

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Výskyt maligních monoklonálních gamapatií u
pacientů vyšetřovaných v Oblastní nemocnici Jičín a.s.**

Bc. Eliška Trejbalová

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Monika Mašková

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

Poděkování

Ráda bych vyjádřila vděčnost vedoucí mé diplomové práce doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D., za její podporu, cenné rady a trpělivost během celého procesu tvorby této diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat Oddělení klinické biochemie Oblastní nemocnice Jičín a.s., které poskytlo prostředí pro provádění experimentální části mého výzkumu. Mé upřímné poděkování patří také Mgr. Monice Maškové, za její odborné rady, které přispěly k lepšímu porozumění danému tématu a tím i vylepšení zejména praktické části diplomové práce a dále za věnovaný čas. Nemohu zapomenout na podporu mé rodiny během celého studia. Děkuji všem, kteří se jakýmkoliv způsobem podíleli na realizaci této práce.

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Podpis

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Eliška Trejbalová

Školitel: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Monika Mašková

Název diplomové práce: Výskyt maligních monoklonálních gamapatií u pacientů
vyšetřovaných v Oblastní nemocnici Jičín a.s.

Monoklonální gamapatie zahrnují onemocnění postihující B linii krevních buněk maligního i nemaligního původu, jejichž společným znakem je výskyt M-proteinu v séru nebo v moči pacienta. Maligní monoklonální gamapatie jsou stejně jako další maligní onemocnění s ohledem na četnost případů z dlouhodobého hlediska na vzestupu. Mezi maligní monoklonální gamapatie řadíme mimo jiné mnohočetný myelom, což je druhý nejčastější krevní nádor, dále pak vzácnější nemoci (např. Waldenströмова makroglobulinemie). Většině maligních monoklonálních gamapatií předchází nemaligní typ tzv. monoklonální gamapatie nejistého významu. Pacienty s touto diagnózou je doporučeno sledovat v určitých intervalech a při případném přechodu do malignity včas zahájit léčbu. Odhalit monoklonální gamapatii u pacientů vyšetřovaných v Oblastní nemocnici Jičín tak, aby analýza pokryla co možná největší možný počet osob v oblasti Jičínska, bylo hlavním cílem diplomové práce. Zvolený region je společně s dalšími (např. Trutnovsko, Královéhradecko) zasažen četností monoklonálních gamapatií nejvíce. Pro dosažení cílů byly zvoleny dvě základní metody odhalující výskyt, typ a koncentraci M-proteinu – gelová elektroforéza a imunofixace. U pacientů s nálezem M-proteinu byly různými metodami vyšetřeny další parametry (např. koncentrace kreatininu, vápníku, hemoglobinu, volných lehkých řetězců). Díky těmto parametrům lze pacienta zařadit do určitého typu maligní nebo nemaligní monoklonální gamapatie, do rizika přechodu v maligní formu, případně do stádia maligního onemocnění. Z 3805 elektroforeticky analyzovaných vzorků byl u 789 prokázán M-protein. Imunofixace prokázala přítomnost paraproteinu u 292 pacientů, z toho u 177 nově. Maligní forma byla určena z celého souboru u 14 pacientů.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Eliška Trejbalová

Supervisor: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Consultant: Mgr. Monika Mašková

Title of diploma thesis: Incidence of malignant monoclonal gammopathies in patients
examined at the Regional Hospital Jičín a.s.

Monoclonal gammopathies include diseases affecting B-lineage blood cells of malignant and non-malignant origin, the common feature of which is the presence of M-protein in the patient's serum or urine. Malignant monoclonal gammopathies, like other malignant diseases, are on the rise in terms of case rates in the long term. Malignant monoclonal gammopathies include, among others, multiple myeloma, which is the second most common blood tumour, and less prevalent diseases (e.g. Waldenström's macroglobulinemia). Most malignant monoclonal gammopathies are preceded by a non-malignant type called monoclonal gammopathy of undetermined significance. Patients with this diagnosis are recommended to be monitored at specific intervals and in case of progressions to malignancy, to initiate treatment in time. The main goal of this thesis was to detect monoclonal gammopathy in patients examined at the Jičín Regional Hospital so that the analysis covers as many people as possible in the Jičín region. The selected region together with other (e.g. Trutnovsko, Královéhradecko) is the most affected by the frequency of monoclonal gammopathies. To achieve the goals, two basic methods were chosen to detect the occurrence, type, and concentration of M-protein – gel electrophoresis and immunofixation. Other parameters (e.g. creatinine, calcium, haemoglobin, free light chains, etc.) were examined in patients with detected M-protein. Thanks to these parameters, the patient can be categorized into a certain type of malignant or non-malignant monoclonal gammopathy, risk of transition to the malignant form, or stage of malignant disease. Of the 3805 electrophoretically analysed samples, M-protein was detected in 789. Immunofixation showed the presence of paraprotein in 292 patients, with 177 being newly identified. The malignant form of the disease was identified in the entire cohort in 14 patients.

Obsah

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1. Monoklonální gamapatie.....	10
2.2. Typy monoklonálních gamapatií.....	11
2.2.1. Mnohočetný myelom	11
2.2.2. Waldenströмова makroglobulinemie.....	13
2.3. Laboratorní diagnostika monoklonálních gamapatií.....	14
2.4. Přehled jednotlivých laboratorních metod využívaných v diagnostice MG	15
2.4.1. Stanovení vybraných hematologických parametrů.....	15
2.4.1.1. Krevní obraz.....	16
2.4.1.2. Vyšetření kostní dřeně	17
2.4.1.3. Sedimentace erytrocytů.....	17
2.4.2. Stanovení vybraných biochemických parametrů	18
2.4.2.1. Minerály – sodík, draslík, chloridy, vápník	18
2.4.2.2. Urea, kreatinin, kyselina močová.....	20
2.4.2.3. Celková bílkovina	21
2.4.2.4. Albumin	22
2.4.2.5. Imunoglobuliny	22
2.4.2.6. Volné lehké řetězce imunoglobulinů	25
2.4.2.7. β_2 -mikroglobulin	26
2.4.2.8. Laktátdehydrogenasa	27
2.4.3. Elektroforetické metody	27
2.4.3.1. Typ akutního zánětu.....	28
2.4.3.2. Typ chronického zánětu	28
2.4.3.3. Typ chronické hepatopatie.....	29
2.4.3.4. Typ nefrotického syndromu	29
2.4.3.5. Malnutriční typ.....	29
2.4.3.6. Monoklonální gamapatie	29
2.4.4. Imunofixace	30
2.4.5. Kryoproteiny	30

2.4.6.	Viskozita séra.....	31
2.4.7.	Průtoková cytometrie v diagnostice MG	31
2.4.8.	Zobrazovací metody v diagnostice MG.....	32
2.5.	Dělení monoklonálních gamapatií dle diagnostických kritérií	33
3.	CÍL PRÁCE	37
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1.	Biologický materiál.....	38
4.1.1.	Sérum.....	38
4.1.1.1.	Sérum pro elektroforézu	38
4.1.1.2.	Sérum pro imunofixaci	39
4.1.2.	Moč	39
4.2.	Přístroje	40
4.3.	Reagencie a materiál	41
4.3.1.	Reagencie a materiál pro elektroforézu	41
4.3.1.1.	Agarózové gely	41
4.3.1.2.	Pufrované stripy	41
4.3.1.3.	Ředící roztok pro amidočernň.....	41
4.3.1.4.	Amidočernň.....	41
4.3.1.5.	Aplikátory	42
4.3.1.6.	Tenké filtrační papíry.....	42
4.3.1.7.	Odbarvovací roztok.....	42
4.3.1.8.	Promývací roztok	43
4.3.1.9.	Vlhká zásobní komora	43
4.3.2.	Reagencie a materiál pro imunofixaci	43
4.3.2.1.	Kyselá violet'.....	43
4.3.2.2.	Diluent.....	43
4.3.2.3.	Antiséra	44
4.3.2.4.	Fixační roztok	44
4.3.2.5.	Antisérové segmenty.....	44
4.3.2.6.	Zesílené filtrační papíry	44
4.4.	Postup elektroforetického stanovení	44
4.4.1.	Nastavení migrace.....	45

4.4.2.	Migrace	48
4.4.3.	Příprava zpracování gelu	49
4.4.4.	Dokončení zpracování gelu	50
4.4.5.	Kontrola kvality	50
4.4.6.	Interpretace výsledků	50
4.5.	Postup imunofixace	52
4.5.1.	Nastavení migrace	52
4.5.2.	Migrace	54
4.5.3.	Nastavení imunofixací	54
4.5.4.	Imunofixace	57
4.5.5.	Inkubace	59
4.5.6.	Odsátí přebytečné tekutiny z gelu	59
4.5.7.	Sušení gelu	60
4.5.8.	Nabarvení gelu	60
4.5.9.	Konečné zpracování gelu	61
4.5.10.	Kontrola kvality	61
4.5.11.	Interpretace výsledků	61
4.6.	Statistické vyhodnocení výsledků	61
5.	VÝSLEDKY	63
6.	KAZUISTIKY	80
6.1.	Kazuistika 1	80
6.2.	Kazuistika 2	82
7.	DISKUSE	85
8.	ZÁVĚR	88
9.	POUŽITÉ ZKRATKY	89
10.	POUŽITÁ LITERATURA	91

1. ÚVOD

Termín monoklonální gamapatie zahrnuje onemocnění vyznačující se maligní či potencionálně maligní proliferací B-buněčné linie produkující monoklonální imunoglobulin tzv. paraprotein. Včasná diagnostika maligní monoklonální gamapatie umožňuje rychlé zahájení léčby, čímž lze zlepšit prognózu a kvalitu života pacienta. Diagnostika nemaligní monoklonální gamapatie bez časové prodlevy je neméně důležitá, a to z důvodu 1% rizika transformace do maligní formy ročně. Pacienty je tedy nutné v určitých intervalech sledovat. Nemaligní monoklonální gamapatie jsou většinou bezpříznakové, což může být úskalím včasného rozpoznání onemocnění (Maisnar 2018, Ščudla 2017, Šolcová 2019).

Stanovení diagnózy monoklonální gamapatie je založeno na průkazu paraproteinu ve vzorku séra nebo moči pacienta. Nejčastěji se provádí průkaz elektroforetickou metodou, na kterou v případě pozitivního nebo nejasného výsledku navazuje metoda imunofixace. Imunofixace dále umožňuje určení typu a koncentrace paraproteinu. Obě zmíněné metody byly v rámci diplomové práce využity. Typ monoklonální gamapatie, jehož určení bylo cílem diplomové práce, lze stanovit jednak na základě paraproteinu, ale i dalších diagnostických parametrů (např. koncentrace volných lehkých řetězců, kreatininu, vápníku) (Maisnar 2018, Ščudla 2017). Tyto parametry byly stanoveny téměř u všech pacientů vyšetřovaných v rámci této diplomové práce.

Diplomová práce navazuje výzkumnou částí na bakalářskou práci, ve které byli vyšetřováni pouze pacienti nefrologické ambulance Oblastní nemocnice Jičín a.s., u kterých jsme se zaměřovali především na výskyt nemaligní monoklonální gamapatie nejasného významu. V rámci experimentální části diplomové práce jsme výzkum rozšířili na spektrum pacientů vyšetřovaných v Oblastní nemocnici Jičín a.s. ze všech oddělení nemocnice, ale i od praktických lékařů či lékařů specialistů. Zaměřili jsme se hlavně na maligní monoklonální gamapatie, především mnohočetný myelom nebo Waldenströmovu makroglobulinemii.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Monoklonální gamapatie

Monoklonální gamapatie (MG) představují heterogenní skupinu onemocnění se zhoubným či nezhooubným původem. Společným jmenovatelem této skupiny onemocnění je tvorba monoklonálního imunoglobulinu tzv. paraproteinu (M-proteinu) v důsledku klonální proliferace B buněčné linie. Paraprotein lze detekovat v séru a/nebo moči. Tato monoklonální komponenta může být produkována ve formě monoklonálního imunoglobulinu nebo jeho strukturních komponent, tzv. volných lehkých řetězců (Free light chains, FLC) κ či λ . Monoklonální komponenta nacházející se v moči je často nazývána jako Bence Jonesova bílkovina (Kušnierová 2022, Študla 2017, Študla 2018, Vávrová 2020).

MG dělíme z klinického hlediska dle Kyle do dvou základních kategorií:

1. Monoklonální gamapatie nejistého významu (MGUS)
2. Maligní monoklonální gamapatie

Maligní MG rozřazujeme do dalších kategorií, které jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 Typy maligních monoklonálních gamapatií (Maisnar 2023)

Typický mnohočetný myelom	Těžké řetězce	IgG
		IgA
		IgD
		IgE
	Lehké řetězce	Kappa
		Lambda
Variantní formy myelomu	Doutnající myelom	
	Plasmocelulární leukemie	
	Nesecernující myelom	
	Solitární kostní plasmocytom	
	Extramedulární plasmocytom	
	Osteosklerotický myelom (POEMS)	
Zhoubné lymfoproliferativní stavy	Waldenströmova makroglobulinemie	
	Maligní lymfomy	
	Chronická lymfatická leukemie	
Nemoci těžkých řetězců	Gama	
	Alfa	
	Mí	
	Delta	
Amyloidóza	Primární	
	Při myelomu (sekundární)	

Výskyt onemocnění patřících mezi MG je relativně častý a s věkem pravděpodobnost onemocnění stoupá. Nejčastěji postihuje pacienty onemocnění typu MGUS (Ščudla 2017).

2.2. Typy monoklonálních gamapatií

Existuje několik typů MG, mezi nejčastěji zastoupené patří MGUS, z maligních MG mnohočetný myelom. Další text podrobněji popisuje MG, které se objevily v experimentální části práce. Dále tedy bude popsán mnohočetný myelom a Waldenströмова makroglobulinemie.

2.2.1. Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom (MM) je maligní onemocnění charakteristické klonální nekontrolovatelnou proliferací B-lymfocytů. Vlivem proliferace je onemocnění provázeno produkcí monoklonálního imunoglobulinu (nejčastěji typu IgG), který může být prokazatelný v séru i v moči. Nejčastějším projevem tohoto onemocnění bývá osteolýza skeletu, porucha funkce ledvin a útlum krve tvorby. Často vzniká z MGUS typu IgG, IgA, případně MGUS lehkých řetězců. V České republice je frekvence tohoto onemocnění 2,65 na 100 000 obyvatel, z čehož nejčastěji postihuje starší lidi, medián věku při stanovení diagnózy je 68 let (ve věku 20–40 let se vyskytuje vzácně) (Czech Myeloma Group 2023, Doubek 2020, Hájek 2019).

Diagnózu MM stanovuje klinický lékař na základě porovnání rentgenologického, cytologického a biochemického nálezu daného pacienta, na rozdíl od lymfomů, kdy diagnózu stanovuje patolog. Klinické projevy tohoto onemocnění bývají různé, nejčastější bývá bolestivost kostí. Vybrané projevy MM:

- a) **Bolesti kostí způsobené osteolýzou** nejčastěji v oblasti bederní páteře, ale i v dalších částech lidského těla, jsou klasickým klinickým projevem MM. Myelom způsobí osteolytická ložiska viditelná na rentgenovém (RTG) snímku či při magnetické rezonanci (MR).
- b) **Infekce způsobené imunosupresí** jsou dalším typickým projevem MM, k němuž dochází kvůli defektu B-buněčné imunity. Omezená tvorba funkčních imunoglobulinů způsobuje u pacientů s MM delší a závažnější průběh i u běžných infekcí.

c) **Anemie** je způsobená mechanickým útlakem nádorovou tkání a působením cytokinů, které jsou tvořeny myelomovými buňkami.

d) **Myelomová nefropatie** vedoucí až k renální insuficienci je způsobena především monoklonálními lehkými řetězci. FLC jsou vstřebávány v tubulech ledvin, které mohou být funkčně poškozeny v případě nadměrného množství lehkých řetězců.

e) **Hyperviskozita** je typickým projevem hlavně u IgM MG, ale může se vyskytovat i u IgG a IgA MG (Czech Myeloma Group 2023).

Nezbytností pro stanovení diagnózy MM je průkaz přítomnosti klonální populace plasmatických buněk v kostní dřeni. Další nutná vyšetření zahrnují průkaz monoklonálního imunoglobulinu IgG nebo IgA elektroforeticky s následnou imunofixací, průkaz typických osteolytických ložisek pomocí RTG (případně MR). Tyto a další metody laboratorní diagnostiky MM jsou probrány v kapitole 2.3 (Czech Myeloma Group 2023, Doubek 2020).

Dalším úskalím při určování onemocnění MM je jeho odlišení od nemaligní MG – MGUS, a také od variantní formy – doutnajícího myelomu. Obě tyto varianty jsou asymptomatické a mohou přejít do symptomatického MM, rozlišení těchto typů je z hlediska zahájení léčby důležité. K odlišení těchto diagnóz bylo vydáno doporučení *International Myeloma Working Group* (IMWG), které pracuje s výsledky určitých diagnostických metod (uvedeno v kap. 2.5., tabulka 14). Další kritéria k určení MM poukazují na poškození tkání či orgánů myelomem, jedná se o tzv. CRAB symptomy (tabulka 14). Název odpovídá dysfunkci či destrukci tkáně:

C (calcium) – hladina vápníku zvýšená nad 2,8 mmol/l,

R (renal) – renální insuficience s kreatininem nad 177 mmol/l,

A (anemia) – anemie s hemoglobinem pod 100 g/l,

B (bone) – osteolytické kostní destrukce (Czech Myeloma Group 2023, Doubek 2020, Maisnar 2018).

Zahájení léčby MM by mělo následovat v případě splnění kritérií symptomatického MM (především CRAB symptomy) nebo u vysoce rizikových asymptomatických stádií. Za včasného stanovení diagnózy, příznivých prognostických podmínek,

intenzivní vstupní i udržovací léčby může být MM vyléčitelný. Naproti tomu relaps či progres MM vyléčitelný není, zajišťuje pouze lepší prognózu, přežití je asi 10 let od stanovení diagnózy. Léčba MM se dále vyvíjí. Uvádí se, že zařazení vysokodávkové chemoterapie v kombinaci s autologní transplantací prodloužilo pacientům život přibližně o 20 měsíců (Doubek 2020, Štork 2017).

2.2.2. Waldenströмова makroglobulinemie

Waldenströмова makroglobulinemie (morbus Waldenström – MW) je typ MG charakteristický přítomností lymfoplasmocytárního lymfomu v kostní dřeni a monoklonálního imunoglobulinu typu IgM. Často vzniká z MGUS typu IgM, rizikovým faktorem tohoto přechodu je abnormální počet FLC a koncentrace paraproteinu typu IgM vyšší než 15 g/l. Jedná se o vzácnější chorobu než MM, incidence MW se uvádí 0,34/100 000 mužů a 0,17/100 000 žen. Medián přežití MW je 5–10 let. Klinické příznaky MW mohou být různorodé a souvisí s různými faktory nemoci:

- a) **Infiltrace kostní dřene** vedoucí k potlačení normální krvetvorby – anemie, trombocytopenie, neutropenie.
- b) **Extramedulární proliferace**, která může způsobit lymfadenopatii, organomegalii (především splenomegalii).
- c) **Přítomnost M-proteinu** vyvolávající hyperviskozitu, kryoglobulinemii nebo periferní neuropatii. Hyperviskozita se projevuje bolestí hlavy, zhoršením zraku nebo zmateností.
- d) **Přítomnost nádoru** projevující se B-symptomy (febrilie a subfebrilie, noční pocení, úbytek hmotnosti), kožními a krvácivými projevy.

Dále se může MW projevovat únavou, gastrointestinálními problémy či osteolytickými ložisky skeletu, která jsou ale spíše výjimečná (Adam 2022, Doubek 2020, Kaščák 2019).

Téměř v každém případě MW je postižena kostní dřeň, proto je nutností při stanovování diagnózy vyšetření kostní dřene. Typická je přítomnost B-lymfocytů se znaky CD19, CD20, CD22, CD25, CD27. Důležité jsou též znaky, které v rámci

MW exprimovány nejsou – CD5, CD10, CD11c, CD23 a CD103. Dalším důležitým diagnostickým kritériem je průkaz monoklonálního imunoglobulinu IgM v séru. Diagnostika MW může být dále upřesněna molekulárně genetickým vyšetřením (mutace v genech *MYD88*, *CXCR4*). Podpůrnými vyšetřeními souvisejícími s MW jsou také průkaz anemie, kryoglobulinemie, hyperviskozity a dalších. Zmíněné diagnostické metody jsou probrány v kapitole 2.4 (Kaščák 2019).

Současná léčba MW dosahuje dlouhotrvající léčebné odpovědi, po jejímž dosažení dochází ve většině případů k recidivě onemocnění vyžadující další terapii. Z tohoto důvodu se doporučuje asymptomatické onemocnění typu MW pouze pozorovat a zahájit léčbu až při splnění určitých kritérií:

- noční pocení, úbytek hmotnosti (> 10 %/ 6 měsíců), opakované teploty, únava,
- hyperviskozita, kryoglobulinemie, periferní neuropatie,
- symptomatická hepato/splenomegalie,
- symptomatická organomegalie či infiltrace tkání/ orgánů,
- lymfadenopatie,
- koncentrace hemoglobinu pod 100 g/l nebo počet trombocytů pod $100 \times 10^9/l$.

Naopak jakákoliv koncentrace M-proteinu IgM není indikací k zahájení léčby (Kaščák 2019).

2.3. Laboratorní diagnostika monoklonálních gamapatií

Včasná diagnostika MG je důležitá zejména u maligních forem MG, kdy umožňuje včasné zahájení potřebné terapie. Rozvoj léčebných postupů umožňuje zlepšit prognózu a kvalitu života pacienta s tímto typem onemocnění. Podezření na MG může vzbuzovat úbytek hmotnosti pacienta, bolesti kostí nereagující na analgetickou léčbu, anemie, hyperkalcemie, proteinurie a další (Ščudla 2017).

MG jsou charakterizovány přítomností paraproteinu, proto mezi metody stanovení MG patří především elektroforéza s následnou imunofixací, které prokážou přítomnost tohoto paraproteinu včetně jeho kvantifikace. Jak již bylo řečeno, u pacientů s tímto onemocněním mohou být přítomny pouze FLC (vzácně těžké řetězce), které stanovujeme

imunoturbidimetrickou či imunonefelometrickou metodou. Tyto specifické metody jsou doprovázeny metodami základními — stanovení celkové bílkoviny v séru a moči, sedimentace erytrocytů, stanovení hemoglobinu, albuminu, kalcia atd. (Kušnierová 2022).

Doporučený postup při podezření na MM, či jinou MG, zahrnuje následující kroky:

1. Laboratorní vyšetření při podezření na MM (provádí praktický lékař):
 - a. Vyšetření krevního obrazu, sedimentace erytrocytů. Stanovení viskozity séra.
 - b. Biochemické vyšetření séra: glukóza, urea, kreatinin, kyselina močová, minerály (Na, K, Cl, Ca, P), bilirubin, celková bílkovina, proteinurie, elektroforéza séra i moči.
2. Laboratorní vyšetření pro potvrzení diagnózy MM:
 - a. Imunofixace séra a moči, stanovení jednotlivých tříd imunoglobulinů, stanovení FLC a poměru κ/λ .
 - b. Laktátdehydrogenasa (LDH), C-reaktivní protein (CRP) zjišťující poškození tkání a orgánů myelomem.
 - c. β 2–mikroglobulin pro vyšetření myelomové masy a prognózy.
3. Vyšetření kostní dřeně.
4. Vyšetření kostního postižení (RTG, MR) (Maisnar 2023, Vávrová 2020).

2.4. Přehled jednotlivých laboratorních metod využívaných v diagnostice MG

Ke stanovení diagnózy MG se využívá především elektroforéza a imunofixace, tedy metody určující kvalitativní i kvantitativní přítomnost paraproteinu. Stanovení diagnózy, stádia či typu se však opírá také o další parametry.

2.4.1. Stanovení vybraných hematologických parametrů

Diagnostika MG spadá nejen do odvětví klinické biochemie, ale je třeba vyšetřit i parametry klinické hematologie (např. nejzákladnější vyšetření – krevní obraz).

2.4.1.1. Krevní obraz

Stanovení krevního obrazu (KO) patří mezi běžná a základní vyšetření sloužící k diagnostice a sledování terapie řady onemocnění. KO zahrnuje deset až dvanáct číselných výsledků tvořících komplexní soubor charakterizující buněčné elementy periferní krve. Tyto hodnoty jsou změřené a vypočtené analyzátozem, úzce spolu navzájem souvisí. Ke KO lze vyšetřit i diferenciální rozpočet leukocytů (přístrojový, mikroskopický), který vypovídá o zastoupení jednotlivých typů leukocytů. Dále lze také stanovit počet retikulocytů v periferní krvi (Pulcer 2022). Jednotlivé parametry KO a referenční hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 Parametry vyšetření krevního obrazu s referenčními hodnotami (Kušnierová 2022, Pulcer 2022)

Parametr KO	Zkratka	Referenční hodnota
Hemoglobin	HBG	Ženy 120–160 g/l Muži 135–175 g/l
Erytrocyty (Red Blood Cells)	RBC	Ženy $3,8–5,2 \times 10^{12}/l$ Muži $4,0–5,8 \times 10^{12}/l$
Hematokrit	HTC	Ženy 0,35–0,47 Muži 0,40–0,50
Střední objem erytrocytu (Mean Corpuscular Volume)	MCV	82–98 fl
Distribuční šíře erytrocytů (Red cell Distribution Width)	RDW	CV 10–15,2 % SD 37–54 fl
Střední množství hemoglobinu v erytrocytu (Mean Corpuscular Hemoglobin)	MCH	28–34 pg
Střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)	MCHC	320–360 g/l
Leukocyty (White Blood Cells)	WBC	$4,0–10,0 \times 10^9/l$
Trombocyty	PLT	$150–400 \times 10^9/l$
Destičkový hematokrit – trombokrit (Plateletcrit)	PCT	1,2–3,5 ml/l
Střední objem krevní destičky (Mean Platelet Volume)	MPV	7,8–12,8 fl
Distribuční šíře trombocytů (Plateletes Distribution Width)	PDW	CV 9–17 % SD 12–18 fl

Z hlediska stanovení diagnózy MG se z KO zaměřujeme především na koncentraci HBG. MM i MW jsou provázány anemií s koncentrací

HGB < 100 g/l. Dále mohou být provázeny trombocytopenií, neutropenií či penízkovatěním erytrocytů. (Ščudla 2017, Vávrová 2020).

2.4.1.2. Vyšetření kostní dřeně

Vyšetření kostní dřeně (KD) je součástí diagnostického postupu u pacientů s hematologickým/hematoonkologickým onemocněním, tedy i u diagnózy MG. Jedná se o invazivní metodu, proto je vyšetření indikováno až po zhodnocení výsledků ostatních vyšetření. Pro cytologické zhodnocení KD odebíráme tzv. aspirát. Aspirát se odebírá speciální punkční jehlou z hrudní kosti, případně z lopaty kosti kyčelní (trepanobiopsie). Z odebrané KD se zhotoví nátěr, který se následně obarví a mikroskopicky zhodnotí. Zhodnocením KD je získán tzv. myelogram. V rámci diagnostiky MG pozorujeme především výskyt monoklonálních plasmocytů v KD, které se tam fyziologicky nenachází. Procentuální počet plasmocytů v KD je součástí kritérií rozlišujících typy MG (Maisnar 2018, Pulcer 2022, Ščudla 2017, Zima 2013).

2.4.1.3. Sedimentace erytrocytů

Vyšetření sedimentace erytrocytů (FW) patří mezi základní laboratorní testy vypovídající o probíhajícím patologickém procesu. Z důvodu nedostatečné specifity je vyšetření FW nahrazováno stanovením CRP, díky němuž lze určit probíhající virový nebo bakteriální zánět. CRP však nenahradí diagnostiku monoklonálních gamapatií, protože u těchto onemocnění je důležitá rychlost sedimentace erytrocytů.

Metoda je založena na sledování rychlosti sedimentace erytrocytů, která je u zdravého člověka pomalá a stálá (viz tabulka 3). Ke zrychlení sedimentace dochází vlivem tvorby shluků erytrocytů způsobené patologickým stavem – např. hyperfibrinogenemií, zvýšenou koncentrací reaktantů akutní fáze, zmnožením imunoglobulinu, nádorovým onemocněním a hemoblastózou. Zvýšená sedimentace může být také v těhotenství. Naopak snížení sedimentace pozorujeme ve spojení s hepatitidou, uzávěrem žlučových cest kamenem, polycytemií a polyglobulií (Kušnierová 2022).

Tabulka 3 Referenční hodnoty sedimentace erytrocytů (Prokopcová 2023)

Muži	Ženy
2–5 mm/ 1 hod	3–8 mm/ 1 hod
6–10 mm/ 2 hod	9–15 mm/ 2 hod

Přítomnost monoklonálního imunoglobulinu u MG způsobuje velmi vysokou FW (Vávrová 2020).

2.4.2. Stanovení vybraných biochemických parametrů

Následující probrané metody využívané k diagnostice MG spadají do odvětví klinické biochemie.

2.4.2.1. Minerály – sodík, draslík, chloridy, vápník

Stanovení minerálů (iontů) řadíme mezi základní biochemická vyšetření krve pacienta, tzv. biochemický screening. Stanovením sodíku, draslíku, chloridů a dalších iontů (vápník, fosfor, hořčík, železo) získáme tzv. iontogram (mineralogram) (Kovářová 2019).

Koncentrace iontů se liší v intracelulární (uvnitř buněk) a extracelulární (mezi buňkami – krev, mozkomíšní mok) tekutině, což zajišťuje správnou činnost buněk, srdce, nervosvalové dráždivosti atd. Vyšetření vypovídá o mnohém, proto je i nezbytnou součástí diagnostiky MG.

Sodík (*Natrium*, Na^+) na sebe váže nejvíce vody a jedná se o hlavní extracelulární kation. Snížená natremie může být způsobena zvýšenou sekrecí antidiuretického hormonu, srdečním selháváním, hypoproteinemií, předávkováním diuretiky. Naproti tomu ke zvýšení jeho koncentrace dochází vlivem nedostatečného příjmu vody, zvýšených ztrát vody nebo při jeho vysokém příjmu ve formě kuchyňské soli (Kušnierová 2022, Racek 2019).

Draslík (*Kalium*, K^+) najdeme převážně uvnitř buněk, je hlavním intracelulárním kationtem. Snížená kalemie nastává při přesunu směrem do buněk – např. při alkalóze, dále při zvýšené ztrátě ledvinami nebo infuzi glukózy s inzulínem. Naopak příčinou zvýšené koncentrace je přesun směrem z buněk – např. při acidóze, katabolismu nebo hemolýze a při renálním selhání (ledviny nedokáží K^+ vyloučit) (Kušnierová 2022, Racek 2019).

Chloridy (*Cl*) jako hlavní extracelulární anion se podílí na udržení osmotického tlaku společně s Na^+ . Hypochloridemie souvisí se ztrátami Cl^- zaživacím traktem (zvracení, odsávání kyselé šťávy žaludku) nebo močí (předávkování diuretiky),

případně respirační insuficiencí. Hyperchloridemie nastává vlivem sníženého vylučování Cl^- močí (selhání ledvin) nebo trávicím traktem (průjmy), dále při respirační alkalóze (Kušnierová 2022, Racek 2019).

Stanovení zmíněných minerálů je založeno na principu změny potenciálu vlivem koncentrace iontů s využitím iontově selektivní elektrody. Referenční hodnoty jednotlivých iontů jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 Referenční hodnoty minerálů v séru (Kušnierová 2022, Racek 2019)

Analyt	Referenční hodnoty (mmol/l)
Na^+	137–145
K^+	3,6–4,8
Cl^-	98–109

Vápník (Calcium, Ca) se v těle nachází především v kostní tkáni, zbytek je obsažen v extracelulární tekutině, v buňkách je jeho koncentrace zanedbatelná. V krevní plasmě je vápník v několika formách (vázaný na bílkoviny, ve formě komplexních sloučenin a ionizovaný vápník Ca^{2+}), z nichž pouze ionizovaná forma je biologicky aktivní. Hypokalcemie má několik příčin – nedostatek Ca v potravě, porucha vstřebávání, snížená produkce parathormonu či nedostatek vitamínu D (řídí metabolismus Ca). Naopak hyperkalcemie nastává vlivem přesunu Ca z kostní tkáně do krve (imobilizace pacienta, nadměrná tvorba parathormonu). Příčinou zvýšení Ca v krvi může být i probíhající mnohočetný myelom v důsledku tvorby kostních lézí. Proto mezi kritéria určení diagnózy MM patří stanovení Ca (součástí tzv. CRAB symptomů), jehož koncentrace v séru je u pacientů vyšší než 2,75 mmol/l (příp. o $> 0,25$ mmol/l nad horní fyziologickou mezí) (Kušnierová 2022, Racek 2019, Ščudla 2017).

Nejvyžívanější metodou stanovení celkového vápníku je atomová absorpční spektrofotometrie a ionizovaného vápníku iontově selektivní elektroda. Referenční hodnoty příslušných forem Ca jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 Referenční hodnoty Ca v séru (Kušnierová 2022, Racek 2019).

Analyt	Referenční hodnoty (mmol/l)
Ca (celkový)	2,20–2,60
Ca^{2+} (ionizovaný)	1,15–1,30

2.4.2.2. Urea, kreatinin, kyselina močová

Hodnoty urey, kreatininu a kyseliny močové jsou součástí základního biochemického panelu vyšetření pacienta, svědčí především o funkci ledvin, jedná se o tzv. ledvinový komplex. Indikací ke stanovení může být nefropatie, choroby a insuficience ledvin, u kyseliny močové také dna (metabolické onemocnění). Tyto analyty řadíme mezi nebiřkovinné dusíkaté látky (Kovářová 2019, Racek 2019).

Urea (močovina) vzniká v játrech v močovinovém cyklu jako konečný produkt detoxikace dusíku pocházejícího z aminokyselin, z organismu se vylučuje močí (90 %), trávicím traktem (GIT) a kůží. Koncentrace urey stoupá vlivem zvýšení katabolismu proteinů – dlouhotrvající hladovění, infekce, sepse, rozsáhlé pohmožděnin, nádorová onemocnění, resorpce hematomů či krvácení do GIT (bez vzestupu kreatininu). Dále se hladina zvyšuje při nedostatečném vylučování močí – selhání ledvin. Naopak pokles koncentrace urey způsobí její nedostatečná tvorba (např. při selhání jater) či zvýšení jejího vylučování (např. zvýšení glomerulární filtrace během gravidity). Stanovení UV detekcí či enzymovou elektrodou umožňuje posoudit dusíkovou bilanci organismu (Kušnierová 2022, Racek 2019).

Kreatinin vzniká jako produkt odbourávání svalového kreatinu a kreatinfosfátu a je vylučován do moči glomerulární filtrací. Pro tuto skutečnost je vyšetřením tzv. clearance kreatininu posuzována funkce glomerulární filtrace ledvin. Toto vyšetření je však ovlivněno řadou faktorů (množství svalové hmoty, věk), proto se k posouzení funkce glomerulární filtrace stanovuje také koncentrace cystatinu C v krvi. Dále se doporučuje u tohoto funkčního testu využít rovnici CKD-EPI počítající pouze s hodnotami cystatinu C v séru nebo v kombinaci s koncentrací kreatininu v séru (nejpřesnější odhad funkce glomerulární filtrace). Kreatinin lze stanovit dvěma metodami (Jaffého a enzymovou), z nichž se dnes přikláníme spíše k enzymové metodě pro její větší specifickou. Ke zvýšení hladiny kreatininu dochází při selhání ledvin. Masitá strava a tělesná námaha dokážou hladinu zvýšit nepatrně. Snížení koncentrace nastává při atrofii svalů u dlouhodobě imobilizovaných pacientů.

Stanovení koncentrace kreatininu a jeho clearance slouží dále k posouzení poškození orgánů nebo tkání myelomem (CRAB symptomy), u pacientů s MM dochází k renální insuficienci (clearance kreatininu < 40 ml/min; koncentrace kreatininu v séru > 177 $\mu\text{mol/l}$) (Kušnierová 2022, Racek 2019, Doubek 2020).

Kyselina močová je konečný metabolit purinových bazí nukleových kyselin, vzniká v játrech a tenkém střevě. Vylučování kyseliny močové zajišťují především ledviny, dále také střeva. Zvýšení hladiny kyseliny močové ovlivňuje strava (nadměrný příjem purinů), renální insuficience, enzymová porucha (vzácněji) a protinádorová léčba B-buněčných neoplazií u onkologických pacientů (tzv. syndrom nádorového rozpadu). S hyperurikémií je spjaté metabolické onemocnění dna charakteristická atakami artritidy. Hypourikémie je obvykle asymptomatická, může být způsobena léky, sníženou resorpcí v distálním tubulu, enzymovou poruchou, případně vlivem některých onemocnění (malignity, popáleniny, diabetes mellitus). Stanovení je založeno na principu spektrofotometrie (Kušnierová 2022, Racek 2019).

Fyziologické hodnoty všech tří analytů jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 Referenční hodnoty analytů – urea, kreatinin, kyselina močová v séru (Prokopcová 2023)

Analyt	Referenční hodnoty v séru	
	Muži	Ženy
Urea	2,8–8,0 mmol/l	2,0–6,7 mmol/l
Kreatinin	64–104 $\mu\text{mol/l}$ (18–64 let)	49–90 $\mu\text{mol/l}$ (18–64 let)
Kyselina močová	230–480 $\mu\text{mol/l}$	155–350 $\mu\text{mol/l}$

2.4.2.3. Celková bílkovina

Krevní plasma obsahuje různé druhy bílkovin lišících se koncentrací, velikostí molekuly a funkcí, z nichž většina je produkována hepatocyty. Plasmatické bílkoviny se podílí na udržení tekutiny v krevním řečišti, transportu různých látek (léky, vitaminy, minerály, hormony), udržení pH krve, obraně proti infekcím, hemokoagulaci, fibrinolýze aj. Indikace ke stanovení celkové bílkoviny může být u poruch výživy a imunity, dále při podezření na mnohočetný myelom. Celková bílkovina se řadí mezi základní vyšetření MG, a také při pozitivním nálezu umožňuje kvantifikovat nalezený paraprotein. Diagnostika je založena na principu

spektrofotometrie s využitím biuretového činidla. Sníženou koncentraci proteinu v plasmě způsobí převodnění pacienta, velké ztráty močí nebo podvýživa. Naopak hyperproteinemie doprovází dehydrataci, mnohočetný myelom či jiný druh MG. Fyziologická koncentrace celkové bílkoviny v séru je 65–85 g/l. Na stanovení celkové bílkoviny v plasmě navazuje v diagnostice MG elektroforéza bílkovin (Maisnar 2018, Kovářová 2019 Prokopcová 2023, Racek 2019).

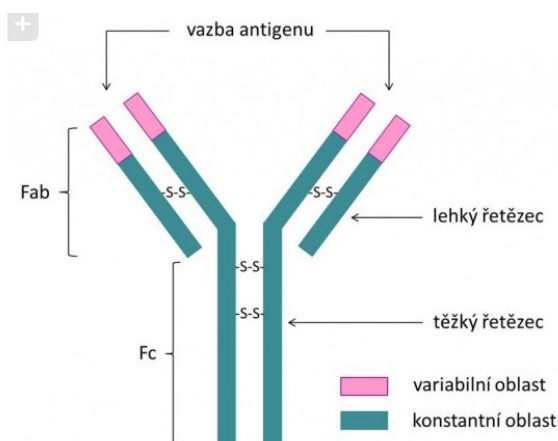
2.4.2.4. Albumin

Albumin patří mezi sérové bílkoviny, z nichž tvoří více než 50 %. Jako většinu bílkovin plasmy ho syntetizují hepatocyty. Mezi funkce albuminu řadíme udržení vody v krevním řečišti (onkotický tlak plasmy), transport látek (nekonjugovaný bilirubin, neesterifikované mastné kyseliny, hormony štítné žlázy, Ca, Mg, Zn, léky), udržení acidobazické rovnováhy a ochrana proti volným radikálům. Stanovení albuminu se provádí z důvodu sledování syntetické činnosti jater, dále ke zjištění velikosti myelomové masy ve spojitosti s MM či ve spojitosti s chronickým onemocněním ledvin. Princip spektrofotometrického stanovení koncentrace albuminu je založen na tvorbě barevného komplexu albuminu s bromkresolovým purpurem či bromkresolovou zelení. Další možností je turbidimetrie. Hypoalbuminemie nastává vlivem snížené syntézy (hepatopatie, proteinová malnutrice, alkoholová cirhóza jater), zvýšeného katabolismu (akutní záněty, nádory, akutní stavy, nefrotický syndrom), hyperhydratace pacienta, těhotenství (fyziologicky) a léčby kortikosteroidy. Zvýšená koncentrace albuminu nastává při hemokoncentraci vlivem terapie diuretiky nebo dehydratace. Fyziologická koncentrace albuminu v séru je 35–53 g/l. Při elektroforéze sérových bílkovin je albumin první a největší frakcí nalezenou v elektroforeogramu. Pro tvorbu monoklonálního imunoglobulinu při MG může být koncentrace albuminu snížena, což je patrné v elektroforeogramu (Kušnierová 2022, Prokopcová 2023, Racek 2019, Racek 2021, Vávrová 2020, Zima 2013).

2.4.2.5. Imunoglobuliny

Imunoglobuliny (Ig) reagují v těle s antigenem jako protilátky, jsou tedy součástí obrany organismu a tvoří je buňky lymforetikulárního systému. Strukturně se jedná o glykoproteiny, jsou tvořeny dvěma těžkými řetězci (heavy, H) a dvěma lehkými řetězci (light, L) vzájemně spojenými disulfidickými můstky. Lehké řetězce jsou

dvojího typu – κ , λ . Těžké řetězce řadíme do pěti typů – γ , α , μ , δ , ϵ , dle kterých dělíme imunoglobuliny do pěti tříd – IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Dále můžeme rozdělit molekulu Ig na dva menší fragmenty Fab a jeden větší fragment Fc, tímto způsobem štěpí molekulu enzym papain. Na Fab fragmentu se nachází variabilní konec Ig, který je proměnný dle konkrétního antigenu. Konstantní konec společný pro všechny protilátky se nachází na Fc fragmentu (Racek 2019). Struktura molekuly imunoglobulinů je znázorněna na obrázku 1.



Obrázek 1 Struktura imunoglobulinu (Racek 2019)

Koncentrace Ig je ovlivněná věkem. Nižší koncentraci Ig nalezneme fyziologicky u novorozenců a kojenců. Patologicky dochází ke snížení při dědičných poruchách syntézy, získaných poruchách syntézy (nádory lymfatických tkání, mnohočetný myelom) nebo nadměrných ztrátách (nefrotický syndrom). Nadměrná tvorba Ig způsobí u MG polyklonální či monoklonální hyperimmunoglobulinemii.

Laboratorní diagnostika je založena na reakci antigen–protilátka, jedná se tedy o imunochemické metody nejčastěji imunoprecipitační (imunoturbidimetrie, imunonefelometrie). Pro stanovení monoklonálního imunoglobulinu se však využívají elektroforetické metody, protože tyto Ig mají pouze některé z determinant, dochází k rychlé tvorbě precipitátu a výsledky imunochemického stanovení mohou být falešně vyšší.

Imunoglobulin G (IgG) je v plasmě zastoupen v nejvyšší koncentraci ze všech Ig. Jedná se o monomer procházející fetoplacentární bariérou, a proto má novorozenec vyšší hladinu tohoto imunoglobulinu, která postupně klesá. IgG vzniká jako odpověď na rozpustné antigeny (např. toxiny, produkty rozkladu bakterií).

Fyziologické koncentrace IgG v závislosti na věku a pohlaví jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7 Referenční hodnoty IgG v séru (Prokopcová 2023)

Věk (m, měsíc; r, rok)	Koncentrace – muži (g/l)	Koncentrace – ženy (g/l)
0 – 1 m	3,97 – 17,65	3,91 – 17,37
1 m – 1 r	2,05 – 9,48	2,03 – 9,34
1 – 2 r	4,75 – 12,10	4,83 – 12,26
2 – 80 r	5,40 – 18,22	5,52 – 16,31

Imunoglobulin A (IgA) nalezneme v plasmě ve formě monomeru a na povrchu sliznic (GIT, dýchacích cest) ve formě dimerů, proto neprochází fetoplacentární bariérou. Chrání sliznice před bakteriální infekcí. Fyziologické koncentrace IgA v závislosti na věku a pohlaví jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8 Referenční hodnoty IgA v séru (Prokopcová 2023)

Věk (m, měsíc; r, rok)	Koncentrace – muži (g/l)	Koncentrace – ženy (g/l)
0 – 3 m	0,05 – 0,34	0,05 – 0,34
3 m – 1 r	0,08 – 0,91	0,08 – 0,91
1 – 12 r	0,21 – 2,91	0,21 – 2,82
12 – 60 r	0,63 – 4,84	0,65 – 4,21
> 60 r	1,01 – 6,45	0,69 – 5,17

Imunoglobulin M (IgM) vzniká časně jako reakce na bakteriální či virovou infekci, později je nahrazován syntézou IgG. V plasmě se vyskytuje ve formě pentameru, neprochází fetoplacentární bariérou, ale v plodu se tvoří již před porodem. Fyziologické koncentrace IgM v závislosti na věku a pohlaví jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9 Referenční hodnoty IgM v séru (Prokopcová 2023)

Věk (m, měsíc; r, rok)	Koncentrace – muži (g/l)	Koncentrace – ženy (g/l)
0 – 3 m	0,06 – 0,21	0,06 – 0,21
3 m – 1 r	0,17 – 1,43	0,17 – 1,50
1 – 12 r	0,41 – 1,83	0,47 – 2,40
> 12 r	0,22 – 2,40	0,33 – 2,93

Imunoglobulin D (IgD) má nízkou hladinu v krvi, slouží jako receptorová molekula na povrchu B-lymfocytů. Další funkce tohoto typu Ig jsou doposud neznámé.

Imunoglobulin E (IgE) reaguje s alergeny a vyvolá tím uvolnění histaminu a jiných mediátorů alergické reakce z mastocytů. Indikace k jeho stanovení je při podezření na atopii, případně parazitární infekci. Fyziologické koncentrace IgE v závislosti na věku a pohlaví jsou uvedeny v tabulce 10 (Kušnierová 2022, Racek 2019, Racek 2021, Zima 2013).

Tabulka 10 Referenční hodnoty IgE v séru (Prokopcová 2023)

Věk (m, měsíc; r, rok)	Koncentrace (kU/l)
0 – 12 m	< 15,7
1 – 5 r	< 60,0
5 – 10 r	< 90,0
10 – 15 r	< 200,0
> 15 r	< 100,0

2.4.2.6. Volné lehké řetězce imunoglobulinů

Stanovení volných lehkých řetězců (FLC) se řadí již mezi speciální vyšetření bílkovin sloužící pro laboratorní diagnostiku MG. B-lymfocyty produkují polyklonální lehké řetězce jako součást imunoglobulinové molekuly, ale také jako volné lehké řetězce, které se dostávají do oběhu (asi 500 mg). V krevním oběhu rozlišujeme dva typy FLC – κ (nejčastěji jako monomer) a λ (nejčastěji jako dimer). FLC jsou následně vylučovány v glomerulech a vstřebávány v proximálních tubulech, do moči se dostane 1–10 mg FLC, které jsou denně vyloučeny z těla.

V klinické praxi se stanovuje jednak koncentrace obou typů FLC zvlášť a dalším důležitým parametrem je jejich poměr (FLC ratio, FLC index). Nadměrná koncentrace polyklonálních FLC je spojována s autoimunitními onemocněními. U maligních proliferací plasmatických buněk (včetně MG) a nemoci z lehkých řetězců dochází ke zvýšení koncentrace monoklonálních FLC i jejich poměru (Kušnierová 2022, Vávrová 2020).

Diagnostika FLC v séru i moči je založena na principu imunoturbidimetrie nebo imunonefelometrie. Díky protilátkám namířeným proti epitopům, které jsou

přístupné jedině bez vazby na těžký řetězec, lze detekovat pouze lehké řetězce vyskytující se volně. FLC index se vypočítá jako poměr FLC κ ku FLC λ . Referenční hodnoty jednotlivých stanovení jsou uvedeny v tabulce 11. Ke správnému zhodnocení získaných výsledků je nutné kvantitativně stanovit imunoglobuliny IgA, IgG a IgM (Kušnierová 2022, Vávrová 2020).

Tabulka 11 Referenční hodnoty FLC (Prokopcová 2023)

	FLC kappa (mg/l)	FLC lambda (mg/l)	Poměr κ/λ
Sérum	3,30–19,40	5,71–26,30	0,26–1,65
Moč	1,35–24,19	0,24–6,66	2,04–10,37

2.4.2.7. β_2 –mikroglobulin

Nízkomolekulární protein β_2 –mikroglobulin (B2M) se nachází na většině jaderných buněk jako součást hlavního histokompatibilního komplexu (HLA) – molekuly 1. třídy. Fyziologicky je jeho hladina v séru i moči, případně i jiných tělních tekutinách nízká vlivem metabolismu HLA. Jeho koncentrace odráží proliferaci myeloidních a lymfoidních buněk, dále závisí na funkci ledvin a slouží jako prognostický faktor u pacientů s mnohočetným myelomem. V souvislosti s funkcí ledvin je pozorována zvýšená koncentrace B2M v séru související se sníženou glomerulární filtrací, naopak snížená koncentrace B2M v séru upozorňuje na tubulární poškození. Od stanovení B2M v moči se upustilo pro jeho nestálost v pH nižším než 5,5 a v současné době je nahrazováno stanovením α_1 –mikroglobulinu. Koncentraci B2M stanovujeme pomocí imunoturbidimetrie či imunonefelometrie. Fyziologické hodnoty v séru i moči jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12 Referenční hodnoty B2M (Prokopcová 2023)

Sérum (mg/l)	Moč (mg/l)
0,97–2,64	< 0,32

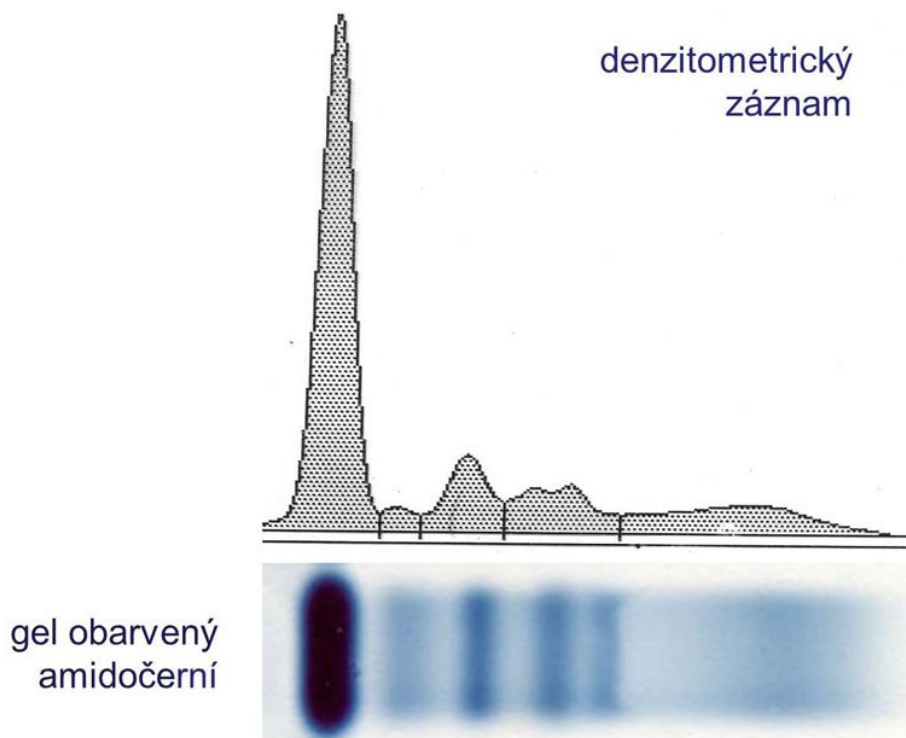
B2M řadíme společně s albuminem do mezinárodního prognostického indexu pro MM, který rozděluje MM do tří klinických stádií (Kušnierová 2022, Vávrová 2020).

2.4.2.8. Laktátdehydrogenasa

Laktátdehydrogenasa (LDH) je enzym katalyzující přeměnu pyruvátu na laktát v rámci anaerobní glykolýzy, při níž se z $\text{NADH} + \text{H}^+$ stává NAD^+ . Stanovení aktivity LDH je založeno na této reakci, konkrétně se spektrofotometricky stanovuje přeměna $\text{NADH} + \text{H}^+$ na NAD^+ . Tento enzym je přítomný ve všech tkáních, největší aktivitu má v játrech, svalech a erytrocytech. Fyziologické hodnoty aktivity LDH v séru dospělého člověka se pohybují v rozmezí 1,75–3,42 $\mu\text{kat/l}$. Zvýšenou aktivitu může způsobit intravaskulární hemolýza, infarkt myokardu, svalová onemocnění, nádorová onemocnění aj. Aktivita LDH je také pozorována u pacientů s MM, poukazuje na poškození tkání a její zvýšení znamená nepříznivou prognózu pro pacienta (Kušnierová 2022, Prokopcová 2023, Racek 2019, Zima 2013).

2.4.3. Elektroforetické metody

Elektroforetické metody využívají rozdílné pohyblivosti částic látky vlivem elektrického pole. Pohyblivost částic závisí na velikosti náboje, velikosti molekuly (u zónové elektroforézy), ale také vlastnostech prostředí, ve kterém dělení probíhá. V rámci klinické biochemie se elektroforéza využívá k dělení proteinů krevního séra, kdy dochází k rozdělení na 5–6 frakcí – albumin a globuliny α_1 , α_2 , β (často β_1 , β_2) a γ . V klinické praxi se využívají především dva typy elektroforézy, a to zónová elektroforéza s gelovým nosičem (agarózový, acetátcelulózový) nebo kapilární elektroforéza využívající jako nosič tenkou skleněnou kapiláru. Výstupem zónové elektroforézy je tzv. elektroforeogram, který je dále obarven a hodnocen pomocí denzitometru (viz obrázek 2) (Kušnierová 2022, Racek 2019, Racek 2021, Zima 2013).



Obrázek 2 Výstup elektroforézy sérových bílkovin rozdělen na 5 frakcí (albumin, α_1 , α_2 , β a γ globuliny) (Racek 2019)

Vlivem patologického stavu pacienta může být podíl frakcí pozmeněn. Změnu podílu lze přiřadit určitým chorobným stavům, rozlišujeme tedy tzv. elektroforetické typy (Racek 2021).

2.4.3.1. Typ akutního zánětu

V případě probíhajícího akutního zánětu je koncentrace proteinů v krvi v normě, ale je pozmeněn jejich poměr ve prospěch reaktantů akutní fáze. Mezi reaktanty akutní fáze patří zejména bílkoviny α_1 a α_2 frakce (často i β_2). Pro vyrovnání celkové koncentrace dochází k úbytku albuminu (Racek 2021).

2.4.3.2. Typ chronického zánětu

Chronický zánět navazuje na akutní. Přetrvává vzestup α_1 a α_2 frakce, k nimž se přidá vzestup γ frakce zahrnující imunoglobuliny. Opět je podíl dorovnan poklesem albuminové frakce (Racek 2021).

2.4.3.3. Typ chronické hepatopatie

Těžké nemoci jater (jaterní fibróza, jaterní cirhóza) způsobí nedostatečnou tvorbu bílkovin tímto orgánem, tudíž dochází k poklesu albuminu, α_1 -globulinů, α_2 -globulinů a β_1 -globulinů. Naopak dochází k vzestupu IgA, který se nachází mezi β a γ frakcí, což má za následek vznik typického β - γ můstku (Racek 2021).

2.4.3.4. Typ nefrotického syndromu

Při nefrotickém syndromu dochází k nadměrným ztrátám bílkovin – především albuminu a γ -globulinů. Bílkoviny s největší molekulou neprojdou glomerulárním sítím, jejich koncentrace stoupá. Jedná se o α_2 -globuliny a β -globuliny (Racek 2021).

2.4.3.5. Malnutriční typ

Při malnutrici je nedostatek aminokyselin pro syntézu bílkovin, jejich celková koncentrace klesá. Výrazně je snížena hladina albuminu a β_1 -globulinů, ostatní frakce bývají v normě (Racek 2021).

2.4.3.6. Monoklonální gamapatie

Přítomnost monoklonálního imunoglobulinu se v elektroforeogramu projeví úzkým proužkem, který může být kdekoli od α_2 frakce po γ frakci. Těžší forma tohoto onemocnění může vyústit v hypoalbuminemii, či vymizení ostatních imunoglobulinů. V rámci diagnostiky MG hraje elektroforéza nezastupitelnou roli. Pokud je prokázán M-protein v elektroforeogramu navazuje určení jeho typu a kvantifikace metodou imunofixace.

Monoklonální komponenta (tzv. Bence-Jonesova bílkovina) může být elektroforézou prokazována i v zakoncentrované moči pacienta. Výstup je hůře hodnotitelný, jelikož v moči je výrazně nižší koncentrace bílkovin. Do moči pronikají FLC pro svou malou molekulu, jejich náleznost je důkazem dediferenciace a horší prognózy (Racek 2021).

2.4.4. Imunofixace

Imunofixace neboli imunofixační elektroforéza (IFE) je metoda následující po elektroforéze v případě nálezu paraproteinu v séru i v moči. Při IFE nejprve dojde k rozdělení bílkovin elektroforézou na agarózovém gelu, následně se gel inkubuje s antiséry, promyje od nenavázaných bílkovin, obarví se kyselou violetí (příp. amidočerní) a zhodnotí se vizuálně či denzitometricky. Používaná antiséra specifická proti těžkým řetězcům γ , α , μ a lehkým řetězcům κ , λ se pipetují do pěti řad. V případě přítomnosti dané bílkoviny vytváří komplex antigen–protilátka, proto lze stanovit typ monoklonálního imunoglobulinu (Kušnierová 2022).

Metoda IFE slouží pro potvrzení nálezu paraproteinu a pro jeho typizaci. Provádí se v případě podezření na MG i bez průkazu M-proteinu v elektroforéze. Dále je nutná k potvrzení kompletní remise pacienta s MG, u kterého byl v minulosti M-protein prokázán (Vávrová 2020).

Při diagnóze MG může být v IFE viditelný kompletní imunoglobulin, tzn. určitý typ těžkého i lehkého řetězce (např. IgG κ) nebo pouze určitý typ lehkého řetězce přítomného vlivem FLC. Přítomnost FLC je doporučeno potvrdit imunoturbidimetricky či imunonefelometricky (Kušnierová 2022).

2.4.5. Kryoproteiny

Patologické proteiny tzv. kryoproteiny precipitují při nižších teplotách než 37 °C, v případě vyšších teplot se opět rozpouští. Rozlišujeme dvě skupiny kryoproteinů – kryoglobuliny (v séru i plasmě) a kryofibrinogeny (pouze v plasmě). Vlastnost kryoprecipitace je variabilní, mohou ji mít monoklonální i polyklonální imunoglobuliny, případně oba typy (smíšená kryoprecipitace) (Kušnierová 2022).

Kryoglobuliny jsou trojího typu:

- a) **Kryoglobuliny typu I** precipitují do 24 hodin v chladničkové teplotě (2–8 °C), tvoří je paraprotein, provází je hyperviskozita. Jejich koncentrace bývá > 5 g/l.
- b) **Kryoglobuliny typu II** precipitují shodně s typem I, tvoří je monoklonální komponenta především M-protein typu IgM s protilátkovou aktivitou

proti polyklonálním imunoglobulinům (hlavně IgG). Jejich koncentrace bývá ≥ 1 g/l.

c) Kryoglobuliny typu III precipitují několik dnů při teplotě 2–8 °C, tvoří je polyklonální imunoglobuliny, koncentrace bývá ≤ 1 g/l.

Stanovení kryoprecipitačních vlastností spočívá v průkazu kryoprecipitátu (viditelného okem) ve vzorku uchovávaném při chladničkové teplotě (2–8 °C) a jeho následném rozpuštění při zahřátí na 37 °C. Jinou možností je stanovení imunoglobulinů v séru při teplotě 2–8 °C a následně při 37 °C, kdy je v případě rozdílných hodnot potvrzen kryoprecipitát. Pokud je kryoglobulin v séru pacienta prokázán je nutné, aby byl vzorek před elektroforézou a imunofixací předeříván na 37 °C (Kušnierová 2022, Vávrová 2020).

2.4.6. Viskozita séra

Viskozita séra je spojena s obsahem proteinů v séru, hodnotí tekutost séra. Stanovení viskozity séra je důležité u pacientů s podezřením na hyperviskózní syndrom, tzn. i u pacientů s MG. Z MG nejčastěji provází MW kvůli vysoké koncentraci IgM, dále také MM. Indikace k vyšetření viskozity séra je koncentrace M–proteinu typu IgM > 40 g/l a IgG > 60 g/l (Kušnierová 2022, Ščudla 2017, Vávrová 2020).

2.4.7. Průtoková cytometrie v diagnostice MG

V diagnostice MG se uplatňuje i moderní analytická metoda – průtoková cytometrie rozlišující buňky a jejich části na základě optických vlastností. Průtoková cytometrie je využívána v hematoonkologii především k imunofenotypizaci leukocytů (Pulcer 2022, Zima 2013).

Průtoková cytometrie je založena na průtoku fluorescenčně značených buněk laserovým paprskem, kdy se zaznamenává a elektronicky zpracovává rozptyl a emise fluorescence. Průtokový cytometr se skládá z fluidiky, zajišťující průtok buněk v řadě za sebou. Další částí je optika, která zahrnuje zdroje monochromatického světla (laser, soustavy čoček, filtry atd.). Díky této části lze rozlišit buňky na základě velikosti (forward scatter) a vnitřní sktruktury, vč. granularity (side scatter). Poslední částí je

elektronika převádějící světelný signál na elektronický, který je výstupem průtokové cytometrie – histogram nebo dvouparametrový graf (Pulcer 2022).

Průtokový cytometr se také využívá k imunofenotypizaci leukocytů, kterou lze provést pomocí monoklonálních protilátek (MAb). Tyto MAb jsou vždy namířené proti určitému povrchovému znaku daného leukocytu, tzv. CD znaku. Díky znalosti použité protilátky dokážeme určit přesný druh buňky, její klonalitu a kvantitu. Imunofenotypizaci můžeme s využitím MAb provést metodou histochemickou, oproti které má však průtoková cytometrie výhodu možnosti využití více MAb najednou. Dokážeme tedy mnohem přesněji určit sledovanou buňku nebo dokonce celou buněčnou populaci (Zima 2013).

V rámci diagnostiky MG se průtoková cytometrie využívá k vyhodnocení zbytkového nádorového onemocnění – minimální reziduální nemoc (MRD – minimal residual disease). V případě MM se MRD stanovuje v KD pacienta. Pro diagnostiku normální a abnormální populace buněk v KD jsou nezbytné znaky CD19 a CD56, doporučené znaky CD20, CD28, CD27, CD81, CD117, případně i CD200. Obecně platí, že nemocní s negativní MRD mají významně lepší prognózu, která nezávisí na volbě léčby pacienta (Hájek 2017, Hájek 2019).

2.4.8. Zobrazovací metody v diagnostice MG

Zobrazovací metody mají v diagnostice MG také významnou roli. Především maligní MG jsou mimo jiné charakteristické kostními ložisky, která jsou právě viditelná v zobrazovacích metodách. V případě nemaligního MGUS je doporučeno RTG celého skeletu, další a dnes již preferovanou možností je výpočetní tomografie (CT), celotělová MR, PET/CT nebo PET/MR. U pacientů bez bolestí kostí s nálezem M-proteinu IgG < 15 g/l nebo IgA ≤ 10 g/l nemusí být vyšetření zobrazovacími metodami požadováno (Hájek 2019, Maisnar 2018).

2.5. Dělení monoklonálních gamapatií dle diagnostických kritérií

Všechna výše uvedená diagnostická kritéria umožňují stanovit diagnózu MG, vč. stanovení konkrétního typu. Každý z typů MG se vyznačuje určitou charakteristikou, ty jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13 Charakteristické znaky jednotlivých typů MG (Ščudla 2017, Zima 2013)

Diagnóza	Typické klinické projevy	Diagnostika
<i>MGUS</i>	Asymptomatický stav	M-Ig < 30 g/l v séru
		Plasmocyty v KD < 30 %
		Bez postižení orgánů
<i>MM–typický</i>	Únavový syndrom, bolesti skeletu, patologické fraktury, recidivující infekce aj.	Přítomnost M-Ig v séru/ moči
		Plasmocyty v KD ≥ 30 %
		Postižení orgánů – CRAB symptomy
<i>MM – doutnající</i>	Asymptomatický stav	M-Ig ≥ 30 g/l v séru
		Plasmocyty v KD > 10 %
		Bez postižení orgánů
<i>MM – nesečernující</i>	Únavový syndrom, bolesti skeletu, patologické fraktury, recidivující infekce	Bez přítomnosti M-Ig
		Plasmocyty v KD ≥ 10 %
		Známky postižení orgánů
<i>Plasmocelulární leukemie</i>	Náhlý začátek, únavový syndrom, bolesti kostí, infekce, teploty, anemický syndrom, krvácivé projevy aj.	Leukocytóza, cirkulující monoklon. plasmocytom v krvi ≥ $2 \times 10^9/l$ (průtoková cytometrie), zvýšení LDH
<i>Solitární kostní plasmocytom</i>	Lokalizovaná kostní bolest, extramedulární léze, lokální projevy	Solitární léze: CT/MR klonální atypické plasmocytomy (biopsie), absence CRAB, M-Ig
<i>POEMS</i>	Polyneuropatie, organomegalie, endokrinopatie, kožní změny aj.	Sklerotizovaná kostní léze, Castlemanova choroba, zvýšené hodnoty VEGFA

<i>Waldenströмова makroglobulinemie</i>	Anemický syndrom, hyperviskózní syndrom, hepato/spleno/lymfadenomegalie, poruchy zraku aj.	M-Ig typu IgM, > 10 % lymfoplasmocytárních elementů v KD
<i>Maligní lymfomy</i>	Lymfadenopatie, splenomegalie, anemie, trombocytopenie, neinfekční horečky, noční pocení, hubnutí aj.	Biopsie kosti/ sliznice/ ložiska, PET-CT
<i>Chronická lymfatická leukemie</i>	Lymfocytóza, anemie, trombocytopenie, lymfadenopatie, splenomegalie/hepatomegalie	Klonální zmnožení abnormální B-lymfocytů v krvi > 5 × 10 ⁹ /l B-lymfocytů, přít. povrchových antigenů CD5, CD19, CD20
<i>Nemoci těžkých řetězců</i>	Únavový syndrom, anemický syndrom, hepato/spleno/lymfadenomegalie, teploty, malabsorpční syndrom aj.	Přítomnost Ig v nadměrné míře (dle typu HCD)
<i>Amyloidóza</i>	Únavový syndrom, nefrotický syndrom, renální insuficience, polyneuropatie, městnavá srdeční slabost aj.	Pozitivní výsledek barvení vzorku tkáně kongo červení, průkaz amyloidu, zvýšené hodnoty FLC

Nejčastějším onemocněním z řady MG je MGUS zahrnující asi 2/3 všech výskytů MG. Jedná se o asymptomatické, nezhoubné onemocnění s přítomností paraproteinu, které se může změnit v maligní MG. MGUS se transformuje především do MM přes asymptomatické stádium – doutnajících myelom. Diagnostická kritéria těchto stádií jsou uvedena v tabulce 14 (Ščudla 2018, Šolcová 2019, Zima 2013).

Tabulka 14 Diagnostická kritéria – MGUS, doutnající myelom a MM (Zima 2013)

	MGUS	Doutnající myelom	Mnohočetný myelom
Paraprotein koncentrace v séru (g/l)	M-IgG < 30 M-IgA < 20	M-IgG > 30 M-IgA > 30	Přítomen
Paraprotein v moči	–	–	Přítomen
Počet plasmocytů v KD (%)	< 10	> 10	≥ 10 nebo průkaz plasmocytomu
	Proteinurie lehkých řetězců < 1 g/ 24 h		
	Bez přítomnosti		Přítomnost orgánového poškození myelomem
	Hyperkalcemie	C	Ca > 2,8 mmol/l
	Renálního selhání (insuficience)	R	Kreatinin > 177 μmol/l
	Anemie	A	HGB < 100 g/l
	Osteolytických ložisek	B	Osteolytické kostní destrukce/ osteoporóza

Míru rizika přeměny MGUS v symptomatický MM dokážeme určit podle dalších diagnostických kritérií, která jsou uvedena v tabulce 15. Jedná-li se o vysoké riziko vzniku MM, rozumíme tím 58% riziko přechodu do 20 let od stanovení diagnózy MGUS.

Tabulka 15 Riziko přeměny MGUS do MM (Zima 2013, Vávrová 2020)

Rizikové faktory	Riziko			
	Nízké	Nízké-střední	Střední-vysoké	Vysoké
M-protein < 15 g/l	1 podmínka nesplněna	2 podmínky nesplněny	Žádná z podmínek nesplněna	
typ M-proteinu IgG				
Poměr FLC Normální				
Riziko přechodu MGUS do malignity během 20 let (%)	5	21	37	58

Dle uvedených rizik jsou doporučeny intervaly pravidelného sledování pacientů s diagnózou MGUS. Návrh vyšetřovacích postupů u těchto pacientů zavedl Kyle v roce 2010 (tabulka 16).

Tabulka 16 Doporučení sledování pacientů s diagnózou MGUS (Zima 2013)

Vyšetřovací postupy	Nízké riziko	Střední/ vysoké riziko
Vyšetření KD	Ne	Ano
Kontrolní elektroforéza	Za 3–6 měsíců	Za 3–6 měsíců
Nález bez vývoje po provedení kontrolní elektroforézy	Za 2–3 roky (nebo při nových obtížích)	Za 6–12 měsíců

Následuje maligní stav – MM, který zhodnocením určitých faktorů můžeme dále rozdělit do třech klinických stádií (tabulka 17), která zároveň určují prognózu pacienta.

Tabulka 17 Klinická stádia MM (Zima 2013)

Stádium	Kritéria (dle Durieho a Salmona)	Kritéria International Staging Systém (ISS)	Medián přežití (měsíce)
I	Jsou-li splněny všechny tyto podmínky:	B2M < 3,5 mg/l Albumin > 35 g/l	62
	1. HGB > 100 g/l 2. Ca v séru – v normě 3. RTG skeletu – v normě 4. M-komponenta nízká: IgG < 50 g/l IgA < 30 g/l exkrece FLC do moči < 4 g/24 h		
II	Nejsou-li splněny podmínky I. ani III. stádia.	Nejsou-li splněny podmínky I. ani III. stádia:	44
		1. B2M < 35 mg/l, albumin < 35 g/l 2. B2M 3,5–5,5 mg/l, bez ohledu na albumin	
III	Je-li přítomen alespoň jeden z uvedených znaků:	B2M > 5,5 mg/l	29
	1. HGB < 85 g/l 2. Ca v séru – zvýšený > 3,0 mmol/l 3. RTG skeletu vícečetná osteolytická ložiska v kostech 4. M-komponenta vysoká: IgG > 70 g/l IgA > 50 g/l exkrece FLC do moči > 12 g/24 h		
Subklasifikace: A – kreatinin < 177 μmol/l B – kreatinin > 177 μmol/l (renální insuficience s retencí dusíkatých látek)			

3. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit výskyt monoklonálních gamapatií, především maligních, u pacientů vyšetřovaných v Oblastní nemocnici Jičín a.s. K dosažení cíle bylo potřebné splnit následující body:

- Sbírat vzorky séra (případně i moči) pacientů vyšetřovaných v Oblastní nemocnici Jičín a.s. v období od června 2021 do září 2023
- Provést elektroforetickou analýzu séra (případně i moči) z nasbíraných vzorků
- Provést imunofixační analýzu vzorků séra (případně i moči) u pacientů s nálezem M-proteinu v elektroforeogramu
- Stanovit další důležité parametry u pacientů s prokázaným M-proteinem ke zhodnocení nálezu monoklonální gamapatie – CRAB symptomy, celková bílkovina, FLC, imunoglobuliny atd.
- Vyhodnotit naměřené výsledky včetně rozdělení nálezů do typů MG a provést jejich statistickou analýzu

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Biologický materiál

V rámci experimentální části diplomové práce byly využívány vzorky séra a moči pro elektroforézu i imunofixaci. Podrobnější informace o vyšetřovaných pacientech budou uvedeny v kapitole 5. Pro dosažení nejlepších výsledků je doporučeno využívat čerstvé vzorky séra a moče. Z ekonomického hlediska je však žádoucí využívat kity k analýze takového počtu vzorků, pro které jsou určeny. Z tohoto důvodu byly vzorky skladovány dle parametrů uvedených v tabulce 18 (Sebia 2020).

Tabulka 18 Možnosti skladování vzorků pro pozdější analýzu (Sebia 2020)

Teplota skladování (°C)	Doba skladování (týden)	
	Sérum	Moč
2–8	1	1
-20	12	4

4.1.1. Sérum

Jedním z analyzovaných biologických materiálů v rámci experimentální části práce bylo sérum, které vyžaduje jiný přístup před elektroforetickou a imunofixační analýzou.

4.1.1.1. Sérum pro elektroforézu

Vzorky séra se předem k elektroforetické analýze neředí ani jinak neupravují. Pokud používáme vzorky po rozmrazení, je nutné jejich důkladné promíchání.

Ve speciálních případech je doporučeno upravit vzorek séra přidavkem roztoku *Fluidil*, který je přikládán k reagenční soupravě. K 75 µl séra je doporučeno přidat 25 µl *Fluidil*, důkladně promíchat pomocí vortexu po dobu 15 sekund a dále postupovat dle standardního protokolu. Případy vyžadující úpravu vzorku:

- vzorky s narušenými difuzními vlastnostmi, tzn. viskózní nebo zakalené vzorky,
- vzorky s polymerizovaným IgM,
- vzorky s elektroforeogramem s nízkou intenzitou.

4.1.1.2. Sérum pro imunofixaci

Před imunofixací je třeba vzorky séra upravit, čímž se postup liší od elektroforézy. Ředícím roztokem (diluentem) je bromfenolová modř, která slouží k ulehčení nanášení vzorku na migrační plochu přístroje.

Sérum se ředí dle tabulky 19, následně je třeba naředěný vzorek důkladně promíchat. V případě, že je hladina celkových Ig vyšší než 20 g/l, používá se vyšší ředění vzorku (vyjma stopy ELP – viz dále). Naopak hladiny celkových Ig nižší než 5 g/l vyžadují nižší ředění (opět vyjma ELP).

Tabulka 19 Ředění vzorků séra diluentem před imunofixačním stanovením

STOPA	Sérum (μl)	Diluent (μl)
Imunofixační stopa IgG	20	100
Referenční stopa ELP a všechny další imunofixační stopy	30	60

K sadě reagensů je rovněž přidán *Fluidil*, který se využívá stejným způsobem jako u elektroforézy (viz kapitola 4.1.1.1).

4.1.2. Moč

K elektroforetické analýze využíváme vzorky ranní moči zahuštěné na koncentraci bílkoviny 1,5–2 g/l. Pro imunofixaci je doporučen vzorek sbírané moči, pokud není k dispozici lze metodu provést také ze zahuštěné moči jako u elektroforézy (Sebia 2020).

Vzorek ranní moče odebíráme do čisté a suché nádoby, nejlépe plastové zkumavky. Pro zabránění kontaminace se doporučuje předchozí omytí zevního genitálu (Prokopcová 2023).

Zahuštění moči na příslušnou koncentraci bílkovin umožňuje technika využívající absorpci rozpouštědla a nízkomolekulárních látek na celulózu membránu, kdy se naopak makromolekuly koncentrují na dně nádoby. Zmíněný princip mimo jiné využívá absorpční koncentrátor VIVAPORE firmy Sartorius (obrázek 3), který byl využit v rámci experimentální části práce. Zařízení VIVAPORE pipetou naplníme po okraj vzorkem ranní moči, necháme stát na rovné podložce, po dosažení rysky 50 (znamenající zahuštění 50×) odsajeme zbylý vzorek do čisté a řádně označené zkumavky. Takto upravenou moč analyzujeme pomocí elektroforézy, případně imunofixace (Vivapore 2021).



Obrázek 3 Zařízení pro zahuštění moči (Vivapore 2021)

4.2. Přístroje

Elektroforéza i imunofixace byly provedeny na poloautomatickém multiparametrickém systému *HYDRASYS 2 Focusing*. Poloautomat umožňuje provedení kompletní

- elektroforetické analýzy – nanesení vzorku, migrace, inkubace, sušení, barvení, odbarvení a závěrečné sušení,
- imunofixační analýzy – nanesení vzorku, separace, imunofixace, blotting, sušení a obarvení.

Přístroj *HYDRASYS 2 Focusing* má několik částí:

- **Migrační modul** – nosič elektrody, nosič aplikátoru, dynamická maska, tyč vodiče masky,
- **Barvicí modul** – držák gelu,
- **Uživatelské rozhraní** – TFT barevná dotyková obrazovka.

Dále byl využit *Photo scanner* značky *Epson* pro správné vyhodnocení vzniklých elektroforeogramů, případně imunofixačních výstupů. Gely jsou hodnoceny v počítačovém programu *Phoresis* (Sebia 2020).

4.3. Reagencie a materiál

V rámci experimentální části diplomové práce byly využity sady reagentů od firmy Sebia, která dodává kity pro elektroforetické i imunofixační stanovení.

4.3.1. Reagencie a materiál pro elektroforézu

K elektroforetické analýze séra i moči jsou určeny sady reagentů *HYDRAGEL* $\beta 1$ – $\beta 2$ s možností analýzy 7, 15 nebo 30 vzorků. Sada obsahuje agarózové gely, houbičky s pufrem, ředící roztok, amidočern, aplikátory, tenké filtrační papíry. Součástí sady není odbarvovací roztok, promývací roztok a *Fluidil*, které se objednávají samostatně (Sebia 2020).

4.3.1.1. Agarózové gely

Agarózové gely slouží jako nosné médium pro elektroforézu. Jedná se o alkalicky pufované gely s pH $8,6 \pm 0,5$. Gely obsažené v sadě *HYDRAGEL* jsou připraveny k použití, není třeba je dále upravovat. Gely lze skladovat při pokojové (15–30 °C) nebo chladničkové (2–8 °C) teplotě do doby expirace (Sebia 2020).

4.3.1.2. Pufované stripy

Pro kontakt gelu s elektrodami a také jako zásobárna pufru slouží pufované houbovitě proužky (stripy), které jsou součástí sady a jsou připraveny k použití. Pufr, kterým jsou napuštěny, obsahuje tlumící roztok s pH $8,5 \pm 0,5$. Obdobně jako gely se skladují při pokojové i chladničkové teplotě, důležitý je nepoškozený obal, protože jinak hrozí vyschnutí (Sebia 2020).

4.3.1.3. Ředící roztok pro amidočern

K vizualizaci elektroforeogramu slouží barvicí roztok, k jehož přípravě je nutná amidočern a ředící roztok (60 ml, pH 2). Ředící roztok se skladuje při chladničkové teplotě a nesmí se mrazit (Sebia 2020).

4.3.1.4. Amidočern

Pro obarvení gelu se využívá amidočern (20 ml), která je sama o sobě viskózní a může gelovatět, proto je třeba ji naředit následujícím postupem:

1. Do lahvičky zásobního roztoku amidočerni přidáme asi 15 ml ředícího roztoku pro amidočern. Nádobku pečlivě uzavřeme.
2. Lahvičku důkladně protřepeme po dobu 5 sekund.
3. Promíchaný obsah lahvičky přelijeme do odměrného válce.
4. Do prázdné lahvičky opět nalijeme asi 15 ml ředícího roztoku, promícháme a přelijeme do odměrného válce. Tento krok opakujeme 2–3krát do úplného rozpuštění amidočerni v zásobní lahvi.
5. Nalijeme zbylý obsah ředícího roztoku do odměrného válce a následně válec doplníme do 300 ml destilovanou (deionizovanou) vodou.
6. Obsah válce promícháváme po dobu 5–10 minut.
7. Obsah válce přelijeme do zásobního kanystru připojeného k přístroji. Nyní je barvicí roztok připraven k použití.

Takto připravený roztok je použitelný pro obarvení deseti gelů, poté je třeba roztok vyměnit (Sebia 2020).

4.3.1.5. Aplikátory

Aplikátory obsažené v sadě Sebia slouží k nanesení vzorků na gel, jsou připraveny k použití (Sebia 2020).

4.3.1.6. Tenké filtrační papíry

Pro odsátí přebytečné tekutiny z povrchu gelu se využívají tenké filtrační papíry na jedno použití (Sebia 2020).

4.3.1.7. Odbarvovací roztok

Koncentrát odbarvovacího roztoku se naředí 1000× destilovanou (deionizovanou) vodou (5 ml koncentrátu doplněný do 5 l vodou).

Takto připraveným roztokem se odstraňuje přebytečné množství barvicího roztoku z elektroforeogramu a plně se odbarvuje pozadí agarózové plotny. Tímto roztokem se také vyplachuje barvicí prostor po promývacím kroku (Sebia 2020).

4.3.1.8. Promývací roztok

Promývací roztok se ředí 62,5× destilovanou (deionizovanou) vodou (80 ml koncentrátu doplnit do 5 l vodou). Promývací roztok čistí modul přístroje určený k barvení gelů (Sebia 2020).

4.3.1.9. Vlhká zásobní komora

Vlhká zásobní komora se uchovává v ledničce (2–8 °C). Po nanesení vzorků na aplikátory se tyto aplikátory vloží do vlhké komory. Vlhké prostředí umožní difuzi vzorků do aplikátorů (Sebia 2020).

4.3.2. Reagencie a materiál pro imunofixaci

Po elektroforéze, při níž byl prokázán paraprotein, byla následně provedena imunofixace séra (případně i moči). Sada reagensů určená pro imunofixační analýzu se nazývá *HYDRAGEL IF 1, 2, 4* nebo *9* podle počtu analyzovaných vzorků. Během imunofixace jsou proteiny nejprve elektroforeticky rozděleny a následně inkubovány se specifickými antiséry proti těžkým (IgG, IgA, IgM) a lehkým (κ , λ) řetězcům.

Některé komponenty v sadě *HYDRAGEL IF* se shodují se součástmi kitu *HYDRAGEL β 1- β 2*. Jedná se o *agaróзовé gely, pufrované stripy, aplikátory, tenké filtrační papíry, odbarvovací roztok, promývací roztok, Fluidil a vlhkou zásobní komoru*. Dále jsou zmíněny části kitu obsažené pouze v *HYDRAGEL IF* (Sebia 2020).

4.3.2.1. Kyselá violeť

Na rozdíl od barvení elektroforeogramů se k vizualizaci imunofixace využívá kyselá violeť. Zásobní roztok kyselé violeti (75 ml) se ředí destilovanou (deionizovanou) vodou do 300 ml. Takto připravený barvicí roztok je určen pro barvení deseti gelů, následně je třeba ho vyměnit. Zásobní i pracovní roztok se může skladovat při pokojové i chladničkové teplotě. Nutností je však uchování v pevně uzavřené nádobě, aby nedocházelo k odpařování (Sebia 2020).

4.3.2.2. Diluent

Vzorky séra se před imunofixací ředí z důvodu ulehčení nanášení vzorku na migrační marker. K této úpravě vzorku slouží diluent (ředící roztok), který v tomto případě představuje bromfenolová modř. Diluent obsažený v sadě

HYDRAGEL IF je připraven k použití, skladuje se při pokojové nebo chladničkové teplotě. Postup ředění vzorků sér je uveden v kapitole (4.1.1.2) (Sebia 2020).

4.3.2.3. Antiséra

Antiséra pocházející z různých živočišných druhů (nejčastěji savčí) namířené proti lidským imunoglobulinům slouží k imunofixaci bílkovin, které byly rozděleny elektroforézou. Tyto protilátky jsou namířené proti lidským těžkým řetězcům γ , α , μ a proti lidským lehkým řetězcům κ , λ . Pro lepší rozlišení a snadnější práci s nimi jsou jednotlivé protilátky obarveny různými barvami. Pro nanášení antisér je součástí sady *HYDRAGEL* barevná referenční šablona. Antiséra se skladují při 2–8 °C a nesmí se mrazit (Sebia 2020).

4.3.2.4. Fixační roztok

Imunofixace probíhá v šesti migračních stopách, z nichž první je referenční (ELP) stopa. Do místa ELP stopy se žádné antisérum nenanáší, proto je nutné proteiny v této stopě fixovat, k tomu slouží fixační roztok. Fixační roztok není třeba předem upravovat, skladuje se při teplotě 2–8 °C (Sebia 2020).

4.3.2.5. Antisérové segmenty

Antisérové segmenty slouží k aplikaci antisér a fixačního roztoku na gely k imunofixaci (Sebia 2020).

4.3.2.6. Zesílené filtrační papíry

Oproti elektroforetické sadě obsahuje sada pro imunofixaci nejen tenké filtrační papíry, ale také zesílené, které slouží k odsátí proteinů, které s protilátkou nereagovaly, a odsátí nadbytku protilátek z gelu po imunofixaci (Sebia 2020).

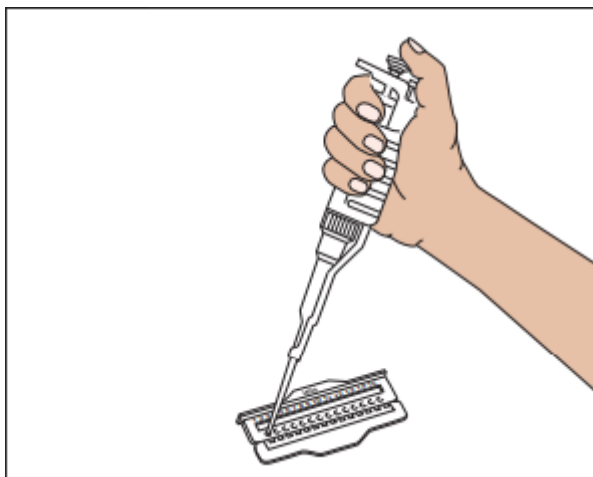
4.4. Postup elektroforetického stanovení

Elektroforéza probíhá na poloautomatickém přístroji, proto postup zahrnuje automatické i manuální kroky. Mezi automatizované části metody řadíme nanesení vzorků, elektroforetickou migraci, sušení, barvení, odbarvování a osušení gelu. Ručně se vkládají reagenty, manipuluje se se vzorky a gely, nastavuje přístroj do příslušného módu.

Postup můžeme rozdělit do 4 fází – nastavení migrace, migrace, příprava zpracování gelu a dokončení zpracování gelu (Sebia 2020).

4.4.1. Nastavení migrace

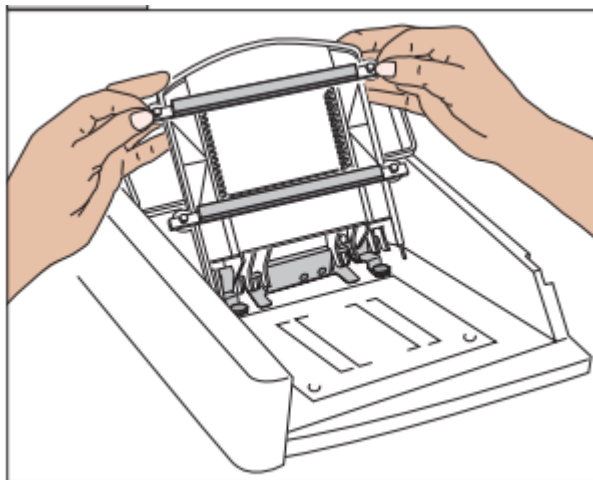
1. Zapneme analyzátor HYDRASYS. V menu přístroje vybereme příslušný program:
 - a. „7 B1-B2“ při analýze 7 vzorků s využitím sady *HYDRAGEL 7 β 1- β 2*,
 - b. „15/30 B1-B2“ při analýze 15 nebo 30 vzorků s využitím sady *HYDRAGEL 15 (30) β 1- β 2*.
2. Z laboratorního informačního systému (LIS) vytiskneme Pracovní protokol pro elektroforézu.
3. Z příslušné sady HYDRAGEL (dle počtu stanovovaných vzorků) vyjmeme aplikátory, umístíme je na rovnou podložku čísly jamek nahoru (obrázek 4).



Obrázek 4 Aplikátor vzorků HYDRAGEL (Sebia 2020)

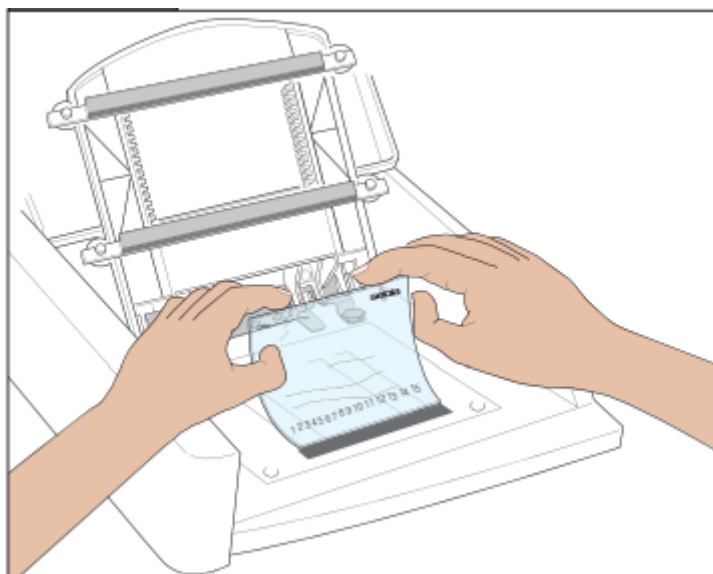
4. Do každé jamky aplikátoru pipetujeme 10 μ l séra nebo zahuštěné moči. Nanášení vzorků do všech jamek aplikátoru by nemělo trvat déle než 2 minuty.
5. S aplikátorem manipulujeme pouze za ochranný rámeček s nápisem „Sebia“. Aplikátor vložíme do vlhké komory zoubky směrem nahoru. Vlhkou komoru zavřeme, umístíme do lednice a necháme vzorky difundovat po dobu 5 minut.
6. Mezitím otevřeme víko migračního modulu, zvedneme nosiče elektrod a aplikátorů.
7. Ze sady reagensů a ochranného obalu vyndáme pufrované stripy, které je nutné držet pouze za plastové konce. Pufrované stripy umístíme za děrované konce

na kovové výstupky migračního rámečku nad elektrody tak, aby vyztužení proužků směřovalo k nosiči (obrázek 5).



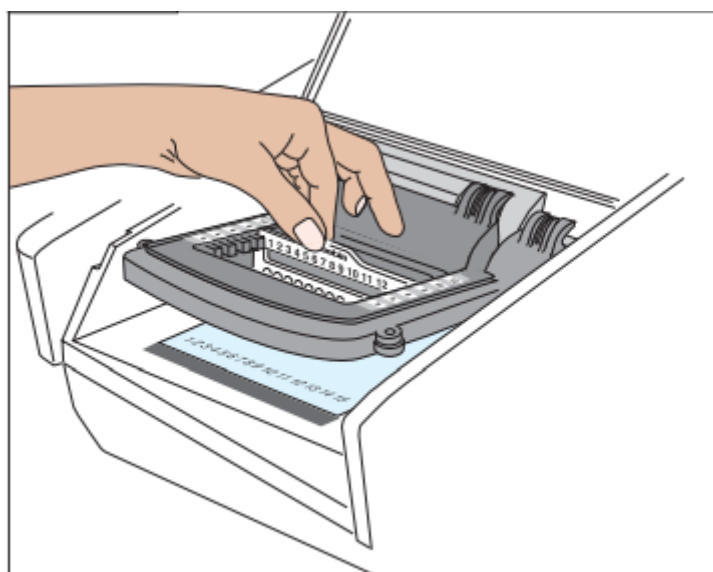
Obrázek 5 Správné umístění pufrovaných proužků do migračního modulu
(Sebia 2020)

8. Do spodní třetiny migrační plochy naneseme destilovanou vodu
 - a. 120 μl pro analýzu 7 vzorků a využití sady *HYDRAGEL 7 $\beta 1$ - $\beta 2$* ,
 - b. 200 μl pro analýzu 15 nebo 30 vzorků a využití sady *HYDRAGEL 15 (30) $\beta 1$ - $\beta 2$* .
9. Ze sady reagensů vyjmeme agarózový gel a jeden tenký filtrační papír. Agarózový gel vyndáme z ochranného obalu tak, abychom se nedotýkali horní části gelu. Gel si položíme na dlaň a manipulujeme s ním prsty pouze za hrany. Přebytečnou vodu z gelu vysajeme pomocí tenkého filtračního papíru tak, že filtrační papír po povrchu gelu postupně rolujeme až do přilnutí papíru po celé ploše gelu a následně papír sejmeme (delší kontakt gelu s filtračním papírem by mohl znamenat nežádoucí vyschnutí gelu).
10. Agarózový gel opřeme jeho spodním okrajem o zarážku na spodní části vyznačeného rámečku na migrační ploše. Gel ohneme a postupně pokládáme do kontaktu s kapkou vody, necháme vodu rovnoměrně rozestoupit po šířce gelu a pokračujeme s postupným pokládáním gelu až do jeho narovnání na migrační plochu. Gel musí být narovnaný s vyznačeným rámečkem na migrační ploše a nesmí pod ním být vzduchové bubliny (obrázek 6).



Obrázek 6 Vložení gelu na migrační plochu (Sebia 2020)

11. Snížíme migrační rámeček s pufrovanými stripy dolů.
12. Z lednice vyndáme vlhkou komoru s aplikátory a aplikátory z komůrky vyjmeme. Odlomíme ochranný rámeček aplikátorů a umístíme je do nosiče aplikátorů tak, aby čísla vyznačená na aplikátorech směřovala k nám (obrázek 7)
 - a. do pozice č. 6 v případě analýzy 7 nebo 15 vzorků,
 - b. do pozice č. 3 a 9 při analýze 30 vzorků



Obrázek 7 Vložení aplikátoru do nosiče (Sebia 2020)

13. Uzavřeme víko migračního modulu.
14. Stisknutím tlačítka „START“ v levé části menu spustíme migraci (Sebia 2020).

4.4.2. Migrace

Migrace probíhá jako automatizovaný proces v systému HYDRASYS.

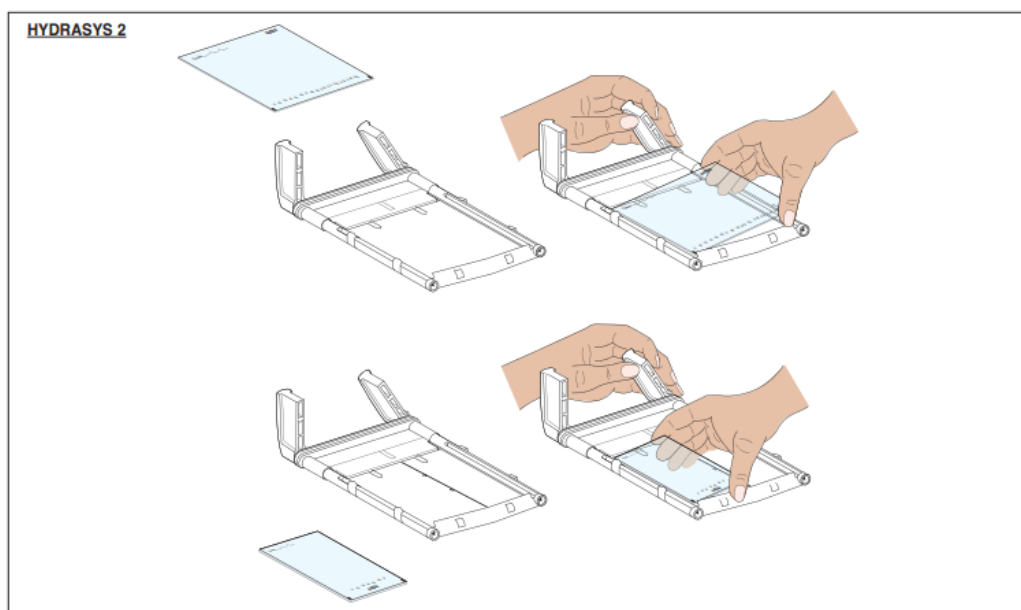
1. Nejprve probíhá aplikace vzorků do gelu, která je umožněna kontaktem gelu s pufrovanými stripy i aplikátory. Tento kontakt je umožněn po posunutí všech částí migračního rámečku směrem dolů. Aplikace probíhá 30 sekund.
2. Po dokončení aplikace se zvedne nosič aplikátorů. Elektrody nesoucí stripy zůstávají dole.
3. Následně proběhne migrace využívající řízení teploty na základě Peltierova efektu. Migrace probíhá 7 minut při 20 °C a při konstantním výkonu
 - a. 10 W pro analýzu 7 vzorků,
 - b. 20 W pro analýzu 15 nebo 30 vzorků.

Peltierův efekt je fyzikální jev, který popisuje vytváření teplotních rozdílů při průchodu elektrického proudu přes spoj dvou různých vodičů (termodynamických materiálů). V důsledku tohoto proudu dochází k absorpci tepla na jednom spoji (ochlazování) a uvolňování tepla na druhém spoji (ohřívání). Jev je závislý na směru proudu a materiálu vodičů.

4. Po migraci se zvedne nosič elektrod a elektrody se odpojí.
5. Následuje sušení gelu, při kterém stoupá teplota migrační plochy až na 65 °C. Sušení probíhá 10 minut.
6. Posledním bodem migrace je ochlazování gelu nejprve na 50 °C a následně na 20°C během 5 minut.
7. Po dokončení všech kroků automatizované migrace zazní zvukový signál (Sebia 2020).

4.4.3. Příprava zpracování gelu

1. Otevřeme víko migračního modulu.
2. Vydáme aplikátory a odstraníme je.
3. Zvedneme oba nosiče, sundáme pufrované stripy (uchopením za plastové konce) a odstraníme je.
4. Manipulací za hrany a spodní část vyjmeme vysušený gel.
5. Omyjeme migrační plochu a elektrody navlhčenou buničinou.
6. Z barvicí komory systému HYDRASYS vyjmeme držák gelu a otevřeme ho. Do žlábků držáku umístíme vysušený gel a zavřeme ho. Ujistíme se, že je plotna umístěna správně uvnitř držáku (obrázek 8) (Sebia 2020).



Obrázek 8 Vložení gelu do držáku gelu před barvením (Sebia 2020)

7. Držák s gelem umístíme zpět do barvicí komory.
8. Před zapnutím příslušného programu zkontrolujeme
 - a. zda kontejner obsahuje minimálně 300 ml barvicího roztoku,
 - b. zda kontejner pro odbarvování obsahuje minimálně 1 litr odbarvovacího roztoku,

c. zda kontejner na odpad není plný.

9. V pravém menu přístroje vybereme program pro barvení „PROTEIN(E)/β1-β2“ a stiskneme „START“.

Následně probíhá barvení, odbarvování a sušení gelu, během kterého je modul zajištěn. Po dokončení všech procesů zazní zvukový signál (Sebia 2020).

4.4.4. Dokončení zpracování gelu

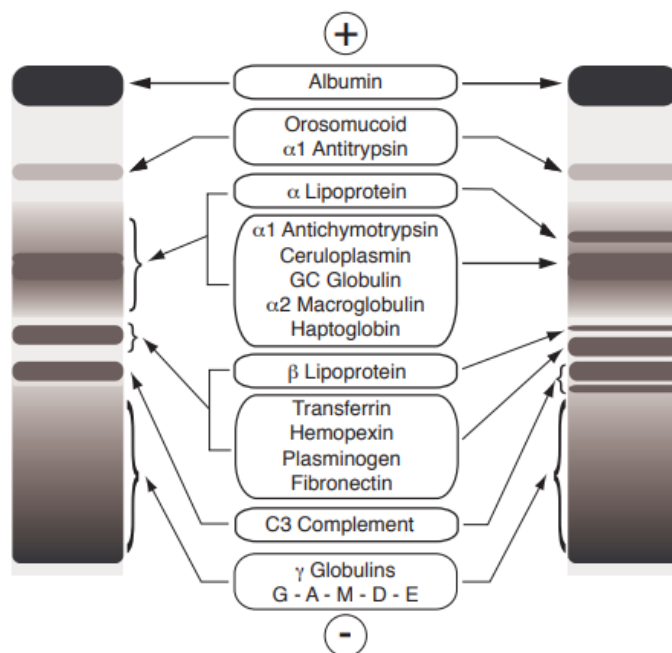
1. Vyjmeme držák s gelem, otevřeme ho a vyndáme usušený obarvený gel.
2. Zhodnotíme elektroforeogramy okem.
3. Zhodnotíme výstup elektroforézy denzitometricky pomocí skeneru. V programu *Phoresis* zvolíme příslušný počet pacientů na jednom elektroforeogramu a u všech pacientů vyplníme hodnotu celkové koncentrace bílkovin v séru (případně moči).
4. Hodnocení elektroforeogramů zahrnuje zhodnocení jednotlivých oblastí proteinů, případně jejich úpravu v programu a případný nález M-proteinu. Po nález M-proteinu a označení jeho oblasti program vypočítá jeho koncentraci na základě celkové koncentrace proteinů v séru (moči) pacienta. Dojde tedy ke kvantifikaci M-proteinu.
5. V případě nález M-proteinu pokračujeme imunofixací séra (moči) daného pacienta (Sebia 2020).

4.4.5. Kontrola kvality

Pro každou sérii vzorků je doporučeno zařadit kontrolní sérum. Kontrolní sérum dodává také společnost Sebia (Sebia 2020).

4.4.6. Interpretace výsledků

Elektroforéza bílkovin na agarózovém gelu, který slouží jako univerzální a efektivní podpůrné médium, rozdělí bílkoviny na 6 hlavních frakcí. Výstupem je elektroforeogram (obrázek 9). Doporučuje se provést hodnocení gelu ihned po dokončení zpracování gelu, kdy je gel nejkvalitnější.



Obrázek 9 Elektroforeogram (Sebia 2020)

Referenční rozmezí jednotlivých frakcí bílkovin se může lišit v jednotlivých laboratořích. Referenční meze pro Oddělení klinické biochemie v nemocnici Jičín jsou uvedeny v tabulce 20.

Tabulka 20 Referenční hodnoty jednotlivých frakcí bílkovin séra (Prokopcová 2022)

	%
Albumin	60,3–72,8
α1-globuliny	1,0–2,6
α2-globuliny	7,2–11,8
β1-globuliny	5,6–9,1
β2-globuliny	2,2–5,7
γ-globuliny	6,2–15,4

Každý číselný výsledek elektroforézy je také doplněn o klinické interpretační komentáře. Další vyšetřovací postup je dle výsledků konzultován s žádajícím lékařem. Pro správnou diagnostiku monoklonálních gamapatií se mimo elektroforeogram přihlíží také k výsledkům dalších speciálních vyšetření (Sebia 2020, Prokopcová 2023).

4.5. Postup imunofixace

K typizaci paraproteinu imunofixací se využívá obdobný poloautomatický systém HYDRASYS jako u elektroforézy. Manuální kroky zahrnují manipulaci se vzorky a gely, aplikaci fixačního roztoku a antisér, aplikaci reagensů a nastavení přístroje. Automaticky provádí systém postupné nanesení vzorku, elektroforetickou migraci, inkubaci s fixačním roztokem a antisérem, sušení, barvení, odbarvování a finální sušení (Sebia 2020).

4.5.1. Nastavení migrace

1. Zapneme systém HYDRASYS. V levé části menu zvolíme příslušný program migrace.
 - a. „1 IF SM/DM“ pro analýzu 1 vzorku s využitím sady *HYDRAGEL 1 IF*,
 - b. „2/4 IF SM/DM“ pro analýzu 2 nebo 4 vzorků s využitím sady *HYDRAGEL 2 (4) IF*,
 - c. „9 IF SM/DM“ pro analýzu 9 vzorků s využitím sady *HYDRAGEL 9 IF*.
 2. Z LISu vytiskneme Pracovní protokol pro imunofixaci.
 3. Z příslušné sady HYDRAGEL (dle počtu stanovovaných vzorků) vyjmeme aplikátory umístíme je na rovnou podložku čísla jamek nahoru:
 - a. 1 aplikátor pro analýzu 1 vzorku (*HYDRAGEL 1 IF*) nebo 2 vzorků (*HYDRASYS 2/4 IF*),
 - b. 2 aplikátory pro analýzu 4 vzorků (*HYDRAGEL 2/4 IF*),
 - c. 3 aplikátory pro analýzu 9 vzorků (*HYDRAGEL 9 IF*).
 4. Do každé jamky aplikátoru pipetujeme 10 µl zředěného séra (viz kapitola 4.1.1.2) nebo koncentrované moči (viz kapitola 4.2) dle následující tabulky 21. Nanášení vzorků do všech jamek aplikátoru by nemělo trvat déle než 2 minuty.
- Jamky č. 1, 8 a 15 se v sadě *HYDRAGEL IF 2/4* nevyužívají, proto je vhodné si je před nanášením vzorků označit (např. křížkem).

Tabulka 21 Postup pipetování při imunofixaci

	Imunofixační stopa					
	ELP	G	A	M	K	L
Sada <i>HYDRAGEL</i>	Číslo jamky					
<i>1 IF</i>	1	2	3	4	5	6
<i>2/4 IF</i>						
Vzorek č. 1 nebo 3	2	3	4	5	6	7
Vzorek č. 2 nebo 4	9	10	11	12	13	14
<i>9 IF</i>						
Vzorek č. 1, 4 nebo 7	1	2	3	4	5	6
Vzorek č. 2, 5 nebo 8	7	8	9	10	11	12
Vzorek č. 3, 6 nebo 9	13	14	15	16	17	18

5. S aplikátorem manipulujeme pouze za ochranný rámeček s nápisem „Sebia“. Aplikátor vložíme do vlhké komory zoubky směrem nahoru. Vlhkou komoru zavřeme, umístíme do lednice a necháme vzorky difundovat po dobu 5 minut.
6. Mezitím otevřeme víko migračního modulu, zvedneme nosiče elektrod a aplikátorů.
7. Ze sady reagentů a ochranného obalu vyndáme pufrované stripky, které je nutné držet pouze za plastové konce. Pufrované stripky umístíme za děrované konce na kovové výstupky migračního rámečku nad elektrody tak, aby vyztužení proužků směřovalo k nosiči (obrázek 5).
8. Do spodní třetiny migrační plochy naneseeme destilovanou vodu
 - a. 120 µl pro analýzu 1 vzorku s využitím sady *HYDRAGEL 1 IF*,
 - b. 200 µl pro analýzu 2, 4 nebo 9 vzorků s využitím sady *HYDRAGEL 2/4 IF* nebo *9 IF*.
9. Ze sady reagentů vyjmeme agarózový gel a jeden tenký filtrační papír. Agarózový gel vyndáme z ochranného obalu tak, abychom se nedotýkali horní části gelu, gel si položíme na dlaň a manipulujeme s ním prsty pouze za hrany. Přebytkovou vodu z gelu vysajeme pomocí tenkého filtračního papíru tak, že filtrační papír po povrchu gelu postupně rolujeme až do přilnutí papíru po celé ploše gelu a následně papír sejmem z gelu (delší kontakt gelu s filtračním papírem by mohl znamenat nežádoucí vyschnutí gelu).

10. Agarózový gel opřeme jeho spodním okrajem o zarážku na spodní části vyznačeného rámečku na migrační ploše. Gel ohneme a postupně pokládáme do kontaktu s kapkou vody, vodu necháme rovnoměrně rozestoupit po šířce gelu a pokračujeme s postupným pokládáním gelu až do jeho narovnání na migrační plochu. Gel musí být zarovnan s vyznačeným rámečkem na migrační ploše a nesmí pod ním být vzduchové bubliny (obrázek 6).
11. Snížíme migrační rámeček s pufrovanými stripy dolů.
12. Z lednice vyndáme vlhkou komoru a aplikátory z ní. Odlomíme ochranný rámeček aplikátorů a umístíme je do nosiče aplikátorů tak, aby čísla vyznačená na aplikátorech směřovala k nám (obrázek 7):
 - a. do pozice č. 6 v případě analýzy 1 nebo 2 vzorků,
 - b. do pozic č. 3 a 9 při analýze 4 vzorků,
 - c. do pozic č. 2, 6 a 10 při analýze 9 vzorků.
13. Uzavřeme víko migračního modulu.
14. Stisknutím tlačítka „START“ v levé části menu spustíme migraci (Sebia 2020).

4.5.2. Migrace

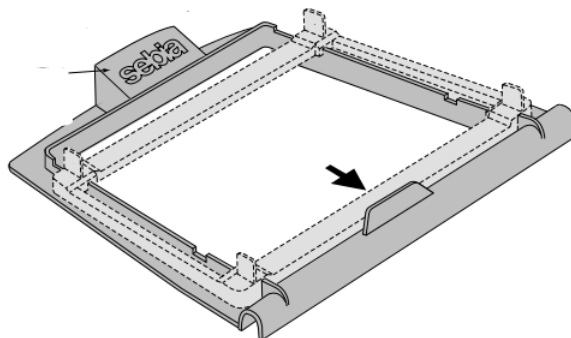
Migrace probíhá jako automatizovaný proces v systému HYDRASYS. Migrace je založena na principu Peltierova efektu (viz kapitola 4.4.2) a probíhá za konstantního výkonu 10 W pro *HYDRAGEL 1 IF* a 20 W pro *HYDRAGEL 2/4 IF* a *9 IF* při 20 °C.

Po zaznění signálu je migrace dokončena, na displeji se objeví nápis „↓ AS“ (Sebia 2020).

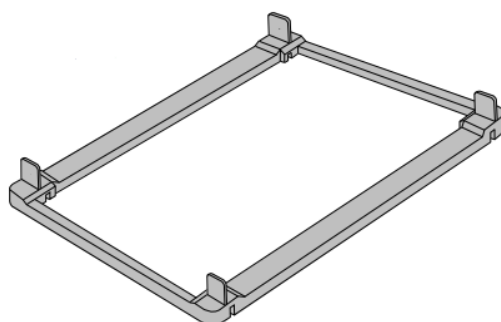
4.5.3. Nastavení imunofixací

Během probíhající migrace si připravte tzv. dynamickou masku, která slouží k rovnoměrnému nanesení antisér na gel dle následujícího postupu.

1. Vodicí rámeček (obrázek 10) položíme na rovnou plochu. Pokud analyzujeme 1 nebo 2 vzorky, je třeba do rámečku umístit distanční rámeček (obrázek 11) pro redukci délky.

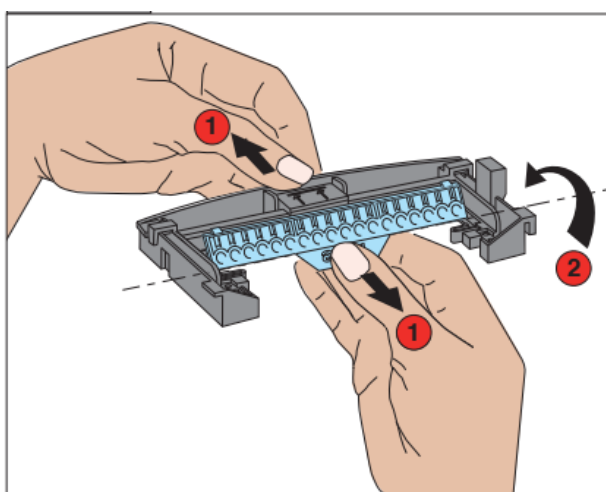


Obrázek 10 Vodící rámeček dynamické masky (Sebia 2020)



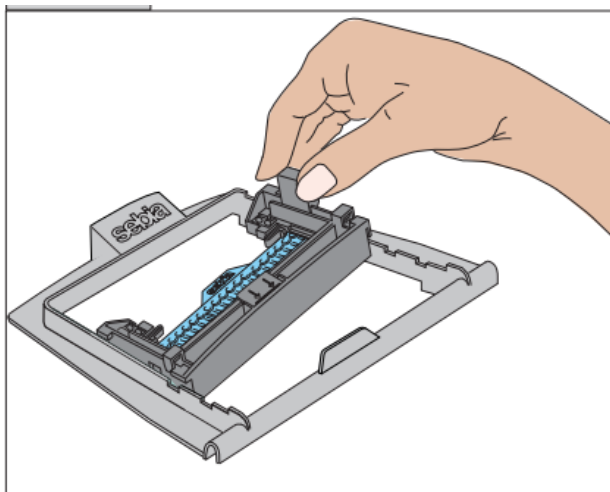
Obrázek 11 Distanční rámeček dynamické masky pro redukci délky (Sebia 2020)

- Segment sloužící pro nanášení antisér upevníme do jeho držáku tak, že ho nejprve pod úhlem 45° vtlačíme proti plastovým pružinkám do držáku, současně táhneme segment i držák od sebe a segment postupně narovnááme (obrázek 12). Segment by měl být zafixován do zoubků držáku.



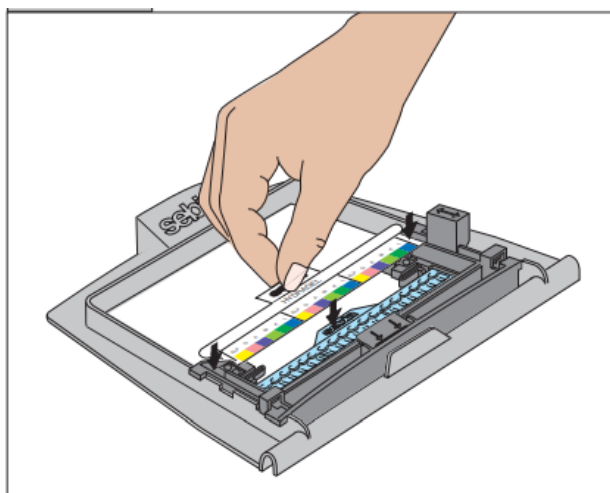
Obrázek 12 Postup umístění segmentu pro antiséra do držáku (Sebia 2020)

3. Držák se segmentem umístíme do vodícího rámečku dynamické masky (obrázek 13).



Obrázek 13 Umístění držáku se segmentem do dynamické masky (Sebia 2020)

4. Na držák před jamky umístíme barevnou šablonu (dle příslušné metody), která slouží ke správnému nanesení antisér.



Obrázek 14 Umístění barevné referenční šablony do dynamické masky (Sebia 2020)

5. Reagencie pipetujeme do jamek dle barevné referenční šablony, která usnadňuje aplikaci antisér (viz tabulka 22), následovně:
 - a. *HYDRAGEL 1 IF* – 6 jamek: 8 μ l na jamku,
 - b. *HYDRAGEL 2/4 IF* – 15 jamek: 8 μ l na jamku při analýze 2 vzorků, 12 μ l na jamku při analýze 4 vzorků,

v tomto kitu se nevyužívají jamky 1, 8 a 15,

c. *HYDRAGEL 9 IF* – 18 jamek: 8 μ l na jamku.

Tabulka 22 Antiséra

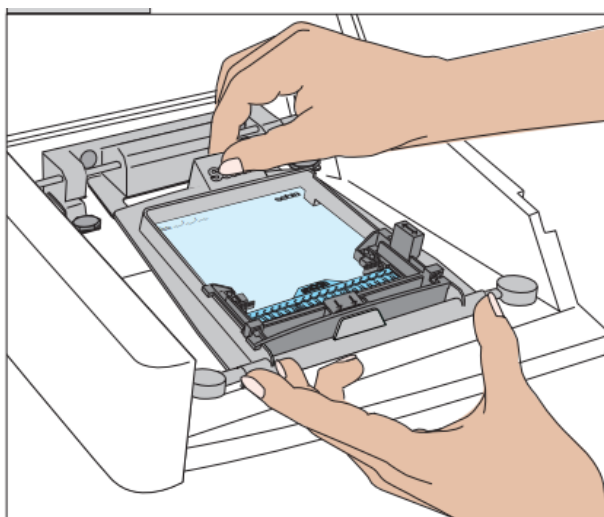
STOPA	REAGENCIE	BARVA
ELP	Fixační roztok	Žlutá
G	Antisérum proti těžkým řetězcům γ	Růžová
A	Antisérum proti těžkým řetězcům α	Tmavě modrá
M	Antisérum proti těžkým řetězcům μ	Žlutozelená
K	Antisérum proti lehkým řetězcům κ (volné i vázané)	Světle zelená
L	Antisérum proti lehkým řetězcům λ (volné i vázané)	Světle modrá

6. Po napipetování antisér do jednotlivých jamek, vyjmeme referenční šablonu (Sebia 2020).

4.5.4. Imunofixace

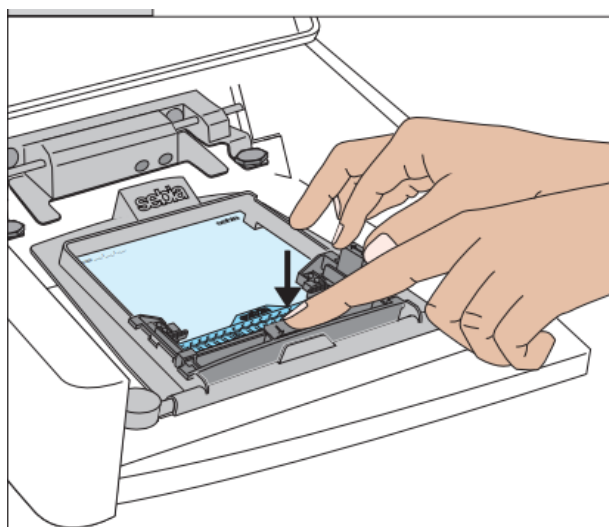
Po dokončení migrace následuje imunofixace, tedy po zaznění zvukového signálu a zobrazení nápisu na displeji „ \Downarrow AS”.

1. Otevřeme víko migračního modulu.
2. Vyjmeme aplikátory vzorků, které vyhodíme do nebezpečného odpadu.
3. Zvedneme oba nosiče, sundáme pufrované stripy a odstraníme je. Vyjmeme i oba nosiče. Gel ponecháme na místě.
4. Vezmeme připravenou dynamickou masku s antiséry a položíme ji na vodící kovovou tyčku v místě migrační plochy (obrázek 15). S dynamickou maskou manipulujte pouze za nápis „Sebia“.



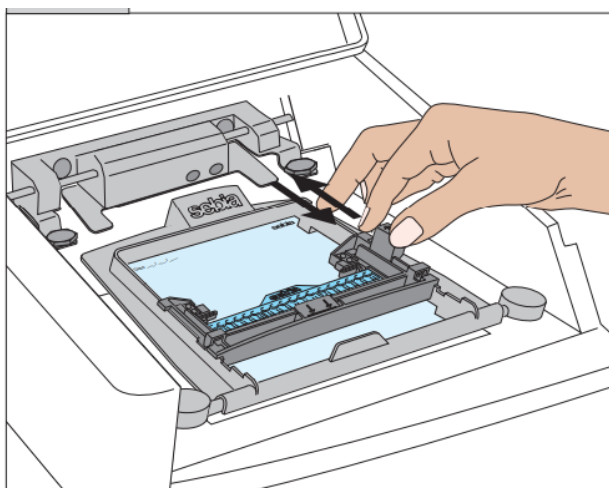
Obrázek 15 Umístění dynamické masky na gel v migračním modulu (Sebia 2020)

5. Držák segmentu na dynamické masce přesunujeme do nejnižšího bodu (nejblíže k nám).
6. Uprostřed držáku segmentu se nachází vyznačený bod, na který zatlačíme prstem a opět uvolníme (obrázek 16).



Obrázek 16 Centrální bod držáku segmentu (Sebia 2020)

7. Uchopíme držák segmentu za označenou úchytku na pravé straně a rovnoměrným pomalým pohybem posouváme držák segmentu po celé délce dynamické masky nahoru a zase zpět dolů (obrázek 17). Tato aplikace by měla trvat přibližně 5 sekund, aby došlo ke správnému a rovnoměrnému rozprostření antisér po celé ploše gelu.



Obrázek 17 Aplikace antisér pomocí dynamické masky (Sebia 2020)

8. Vyjmeme celou dynamickou masku a zavřeme víko migračního modulu.
9. Následně stiskneme tlačítko „START“ (Sebia 2020).

4.5.5. Inkubace

Po nanesení antisér následuje inkubace rozdělených bílkovin s antiséry. Inkubace je také založena na Peltierově efektu při 20 °C, jedná se o automatizovaný proces.

Po dokončení inkubace zazní zvukový signál a objeví se nápis „↓ THICK FILTER PAPER“ (Sebia 2020).

4.5.6. Odsátí přebytečné tekutiny z gelu

1. Z obalu vyjmeme zesílený filtrační papír.
2. Otevřeme víko migračního modulu.
3. Zarovnáme okraj filtračního papíru s okrajem gelu, nakloníme jej pod úhlem 45° a pomalu jej přiložíme na celý gel.
4. Jednou rukou si přidržujeme filtrační papír na gelu, aby nedošlo k jeho posouvání po gelu (mohlo by dojít k znehodnocení výsledků). Prsty druhé ruky přejíždíme nejprve po okrajích filtračního papíru a následně po celé jeho ploše, aby došlo k dokonalé přilnavosti papíru na gelu.
5. Zavřeme víko migračního modulu.

6. Stiskneme tlačítko „START“.

Následuje automatické odsátí gelu do filtračního papíru opět na principu Peltierova efektu při 40 °C. Po dokončení zazní zvukový signál a objeví se nápis na displeji „↑ THICK FILTER PAPER“ (Sebia 2020).

4.5.7. Sušení gelu

1. Otevřeme víko migračního modulu.
2. Odstraníme filtrační papír.
3. Gel ponecháme na místě.
4. Víko zavřeme a stiskneme tlačítko „START“.

Následuje automatizovaný proces sušení gelu Peltierovým efektem při 50 °C. Po jeho dokončení zazní zvukový signál a na displeji se objeví hláška „MAINTAINED TEMPERATURE“.

Tímto krokem je dokončena část imunofixace probíhající v migračním modulu (Sebia 2020).

4.5.8. Nabarvení gelu

1. Otevřeme víko migračního modulu.
2. Vyjmeme osušený gel.
3. Otevřeme držák gelu, do kterého umístíme osušený gel tak, aby se nacházel mezi drážkami držáku. Zavřeme držák gelu.
4. Držák se správně umístěným gelem vložíme do barvicího modulu.
5. Před zahájením barvení se ujistíme, že máme dostatečné množství promývacího roztoku (minimálně 400 ml), barvicího roztoku (minimálně 300 ml) a odbarvovacího roztoku (minimálně 1 litr). Dále se ujistíme, že odpadní nádoba není plná.
6. Z pravého menu přístroje vybereme program *IF ACID VIOLET*.
7. Spustíme barvicí proces stisknutím tlačítka „START“ (Sebia 2020).

4.5.9. Konečné zpracování gelu

1. Vyjmeme držák s gelem z barvicího modulu. Otevřeme ho a vyjmeme obarvený gel.
2. Obarvený gel okem zhodnotíme (Sebia 2020).

4.5.10. Kontrola kvality

Po každé změně reakčního činidla je doporučeno analyzovat kontrolní sérum stejným způsobem jako patientská séra (Sebia 2020).

4.5.11. Interpretace výsledků

Imunofixační analýzou séra nebo moči pacienta můžeme získat následující výstupy:

1. **Nepřítomnost monoklonální komponenty**, která se vyznačuje jemným difuzním zbarvením polyklonálních imunoglobulinů ve všech stopách.
2. **Přítomnost monoklonální komponenty**, kdy v obarveném gelu nacházíme monoklonální proužek detekovaný jedním z antisér proti těžkým nebo lehkým řetězcům. Detekovaný proužek musí být umístěn ve stejné migrační vzdálenosti jako monoklonální proužek v referenční stopě (ELP).
3. **Přítomnost dvou nebo více monoklonálních komponent**, v tomto případě se jedná o biklonální gamapatii (2 proužky těžkých řetězců a 2 proužky lehkých řetězců) nebo o oligoklonální gamapatii (mnohočetné proužky 1 nebo více typů těžkých řetězců nebo jedním/dvěma typy lehkých řetězců) (Sebia 2020).

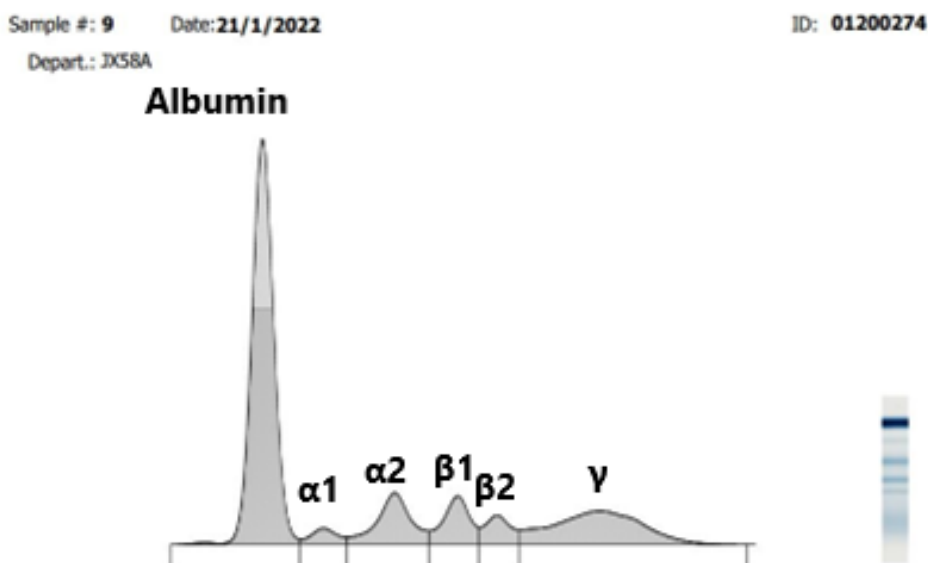
4.6. Statistické vyhodnocení výsledků

Ke statistickému zhodnocení získaných dat v rámci experimentální části diplomové práce byla využita popisná statistika. Pro zjištění vztahu mezi dvěma kategoriálními proměnnými jsme použili neparametrickou statistickou metodu Chí–kvadrát test. Tato metoda umožňuje posoudit, zda mezi proměnnými existuje statisticky významná závislost na 5% hladině významnosti. Četnosti studovaných proměnných se nejprve zavedou do kontingenční tabulky, ze které se následně stanovuje p–hodnota metodou Chí–kvadrát. Pokud je p–hodnota nižší než hladina významnosti (v našem případě 5 %), zamítáme nulovou hypotézu, tudíž se jedná o statisticky významnou závislost

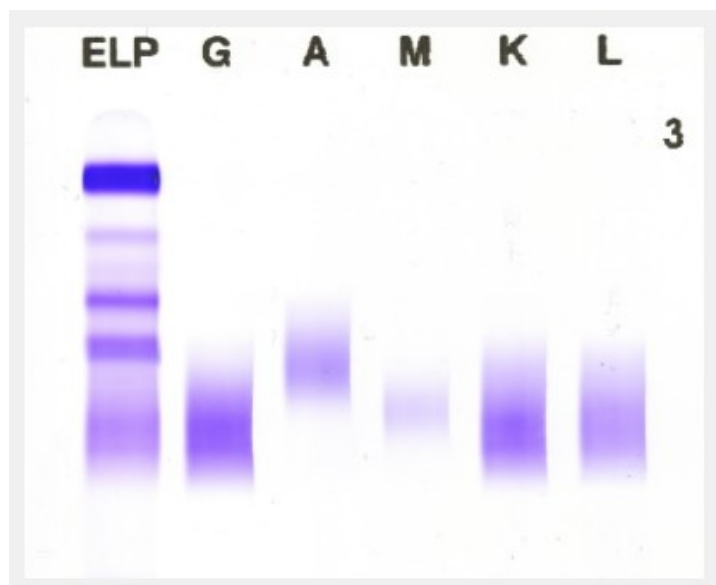
mezi danými proměnnými. Naopak pokud je p -hodnota vyšší než hladina významnosti, nulová hypotéza je potvrzena a parametry na sobě nejsou statisticky významně závislé. Statistická analýza byla provedena v programech Microsoft Excel 2021 a GraphPad Prism.

5. VÝSLEDKY

V rámci experimentální části diplomové práce bylo elektroforeticky vyšetřeno celkem 3805 patientských vzorků v období od června 2021 do září 2023. Z vyšetřených vzorků byl u 789 elektroforeticky (ELFO) prokázán paraprotein, proto u nich následovalo vyšetření IFE. Pokud bychom analýzu IFE převedli na počet pacientů, značí jejich počet 518 (u některých byla imunofixace provedena vícekrát). U zbylých 3016 vzorků byl ELFO nález negativní (obrázek 18). Imunofixace prokázala paraprotein u 292 pacientů. U 7,3 % patientských vzorků byla prokázána benigní forma MG (MGUS) s různým rizikem přechodu do maligní formy. U 5,9 % patientských vzorků se přítomnost M-proteinu imunofixačně neprokázala (obrázek 19). U zbylých 14 vzorků IFE a další parametry prokázaly některý z typů maligní MG.



Obrázek 18 Negativní nález ELFO (Albumin: 60,3–72,8 %; α_1 : 1,0–2,6 %; α_2 : 7,2–11,8 %; β_1 : 5,6–9,1 %; β_2 : 2,2–5,7 %; γ : 6,2–15,4 %)



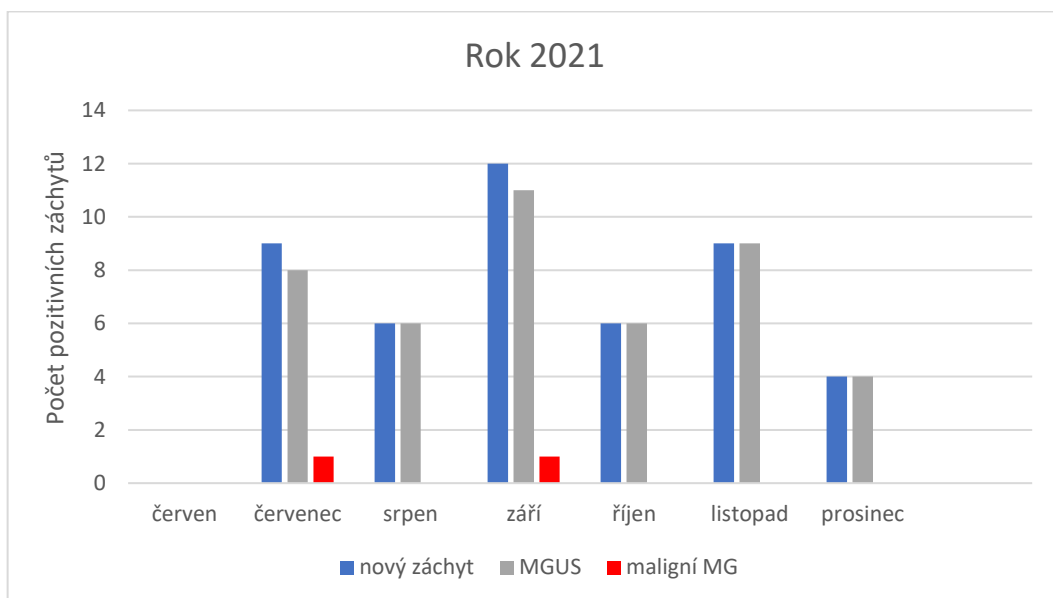
Obrázek 19 Negativní nález IFE – 6 stop: ELP (bez antiséra, obdoba ELFO), G (anti-IgG), A (anti-IgA), M (anti-IgM), K (anti- κ), L (anti- λ)

Jednalo se o pacienty z různých oddělení Oblastní nemocnice Jičín i partnerské nemocnice Nový Bydžov, ale také od praktických lékařů nebo specialistů (např. alergolog, oční lékař). Nejvíce záchytů jsme zaznamenali u pacientů z Oddělení transfuzního a hematologického (HTO) nemocnice Jičín. ELFO stanovení bylo u většiny pacientů požadováno lékařem. V případě, že anamnéza či laboratorní výsledky ukazovaly možnost výskytu MG, byla ELFO po konzultaci analytického pracovníka laboratoře s ošetřujícím lékařem dovyšetřena (celkem u 2 % pacientů). Pro lékaře Oblastní nemocnice Jičín i okolní praktické lékaře či specialisty se konají semináře poukazující na problematiku MG, včetně typických příznaků (např. bolestivost zad, únava), což umožňuje vyšší záchyt tohoto onemocnění. Tuto skutečnost potvrzuje tabulka 23, která ukazuje procentuální zastoupení jednotlivých oddělení, praktických lékařů a specialistů, kteří nechali vyšetřit ELFO u svých pacientů a MG se pomocí IFE prokázala. Pokud není v tabulce uvedeno jinak, jedná se o oddělení Oblastní nemocnice Jičín a.s.

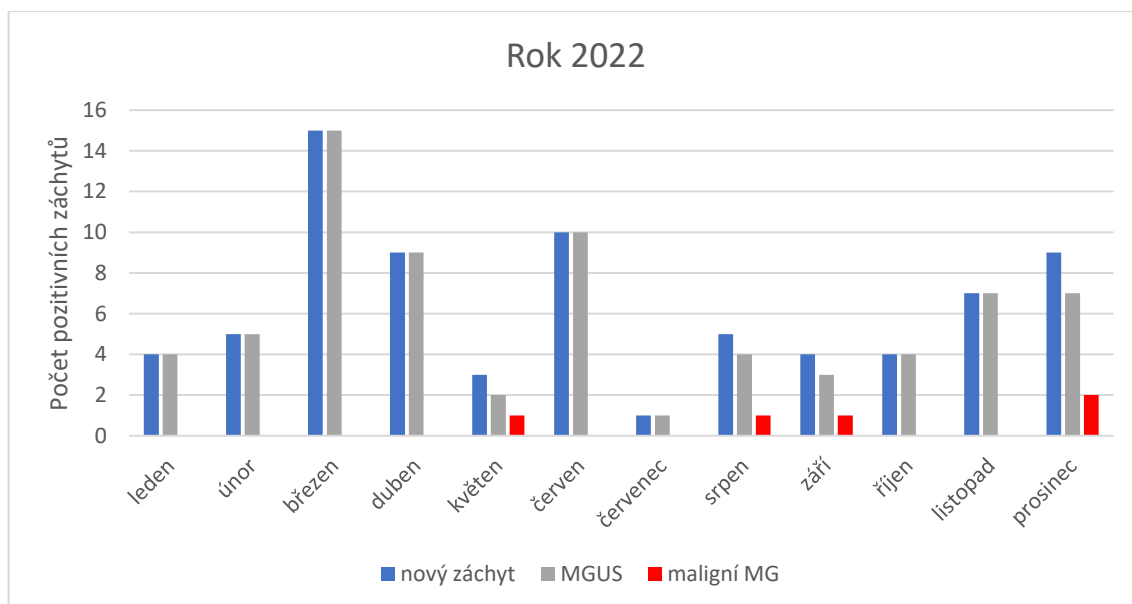
Tabulka 23 Zastoupení pacientů s MG dle oddělení či lékařů

Oddělení	Pacienti s pozitivním IFE (%)
HTO	26,0
Interní oddělení	16,8
Praktičtí lékaři	14,7
Interní ambulance (Nový Bydžov)	5,5
Metabolická ambulance	4,1
Nefrologické oddělení	3,4
Neurologická ambulance	3,1
Interní ambulance	2,8
Interní oddělení (Nový Bydžov)	2,8
Gastroenterologie	2,7
Revmatologie	2,4
Dialýza	2,1
Jednotka intenzivní péče	2,1
Neurologické oddělení	2,1
Oddělení klinické biochemie	2,1
Lékařská pohotovostní služba	1,4
Neurologie (poliklinika)	1,0
Léčebna dlouhodobě nemocných (LDN) (Nový Bydžov)	0,7
Nefrologická ambulance (Nový Bydžov)	0,7
Lékař věznice Valdice	0,7
Anesteziologicko-resuscitační oddělení	0,3
Diabetologie	0,3
Hemodialýza	0,3
Chirurgie	0,3
Nefrologická ambulance	0,3
Revmatologie (Nový Bydžov)	0,3
Endokrinologie (poliklinika)	0,3
Alergologie	0,3
Oční lékař (poliklinika)	0,3

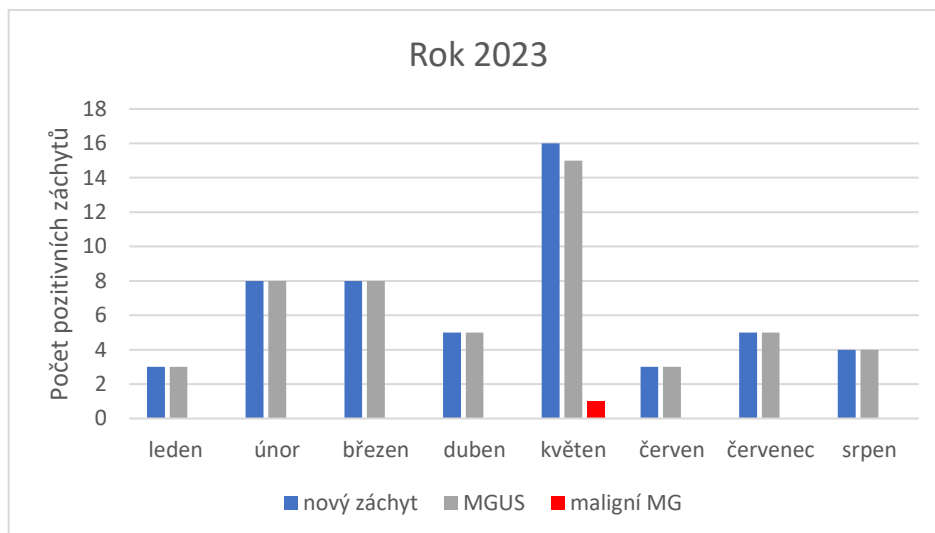
Z celkového počtu 292 pozitivních IFE byl paraprotein prokázán nově (dříve nebyl diagnostikován) u 177 pacientů, ve většině případů jako nemaligní forma MGUS mimo osmi případů s maligní formou MG. V následujících grafech (obrázek 20–22) je znázorněn celkový počet nových záchytů v daném měsíci (modrý sloupec) a z toho počet nových maligních (červený sloupec) a nemaligních (šedý sloupec) MG ve zmíněném období.



Obrázek 20 Záchyt nových MG v jednotlivých měsících roku 2021.



Obrázek 21 Záchyt nových MG v jednotlivých měsících roku 2022



Obrázek 22 Záchyt nových MG v jednotlivých měsících roku 2023

Ve sledovaném období bylo zjištěno celkem 14 případů maligních MG, z nichž u osmi bylo onemocnění diagnostikováno nově. Následující tabulka 24 shrnuje výsledky a základní údaje o pacientech s maligním typem MG. Na přiložených obrázcích 23–26 jsou viditelné příklady záchytů paraproteinů u pacientů s maligní MG.

Tabulka 24 Přehled pacientů s maligní MG

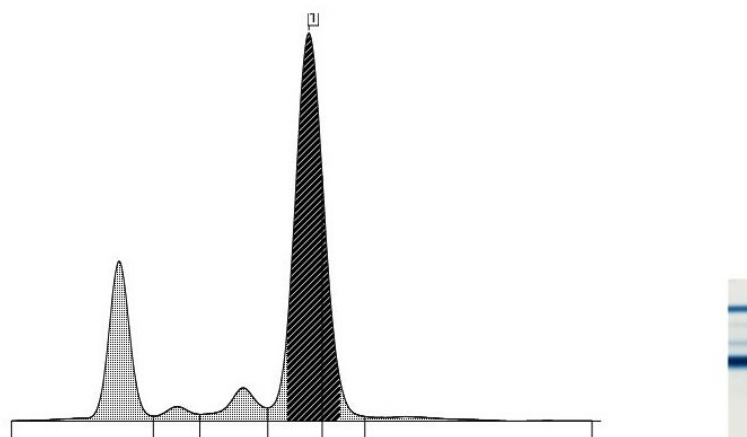
Pacient č.	Nový	Pohlaví	Věk	Oddělení	M-protein (g/l)	Typ M-proteinu	Typ MG
1	Ne	Muž	69	HTO	30,9	IgM λ	MW
2	Ano	Žena	91	Interní odd. Nový Bydžov	66,0	IgG λ	Doutnající myelom
3	Ne	Žena	91	LDN Nový Bydžov	30,4	IgG λ	Doutnající myelom
4	Ano	Muž	86	Hemodialýza	47,0	IgG κ	MM
5	Ano	Muž	82	HTO	30,5	IgG κ	MM
6	Ano	Žena	80	Interní amb.	44,4	IgG κ	MM
7	Ano	Žena	57	Chirurgie	43,6	IgG κ	MM
8	Ano	Žena	88	Interní odd. Nový Bydžov	49,9	IgG κ	Doutnající myelom
9	Ano	Muž	50	Interní odd.	60,8	IgG λ	MM
10	Ano	Muž	59	Prakt. lékař	84,6	IgG κ	MM
11	Ne	Žena	87	HTO	32,2	IgG κ IgG λ	MM
12	Ne	Muž	50	HTO	19,6	IgM κ	MW
13	Ne	Muž	67	HTO	15,7	IgG κ	Doutnající myelom
14	Ne	Žena	87	HTO	18,1	IgM κ	MW

Na obrázku 23 je ukázán elektroforeogram pacienta 10, u něhož byla nalezena nejvyšší koncentrace paraproteinu. Konkrétně se jednalo o IgG κ a jeho koncentrace byla 84,6 g/l. Na následujícím obrázku 24 je záznam z IFE tohoto pacienta.

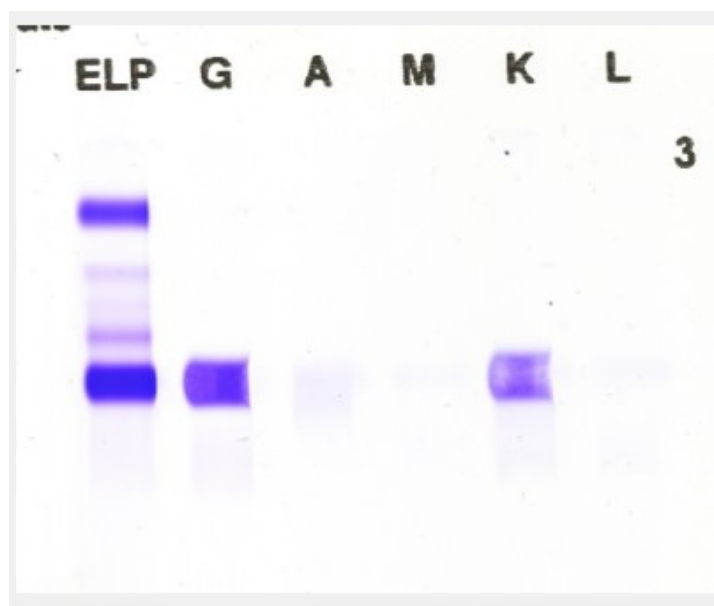
Sample #: 5 Date: 5/5/2023

ID: 05040470

Depart.: NP05A



Obrázek 23 Elektroforeogram pacienta č. 10 s nejvyšší koncentrací paraproteinu v oblasti β (IgG κ 84,6 g/l)

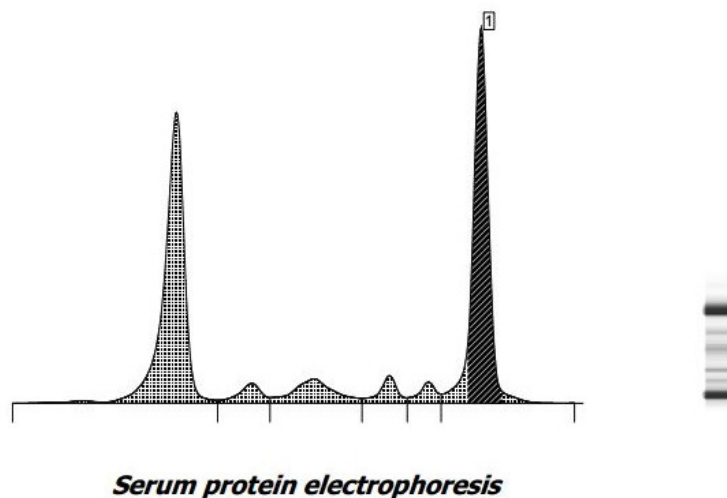


Obrázek 24 Výsledný gel IFE pacienta č. 10 s nejvyšší koncentrací paraproteinu (IgG κ 84,6 g/l)

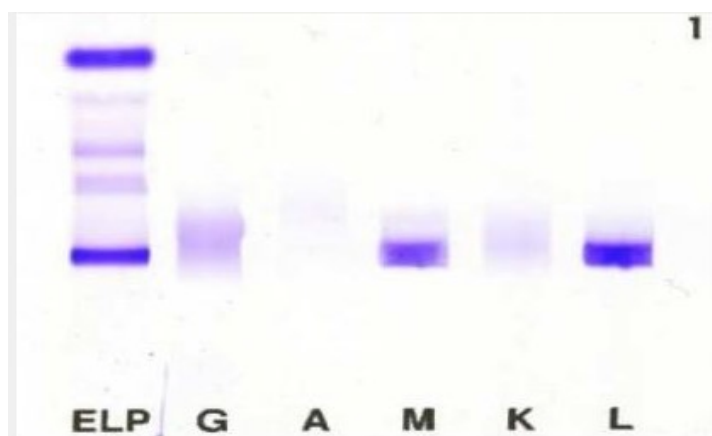
U pacienta č. 1 byl identifikován paraprotein IgM. V obrázku 25 je ukázán elektroforeogram tohoto pacienta a v obrázku 26 záznam IFE.

Sample #: 16 Date: 16/11/2023
 Depart.: JX58A

ID: 1116Pe255S
 Birth: 23/11/1952



Obrázek 25 Elektroforeogram pacienta č. 1 s paraproteinem typu IgM v oblasti γ



Obrázek 26 Výsledek IFE pacienta č. 1 s paraproteinem typu IgM λ

U pacientů s doutnajícím myelomem jsou dalším důležitým faktorem CRAB symptomy, díky kterým dokážeme rozlišit, zda se jedná o doutnající myelom či MM (tabulka 25).

Tabulka 25 CRAB symptomy pacientů s doutnajícím myelomem

Pacient č.	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Ca (mmol/l)	HGB (g/l)
2	173	1,86	53
3	128	1,97	103
8	58	2,38	112
13	59	2,31	132

Dalším důležitým sledovaným faktorem jsou volné lehké řetězce a jejich poměr. Tento parametr může poukázat na výskyt amyloidózy. Amyloidóza je onemocnění, které se diagnostikuje po specifickém nálezů amyloidu, který se v laboratoři Oblastní nemocnice Jičín neurčuje. V případě podezření na toto onemocnění je pacient odeslán na specializované pracoviště (např. Fakultní nemocnice Hradec Králové). Poměr FLC mimo amyloidózy umožňuje společně s dalšími parametry určit riziko přechodu benigní MGUS do maligního MM. Z celkového počtu 292 IFE pozitivních pacientů byla u 192 (tj. 65,8 %) zjištěna nějaká abnormalita v hodnotách FLC nebo jejich poměru. Statistika abnormálního výskytu FLC je uvedena v tabulkách 26 a 27.

Tabulka 26 Statistika abnormálních hodnot FLC všech pacientů

	Počet abnormálních (%)	Nejvyšší hodnota (mg/ml)	Nejnižší hodnota (mg/ml)
FLC κ	17,9	6050,00	7,70
FLC λ	1,4	2890,00	2,55
poměr $\frac{\kappa}{\lambda}$	1,0	378,33	0,01

Tabulka 27 Statistika jednotlivých typů FLC všech pacientů

Kombinace	FLC κ , FLC λ , poměr $\frac{\kappa}{\lambda}$	FLC κ , poměr $\frac{\kappa}{\lambda}$	FLC λ , poměr $\frac{\kappa}{\lambda}$	FLC κ , FLC λ
Počet abnormálních (%)	21,2	26,1	5,8	26,6

Zjištěnou koncentraci a typ M-proteinu a poměr FLC jsme u 278 pacientů s MGUS dále použili k určení rizika přechodu do maligní formy MG. Určení rizika mimo jiné koreluje s doporučenými intervaly a vyšetřeními u pacienta s diagnózou MGUS. Následující tabulka 28 rozděluje pacienty s MGUS do 4 skupin dle rizika přechodu do maligní formy.

Tabulka 28 Rozdělení pacientů s MGUS dle rizika přechodu do malignity

	Riziko			
	Nízké	Nízké-střední	Střední-vysoké	Vysoké
Počet pacientů (%)	44,9	40,1	14,3	0,7

Mezi další vyšetřované parametry v rámci experimentální části diplomové práce patřily albumin a B2M, které využíváme k určení stádia MM dle kritérií ISS. Dva pacienti s MM nebylo možné zařadit do určitého stádia MM, protože u nich nebyl stanoven B2M. Zařazení ostatních pacientů je uvedeno v tabulce 29.

Tabulka 29 Zařazení pacientů s MM do stádií dle kritérií ISS

Č. pacienta s MM	B2M (mg/l)	Albumin (g/l)	Stádium MM
4	–	20,0	–
5	5,370	38,6	II
6	8,264	–	III
7	4,059	41,8	II
9	–	27,0	–
10	4,254	–	II
11	9,180	34,0	III

Stádia MM určujeme také dle kritérií *Durieho* a *Salmona*, v nichž bereme ohled na koncentraci HGB, Ca, M-proteinu a vylučování FLC do moči za 24 hodin. Vylučování FLC do moči nebylo v rámci experimentální části měřeno. Tato kritéria rozdělují MM také do podskupin A a B dle koncentrace kreatininu. Rozdělení stádií je uvedeno v tabulce 30.

Tabulka 30 Zařazení pacientů s MM do stádií dle kritérií Durieho a Salmona

Č. pacienta s MM	HGB (g/l)	Ca (mmol/l)	M-protein (g/l)	Kreatinin (μmol/l)	Stádium MM
4	69	1,57	IgG 47,0	867	II B
5	101	2,84	IgG 30,5	120	I A
6	91	2,41	IgG 44,4	84	I A
7	104	2,26	IgG 43,6	66	I A
9	87	3,40	IgG 60,8	253	II B
10	77	2,22	IgG 84,6	75	II A
11	110	2,56	IgG 32,2	205	I A

Shrnutí všech důležitých výsledků pro MG zobrazuje tabulka 31.

Tabulka 31 Celkový přehled výsledků v experimentální části práce

ELFO měření celkem	3805	
IFE měření celkem	789	
Počet pacientů měřených IFE	518	
IFE pozitivní pacienti	292	
IFE negativní pacienti	226	
MGUS	278	
Maligní MG	14	
Typ maligní MG	<i>Doutnající myelom: 29 % MM: 50 %</i>	<i>MW: 21 %</i>
Přechod z MGUS do maligní MG v daném období	3 pacienti (č. 5, 11, 14) 1,1 %	
Nové MG	177	
Muži (pozitivní IFE)	157	53,8 %
Ženy (pozitivní IFE)	135	46,2 %
Průměrný věk (pozitivní IFE)	71 let žen: 73 let mužů: 70 let	nejmladší: 28 let nejstarší: 92 let
Celková bílkovina (g/l)	71,7	min: 45,3 max: 130,0
Kreatinin (μmol/l)	139,04	
Ca (mmol/l)	2,28	
HGB (g/l)	123	
Paraprotein v séru (g/l)	5,87	
Paraprotein v moči (mg/l)	103,75	
Počet pacientů s pozitivním paraproteinem v moči	5 (nejnižší koncentrace: 20 mg/l) (nejvyšší koncentrace: 320 mg/l)	
Počet typů paraproteinů	320	
	Počet pacientů s nálezem daného paraproteinů	
IgG κ	127	39,7 %
IgG λ	76	23,8 %
IgM κ	38	11,9 %
IgM λ	25	7,8 %
IgA κ	13	4,0 %
IgA λ	9	2,8 %
IgD λ	1	0,3 %
Lf	1	0,3 %
Bi IgG κ	14	4,4 %
Bi IgG λ	7	2,2 %
Bi IgM κ	5	1,6 %

Bi IgM λ	0	0 %
Bi IgA κ	3	0,9 %
Bi IgA λ	1	0,3 %

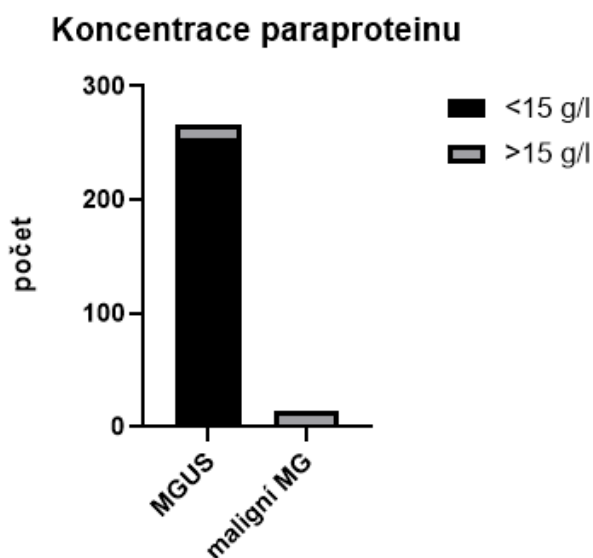
Naměřené výsledky byly následně zpracovány popisnou statistickou analýzou. Pro zjištění statistické významnosti jednotlivých faktorů (věk, pohlaví) a prognostických znaků měřených u pacientů byl využit Chi–kvadrát test. Hodnoty na hladině významnosti 5 % získané tímto testem jsou uvedeny v tabulce 32.

Tabulka 32 Statistická analýza faktorů ovlivňujících výskyt MG

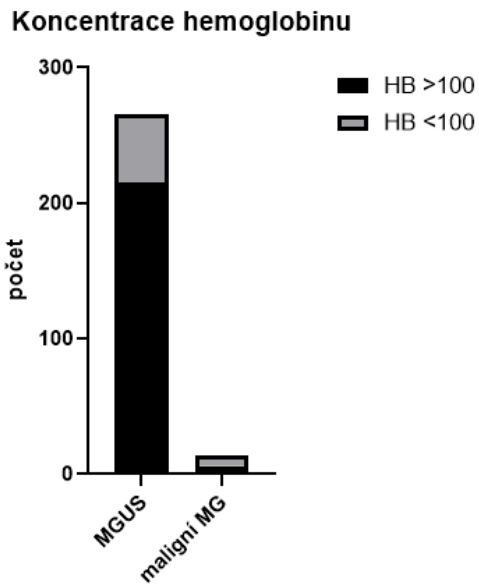
Faktor	MGUS	Maligní MG	p–hodnota
Pohlaví			0,959
Žena	128 (46,0 %)	7 (50,0 %)	
Muž	150 (54,0 %)	7 (50,0 %)	
Věk			0,826
20–29	1 (0,4 %)	0	
30–39	4 (1,4 %)	0	
40–49	8 (2,9 %)	0	
50–59	28 (10,1 %)	4 (28,6 %)	
60–69	52 (18,7 %)	2 (14,3 %)	
≥ 70	185 (66,5 %)	8 (57,1 %)	
Typ paraproteinu			0,474
IgG	213 (69,6 %)	11 (78,6 %)	
IgM, IgA, IgD, lehké řetězce	93 (30,4 %)	3 (21,4 %)	
Koncentrace paraproteinu (g/l)			< 0,001
< 15 g/l	266 (95,7 %)	0	
> 15 g/l	12 (4,3 %)	14 (100 %)	
Albumin (g/l)			0,920
> 35	22 (42,3 %)	2 (40 %)	
< 35	30 (57,7 %)	3 (60 %)	
B2M (mg/l)			0,335
< 3,5	37 (52,1 %)	2 (25 %)	
3,5–5,5	21 (29,6 %)	4 (50 %)	
> 5,5	13 (18,3 %)	2 (25 %)	
HGB (g/l)			< 0,001
> 100	225 (80,9 %)	6 (42,9 %)	
< 100	53 (19,1 %)	8 (57,1 %)	
Ca (mmol/l)			0,792
< 2,8	129 (46,4 %)	7 (50 %)	
> 2,8	149 (53,6 %)	7 (50 %)	
Kreatinin (μmol/l)			0,389
< 177	241 (86,7 %)	11 (78,6 %)	
> 177	37 (13,3 %)	3 (21,4 %)	

FLC poměr			
normální (0,26–1,65)	134 (48,6 %)	2 (14,3 %)	0,012
abnormální	142 (51,4 %)	12 (85,7 %)	
IgG			
normální (5,40–16,31 g/l)	224 (80,6 %)	3 (21,4 %)	< 0,001
abnormální	54 (19,4 %)	11 (78,6 %)	
IgA			
normální (0,63–4,84 g/l)	228 (82,0 %)	3 (21,4 %)	< 0,001
abnormální	50 (18,0 %)	11 (78,6 %)	
IgM			
normální (0,22–2,93 g/l)	233 (83,8 %)	5 (35,7 %)	< 0,001
abnormální	45 (16,2 %)	9 (64,3 %)	

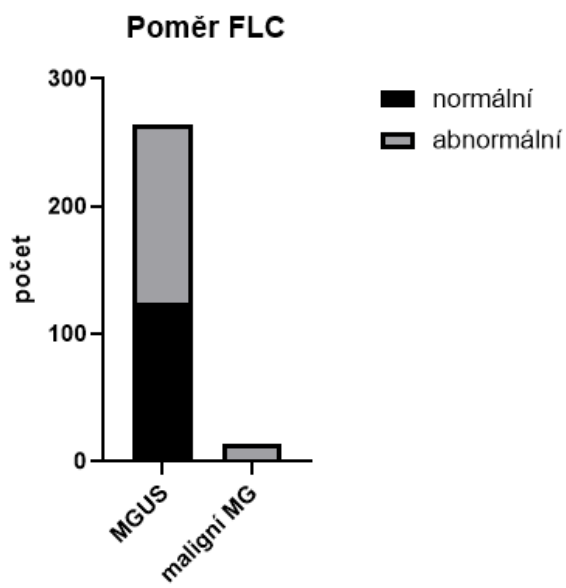
Statistickou analýzou byly zjištěny p-hodnoty, díky kterým můžeme určit, zda se jedná o statisticky významný vliv (pokud je p nižší než 5 % = 0,005) či nikoli. Analýza prokázala, že na výskyt maligních MG mají statisticky významný vliv koncentrace paraproteinu, HGB a jednotlivých typů Ig, dále poměr FLC. Parametry s hodnotou p nižší než 5 % jsou graficky znázorněny na obrázcích 27–32.



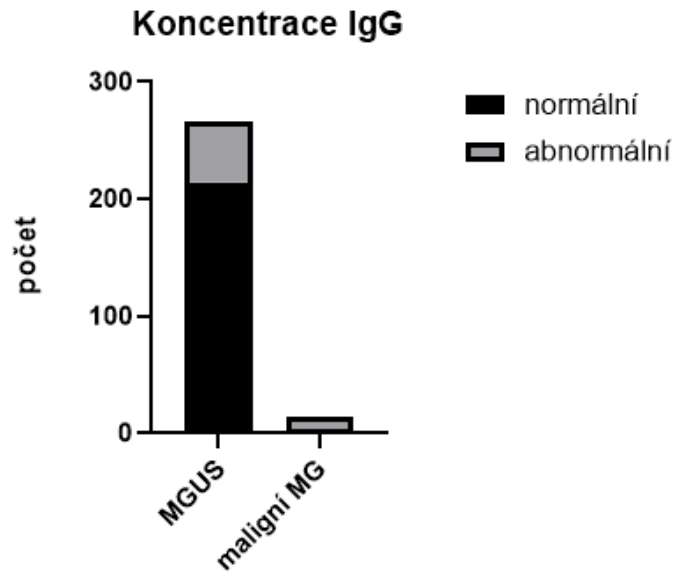
Obrázek 27 Výstup Chí-kvadrát testu vlivu koncentrace paraproteinu na MG



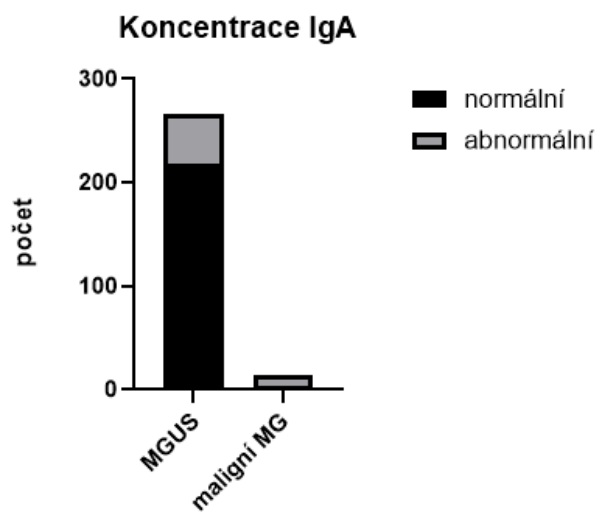
Obrázek 28 Výstup Chí-kvadrát testu vlivu koncentrace HGB na MG



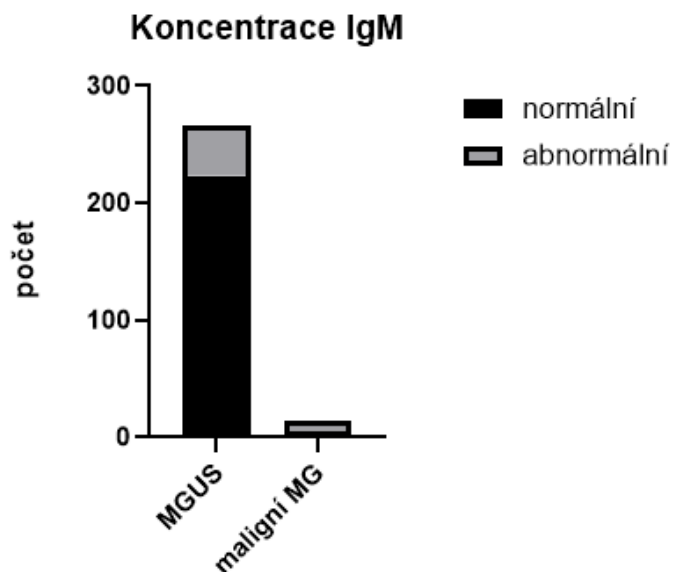
Obrázek 29 Výstup Chí-kvadrát testu vlivu poměru FLC na MG



Obrázek 30 Výstup Chí-kvadrát testu vlivu koncentrace IgG na MG

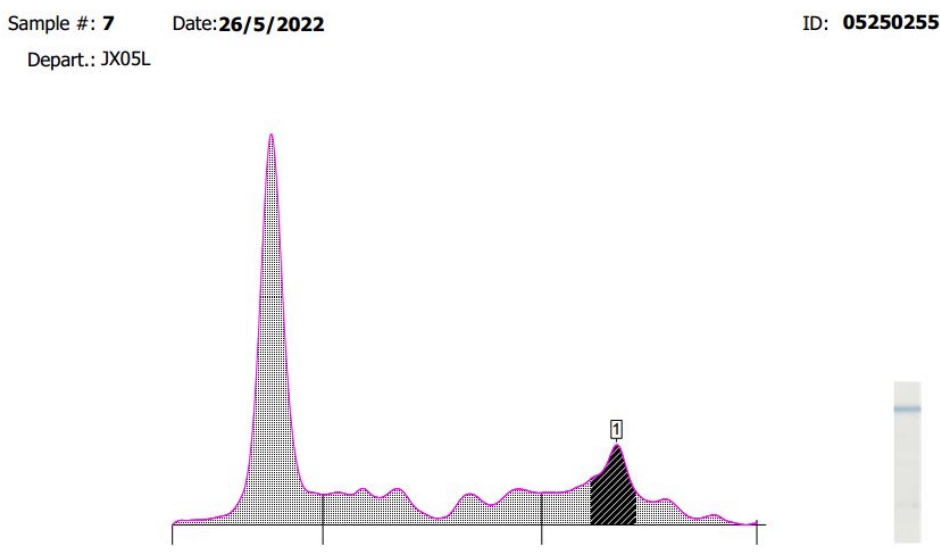


Obrázek 31 Výstup Chí-kvadrát testu vlivu koncentrace IgA na MG

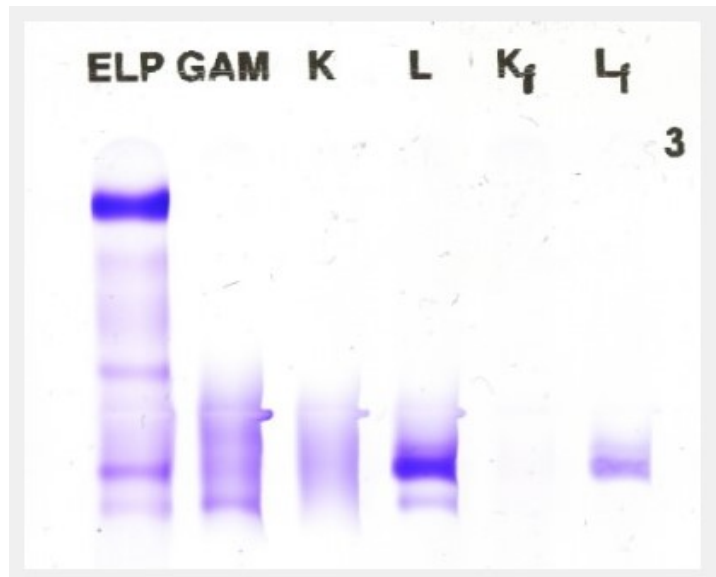


Obrázek 32 Výstup Chí-kvadrát testu vlivu koncentrace IgM na MG

Paraprotein v moči byl prokázán v podstatně méně případech než v séru, pouze u 5 vyšetřovaných pacientů. Ukázka elektroforeogramu a výsledku IFE moči je zobrazena na obrázcích 33 a 34. Na obrázku výsledku IFE je zřejmé, že se jedná o moč, kde je několikanásobně nižší koncentrace proteinů než v séru, což viditelně ovlivňuje výsledný vzhled gelu.



Obrázek 33 Elektroforeogram – nález paraproteinů v moči v oblasti γ



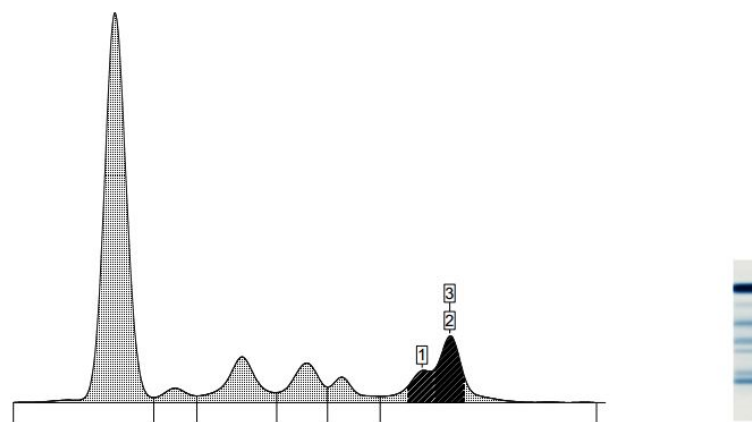
Obrázek 34 Výsledek IFE – nález paraproteinu λ v moči

Dalším zajímavým nálezem je přítomnost biklonálního paraproteinu, který byl přítomen celkem u 30 pacientů. Tento specifický nález lze vidět na obrázcích 35 a 36.

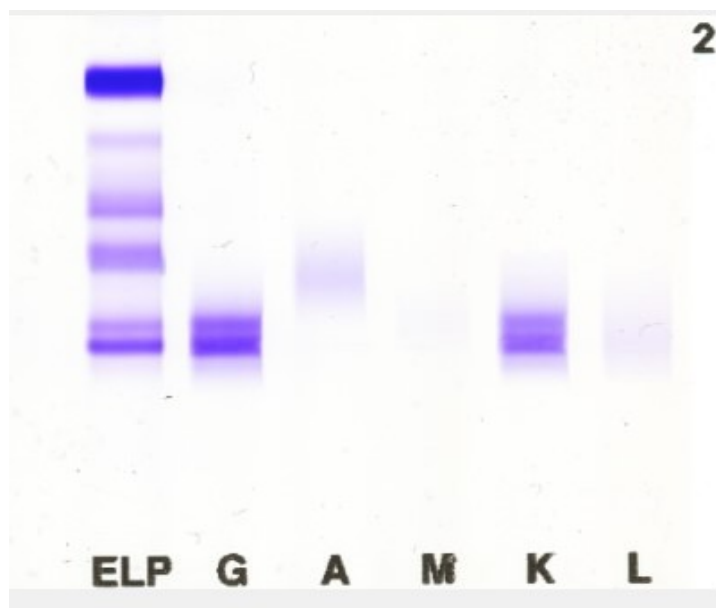
Sample #: 9
Depart.: JX53A

Date: 4/5/2023

ID: 05040082



Obrázek 35 Elektroforeogram – nález biklonálního paraproteinu v oblasti γ



Obrázek 36 Výsledek IFE – nález biklonálního paraproteinu typu IgG κ

6. KAZUISTIKY

V této části experimentální práce uvádím kazuistiky dvou pacientů vyšetřovaných ve sledovaném období na našem pracovišti.

6.1. Kazuistika 1

Muž, 50 let

Rodinná anamnéza: Bez pozoruhodností.

Osobní anamnéza: Bez chronické medikace, v posledním týdnu 3× denně léky na bolest, alkohol výjimečně, kuřák před 20 lety (3 cigarety/den), alergie nemá.

Pracovní anamnéza: Truhlář

Nynější onemocnění: Pacient léčen na ORL pro akutní zánět zevního zvukovodu, bolest ucha trvající zhruba měsíc. V posledním týdnu se k bolesti ucha přidala i bolest hlavy, motání hlavy při chůzi, nechut' k jídlu, mravenčení v oblasti spodní části rtu.

Laboratorní vyšetření: Z oddělení ORL vyžadován ministandard: Urea (10,7 mmol/l), kreatinin (245 μmol/l), kyselina močová (704 μmol/l), bilirubin celkový (4 μmol/l), Na (136 mmol/l), K (4,58 mmol/l), Cl (104 mmol/l), ALT (0,26 μkat/l), AST (0,55 μkat/l), GGT (0,36 μkat/l), CRP (11,5 mg/l), KO+diff (HBG 93 g/l).

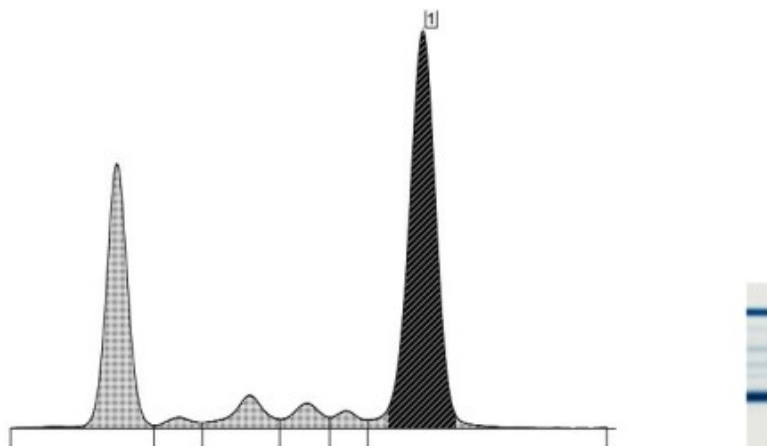
Nově zjištěná anemie, pacient přeložen na Interní oddělení.

Vyšetření požadována z Interního oddělení zahrnovala speciální metody pro zjištění příčiny vzniku anemie včetně elektroforézy séra a vyšetření FLC.

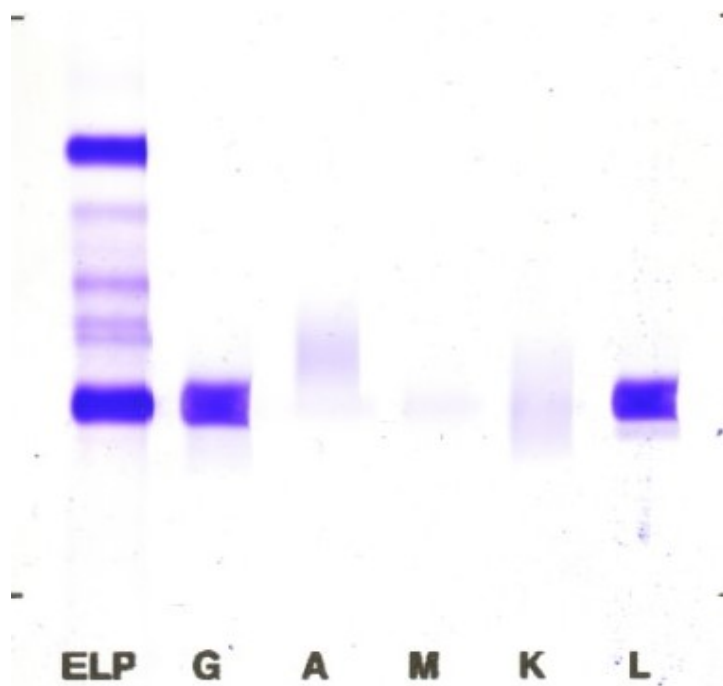
Nález paraproteinu IgG λ 60,8 g/l (obrázek 37 a 38).

Sample #: 11 Date: 12/12/2022
Depart.: JX05L

ID: 12100023



Obrázek 337 Nález paraproteinu v oblasti γ v elektroforeogramu pacienta (kazuistika 1)



Obrázek 348 Nález paraproteinu IgG λ 60,8 g/l po IFE (kazuistika 1)

Další vyšetření: CT mozku (normální nález), ultrazvuk břicha (normální nález), ultrazvuk karotid (normální nález), skiografie (bez patologie), RTG pravé rameno (bez kostního traumatu, mírná artróza).

Diagnostický souhrn: Mnohočetný myelom, hyperviskózní syndrom, hyperurikemie, mikrocytární mikrochromní anemie, chronické onemocnění ledvin.

Závěr: Vzhledem ke klinickému projevu a laboratorním nálezům podezření na mnohočetný myelom komplikovaný hyperviskózním syndromem. Zahájena parenterální hydratace, forsírovaná diuréza a léčba bisfosfonáty. Pacient informován o onemocnění a přeložen k další péči na IV. interní a hematologickou kliniku Fakultní nemocnice Hradec Králové.

6.2. Kazuistika 2

Žena, 87 let (2/2022)

Osobní anamnéza: Pacientka s diagnostikovaným mnohočetným myelomem v r. 2019, sdílená péče s IV. interní a hematologickou klinikou Fakultní nemocnice Hradec Králové. Léčba: cyklofosamid + prednison + thalidomidin, chemoterapie ukončena 10/2019.

Diagnostický souhrn: Mnohočetný myelom (1/2019):

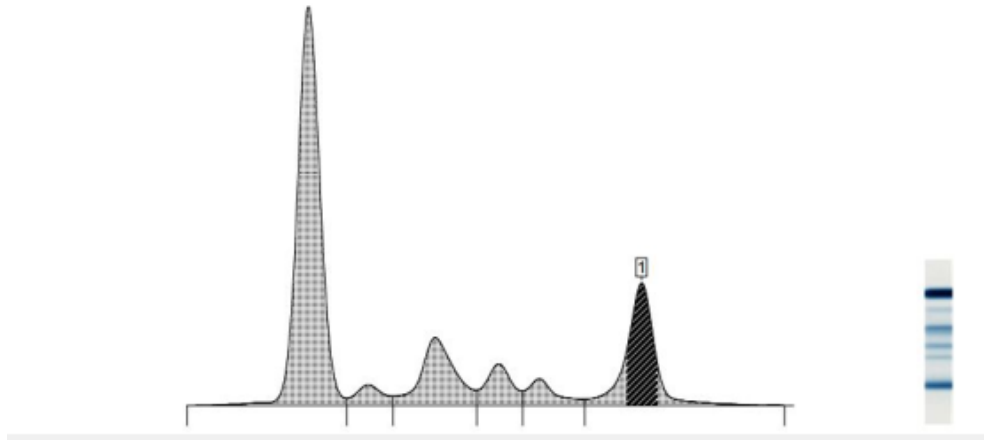
- paraprotein IgG 30,4 g/l, FLC 682 mg/l,
- vícečetná osteolytická ložiska kyčelní kosti, mnohočetná ložiska v žebrech,
- trepanobiopsie – 70% infiltrace mnohočetným myelomem.

Pacientka po ukončení chemoterapie pravidelně kontrolována a vyšetřována na HTO Oblastní nemocnice Jičín a.s.

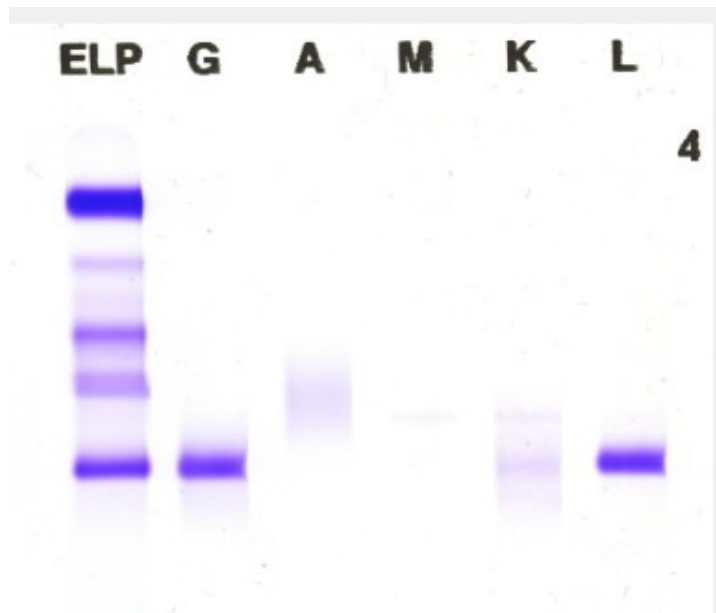
První indikace k vyšetření elektroforézy (obrázek 39) a imunofixací (obrázek 40) séra (10/2021), nález paraproteinu IgG λ 9,6 g/l, kreatinin (142 μ mol/l), celková bílkovina (76,5 g/l).

Sample #: 5 Date: 7/10/2021
Depart.: JX58A

ID: 10050269



Obrázek 359 Nález paraproteinů v oblasti γ v elektroforeogramu pacienta (kazuistika 2, 10/2021)

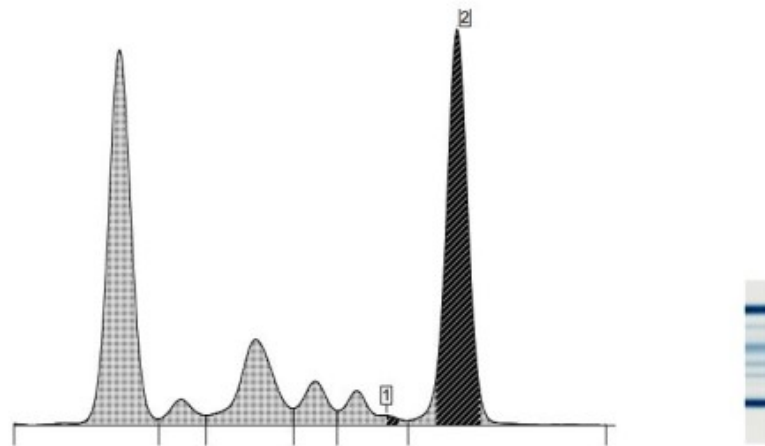


Obrázek 40 Nález paraproteinů IgG λ 9,6 g/l po IFE (kazuistika 2, 10/2021)

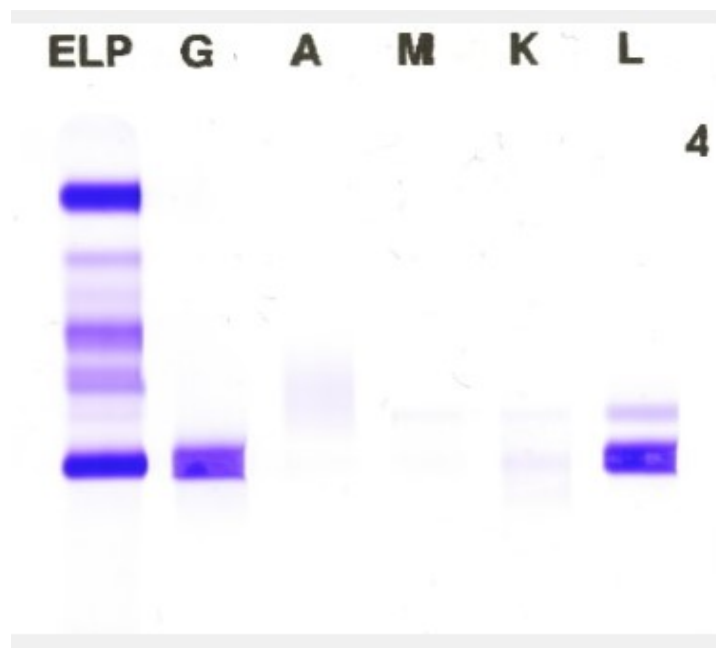
Další vyšetření elektroforézy (obrázek 41) a imunofixací (obrázek 42) séra (2/2022), nález paraproteinů IgG λ 32,2 g/l, kreatinin (205 μ mol/l), celková bílkovina (94,5 g/l).

Sample #: 3 Date:11/2/2022
Depart.: JX58A

ID: 02100263



Obrázek 41 Nález paraproteinu v oblasti γ v elektroforeogramu pacienta (kazuistika 2, 2/2022)



Obrázek 4236 Nález paraproteinu IgG λ 32,2 g/l po IFE (kazuistika 2, 2/2022)

Závěr: Sledován postupný vzestup paraproteinu a koncentrace kreatininu. Stav hodnocen jako relaps onemocnění. Pacientce nabídnuto konziliární vyšetření na IV. interní a hematologické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové. Pacientka odmítla, preferuje paliativní postup na ambulanci HTO Oblastní nemocnice Jičín a.s.

Léčba (2/2022): Prednison, Endoxan.

Pacientka zemřela (5/2022).

7. DISKUSE

V dlouhodobém měřítku počet maligních novotvarů v České republice, ale i ve světě, konstantně roste, podrobná data výskytu nejčastějších malignit shromažďuje Národní onkologický registr. Incidence maligních monoklonálních gamapatií je z dlouhodobého hlediska také na vzestupu, ač jsou některé typy vzácné, MM je druhým nejčastějším krevním nádorem (Krejčí 2022). Nárůst počtu pacientů trpících MM v ČR není způsoben pouze rostoucím počtem nových případů, ale také výrazným pokrokem v diagnostice i léčbě od začátku tisíciletí (Kolektiv autorů 2022). Aktuální incidence MM v ČR je 2,65/100 000 obyvatel (Czech Myeloma Group 2023). Na konci minulého století pacienti s MM přežívali průměrně 2,5–3 roky. Dnes je možné dosáhnout pětiletého přežití až u poloviny pacientů starších 70 let. S agresivní léčbou a transplantací kmenových buněk mohou pacienti mladší 70 let žít až 8 let. Pokrok v léčbě MM patří k téměř nejvýraznějším ve srovnání s léčbou jiných nádorových onemocnění (Kolektiv autorů 2022). V rámci našeho výzkumu byl MM prokázán u 7 pacientů z celkového počtu 518 IFE vyšetřovaných pacientů, což při přepočtu na 1 rok dává 5,4/100 000 obyvatel, tedy údaj násobně vyšší. To je způsobeno faktem, že se nejedná o měření náhodně vybraného souboru obyvatel, ale jedná se o pacienty s problémy naznačujícími možnost výskytu MG či jiného patologického stavu.

Oproti MM je další typ maligní monoklonální gamapatie MW vzácnější. Incidence tohoto onemocnění je asi desetkrát nižší než MM, uvádí se 0,26/100 000 obyvatel (Adam 2009). Z IFE vyšetřovaných 518 pacientů byly odhaleny 3 případy MW, v přepočtu 2,31/100 000 obyvatel. Vyšší incidence je opět způsobena výběrem pacientů. Pro přesnou diagnostiku a případnou léčbu jsou v ČR určena centra diagnostiky a léčby MW, nejbližší centrum je pracoviště Interní hematologické a onkologické kliniky ve Fakultní nemocnici Hradec Králové, kam byli pacienti s podezřením na MW odesláni.

Oběma těmito malignitám a dalším maligním MG předchází prekanceróza MGUS, která se z MG vyskytuje nejčastěji. Četnost MGUS je asi stokrát vyšší než MM, přibližně 3,2 % (3200/100 000 obyvatel) (Maisnar 2013, Šolcová 2021). Ze studovaného souboru 3805 patientských vzorků byl MGUS nalezen u 278 z nich, tedy 7,3 %. Je uváděno, že každý rok 1 % MGUS progreduje do maligní MG, mimo jiné i proto je důležitá včasná diagnostika pacientů s MGUS pro jejich pravidelné sledování. Během období sledování (červen 2021–září 2023) došlo k přechodu z MGUS do maligní MG u 3 pacientů, což je 1,1 % případů.

Výskyt MG je v rámci Národního onkologického registru sledován mimo jiné dle jednotlivých regionů ČR. Dle dostupných dat je výskyt maligních lymfoproliferativních onemocnění včetně MG v Královéhradeckém kraji ze všech krajů nejvyšší, a to konkrétně v oblasti Trutnovska, Jičínska a Královéhradecka. Z tohoto důvodu proběhla studie “Analýza častějšího výskytu mnohočetného myelomu ve východních Čechách” trvající 10 let, ve které se autoři zaměřili na pacienty s MGUS a četnost přechodu do maligní MG konkrétně v oblasti Trutnovska. V rámci této analýzy byla progresa do malignity 1,6 % ročně (v našem výzkumu 0,44 % ročně). Nejčastější maligní diagnózou byl jako v našem případě MM. Zmíněná studie prokázala, že vyšší výskyt maligních lymfoproliferací v regionu souvisí s vyšší četností MGUS, což potvrzuje i náš výzkum odhalující 7,3 % MGUS z celkového počtu měřených pacientů. Příčiny vyšší incidence mohou být různé a lze o nich pouze spekulovat. V úvahu připadají faktory životního prostředí, např. zvýšený výskyt radonu, přechod radioaktivního mraku po havárii černobylské atomové elektrárny aj. (Maisnar 2013).

Incidence výskytu MG s rostoucím věkem stoupá, jedná se o nemoc starších. Medián věku při stanovení diagnózy je 68 let (Czech Myeloma Group 2023, Šolcová 2019). V rámci naší experimentální práce byl medián i průměr věku stanoven na 71 let. Nejmladšímu pacientovi bylo 28 let, u takto mladých lidí (do 40 let) se nemoc vyskytuje vzácně. Nemoc (především MM) je mírně častěji diagnostikována u mužů (Šolcová 2019). V naší analýze tvořili muži více než polovinu pacientů s MG (53,8 %). Nejčastějším typem paraproteinu je IgG (70 %), méně častý IgM (15–20 %) a nejméně se vyskytuje typ IgA (11 %). Z lehkých řetězců převažuje κ (62 %) nad λ (38 %) (Šolcová 2019). Tuto skutečnost potvrdila i naše analýza. Nejčastějším typem nalezeného paraproteinu byl IgG κ (39,7 %), dále IgG λ (23,8 %) a až poté následovaly další typy těžkých řetězců M-proteinu. Během studie jsme také narazili na dva vzácně se vyskytující typy M-proteinu, a to IgD a paraprotein tvořený pouze lehkým řetězcem.

Pro získání dat v diplomové práci byla využita gelová elektroforéza systému HYDRASIS, která byla porovnávána s dalšími metodami v rámci studie časopisu Klinická biochemie a metabolismus. Ze studie vyplývá, že systém HYDRASIS produkuje spolehlivá data o sérových proteinech srovnatelná s jinými možnostmi gelové elektroforézy. Za nevýhodu autoři považují poloautomatický systém s nutností obsluhy po celou dobu probíhající analýzy. Jiné systémy pracující na principu gelové elektroforézy bývají plně automatizované a pracují na základě čárového kódu na zkumavce. V rámci této studie byly také porovnávány

systémy gelové elektroforézy s kapilární elektroforézou. Kapilární elektroforéza je dle výzkumu rychlejší, účinnější a poskytuje vyšší záchyt paraproteinů. Nevýhodou kapilární elektroforézy v této problematice je analýza paraproteinů v moči, která je oproti gelové elektroforéze náročnější a časově delší (Kušnierová 2018). Oddělení klinické biochemie v Oblastní nemocnici Jičín a.s., na kterém byl výzkum diplomové práce prováděn, po uvážení všech pozitiv a negativ přešlo z gelové elektroforézy systému HYDRASIS na kapilární elektroforézu, a to po ukončení našeho výzkumu (od září 2023).

Studie publikovaná „College of American Pathologists“ se zaměřila na porovnávání identifikace typu a kvantifikace paraproteinu pomocí IFE a tzv. imunosubtrakce (ISE) séra, která se provádí v systému kapilární elektroforézy, v oblasti diagnostiky MG. Studie upozorňuje na nižší záchyt paraproteinů v nižší koncentraci a vzácnějšího typu (biklonální paraproteiny, IgD) metodou ISE. Vzhledem k tomu, že pro pacienty s MG je zásadní včasná diagnostika, kvantifikace a určení typu paraproteinu pro včasné a správné zahájení léčby, považují za optimální využití IFE (Mrosewski 2021). V rámci zmíněné studie byla využita sada HYDRASIS IFE obdobně jako v námi prováděné analýze. Pokud bychom vycházeli z výsledků zmíněné studie, nepřišli bychom na 10 % případů ze všech MGUS.

Česká myelomová skupina (CMG) spustila projekt CRAB, který je cílen na praktické lékaře a lékaře prvního kontaktu s pacienty (např. ortopedy, fyzioterapeuty), kam pacienti nejčastěji docházejí při bolesti zad. Tento projekt má upozornit na rostoucí výskyt MG, na které by měli lékaři myslet právě při bolesti zad, která neustupuje a často vzniká neočekávaně (bez zjevné příčiny). Tento projekt poukazuje jednak na jednoduchou a levnou variantu vyšetření základních biochemických a hematologických metod (a RTG vyšetření) zahrnutých v tzv. CRAB symptomech, zmíněných v teoretické části práce. Dále CMG upozorňuje na pokles vyšetřování sedimentace erytrocytů, která byla dříve běžnou součástí preventivní prohlídky pacienta. Sedimentace erytrocytů bývá v moderní medicíně nahrazována vyšetřením CRP, které však na MG neupozorní, přestože i u této nemoci probíhá velice často zánětlivý proces (Straub 2019). Jelikož do CRAB symptomů řadíme základní laboratorní metody, byly tyto symptomy vyšetřeny i u všech námi sledovaných pacientů. Problém s nedostatečnou indikací sedimentace erytrocytů potvrzuje i náš výzkum, při kterém byla sedimentace vyšetřena pouze u 27,8 % všech pacientů.

8. ZÁVĚR

Zhodnocení diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

V období od června 2021 do září 2023 jsme provedli elektroforetickou analýzu vzorků lidského séra (případně moči) u pacientů vyšetřovaných v Oblastní nemocnici Jičín a.s. Jednalo se o pacienty z různých oddělení nemocnice, od praktických lékařů nebo lékařů specialistů. Elektroforetická analýza probíhala na základě indikace lékařem, nebo byla následně vyšetřena po dohodě bioanalytického pracovníka Oddělení klinické biochemie nemocnice Jičín s ošetřujícím lékařem na základě anamnézy pacienta.

V případě nálezu paraproteinu v elektroforeogramu následovalo vyšetření imunofixací pro stanovení typu a koncentrace nalezeného paraproteinu nebo případného vyloučení nálezu paraproteinu. Paraprotein byl elektroforeticky prokázán u 789 patientských vzorků z celkového počtu 3805 vyšetřovaných vzorků. Imunofixačně se tento nález potvrdil u 292 pacientů. Imunofixace vyloučila přítomnost paraproteinu u 226 pacientů.

U vzorků s imunofixačně potvrzeným paraproteinem jsme následně vyšetřili další podstatné parametry (CRAB symptomy, FLC aj.), abychom je mohli dále zařadit dle stanovených kritérií.

Na základě všech zjištěných výsledků jsme stanovili, o jaký typ monoklonální gamapatie by se mohlo u konkrétního pacienta jednat a výsledek konzultovali s ošetřujícím lékařem. Pacienti s podezřením na mnohočetný myelom byli odesláni na Oddělení klinické hematologie a transfuziologie, kde jim byl sdělen další postup a léčba. Při podezření na Waldenströmovu makroglobulinemii byli pacienti odesláni na specializované pracoviště pro diagnostiku a léčbu tohoto onemocnění. Záchyt nemaligního onemocnění MGUS byl sdělen ošetřujícím lékařům, pacienti s tímto druhem monoklonální gamapatie budou sledováni v určitých intervalech dle rizika přechodu do maligní formy.

9. POUŽITÉ ZKRATKY

B2M	β2-mikroglobulin
CMG	Česká myelomová skupina (Czech Myeloma Group)
CRAB	Calcium, Renal, Anemia, Bone
CRP	C-reaktivní protein
CT	Výpočetní tomografie (Computed Tomography)
ELFO	Elektroforéza
ELP	Referenční stopa
FLC	Volné lehké řetězce (Free Light Chains)
FW	Sedimentace erytrocytů (Fahraeus Westergren)
GIT	Gastrointestinální trakt (trávicí trakt)
HGB	Hemoglobin
HTC	Hematokrit
IFE	Imunofixační elektroforéza
Ig	Imunoglobulin
IMWG	International Myeloma Working Group
ISE	Imunosubtrakce
ISS	International Staging System
KD	Kostní dřeň
KO	Krevní obraz
LDH	Laktátdehydrogenasa
LIS	Laboratorní informační systém
MAb	Monoklonální protilátky
MCV	Střední objem erytrocytů (Mean Corpuscular Volume)
MG	Monoklonální gamapatie
MGUS	Monoklonální gamapatie nejistého významu
MCH	Střední množství hemoglobinu v erytrocytech (Mean Corpuscular Hemoglobin)
MCHC	Střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)
MM	Mnohočetný myelom

MPV	Střední objem krevní destičky (Mean Platelet Volume)
MR	Magnetická rezonance
MRD	Minimální reziduální nemoc (Minimal Residual Disease)
MW	Waldenströмова makroglobulinemie (morbus Waldenström)
PCT	Destičkový hematokrit – trombokrit (Plateletcrit)
PDW	Distribuční šíře trombocytů (Plateletes Distribution Width)
PLT	Trombocyty (Plateletes)
RBC	Erytrocyty (Red Blood Cells)
RDW	Distribuční šíře erytrocytů (Red cell Distribution Width)
RTG	Rentgen
WBC	Leukocyty (White Blood Cells)

10. POUŽITÁ LITERATURA

ADAM Z, POUR L, KREJČÍ M et al. Léčba Waldenströmovy makroglobulinemie – zkušenosti jednoho pracoviště. *Vnitřní Lékařství*, 2009, 5(1), 9-17.

ADAM Z, ZEMAN D, POUR L et al. Waldenströmová makroglobulinemie, klinické příznaky, přehled léčebných možností a vlastní zkušenosti s léčbou ibrutinibem. *Onkologie*, 2022, 16(Suppl.B), 83-102.

Czech Myeloma Group (CMG) [online]. 2023 [cit. 2023-11-07]. Dostupné z: <https://www.myeloma.cz/>

DOUBEK M, MAYER J (ed). Léčebné postupy v hematologii 2020: doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně. 2020. 1. vydání. Česká hematologická společnost ČLS JEP, Praha. 528 stran. ISBN 978-80-270-8240-7.

HÁJEK R, ŠEVČÍKOVÁ S. Monoclonal gammopathies – scientific progress in the Czech Republic. *Klinická Onkologie*, 2017, 30(S2), 3-4.

HÁJEK R. Vývoj diagnostiky a léčby mnohočetného myelomu v průběhu posledních 25 let. *Transfúze a Hematologie Dnes*, 2019, 25(1), 96-106.

KAŠČÁK M, HÁJEK R, MINAŘÍK J et al. *Transfúze a Hematologie Dnes*, 2019, 25 (Suppl. 1), 7-67.

KOLEKTIV AUTORŮ. Mnohočetný myelom – nemoc, kterou není snadné porazit. *Zdravotnictví a Medicína*. 2022, 2022(3), 31.

KOVÁŘOVÁ E. Klinická propedeutika [online]. Výukový materiál. Střední zdravotnická škola a Vyšší odborná škola zdravotnická, Ostrava. 2019 [cit. 2023-11-14] Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/121/page00.html>

KREJČÍ D, MUŽÍK J, DUŠEK L. Novotvary 2019–2021 ČR. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR [online]. 2022 [cit. 2024-02-13] Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008447/novotvary2019-2021.pdf>

KUŠNIEROVÁ P, ZEMAN D, FARUZELOVÁ I et al. Porovnání různých elektroforetických systémů v laboratorní diagnostice monoklonálních gamapatií. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2018, 26(2), 82-86.

- KUŠNIEROVÁ P. Laboratorní diagnostika monoklonálních gamapatií. 2022. 1. vydání. Ostrava: Ostravská univerzita. 122 stran. ISBN 978-80-7599-321-2
- MAISNAR V, KREJČÍ M, MINAŘÍK J et al. *Transfuze a Hematologie Dnes*, 2018, 24 (Suppl. 1), 151-155.
- MAISNAR V, MINAŘÍK J, ŠTORK M et al. *Transfuze a Hematologie Dnes*, 2023, 29 (Suppl. 2), 10-133.
- MAISNAR V. Diagnostika monoklonálních gamapatií - GUIDELINES. Fakultní nemocnice Hradec Králové [online]. 2023 [cit. 2023-11-07]. Dostupné z: <https://www.fnhk.cz/kliniky/okh/diagnostika%20monoklonalnich%20gamapatii.htm>
- MAISNAR V. Riziko přechodu monoklonální gamapatie nejasného významu do maligní monoklonální gamapatie. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2013, 21(2), 93-96.
- MROSEWSKI I, URBANK M. Identification of Paraproteins via Serum Immunofixation or Serum Immunosubtraction and Immunoturbidimetric Quantitation of Serum Immunoglobulins in the Laboratory Testing for Monoclonal Gammopathies. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2021, 145(12), 1552-1557.
- PROKOPCOVÁ A. Laboratorní příručka OKB ON Jičín a.s.: C-LP-OKB-001. 2022 Verze 12. Jičín: Centrum klinických laboratoří Oblastní nemocnice Jičín, 1. vydání, 193 stran.
- PROKOPCOVÁ A. Laboratorní příručka OKB ON Jičín a.s.: C-LP-OKB-001. 2023. Verze 16. Jičín: Centrum klinických laboratoří Oblastní nemocnice Jičín, 1. vydání, 191 stran.
- PULCER M, ZUCHNICKÁ J, KOLÁŘOVÁ S et al. Hematologie pro zdravotní laboranty I. (1.díl). Ostrava: Ostravská univerzita, Lékařská fakulta, 2022. 1. vydání. 142 stran. ISBN 978-80-7599-322-9.
- RACEK J, RAJDL D. *Klinická biochemie*. 2021. 3. přepracované a rozšířené vydání. Praha: Galén. 454 stran. ISBN 978-80-7492-545-0.
- RACEK J. *Klinická biochemie* [online]. Výukový materiál. Střední zdravotnická škola a Vyšší odborná škola zdravotnická, Ostrava. 2019. [cit. 2023-11-13]. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/189/page00.html>

SEBIA. Hydragel B1-B2: Sebia návod [online]. Cedex - France: Parc Technologique Léonard de Vinci. 2020. [cit. 2024-02-08]. Dostupné z: <https://medigroupasia.com/wp-content/uploads/2022/10/IFU-4100.pdf>

SEBIA. Hydragel IF: Sebia návod [online]. Cedex - France: Parc Technologique Léonard de Vinci. 2020. [cit. 2024-02-08]. Dostupné z: https://www.ilexmedical.com/files/Sebia%20inserts/HYDRAGEL_IF_DM_Hydrasis.pdf

STRAUB J. Záchyt mnohočetného myelomu může zvýšit obyčejná sedimentace. *Medical Tribune*, 2019, 15(7), 4-5.

ŠČUDLA V, MINAŘÍK J, PIKA T et al. Diferenciální diagnostika monoklonálních gamapatií z pohledu klinické praxe II. Monoklonální gamapatie nejistého významu a ostatní monoklonální gamapatie nezhooubného původu. *Interní Medicína pro Praxi*, 2018, 20(1), 44-48.

ŠČUDLA V, MINAŘÍK J, PIKA T et al. Diferenciální diagnostika monoklonálních gamapatií z pohledu klinické praxe I. Maligní monoklonální gamapatie. *Interní Medicína pro Praxi*, 2017, 19(5), 274-278.

ŠOLCOVÁ L, MAISNAR V. Analýza častějšího výskytu mnohočetného myelomu ve východních Čechách. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 2021, 29(4), 199-203.

ŠOLCOVÁ L, ŠIMKOVÁ J, MAISNAR V. Laboratorní diagnostika pacientů s MGUS a výsledky jejich sledování v regionální biochemické laboratoři v průběhu 10 let. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 2019, 27(48), 112-115.

ŠTORK M, VACULOVÁ J, POUR L et al. Novinky v léčbě mnohočetného myelomu. *Interní Medicína pro Praxi*, 2017, 19(1), 20-22.

VÁVROVÁ J, KUŠNIEROVÁ P, MAISNAR V et al. Doporučení České společnosti klinické biochemie a České myelomové skupiny k laboratorní diagnostice monoklonálních gamapatií. *Klinická Biochemie a Metabolismus*. 2020, 49(1), 26-34.

VIVAPORE. Concentration of Patient Samples for in vitro Diagnostics [online]. Sartorius Lab Instruments GmbH & Co., 2021 [cit. 2024-02-22]. Dostupné z: <https://www.sartorius.hr/media/wdoaihd1/vivapore-datasheet-en-l-sartorius.pdf>

ZIMA T. Laboratorní diagnostika. 2013. 3. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén. 906 stran. ISBN 978-80-7492-062-2