakim lancima u serumu ispitanika. Nastali imunokompleksi postaju vidljivi nakon bojanja. Nakon procesa imunofiksacije uklanjamo višak antiseruma i otopine za fiksaciju češljastim filter papirom, a zatim debelim filter papirom upijamo ne-precipitirane proteine sa gela. Gel se potom automatski kontrolirano suši na 50°C.

Nakon što je gel u potpunosti osušen premještamo ga u modul za vizualizaciju u kojem se vrši postupak bojanja. To je u potpunosti automatizirani proces koji se odvija u nekoliko koraka: faza bojanja od 4 minute, tri uzastopne faze ispiranja (prva od 3 minute, druga od 2 minute i zadnja od 6 minuta) i naposljetku faza sušenja gela na 80°C. Za



bojanje gela koristi se boja Acid Violet iz kompleta reagenasa koju je potrebno razrijediti destiliranom vodom prema uputi proizvođača. Gel je po završetku programa bojanja i sušenja spreman za interpretaciju. Rezultati se očitavaju vizualno.

### 3.2.3. Imunofiksacija urina

Kvalitativna detekcija i identifikacija Bence Jones proteina odnosno monoklonskih lakih lanaca kapa ili lambda tipa u uzorku mokraće izvedena je metodom elektroforetske imunofiksacije na analizatoru Hydrasis 2 Scan Focusing proizvođača Sebia koristeći Hydragel 4 Bence Jones komplet reagenasa. (19)

**Uzorak:** Za analizu je korišten nekoncentrirani uzorak 24-satnog urina.

**Postupak:** U jažice aplikatora nanosi se 10  $\mu\text{L}$  uzorka. Aplikator se nakon punjenja postavlja u vlažnu komoru, zupcima okrenutim prema gore, te se ostavlja da uzorak difundira u zupce 5 minuta.

Za vrijeme difuzije uzorka postavljamo puferirane spužvice na nosač elektrode s plastičnom površinom okrenutom prema nosaču. Višak tekućine s gela lagano se apsorbira tankim filter papirom. Na ploču migracijskog modula ulijevamo 200  $\mu\text{L}$  destilirane vode te spuštamo gel i postavljamo aplikatore. Postupak elektroforeze je automatizirani proces. Nakon što završi proces migracije vadimo i bacamo aplikatore, uklanjamo puferirane trake i namještamo predložak za aplikaciju antiseruma na gel.

Antiserumi se nanose prema oznakama na predlošku (antiserum iz bočice označene odgovarajućom bojom prema pripadajućoj boji na predlošku) u količini od 25  $\mu\text{L}$  za anti- $\kappa$  (antiserum za slobodne lake lance kapa) i anti- $\lambda$  (antiserum za slobodne lake lance lambda). Slobodni laki lanci iz uzorka ispitanika sudjeluju u imunoreakciji s antitijelima iz antiseruma, a nastali imunokompleksi postaju vidljivi nakon bojanja.

Nakon procesa imunofiksacije uklanjamo višak antiseruma češljastim filter papirom, a zatim debelim filter papirom upijamo ne precipitirane proteine sa gela. Gel se nakon toga kontrolirano suši automatiziranim postupkom.

Nakon što je gel u potpunosti osušen premještamo ga u modul za vizualizaciju u kojem se vrši postupak bojanja. Gel je po završetku programa bojanja i sušenja spreman za interpretaciju. Rezultati se očitavaju vizualno.



Slika 12. Analizator Hydrasis 2 Scan Focusing proizvođača Sebia.

### 3.2.4. Određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca imunoglobulina u serumu

Kvantitativno određivanje slobodnih lakih lanaca  $\kappa$  ili  $\lambda$  u serumu izvedeno je metodom imunonefelometrije na analizatoru Atellica NEPH 360 proizvođača Siemens Healthineers koristeći N Latex FLC kapa i N Latex FLC lambda komplet reagenasa. (16)

**Uzorak:** Za analizu je korišten uzorak seruma.

**Postupak:** Kvantitativno određivanje slobodnih lakih lanaca  $\kappa$  ili  $\lambda$  u serumu na analizatoru Atellica NEPH 360 je automatizirana metoda. U reagensu sadržane skupine polistirenskih čestica koje su obložene antitijelima za humane lake lance kapa ili lambda prilikom miješanja s uzorcima koji sadrže slobodne lake lance tvore aglutinate. Nastali aglutinanti uzrokuju raspršivanje zrake svjetlosti koja prolazi kroz uzorak i čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji slobodnih lakih lanaca u uzorku. (16)



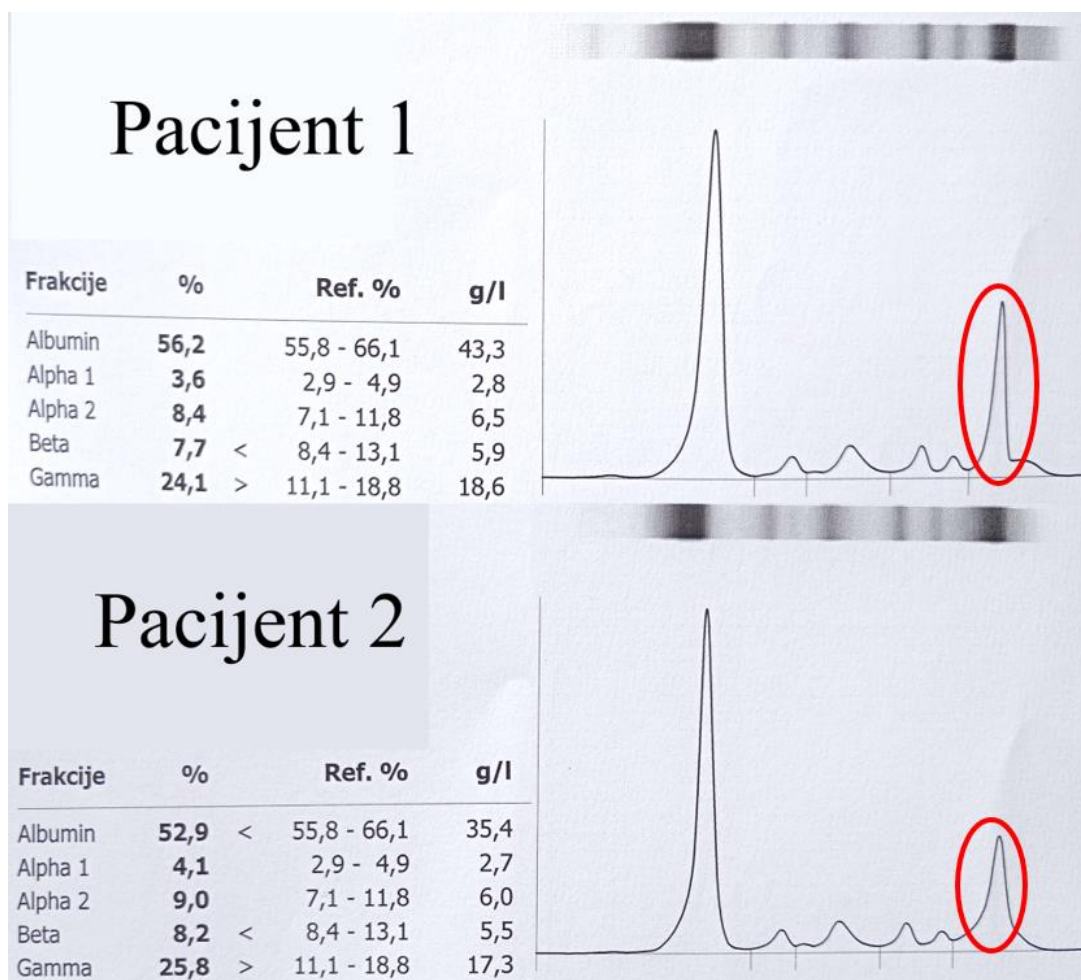
Slika 13. Analizator Atellica NEPH 360 proizvođača Siemens Healthineers.

## 4. REZULTATI

### 4.1. REZULTATI ELEKTROFOREZE PROTEINA U SERUMU

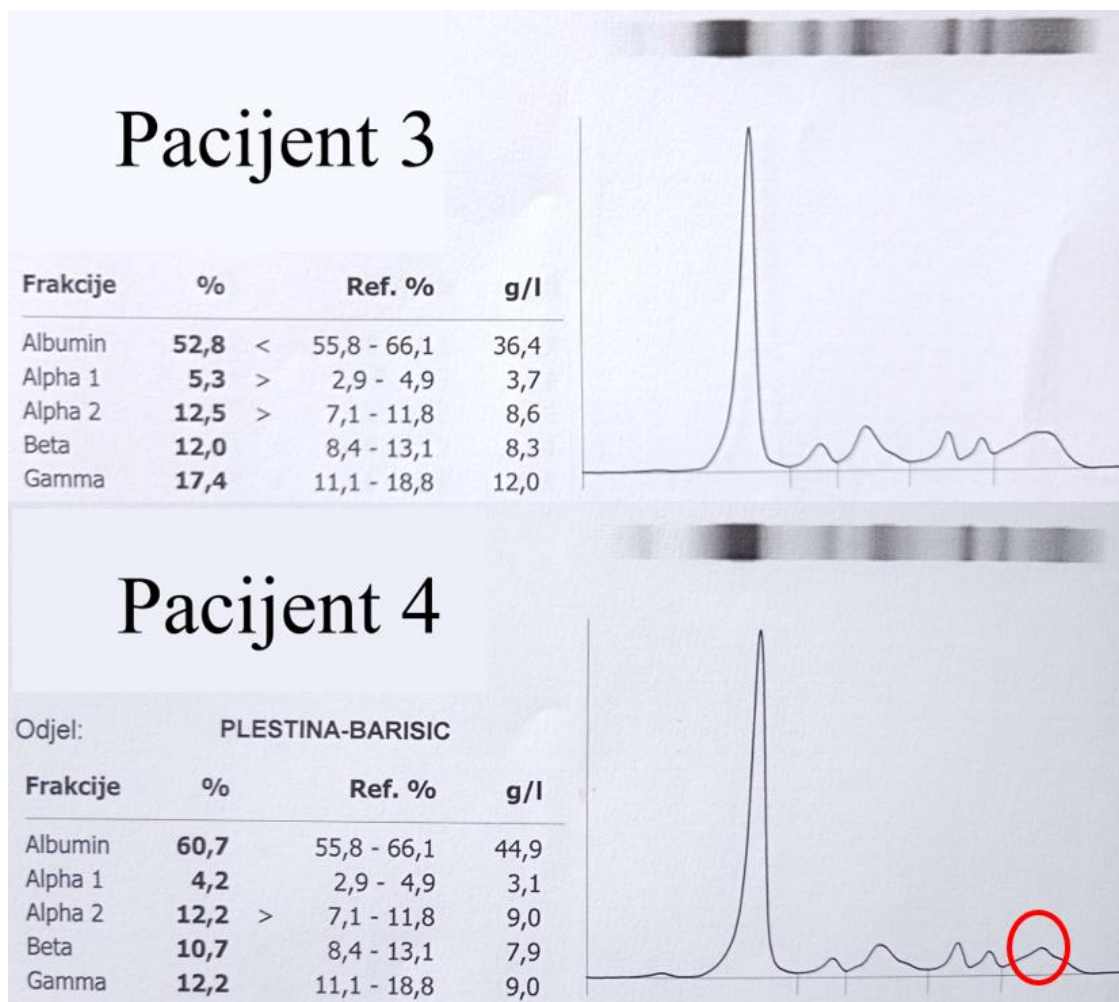
Na elferogramu dvojice od četvero pacijenata (pacijent 1 i 2) dobivenih elektroforezom proteina seruma uočen je visoki uski vršak u gama frakciji (slika 14) kao i kod pacijenta 4 koji ima nešto manji vršak (slika 15). Prisutnost vrška u gama frakciji na elferogramu serumskih proteina odabranih pacijenata predstavlja sumnju na prisutnost M-proteina. Elferogram pacijenta 3 ne pokazuje oštri vršak.

Elektroforeza serumskih proteina također daje uvid u odnose pojedinih frakcija proteina te njihove koncentracije. Osim povišenog udjela gama frakcije kod pacijenta 1 je uočen smanjeni udio beta frakcije, a kod pacijenta 2 smanjeni udio albumina i beta frakcije.



Slika 14. Elektroforeza serumskih proteina i elferogram pacijenata 1 i 2.

Kod pacijenta 3 nije uočen povišeni udio gama frakcije, već smanjeni udio albumina te povišeni udio alfa 1 i alfa 2 frakcija. Kod pacijenta 4 unatoč prisutnosti vrška na elferogramu nije uočen povišeni udio gama frakcije, već samo povišeni udio alfa 2 frakcije.

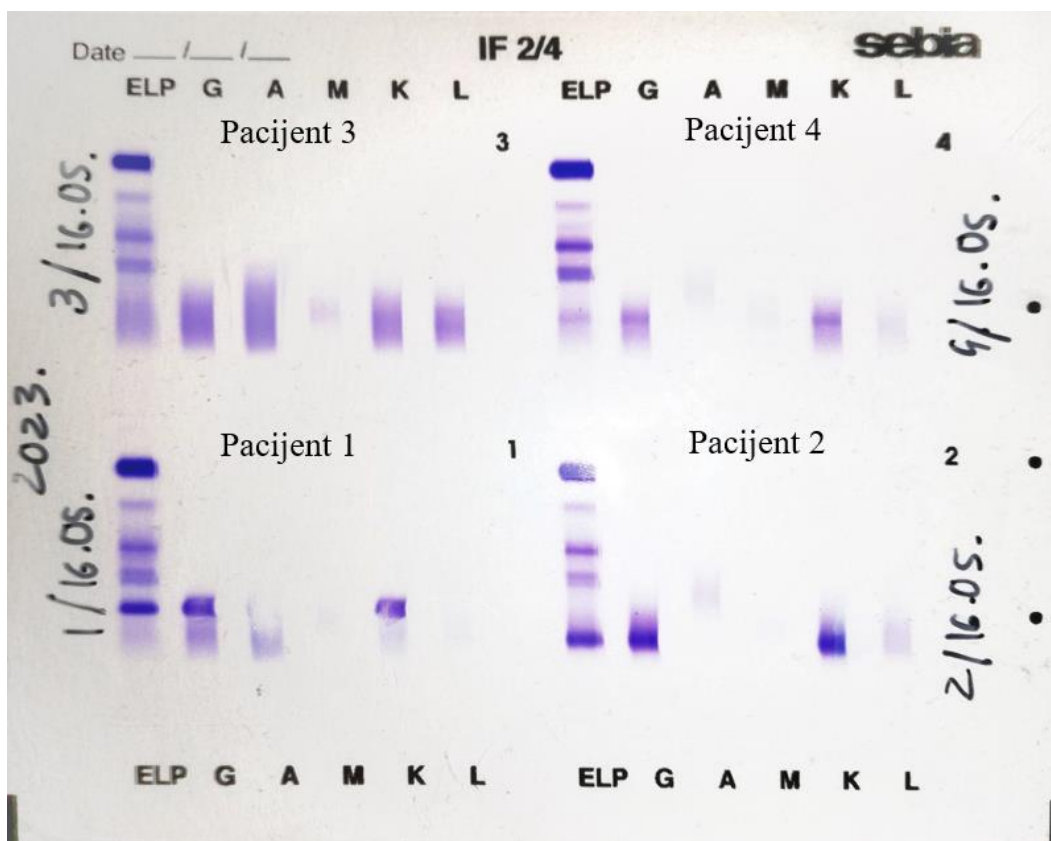


Slika 15. Elektroforeza serumskih proteina i elferogram pacijenata 3 i 4.

## 4.2. REZULTATI IMUNOFIKSACIJE SERUMA

Uzorci seruma svih odabranih pacijenata podvrgnuti su imunofiksaciji kako bi se ispitala sumnja na prisutnost M-proteina te odredio razred i tip ukoliko je M-protein prisutan. Postupkom imunofiksacije dokazana je prisutnost monoklonskog proteina u serumima trojice pacijenata od ukupno četvoro ispitivanih. Kod pacijenta 1, 2 i 4 uočene su monoklonske oštre vrpce u gama području elektroforeze serumskih proteina. Pojava oštih vrpca u području imunoglobulina G i kapa lakih lanaca nakon imunoreakcije dokazuje da se kod sva tri pacijenta radi o M-proteinu IgG kapa tipa.

Kod pacijenta 3 nije uočena monoklonska oštra vrpca u gama području elektroforeze proteina, a također ni u jednoj imunofiksacijskoj traci. Stoga kod pacijenta 3 nije dokazana prisutnost monoklonskog proteina.

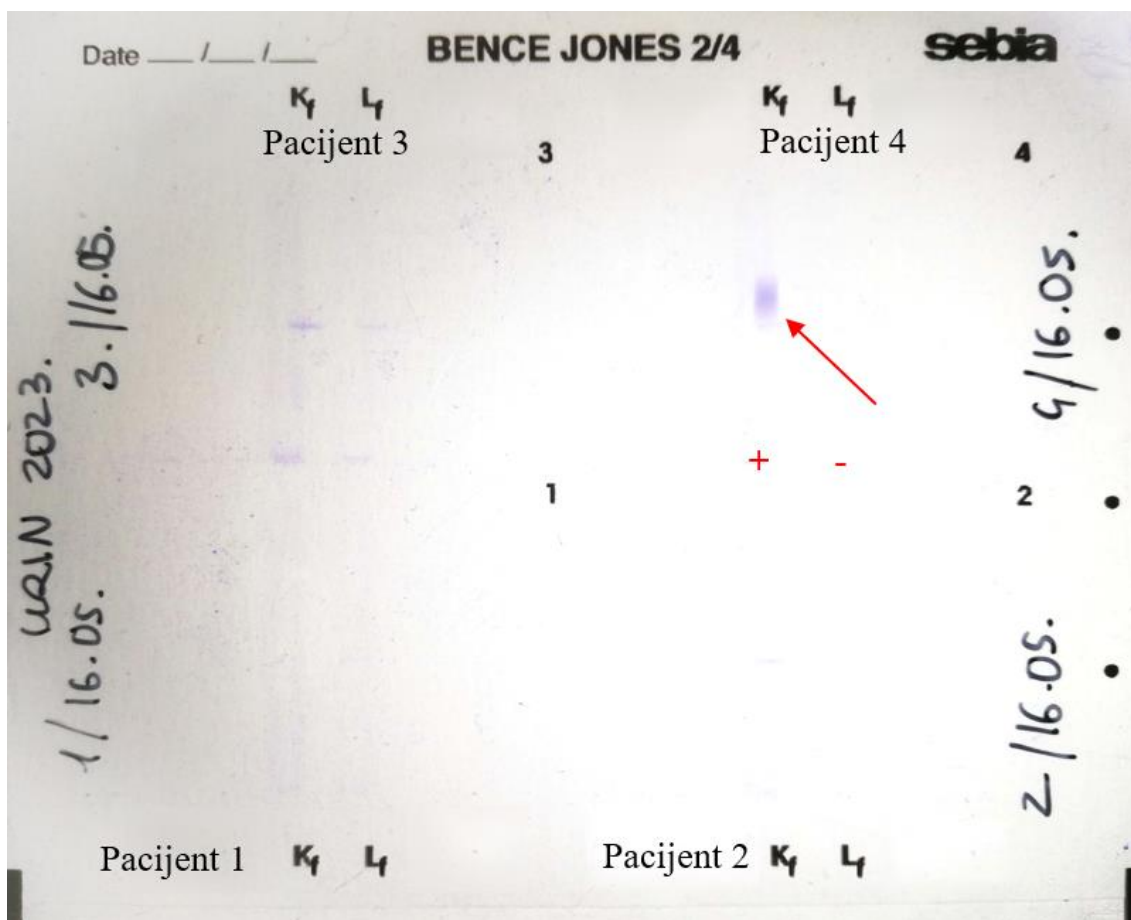


Slika 16. Imunofiksacija serumskih proteina pacijenata 1-4.

### 4.3. REZULTATI IMUNOFIKSACIJE URINA

Kod samo jednog pacijenta od četiri odabrana dokazana je prisutnost Bence Jones proteina postupkom imunofiksacije u uzorku 24-satnog urina. Imunoreakcija s antiserumom za slobodne kapa lake lance vidljiva kao vrpca u području slobodnih kapa lakih lanaca dokaz je prisutnosti Bence Jones proteina tipa kapa kod pacijenta 4 (slika 17). Dokazano je da se kod tog pacijenta radi o Bence Jones proteinu kapa tipa.

Kod preostala tri pacijenta nije dokazana prisutnost Bence Jones proteina.



Slika 17. Imunofiksacija Bence Jones proteina u urinu 1-4.



#### **4.4. REZULTATI ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE SLOBODNIH LAKIH LANACA IMUNOGLOBULINA U SERUMU**

U tablici 2 prikazane su koncentracije slobodnih lakih lanaca kapa i lambda u serumu odabranih pacijenata kao i omjeri koncentracija (kapa/lambda).

<b>PACIJENT</b>	<b>Kapa (mg/L)</b>	<b>Lambda (mg/L)</b>	<b>Omjer kapa/lambda</b>
1	<b>19,2</b>	<b>11,7</b>	<b>1,641</b>
2	<b>15,4</b>	<b>16,7</b>	<b>0,922</b>
3	<b>22,1</b>	<b>26,1</b>	<b>0,847</b>
4	<b>222</b>	<b>8,19</b>	<b>27,106</b>

Tablica 2. Rezultati određivanja koncentracije slobodnih lakih lanaca imunoglobulina u serumu pacijenata 1-4.

Koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu kod odabranih pacijenata su unutar granica referentnog intervala, osim kod pacijenta 4, kod kojeg je izmjerena izrazito povišena koncentracija slobodnih kapa lanaca (referentni interval 6,7-22,4 (mg/L)) i blago snižena koncentracija slobodnih lambda lanaca (referentni interval 8,3-27,0 (mg/L)). Kod dvoje pacijenata (1 i 4) uočen je povišeni omjer koncentracija slobodnih lakih lanaca kapa/lambda (referentni interval 0,31-1,56), s time da je kod pacijenta 4 izrazito povišen, a kod pacijenta 1 samo blago povišen.

## 5. RASPRAVA

Dijagnostička procjena multiplog mijeloma obuhvaća razne laboratorijske pretrage, uključujući elektroforezu proteina seruma, imunofiksaciju seruma, imunofiksaciju urina i određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca imunoglobulina u serumu.

Elektroforeza serumskih proteina je prikladna metoda probira koja nam omogućuje otkrivanje pacijenata sa sumnjom na prisutnost M-proteina, koji je ujedno i jedna od glavnih karakteristika multiplog mijeloma. Prisutnost monoklonskog proteina se opaža pojavom oštrog vrška na elferogramu, najčešće u gama ili beta frakciji. Kod trojice od četiri ispitanika uočen je oštri vršak u gama frakciji serumskih proteina. Kod dvojice od tih ispitanika (pacijent 1 i 2) prisutan je uski i visok vršak karakterističan za monoklonski protein, a kod trećeg (pacijent 4) je vršak malen, ali još uvijek jasno uočljiv te stoga upućuje na moguću prisutnost M proteina.

Kod pacijenta 3 se ne uočava vrpca u elektroforezi karakteristična za monoklonski protein kao ni vršak na elferogramu serumskih proteina. Međutim, odsutnost uskog i oštrog vrška na elferogramu ne isključuje uvijek prisutnost monoklonskog imunoglobulina. Kod niske serumske koncentracije M-proteina, kao što je često slučaj kod mijeloma lakih lanaca i IgD te IgE tipa mijeloma (3), ne mora ni biti uočljiv vršak na elferogramu. Stoga bez obzira na nalaz elektroforeze, pacijentima s kliničkom slikom koja upućuje na multipli mijelom treba uraditi imunofiksaciju seruma.

Budući da se na elferogramu elektroforeze serumskih proteina mogu pojaviti i vršci nalik onima uzrokovanim prisutnošću monoklonskih proteina, slijedeći korak u obradi pacijenata sa suspektnim vrškom na elferogramu serumskih proteina je utvrditi je li taj karakterističan nalaz elektroforeze serumskih proteina uistinu uzrokovan prisutnošću M-proteina. U tu svrhu primjenjuje se imunofiksacija seruma odnosno elektroforetska imunofiksacija s ciljem potvrde prisutnosti monoklonskog proteina kao i određivanjem razreda i tipa M-proteina ili pak odbacivanja sumnje na prisutnost monoklonskog proteina.

Kod sva tri pacijenta sa suspektnim vrškom u gama frakciji potvrđena je prisutnost monoklonskog imunoglobulina. U sva tri uzorka je nađen monoklonski protein IgG kapa

tipa. Kod pacijenta s nalazom elektroforeze serumskih proteina bez suspektog vrška, (pacijent 3) imunofiksacijom seruma nije dokazan monoklonski protein.

Metoda određivanja Bence Jones proteina u urinu također se temelji na principu imunofiksacije. Prisutnost slobodnih lakih lanaca u urinu potvrđena je u uzorku samo jednog ispitanika (pacijent 4). Nađen je kapa tip slobodnih lakih lanaca što je i očekivano obzirom da je imunofiksacija seruma istog pacijenta otkrila monoklonski protein IgG tipa kapa.

Bence Jones proteinurija je prisutna u oko 60% pacijenata koji boluju od multiplog mijeloma, a kod 20% pacijenata isključivo se sintetizira Bence Jones protein bez pratećih teških lanaca imunoglobulina. Prekomjerno izlučivanje Bence Jones proteina putem urina uzrokuje akutno oštećenje bubrega zbog tubularne opstrukcije i tubulointersticijske upale, tj. tubularne nefropatije. (6)

Imunonefelometrija je metoda izbora za kvantitativno određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca, što nam ujedno omogućuje i određivanje omjera koncentracija slobodnih lakih lanaca kapa/lambda. Koncentracija slobodnih lakih lanaca je vrlo osjetljiv pokazatelj procjene slobodnih lakih lanaca u cirkulaciji s omjerom koncentracija kapa/lambda kao odličnim indikatorom klonalne ekspanzije i proliferacije plazma stanica. Oba pokazatelja i koncentracija pojedinih slobodnih lakih lanaca kao i omjer njihovih koncentracija imaju značajnu dijagnostičku prediktivnu vrijednost kod gotovo svih poremećaja plazma stanica te nam omogućavaju procjenu rizika progresije MGUS-a u multipli mijelom i praćenje odgovora na terapiju. (3)

Omjer koncentracija slobodnih lakih lanaca kapa/lambda u serumu ima gotovo 100%-tnu osjetljivost kod otkrivanja ne-sekretornog mijeloma, budući da je kod njega omjer kapa/lambda uvijek abnormalan, čak i u odsutnosti M-proteina, što ovu pretragu čini vrlo pogodnom za praćenje oligoklonalnih i ne-sekretornih tipova multiplog mijeloma. (20) Iako je određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu vrlo korisno kod probira i dijagnoze multiplog mijeloma nije preporučeno koristiti je u svrhu praćenja odgovora na terapiju kod pacijenata s mjerljivom koncentracijom M-proteina u serumu i/ili urinu ( $>10$  g/L u serumu ili  $>200$  mg/24h u urinu). (3)

Kod dvojice ispitanika (pacijent 1 i 4) je utvrđeno da dolazi do neravnomjerne sinteze dvaju tipova lakih lanaca. Kod pacijenta 1 ukupne koncentracije pojedinog tipa slobodnog lakog lanca su u granicama normale, no sintetiziraju se nešto veće količine slobodnih kapa lanaca, što rezultira blago povišenim omjerom koncentracija kapa/lambda i sukladno je nalazu monoklonskog proteina IgG tipa kapa. Kod pacijenta 4 izrazito je povišena koncentracija slobodnih kapa lanaca, te je blago snižena koncentracija slobodnih lambda lanaca. Omjer koncentracija slobodnih lakih lanaca kapa/lambda je također izrazito povišen.

Povišena koncentracija slobodnih kapa lakih lanaca i povećan omjer koncentracija slobodnih lakih lanaca kapa/lambda kod pacijenta 4 također su sukladni nalazu imunofiksacije seruma ali i nalazu imunofiksacije urina kojom je potvrđena prisutnost Bence Jones proteina tipa kapa.

Pacijentu kojem nije dokazana prisutnost monoklonskog proteina u serumu kao ni Bence Jones proteina u urinu (pacijent 3) izmjerene su normalne koncentracije slobodnih lakih lanaca kao i njihov omjer. Stoga kod ovog pacijenta niti jedna korištena metoda nije ukazala na prisutnost monoklonskog proteina te se može zaključivati da se radi o pacijentu liječenom od multiplog mijeloma u remisiji ili o pacijentu sa sumnjom na multipli mijelom kojem laboratorijskom dijagnostikom nije potvrđena bolest.

Naime, izostanak suspektog vrška u elektroforezi proteina seruma, negativan nalaz imunofiksacije seruma i urina te koncentracije slobodnih lakih lanaca i njihov omjer unutar granica referentnog intervala su indikatori potpunog odgovora (CR – complete response) na terapiju, tj. potpune remisije bolesti. (3)

Ukoliko laboratorijskim pretragam nije potvrđena sumnja na multipli mijelom kod pacijenta, potrebno je razmotriti druge bolesti sa sličnom kliničkom slikom.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Elektroforezom proteina u serumu moguće je opaziti monoklonsku vrpca te posumnjati na prisutnost monoklonskog proteina u serumu. Monoklonska vrpca uočena je kod trojice od ukupno četvero ispitivanih pacijenata.
2. Metodom imunofiksacije seruma moguće je potvrditi prisutnost M-proteina u serumu pacijenta i istodobno odrediti razred i tip M proteina. Potvrđeno je prisustvo monoklonskog proteina IgG kapa kod sva tri pacijenata sa suspektnom vrpcom u elektroforezi serumskih proteina.
3. Imunofiksacijom uzorka 24-satnog urina moguće je detektirati prisutnost Bence Jones proteina u urinu i odrediti tip lakih lanaca koji se izlučuju. Bence Jones proteinurija potvrđena je u jednom od četiri uzorka te je dokazan kapa tip lakih lanaca.
4. Imunonefelometrijsko određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu i određivanje omjera koncentracija slobodnih lakih lanaca kapa/lambda koristi se za identifikaciju poremećaja plazma stanica, te kao važan alat u praćenju statusa bolesti i odgovora na terapiju. Povišena koncentracija slobodnih lakih lanaca tipa kapa uočena je kod jednog od četiri ispitanika koji uz još jednog ispitanika ima i povećan omjer koncentracija slobodnih lakih lanaca sukladno ostalim urađenim laboratorijskim pretragama koje upućuju na poremećaj plazma stanica.

## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Multipli mijelom je maligna hematološka bolest koja se javlja kao posljedica nekontrolirane klonalne proliferacije plazma stanica. Najčešće se javlja kod starijih pacijenata i karakterizira je prisutnost paraproteina odnosno monoklonskog imunoglobulina ili njegovih fragmenata slobodnih lakih lanaca u serumu i/ili urinu. Bence Jones proteini su monoklonski slobodni laki lanci imunoglobulina, kapa i lambda koji se koriste kao važan biljeg u dijagnostici multiplog mijeloma. Laboratorijska dijagnostika multiplog mijeloma obuhvaća razne laboratorijske pretrage, uključujući elektroforezu proteina seruma, imunofiksaciju seruma, imunofiksaciju urina i određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca imunoglobulina u serumu.

**Cilj rada:** Svrha ovog rada bila je odrediti paraprotein u serumu i mokraći odabranih pacijenata s uputnom dijagnozom multiplog mijeloma koristeći različite laboratorijske metode i tehnike.

**Materijali i metode:** Izabrani su uzorci seruma i 24-satnog urina četiri pacijenata s uputnom dijagnozom multiplog mijeloma upućena u Zavod za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split na laboratorijsku obradu koja je uključivala elektroforezu proteina u serumu, imunofiksaciju seruma i urina te određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu.

**Rezultati:** Kod trojice pacijenata uočen je suspektan monoklonski vršak na elferogramu serumskih proteina te je metodom imunofiksacije seruma dokazan monoklonski proteina IgG kapa tipa. Imunofiksacijom urina dokazana je prisutnost Bence Jones proteina u jednom od četiri uzorka. Povišena koncentracija slobodnih lakih lanaca dokazana je u jednom od četiri uzoraka, a povišeni omjer koncentracija slobodnih lakih lanaca kapa/lambda u dva od četiri uzoraka.

**Zaključak:** Paraprotein ili M-protein je dokazan trojici od četiri pacijenta s uputnom dijagnozom multiplog mijeloma.

**Ključne riječi:** multipli mijelom; monoklonski protein; elektroforeza; imunofiksacija

## 8. SUMMARY

**Introduction:** Multiple myeloma is a malignant hematological disease that occurs as a result of uncontrolled clonal proliferation of plasma cells. It occurs most often in elderly patients and is characterized by the presence of monoclonal immunoglobulin and free light chains in serum and/or urine. Bence Jones proteins are monoclonal free immunoglobulin light chains, kappa and lambda, which are used as an important marker in the diagnosis of multiple myeloma. Laboratory diagnosis of multiple myeloma includes various laboratory tests, including serum protein electrophoresis, serum immunofixation, urine immunofixation, and measurement of serum free light chain concentration.

**Objective:** The purpose of the study was to examine paraprotein in the serum and urine of selected patients with a referral diagnosis of multiple myeloma using different laboratory methods and techniques.

**Materials and methods:** Serum and 24-hour urine samples of four patients with a referral diagnosis of multiple myeloma received at the Department of Medical Laboratory Diagnostics of UHC Split were selected for laboratory testing, which included serum protein electrophoresis, serum and urine immunofixation, and measurement of the concentration of free light chains in serum.

**Results:** A suspected monoclonal peak was observed in serum protein electrophoresis for three of four patients, and using the serum immunofixation method, a monoclonal IgG kappa type protein was identified. Urine immunofixation proved the presence of Bence Jones protein in one of the four samples. An elevated concentration of free light chains was demonstrated in one of four samples, and an elevated concentration ratio of free light chains kappa/lambda was observed for two of the four samples.

**Conclusion:** Paraprotein or M-protein was demonstrated for three out of four patients with a referral diagnosis of multiple myeloma.

**Key words:** multiple myeloma; monoclonal protein; electrophoresis; immunofixation

## 9. LITERATURA

1. Nau KC, Lewis WD. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2008 Oct 1;78(7):853–9.
2. Danica M. Suvremena laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija. *Lab Dijagnostika Monoklonskih Gamapatija – 2014*. 2014;17–30.
3. Thomas Lothar. Monoclonal Immunoglobulins. In: *Proteins in Clinical and Laboratory Medicine: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*. First Edition. Frankfurt/Main, Germany: Th-Books Verlagsgesellschaft GmbH; 2008. p. 152–74.
4. Willrich MAV, Katzmann JA. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Clin Chem Lab Med CCLM*. 2016 Jun 1;54(6):907–19.
5. Deegan MJ. Bence Jones Proteins: Nature, Metabolism, Detection and Significance.
6. Ramakrishnan N, Jialal I. Bence-Jones Protein. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citirano 2.8.2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541035/>
7. Hungria VT de M, Allen S, Kampanis P, Soares EM. Serum free light chain assays not total light chain assays are the standard of care to assess Monoclonal Gammopathies. *Rev Bras Hematol E Hemoter*. 2016 Feb;38:37–43.
8. Gerecke C, Fuhrmann S, Striffler S, Schmidt-Hieber M, Einsele H, Knop S. The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma. *Dtsch Arztebl Int*. 2016 Jul;113(27–28):470–6.
9. Chesi M, Nardini E, Lim RS, Smith KD, Kuehl WM, Bergsagel PL. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood*. 1998 Nov 1;92(9):3025–34.
10. Albagoush SA, Shumway C, Azevedo AM. Multiple Myeloma. In: *StatPearls [Internet] [Internet]*. StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 May 1]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534764/>
11. Rajkumar SV. Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016 May;(36):e418–23.
12. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*. 2003 Jun;121(5):749–57.
13. Dasgupta A, Wahed A. Chapter 22 - Protein Electrophoresis and Immunofixation. In: Dasgupta A, Wahed A, editors. *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control [Internet]*. San Diego: Elsevier; 2014 [citirano 3.8.2023.]. p. 391–406.



Dostupno

na:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012407821500022X>

14. Opallage PM, De Silva M, Dunn RC. Dual detection high-speed capillary electrophoresis for simultaneous serum protein analysis and immunoassays. *Sci Rep.* 2022 Feb 4;12(1):1951.
15. Wiencek JR, Duh SH, Christenson RH. Chapter 22 - Proteins: analysis and interpretation in serum, urine, and cerebrospinal fluid. In: Clarke W, Marzinke MA, editors. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition)* [Internet]. Academic Press; 2020 [citirano 5.8.2023.]. p. 365–90. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128154991000223>
16. Siemens. N Latex FLC kappa/N Latex FLC lambda. Siemens; 2019.
17. Sebia. Instruction Sheet: Capillarys Protein(E) 6 Ref. 2003 Ref. 2023. Sebia; 2013.
18. Sebia. Instruction Sheet: Hydragel 4 IF Acid Violet Ref. 4804. Sebia; 2021.
19. Sebia. Instruction Sheet: Hydragel 4 Bence Jones ref. 4824. Sebia; 2021.
20. De Novellis D, Fontana R, Carobene A, Serio B, Ferrara I, Martorelli MC, et al. Serum Free Light-Chain Ratio at Diagnosis Is Associated with Early Renal Damage in Multiple Myeloma: A Case Series Real-World Study. *Biomedicines.* 2022 Jul 10;10(7):1657.

## 10. ŽIVOTOPIS

### **OSOBNI PODACI:**

Ime i prezime: Lana Bogović

Datum, godina i mjesto rođenja: 18.12.1999., Varaždin

### **OBRAZOVANJE:**

Visokoškolsko obrazovanje: Rujan 2020. – Rujan 2023.

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Split

Preddiplomski sveučilišni studij

Smjer: Medicinsko Laboratorijska Dijagnostika

Srednjoškolsko obrazovanje: Rujan 2014. – Svibanj 2018.

Medicinska škola Varaždin, Varaždin

Smjer: Zdravstveno-laboratorijski tehničar

Osnovnoškolsko obrazovanje: Rujan 2006. – Lipanj 2014.

III. osnovna škola Varaždin, Varaždin

### **RADNO ISKUSTVO:**

Opća bolnica Varaždin: Medicinsko biokemijski laboratorij (Studeni 2018.– Studeni 2019.)

### **ZNANJA I VJEŠTINE:**

Engleski jezik: Aktivno znanje

Njemački jezik: Aktivno znanje

Rad na računalu: Microsoft Office (Word, Power Point, Excel)