Kvantifikacija serumskoga M-proteina metodom imunosupstrakcije

Šegulja, Dragana

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:116900

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Dragana Šegulja

KVANTIFIKACIJA SERUMSKOGA M-PROTEINA METODOM IMUNOSUPTRAKCIJE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.

Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Dragana Šegulja

KVANTIFIKACIJA SERUMSKOGA M-PROTEINA METODOM IMUNOSUPTRAKCIJE

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Dr. sc. Danica Matišić

Prof. dr. sc. Karmela Barišić

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Dragana Šegulja

QUANTIFICATION OF SERUM M-PROTEIN BY IMMUNOSUBTRACTION METHOD

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Danica Matišić, PhD

Professor Karmela Barišić, PhD

Zagreb, 2023

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskoga stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb u sklopu sveučilišnoga poslijediplomskog doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti" Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Danice Matišić, spec. med. biokem., znanstv. sur. i voditeljice Medicinsko-biokemijskoga laboratorija Poliklinike Salzer te prof. dr. sc. Karmele Barišić, na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Posebnu zahvalu upućujem dr. sc. Danici Matišić, komentorici i bivšoj šefici na poticanju i usmjeravanju u stučnom i znanstvenom napredovanju, ali i na bezrezervnoj ljudskoj podršci.

Zahvaljujem komentorici prof. dr. sc. Karmeli Barišić na usmjeravanju u znanstveno-istraživačkom radu i svim korisnim savjetima tijekom izrade doktorskog rada.

Odajem priznanje mom laboratorijskom timu na profesionalnosti iz dana u dan i entuzijazmu za sve moje ideje.

Hvala Marini i Ivani na ulozi zeca.

Hvala mojoj Ekipici koja je uvijek tu negdje.

Zahvaljujem i svima onima koji su na različite načine pridonijeli završetku ovoga doktorskog rada.

Najveće hvala mojim roditeljima koji su me naučili da se rad i trud uvijek isplate.

Ovaj rad posvećujem ženi koja me je poučila prvim brojkama i slovima, ženi čija mi je snaga i danas inspiracija, babi Seki.

SAŽETAK

Prisutnost M-proteina u serumu karakterizira stanje monoklonske gamapatije. Koncentracija M-proteina izravno korelira s veličinom tumorske mase, osim u vrlo rijetkim slučajevima nesekrecijske bolesti. Detekcija, tipizacija i kvantifikacija M-proteina nužne su za postavljanje dijagnoze, procjenu rizika progresije i praćenje uspješnosti terapije. Ograničenja postojećih metoda kvantifikacije serumskoga M-proteina (denzitometrijska i imunokemijska) razlog su kontinuiranih istraživačkih napora u osmišljavanju novih postupaka koji bi unaprijedili dijagnostiku i praćenje kliničkoga stanja bolesnika s monoklonskom gamapatijom. Cilj je ovoga istraživanja bio razviti i evaluirati osmišljeni računski postupak za kvantifikaciju serumskoga M-proteina primjenom laboratorijskih rezultata kvalitativne metode imunosuptrakcije. Istraživanje je obuhvatilo 133 uzorka bolesnika s monoklonskom gamapatijom klinički praćenih u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. U svim je uzorcima provedena elektroforeza serumskih proteina, imunofiksacija i imunosuptrakcija te određena koncentracija ukupnih proteina i pojedinih razreda imunoglobulina G, A i M. Amplituda vrška M-proteina nativnoga uzorka i globulinske krivulje nakon imunoprecipitacije prepoznate su kao ključni parametri u laboratorijskim rezultatima imunosuptrakcije. Podatci o amplitudi krivulja su, uz koncentraciju ukupnih proteina, razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina i globulina, poslužili kao temelj osmišljenih računskih modela. Utvrđena je vrlo dobra povezanost deriviranih varijabli AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg temeljenih na podacima iz imunosuptrakcijskog elferograma s rezultatima uspoređivanih metoda. Podatci iz imunosuptrakcijskog elferograma o albuminskoj frakciji nisu pridonijeli jačini povezanosti rezultata deriviranih varijabli s rezultatima postojećih metoda. Dokazana je veća preciznost određivanja koncentracije M-proteina primjenom deriviranih varijabli u odnosu na denzitometrijsku metodu i nije ovisila o koncentraciji, prisutnosti poliklonske pozadine niti migracijskom položaju M-proteina.

U ovom je radu istražena i opisana mogućnost umjeravanja rezultata imunosuptrakcije. Najusporediviji rezultati s postojećim metodama dobiveni su s rezultatima derivirane varijable D1Ig uz najbolje rezultate procjene preciznosti i točnosti. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da su u računskim modelima za kvantifikaciju M-proteina amplitude krivulja na mjestu vrška M-proteina u imunosuptrakcijskom elferogramu objektivan i vrijedan mjerljivi parametar neovisan o prisutnosti pozadine. Evaluacijom deriviranih varijabli pokazano je da je njihovom primjenom moguće unaprijediti dijagnostiku i praćenje kliničkoga stanja bolesnika s monoklonskom gamapatijom.

Ključne riječi: kapilarna elektroforeza; M-protein; imunosuptrakcija; gamapatija; multipli mijelom; elektroforeza serumskih proteina, imunokemijski test.

SUMMARY

Introduction

The presence of monoclonal protein (M-protein) is a characteristic of monoclonal gammopathy, which is commonly associated with malignancies, such as multiple myeloma (MM), Waldenström macroglobulinemia, and amyloidosis. The finding of serum M-protein without clinical indicators of the disease is characterized as an asymptomatic condition named monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). Except in very rare cases of nonsecretory disease, M-protein concentration directly correlates with tumor mass. Detection, typing, and quantification of M-protein are necessary for diagnosis, assessment of the risk of progression, and monitoring of the treatment outcome. The shortcomings of existing densitometric and immunochemical methods for measuring serum M-protein encourage ongoing research efforts to develop novel procedures that will improve the management of patients with monoclonal gammopathy. Considering that M-protein is produced by tumor-altered cells, the unpredictability of its structure represents an additional challenge in measuring the concentration.

One of the most used approaches for M-protein quantification is to measure the concentration of the immunoglobulin class involved in the synthesis of M-protein (Ig_{invl}) using turbidimetry or nephelometry. This approach frequently yields overstated monoclonal immunoglobulin concentration. Densitometry is a method that enables quantifying monoclonal fraction in the standard electropherogram (EPG). If M-protein is identified in the gamma globulin fraction, this model is appropriate, but method efficiency is limited by different factors, such as a high polyclonal background, the beta migrating position of M-protein, and the polymerization of immunoglobulin molecules. Furthermore, the use of two models, tangent skimming or perpendicular drop, which both lack objectivity, contributes to the variability of results.

Immunosubtraction is a fully automated method for characterizing M-protein. The method utilizes capillary electrophoresis in combination with immunoprecipitation. Antisera, used for immunoprecipitation, are coupled to sepharose beads that alter mobility in an electric field by binding to immunoglobulin molecules and forming immunocomplexes. Comparison of electropherograms of native serum and serum after immunoprecipitation (ISE-EPGs) enables detection and characterization of M-protein. In addition, the level of polyclonal background and comigrating beta fraction proteins can be assessed by comparing ISE-EPGs. Detected differences could be described by measured and derived variables.

This study aimed to develop and evaluate a novel approach for quantifying serum M-protein in patients with monoclonal gammopathy using laboratory data of qualitative immunosubtraction method. One of the goals of this dissertation was to demonstrate that the proposed derived models, based on immunosubtraction data, correlated with the results of EPG densitometric analysis and turbidimetric measurement of M-protein concentration in monoclonal gammopathy samples. Examining the analytical characteristics of the developed M-protein quantification model was one of the specific aims.

Materials and Methods

A total of 133 patient samples with monoclonal gammopathy were included. The concentrations of individual classes of immunoglobulins G, A, and M were determined in all samples, and capillary electrophoresis, immunofixation, and immunosubtraction were performed. To normalize patient data, the IF/IT Control (Sebia, Lysses, France) sample in which M-proteins IgGλ, IgAκ, and IgMλ were verified in the absence of a polyclonal background was employed. A perpendicular drop (PD) in points where the M-spike meets the polyclonal region, as well as a tangent skimming procedure (TS) that eliminates the polyclonal background and quantifies the M-spike above given points, were used for densitometrical quantification of M-protein. In IS-EPG, measurands were amplitudes of M-protein and albumin fractions. Assessed derived variables also included the immunoglobulin class involved in the synthesis of M-protein, total protein, and globulin data as follows:

AD – the difference between the amplitude of the M-protein spike of the native patient sample and the sample after immunoprecipitation generated from the IS-EPG;

$$AD = (M1 - M2)p$$

ADn – the patient sample AD and the control sample AD ratio;

$$ADn = \frac{(M1 - M2)p}{(M1 - M2)c}$$

AD1nIg – the product of ADn, the ratio of the total protein concentrations in the patient and control sample (TP_p/TP_c) and the concentration of the immunoglobulin class involved in the M-protein synthesis in the patient sample (Ig_{invl});

$$AD1nIg = \left[\frac{(M1-M2)p}{(M1-M2)c}\right] x \left(\frac{TPp}{TPc}\right) x\, Iginvl \quad \text{(g/L)}$$

AD2nIg – AD1nIg equation, in which the AD values are modified by the addition of the difference between the corresponding albumin fraction amplitude (in the patient and control

samples), generated from IS-EPG of the native patient sample and the sample after immunoprecipitation ($a1 - a2$);

$$AD2nIg = \frac{[(M1-M2)p+(a1-a2)p]}{[(M1-M2)c+(a1-a2)c]} \; x \left(\frac{TPp}{TPc}\right) x \; Iginvl \quad \text{(g/L)}$$

ADnG – the product of ADn and the globulin concentration (G, obtained by subtracting the albumin concentration from the total protein concentration);

$$ADnG = \left[\frac{(M1-M2)p}{(M1-M2)c}\right] x \; G \quad \text{(g/L)}$$

D1Ig – the ratio of the AD and M-protein amplitude of the native patient serum generated from IS-EPG multiplied by the concentration of the immunoglobulin class involved in the synthesis of the M-protein in the patient sample (Ig_{invl});

$$D1Ig = \left[\frac{(M1-M2)}{M1}\right] p \; x \; Iginvl \quad \text{(g/L)}$$

D2Ig – the D1Ig equation, in which the ratio of the AD and M-protein amplitude of the native patient serum generated from IS-EPG is modified by addition of the ratio of the difference between albumin fraction amplitude in the native patient sample and the sample after immunoprecipitation and albumin fraction in the sample after immunoprecipitation and multiplied by the concentration of the class involved in the synthesis of the M-protein in the patient sample (Ig_{invl});

$$D2Ig = \left[\left(\frac{M1-M2}{M1}\right) p + \left(\frac{a1-a2}{a2}\right) p\right] x \; Iginvl \quad \text{(g/L)}$$

D1nIg – the ratio of the AD and M-protein amplitude of the native patient serum generated from IS-EPG ratios, those obtained for the patient sample and the control sample multiplied by TP_p/TP_c and by the concentration of the immunoglobulin class involved in the synthesis of the M-protein in the patient sample;

$$D1nIg = \frac{\left[\frac{M1-M2}{M1}\right]p}{\left[\frac{M1-M2}{M1}\right]c} x \left(\frac{TPp}{TPc}\right) x \; Iginvl \quad \text{(g/L).}$$

The accuracy and measuring range were inspected using external quality control material (243 Gammopathies, INSTAND e.V. Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e. V., Düsseldorf, Germany) as a reference material. Impact of background presence on accuracy of the proposed models was investigated by adding different amount of reference material in the serum samples with hypo-, normo- and

hypergammaglobulinemia. Precision testing was carried out in the serum samples, with four known variable factors in the M-protein quantification considered: migration pattern, polyclonal background, M-protein concentration, and gating method. The measurements were performed in hexaplicate and included two observers to inspect variation in gating strategy.

Results

Monoclonal IgG was detected in 71%, IgA in 14% and IgM in 15% of the examined samples. Most of the IgG M-proteins were found in the gamma fraction (91%), IgA in the beta fraction (84%), and IgM in the gamma fraction (86%). Background, polyclonal or beta fraction proteins were found in 43% of the samples. The concentrations of the M-protein determined densitometrically were lower than those obtained turbidimetrically, with a mean difference of -44.69% (95%CI -53.25 to -36.02; P<0.001). Derived variables with included concentration of the immunoglobulin class involved in M-protein synthesis (AD1Ig, D1Ig, D2Ig, and D1nIg) achieved the strongest correlation results with both densitometric and immunochemical methods in the group of samples without the background (R_s for AD1nIg were 0.957 and 0.920 with P<0.001, for D1Ig 0.931 and 0.983 with P<0.001, for D2Ig 0.931 and 0.973 with P<0.001, and for D1nIg 0.957 and 0.983 with P<0.001). The variables with applied normalisation, AD1nIg and D1nIg, revealed a clear tendency of increasing difference in the results with the increase in M-protein concentration, especially above 20 g/L. Passing-Bablok regression analysis pointed out proportional and systematic differences in the AD1nIg results while the D1Ig and D2Ig variables achieved the most comparable results to both examined methods. When data were classified into two groups based on the background presence (polyclonal background or beta migrating M-protein) and compared to the densitometric results, the most comparable results were also noted in the D1Ig and D2Ig variables. Furthermore, the D1Ig results showed no proportional or systematic differences as compared to the results determined immunochemically in the samples without the background presence, (intercept 0.00 (95% CI -0.19 to -0.00), slope 1.00 (95% CI 1.00 to 1.01); P=n/a) and to densitometrically obtained results in the samples with the background (intercept 2.24 (95% CI -2.12 to -4.38), slope 1.19 (95 % CI 0.89 to 1.65); P=0.190). Accuracy testing showed a maximum bias of 11% in the D1Ig results. An experiment of adding different amounts of reference material to three different control serum samples with hypo-, normo- and gammaglobulinemia showed that the assessed models are not significantly affected by the background presence. Regardless of the M-protein concentration, polyclonal background or migration pattern, coefficients of variation (CVs) of the derived variables were lower (maximum 3.1%) than those obtained by densitometric

measurements (highest 37.7%). Among all evaluated approaches, the lowest CVs were observed in the patient sample with M-protein located in the gamma fraction (M-protein concentration 16.6 g/L by PD; 12.5 g/L by TS), in the absence of polyclonal background. In contrast to the densitometric approaches, in derived variables, there was no loss of precision in the patient samples with low M-protein concentration and pronounced polyclonal background.

Discussion

The impact of possible overestimation of the immunoglobulin class concentration due to the diversity in reactivity of the immune reagents with specific monoclonal protein amino acid sequences has not been eliminated in the proposed model, but it was minimised by visualisation of the M-protein in IS-EPG and inclusion of the total protein concentration in the presented model. The D1Ig results, which were not normalised, showed that the D1Ig variable and the PD approach can be used interchangeably in a group with the detected background. The assumption that the applied and only accessible material containing all three classes of M-proteins (IgA, IgG, and IgM) with no polyclonal background would improve the quantification model was not supported with conducted comparisons. We hypothesized that the low concentration of the M-proteins in the used material was the main limitation of normalised variables. Even though immunoprecitated complexes migrated in the albumin and prealbumin fractions, the albumin fraction data had no influence on the explored quantification strategy. Previously, two different strategies of the quantitative immunosubtraction approach were described. Schroeder et al. employed additional software to export IS-EPG results and Bergon and Miravalles estimated M-protein using polyclonal immunoglobulin heavy chain/light chain equivalency factors measured experimentally. Our results showed that the background, detected in 43% of our results, was not an uncommon occurrence and that it altered the relevance of using a universal approach for M-protein quantification, and had no or moderate impact on the D1Ig, D2Ig and D1nIg variables. The well-defined points in IS-EPG, baseline and spike amplitude, were used in this study to avoid the lack of objectivity, a well-known weakness of densitometrical approaches, due to the possibility of subjective M-protein spike demarcation.

Conclusions

For the first time, the concept of immunosubtraction result normalisation was described and studied in this research. The derived variable D1Ig delivered the most comparable results to both examined methods and had the best precision and accuracy testing results. The findings of this study implied that the amplitude of the curves at the M-protein spike point in IS-EPG were

an objective, background-independent, measurable, and relevant parameters for the M-protein quantification using the derived variables. The evaluation of the derived variables showed that their implementation could improve the follow-up of the patients with monoclonal gammopathy.

Keywords: capillary electrophoresis; M-protein; immunosubtraction electrophoresis; multiple myeloma; serum protein electrophoresis; immunoassay

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Imunoglobulini 2

1.2. Monoklonska gamapatija 3

1.3. Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija 10

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA 25

3. MATERIJALI I METODE 27

3.1. Uzorci 28

3.2. Materijali i oprema 29

3.3. Procjena točnosti i mjernoga raspona 32

3.4. Ispitivanje linearnosti 33

3.5. Ispitivanje preciznosti 34

3.6. Mjerni postupci 35

3.7. Statistička obrada 42

3.8. Računalna podrška 43

4. REZULTATI 44

4.1. Razdioba M-proteina prema razredu i tipu te migracijskom položaju u EPG-u 45

4.2. Rezultati analize komercijalnoga kontrolnoga uzorka 47

4.3. Rezultati procjene preciznosti elektroforeze serumskih proteina 48

4.4. Rezultati procjene preciznosti određivanja pojedinih razreda IgG, IgA i IgM 49

4.5. Opisne karakteristike istraživanjem obuhvaćenih M-proteina 50

4.6. Usporedba rezultata denzitometrijskih metoda 51

4.7. Usporedba rezultata imunokemijske s denzitometrijskom PD metodom 55

4.8. Prikaz odstupanja rezultata denzitometrijske TS i imunokemijske metode od rezultata denzitometrijske PD metode u ovisnosti o prisutnosti pozadine 59

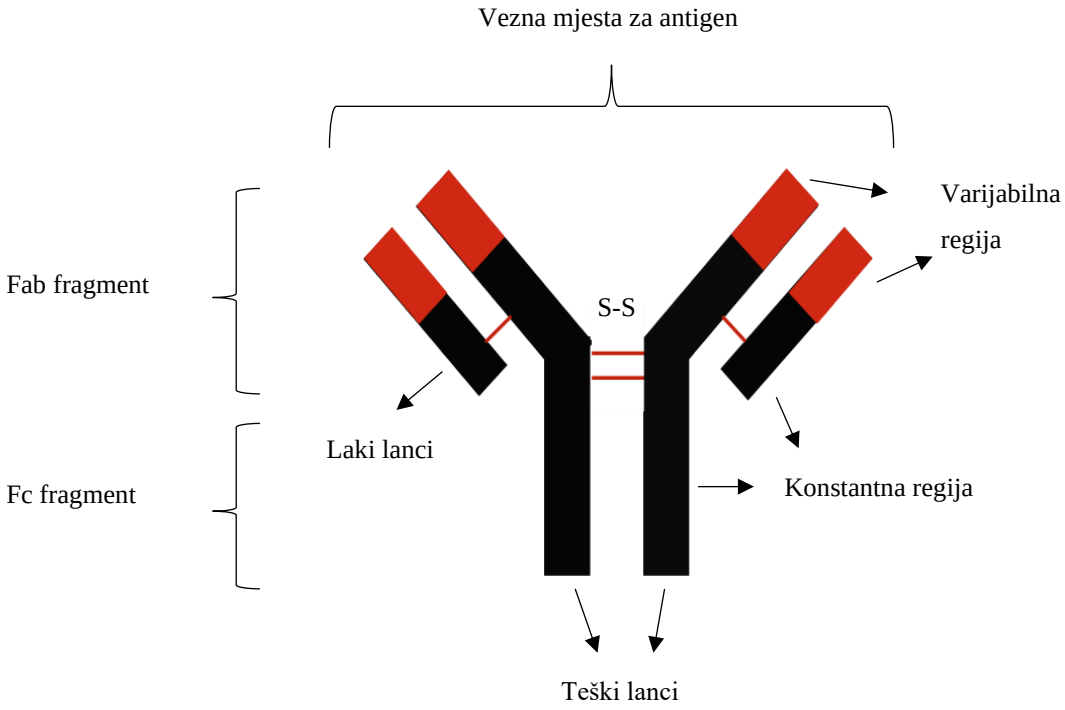
4.9. Povezanost rezultata računskih modela s rezultatima denzitometrijske PD i imunokemijske metode 61

4.10. Povezanost rezultata računskih modela s rezultatima denzitometrijske PD i imunokemijske metode u ovisnosti o prisutnosti pozadine M-proteina 62
4.11. Povezanost rezultata računskih modela s rezultatima denzitometrijske PD i imunokemijske metode u ovisnosti o migracijskom položaju M-proteina 64
4.12. Prikaz razlika rezultata računskih modela u odnosu na denzitometrijsku metodu ... 66
4.13. Prikaz razlika rezultata računskih modela u odnosu na imunokemijsku metodu 68
4.14. Regresijska analiza rezultata računskih modela..... 69
4.15. Prikaz odstupanja rezultata D1Ig računskoga modela od rezultata denzitometrijske PD metode..... 74
4.16. Prikaz odstupanja rezultata D1Ig računskoga modela od rezultata imunokemijske metode..... 75
4.17. Rezultati analize referentnih uzoraka..... 76
4.18. Rezultati procjene linearnosti D1Ig računskoga modela 85
4.19. Rezultati procjene preciznosti računskih modela..... 86
5. RASPRAVA..... 89
6. ZAKLJUČCI 97
7. LITERATURA..... 100
8. POPIS KRATICA 109
9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA 114
10. PRILOG 119
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Imunoglobulini

Molekulu imunoglobulina čine dva para istovrsnih polipeptidnih lanaca koji se razlikuju u broju aminokiselina. Laki su lanci izgrađeni od ~220, a teški od ~440 aminokiselina. Po dva istovrsna teška i dva istovrsna laka lanca međusobno su povezana disulfidnim vezama u četverolančanu jedinicu. Na molekuli imunoglobulina razlikujemo dva funkcijski i topološki različita dijela (Slika 1.), varijabilni dio (Fab) koji specifično prepoznaje epitop na antigenu, dok je konstantni (Fc) odgovoran za efektorske funkcije, kao što su aktivacija imunosnih stanica putem vezanja na specifične receptore i aktivacija komplementa. Razlike u aminokiselinskom slijedu konstantne regije određuju vrstu teškog lanca, gama (γ), alfa (α), mi (μ), delta (δ) i epsilon (ε) temeljem čega su imunoglobulini podijeljeni u pet razreda, IgG, IgA, IgM, IgD i IgE, dok na temelju razlika u aminokiselinskom slijedu konstantne razlike lakih lanaca razlikujemo dva tipa lanaca, kapa (κ) i lambda (λ). Varijabilne regije imunoglobulina omogućuju golemu strukturnu različitost molekule, posebice hipervarijabilna regija, što za posljedicu ima specifično vezanje golemog broja strukturno različitih epitopa.



Slika 1. Shematski prikaz strukture molekule imunoglobulina

Imunoglobulini razreda IgG, IgA i IgM predstavljaju glavninu serumske koncentracije imunogobulina te ujedno čine veći dio beta globulinske i čitavu gama globulinsku frakciju u elferogramu serumskih proteina (EPG). IgG čini 3/4 masene koncentracije svih intravaskularnih imunoglobulina. Nadalje, u fiziološkim uvjetima 2/3 lakih lanaca čine lanci

tipa κ, a 1/3 lanci tipa λ. IgG i IgA intravaskularno cirkuliraju u obliku monomera, dok molekule IgM stvaraju i višejedinične komplekse. Pentamerni zvjezdoliki IgM oblici nastaju povezivanjem monomera disulfidnim vezama i lancem J, polipeptidnim lancem od 15 kDa. U mukoznim sekretima se IgA nalazi u obliku višejediničnih kompleksa (2-3) koji uz lanac J sadrže i sekrecijsku komponentu – polipeptidni lanac od 70 kDa kojeg proizvode lokalno nepokretne epitelne stanice proteolitičkim cijepanjem većeg polipeptida tijekom procesa pinocitoze. Neovisno o broju monomera, u višejediničnim se kompleksima nalazi jedan lanac J.

Organizacija imunoglobulinskih gena je složena, a čine ju tri porodice gena *κ, α i H.* Multigenska porodica *κ* smještena je na kratkom kraku 2. kromosoma dok je multigenska porodica *α* smještena na dugome kraku kromosoma 22. Na dugome kraku kromosoma 14. nalazi se multigenska porodica *H*. U stvaranju heterogenog repertoara imunoglobulina sudjeluje nekoliko genskih mehanizama no, pojednostavljeno rečeno stvaranje antitijela na molekularnoj razini temelji se najvećim dijelom na golemoj varijabilnosti preslagivanja gena.

Tijekom procesa diferencijacije limfocita B u plazma stanice dolazi do stvaranja više klonova plazma stanica sposobnih izlučivati slobodne imunoglobuline usmjerene na različite dijelove antigenske molekule. Jedna plazma stanica stvara samo jednu vrstu imunoglobulina. Posljedično, humoralni imunosni odgovor rezultira poliklonskom sintezom imunoglobulina koja se u EPG-u prikazuje karakterističnim poliklonskim "zvonolikim" oblikom gama globulinske frakcije.

1.2. Monoklonska gamapatija

Nasuprot poliklonskoj, monoklonska sinteza intaktne molekule imunoglobulina ili pojedinoga njezinoga dijela (teškoga ili lakoga lanca) jest posljedica poremećaja u proliferaciji plazma stanica. Monoklonski imunoglobulin, monoklonski protein (M-protein), produkt je jednoga klona plazma stanica. Nalaz M-proteina u serumu i/ili urinu karakterizira stanje nazvano monoklonskom gamapatijom.

1.2.1. Otkriće M-proteina

Prvi dokumentirani slučaj koji se povezuje s monoklonskom gamapatijom jest slučaj bolesnice Sarah Newbury iz 1844. godine. Šest godina kasnije liječnik W. Macintyre opisao je bolesnika

s bolovima u kostima, mijelomskim stanicama u koštanoj srži i nefropatijom čiji je uzorak urina poslao na analizu tada 31-godišnjem kemijskom patologu Henryju Bence Jonesu. Bence Jones je opisao protein u urinu koji ima svojstvo reverzibilne precipitacije u kiselom mediju na temperaturi između 40 – 60 ^{o}C, kasnije nazvan Bence Jones protein (BJP). 1922. godine prepoznato je da BJP čine dvije skupine proteina, a tek su 1956. godine dr. Leonhard Korngold i njegova tehničarka Rose Lipari pokazali da antiserum za lake lance kod bolesnika s multiplim mijelomom (IgG) reagira s BJP-om u urinu istoga bolesnika. Po njima su nazvani laki lanci κ i λ (1).

Usporedno s otkrićem BJP-a razvija se i elektroforeza. Godine 1930. Tiselius opisuje metodu kojom je moguće razdvojiti proteine seruma, a 1939. je po prvi puta opisan visoki uski vršak u EPG-u bolesnika s multiplim mijelomom (MM) (2). U seminarskom predavanju 1961. Jan Waldenström prvi opisuje koncept monoklonske i poliklonske gamapatije.

Krajem 80-ih i početkom 90-ih godina prošloga stoljeća prepoznata su različita klinička stanja bolesnika s dokazanim M-proteinom. U većine bolesnika u kliničkoj slici prevladava bol u kostima, kašalj, anemija, hiperkalcemija i bubrežno oštećenje, dok se kod manjega broja bolesnika serumski M-protein otkrije slučajno sustavnim sistematskim pregledom.

1.2.2. Monoklonska gamapatija neutvrđenoga značenja

Premda se monoklonska gamapatija najčešće povezuje s malignim oboljenjima poput MM-a, Waldenströmove makroglobulinemije i amiloidoze, nalaz serumskoga M-proteina bez kliničkih pokazatelja bolesti karakterizira asimptomatsko stanje monoklonske gamapatije neutvrđenoga značenja (MGNZ). Većina slučajeva bolesnika s MM-om može se povezati s prethodnim stanjem MGNZ-a te se ovo stanje naziva još i predmalignim stanjem. Prema Međunarodnoj radnoj skupini za multipli mijelom (IMWG, engl. *International Myeloma Working Group*) kriteriji za definiranje stanja MGNZ-a jesu:

- koncentracija serumskoga M-proteina < 30 g/L i odsutnost porasta koncentracije M-proteina u nekoliko narednih godina
- zadržana sinteza razreda imunoglobulina koji nisu uključeni u sintezu M-proteina tj. odsutnost supresije poliklonske sinteze razreda imunoglobulina koji nisu uključeni u sintezu M-proteina
- negativan nalaz monoklonskih slobodnih lakih lanaca κ ili λ tipa u serumu i/ili urinu

- nalaz plazma stanica u aspiratu koštane srži < 10 % i
- u kliničkoj slici izostanak oštećenja organa prema CRAB kriteriju:
    - C – koncentracija kalcija u serumu viša za najmanje 0,25 mmol/L od gornje granice referentnoga intervala
    - R – klirens kreatinina < 40 mL/min ili koncentracija kreatinina u serumu >173 μmol/L,
    - A – koncentracija hemoglobina < 100 g/L,
    - B – jedno ili više osteolitičkih žarišta u nalazu slikovnih tehnika kompjutorske tomografije (CT) ili pozitronske emisijske tomografije udružene s kompjutorskom tomografijom (PET-CT) (3).

Premda stanje MGNZ-a ne ispunjava CRAB kriterije, literaturni podatci upućuju na povezanost s više patoloških kliničkih stanja karakterističnih za MM, uključujući oštećenje bubrežne funkcije, sklonost infekcijama, frakturama skeleta te neuropatiji (4).

MGNZ se javlja u oko 3 % osoba starijih od 50 godina i u oko 5 % starijih od 70 godina (5). Prema dosadašnjim istraživanjima, rizik za progresiju MGNZ-a u MM, primarnu amiloidozu ili drugi limfoproliferativni poremećaj procjenjuje se na 1 % godišnje, dok je rizik za razvoj neHodgkinova limfoma, kronične limfocitne leukemije, amiloidoze lakih lanaca ili Waldenströmove makroglobulinemije 1,5 % u skupini bolesnika s IgM MGNZ-om (6). Stanje se nalazi dva puta češće u muškaraca nego u žena i čak tri puta češće u osoba afričkoga podrijetla. U čimbenike rizika za progresiju MGNZ-a u neki od prethodno navedenih limfoproliferativnih poremećaja ubrajaju se koncentracija M-proteina > 15 g/L, razredi IgA i IgM M-proteina, vrijednost omjera slobodnih lakih lanaca κ i λ (FLC, engl. *free light chains kapa and lambda*) < 0,26 i > 1,65, udio plazma stanica u aspiratu koštane srži > 10 % te supresija sinteze razreda imunoglobulina neuključenih u sintezu M-proteina (6). Veći rizik za razvoj MGNZ-a imaju HIV pozitivni bolesnici kao i oni na imunosupresivnoj terapiji (5).

Mehanizam prijelaza iz MGNZ-a u MM još nije potpuno jasan. Česte su kromosomske translokacije u području regija odgovornih za kodiranje dijelova teškoga lanca. Čak u 25 % bolesnika s MGNZ-om detektirana je translokacija t(11;14)(q13;q32) (4). Najveća studija ispitivanja utjecaja genetičkih čimbenika pokazala je 1,7 puta veći rizik za razvoj MM-a i 2,9 puta veći rizik za razvoj MGNZ-a i MM-a u prvoj liniji srodnika (7).

Stanje karakterizirano koncentracijom M-proteina > 30 g/L uz odsutnost ostalih mijelomskih obilježja klasificira se kao asimptomatski ili šuljajući mijelom, a rizik za progresiju u toj je skupini bolesnika 10 % godišnje u prvih 5 godina (8).

Trenutačno ne postoji protokol za probir asimptomatskih pojedinaca na MGNZ već su u tijeku dvije velike kliničke studije : Island pretražuje liječi i prevenira multipli mijelom (iSTOPMM, engl. *Iceland Screens Treats and Prevents Multiple Myeloma*) i Studija predviđanja progresije razvoja mijeloma u visokorizičnoj populaciji (PROMISE, engl. *Predicting Progression of Developing Myeloma in a High-Risk Screened Population*) čiji je cilj razumijevanje epidemioloških, genetičkih i imunosnih čimbenika MGNZ-a (9-10).

1.2.3. Multipli mijelom

Najčešća maligna bolest karakterizirana prisutnošću M-proteina jest MM. MM je druga najčešća zloćudna novotvorina krvotvornoga sustava koja čini do 8 % svih hematoloških zloćudnih bolesti, odnosno 1 % svih zloćudnih tumora (8).

Osim u vrlo rijetkim slučajevima nesekrecijske bolesti, koncentracija M-proteina izravno korelira s veličinom tumorske mase. U bolesnika s MM-om, polovinu detektiranih M-proteina čine M-proteini razreda IgG češće razreda IgG tipa κ nego razreda IgG tipa λ. Razredu IgA pripada 20 % dokazanih M-proteina, dok 15 % M-proteina čine monoklonski slobodni laki lanci imunoglobulina. Preostali dio čine M-proteini razreda IgM i IgD te biklonalne gamapatije (11).

1.2.3.1. Definicija bolesti

Kriteriji za postavljanje dijagnoze MM-a jesu:

- koncentracija M-proteina u serumu > 30 g/L
- supresija sinteze razreda imunoglobulina koji nisu uključeni u sintezu M-proteina, tj. supresija poliklonske sinteze razreda imunoglobulina koji nisu uključeni u sintezu M-proteina,
- nalaz plazma stanica u aspiratu koštane srži ≥ 10 % i
- pozitivan barem jedan od CRAB kriterija (pogledati pod 1.2.2) ili barem jedan od SLiM kriterija:
    - S – nalaz plazma stanica u aspiratu koštan srži ≥ 60 %

- Li – FLC omjer uključenih/neuključenih lanaca u sintezu M-proteina ≥ 100
- M – jedno ili više osteolitičkih žarišta detektiranih slikovnom tehnikom magnetske rezonancije (MR) (3).

1.2.3.2. Epidemiologija i etiologija bolesti

Prema podatcima Hrvatskoga zavoda za javno zdravstvo incidencija bolesti u Hrvatskoj iznosi 4,9 do 5,5 na 100 000 stanovnika godišnje. U 2019. godini novodijagnosticirano je 330 slučajeva. Učestalost bolesti raste s dobi. Godišnje stope incidencija na 100 000 stanovnika u dobnoj skupini od 50 do 59 godina su 5 – 10, u skupini 60 – 69 godina 11 – 24, a iznad 70 godina 29 – 37 (4). Učestalost je nešto veća u muškaraca nego u žena, dva puta je veća u afroameričkoj populaciji, dok je u Azijata manja nego u bijelaca (8, 12).

Etiologija bolesti još uvijek nije poznata. Postoje dokazi o mogućoj genetičkoj predispoziciji (pogledati pod 1.2.2) (13). Literaturni podatci upozoravaju na povezanost hiperfosforiliranoga proteina Paratarg-7 (pP-7) i MGNZ-a odnosno MM-a (14-15). Kao mogući okolišni uzroci navode se utjecaj radioaktivnoga zračenja, kronična antigena stimulacija virusima te višegodišnja izloženost pesticidima i sredstvima za čišćenje (16).

1.2.3.3. Klasifikacija bolesti

Dosadašnje klasifikacije bolesti, stara Durie-Salmon i ISS sustav (engl. *International Staging System*), nisu u potpunosti zadovoljavale kliničku praksu te je 2016. godine prihvaćena nova revidirana klasifikacija tzv. sustav RISS (RISS, engl. *Revised International Staging System*) koji objedinjuje obje klasifikacije i dopunjuje ih s karakterističnim citogenetičkim promjenama (Tablica 1.) (17). Naime, obje su klasifikacije stratificirale bolesnike u tri stadija bolesti, no glavni nedostatak Durie-Salmon klasifikacije bila je nedovoljna objektivnost ulaznih parametara. Premda se ISS klasifikacija temeljila isključivo na mjerljivim parametrima, primjena joj je bila ograničena u bolesnika s bubrežnom bolesti što nije rijedak slučaj u populaciji s MM-om (18-19).

Tablica 1. Prikaz klasifikacije bolesti i petogodišnjih stopa preživljenja prema RISS kriterijima

Stadij	**I**	**II**	**III**
ISS	Albumin > 35 g/L, Beta-2 mikroglobulin < 3,5 g/L	Između stadija I i II	Beta-2 mikroglobulin > 5,5 g/L
Citogenetičke promjene	/		t(4;14), t(14;16), del(17p)
Laktat-dehidrogenaza	Normalna		Povišena
Petogodišnje preživljenje	82 %	62 %	40 %

ISS – međunarodni sustav klasifikacije bolesti (engl. *International Staging System);* RISS – revidirani međunarodni sustav klasifikacije bolesti (engl. *Revised International Staging System*)

1.2.3.4. Terapijski pristup

U posljednjim desetljećima veliki se napredak dogodio u preživljenju bolesnika s MM-om. Od primjene alkilirajućih agenasa (melfalana) 1960-ih godina do sredine 1990-ih godina medijan preživljenja bolesnika s MM-om bio je tri godine (20). Međutim, uvođenjem autologne transplantacije krvotvornih matičnih stanica u terapijski pristup bolesnika i novih lijekova u posljednjem se desetljeću petogodišnje preživljenje procjenjuje na 40 – 50 % (12).

Odabir medikamentoznoga protokola ovisi o mjerljivim pokazateljima aktivnosti bolesti i detektiranim prognostičkim biljezima, a temelji se na kombinaciji lijekova:

- imunomodulator (talidomid, lenalidomid, pomalidomid) + proteasomski inhibitor (bortezomib, karfilzomib) + steroid
- imunomodulator + proteasomski inhibitor + monoklonsko antitijelo (daratumumab, elotuzumab) + steroid (21).

U odmaklim stadijima kliničkih ispitivanja primjenjuju se konjugati antitijela, ciljane male molekule kao i CAR-T stanična terapija (22-23).

1.2.3.5. Kriteriji dubine terapijskoga odgovora

Dubina terapijskoga odgovora procjenjuje se na temelju definicije kategorija kompletnoga odgovora (CR, engl. *Complete response*), kompletnoga terapijskog odgovora u restriktivnim uvjetima (sCR, engl. *Stringent complete response*), vrlo dobroga djelomičnoga odgovora (VGPR, engl. *Very good partial response*) i djelomičnoga terapijskoga odgovora (PR, engl. *Partial response*).

Laboratorijski parametri uspješnosti terapije jesu:

- koncentracija M-proteina
- koncentracije FLC-a te vrijednost FLC omjera i
- udio plazma stanica u aspiratu koštane srži.

CR-om se smatra prisutnost plazma stanica < 5 % u aspiratu koštane srži uz negativan nalaz M-proteina odnosno nemjerljivu koncentraciju serumskoga M-protein. U bolesnika sa MM-om lakih lanca kriterij uključuje i normalan omjer FLC.

Kriteriji za sCR uz one za CR u svih bolesnika obuhvaćaju i odsutnost klonalnih plazma stanica u aspiratu koštane srži.

VGPR podrazumijeva koncentraciju M-proteina ≤ 10 g/L ili smanjenje koncentracije serumskoga M-proteina za ≥ 90 %. Nadalje, u slučaju nemjerljive koncentracije M-proteina, smanjenje za > 90 % koncentracije FLC-a uključenih i neuključenih u sintezu M-proteina.

Kriteriji za PR su smanjenje za ≥ 50 % koncentracije serumskoga M-proteina. U slučaju nemjerljivoga M-proteina, smanjenje za ≥ 50 % koncentracije FLC-a uključenih i neuključenih u sintezu M-proteina.

Progresivnom bolešću definira se stanje karakterizirano porastom od najniže detektirane vrijednosti koncentracije M-proteina za > 25 % ili koncentracije uključenih i neuključenih FLC-a ili udjela plazma stanica, pod uvjetom da ih je više od 10 % kao i hiperkalcemija koja se može povezati samo s bolesti plazma stanica (24).

Napredak u terapiji dovodi do potrebe detekcije minimalne ostatne bolesti s najmanjom analitičkom osjetljivošću od 10^{-4} stanica. Takvu analitičku osjetljivost moguće je postići višeparametarskom analizom stanica, ali čak i veću (10^{-5} – 10^{-6}) metodama molekularne dijagnostike te novom generacijom višeparametarske analize stanica. Međutim, zbog metodoloških i tehnoloških ograničenja navedene metode dostupne su samo u pojedinim centrima tercijarne zdravstvene zaštite i nisu dio standardne obrade bolesnika s MM-om (25-26).

1.2.4. Ostala stanja povezana s monoklonskom gamapatijom

MGNZ i MM čine ukupno 70 % slučajeva karakteriziranih prisutnošću M-proteina. Osim ova dva entiteta, M-protein se nalazi i kod prijelaznoga oblika, asimptomatskoga mijeloma (6 %), primarne amiloidoze (11 %) te drugih limfoproliferativnih bolesti (4 %). 3 % monoklonskih gamapatija otpada na Waldenströmovu makroglobulinemiju te ostatak na druge bolesti (27).

Primarna amiloidoza posljedica je odlaganja lakih lanaca imunoglobulina u tkivima i to najčešće u bubregu, srcu i jetri. Uzrok primarnoj amiloidozi češće je nakupljanje λ nego κ lanaca, a detektira se pregledom bioptata zahvaćenoga tkiva polarizirajućim mikroskopom nakon bojenja s Kongo crvenilom kada se odlaganje fibrilarnih proteinskih struktura prikazuje kao zelena refrakcija svjetlosti (28).

M-protein se može naći i u bolesnika s B-staničnim limfomom i leukemijama. U tih se bolesnika češće nalazi M-protein razreda IgM nego IgG i IgA (29). Nalaz M-proteina razreda IgM najčešće karakterizira Waldenströmovu makroglobulinemiju. Zbog pentamerne strukture molekule IgM, u tih bolesnika često dolazi do razvoja hiperviskoznoga sindroma ili krioglobulinemije što posljedično komplicira njihovu kliničku sliku do razvoja Raynaudovoga sindroma, vaskulitisa i periferne neuropatije (30).

1.3. Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija

Laboratorijska dijagnostika bolesnika sa sumnjom na monoklonsku gamapatiju, osim rutinskih nalaza kompletne krvne slike i općih biokemijskih pretraga, obuhvaća elektroforezu proteina u serumu, određivanje koncentracije ukupnih proteina, pojedinih razreda IgG, IgA i IgM, FLC-a, imunotipizaciju i kvantifikaciju M-proteina (31). U procjeni rizika bolesnika s monoklonskom gamapatijom potrebno je odrediti i koncentraciju albumina i beta-2 mikroglobulina te učiniti citogenetičku analizu kariotipa.

1.3.1. Elektroforeza serumskih proteina

Prvi korak u laboratorijskoj dijagnostici monoklonskih gamapatija jest elektroforeza proteina seruma. Kako molekule M-proteina sintetiziraju plazma stanice koje potječu od istoga klona stanica, one posjeduju jednaka fizikalno-kemijska svojstva te će se sve nastojati zaustaviti na istom mjestu u električnom polju. Zbog navedenoga je metoda probira koja omogućuje razdvajanje proteina u električnom polju na temelju razlike u omjeru mase i naboja kao i

prepoznavanje nakupljanja molekula istih fizikalno-kemijskih svojstava na jednom mjestu u elektroforetskom obrascu postupak izbora u prvom koraku dijagnostike monoklonskih gamapatija.

1.3.1.1. Elektroforeza

Elektroforeza je postupak koji se koristi za razdvajanje i analiziranje smjese različito nabijenih molekula. Pedesetih godina prošloga stoljeća razvojem elektroforeze na papiru metoda je postala dostupna u biomedicini. Omogućuje razdvajanje i relativnu kvantifikaciju serumskih proteina u najmanje pet frakcija (albumin, alfa-1, alfa-2, beta i gama globulini). Koristeći koncentraciju ukupnih proteina i udjele pojedinih frakcija dobivaju se apsolutne vrijednosti.

Razvoj različitih nosača (acetat-celuloze, agaroze, poliakrilamida, otopine pufera) doveo je do unaprjeđenja metode i poboljšanja njezine rezolucijske moći. Danas se u kliničkim laboratorijima elektroforeza na agarozi zamjenjuje kapilarnom elekroforezom visoke djelotvornosti (32).

1.3.1.2. Kapilarna elektroforeza

Osnovna konfiguracija sustava za kapilarnu elektroforezu relativno je jednostavna. Sastoji se od izvora istosmjerne struje, elektroda, kapilare i sustava za detekciju. U kapilaru se pod određenim uvjetima tlaka unose uzorci za analizu. Kapilara čini središnji dio sustava. Ovisno o mediju u kapilari razlikujemo više izvedenica kapilarne elektroforeze (kapilarna elektroforeza slobodne otopine, kapilarna gel-elektroforeza, micelarna elektrokinetička kromatografija itd.). Za razdvajanje serumskih proteina u dijagnostičke svrhe koristi se kapilarna elektroforeza (KE) slobodne otopine. Kod ovoga tipa elektroforeze u kapilari se nalazi puferirana otopina alkalnoga pH u kojoj u kontroliranim uvjetima dolazi do kretanja komponenti uzorka i njihova međusobnoga razdvajanja.

Ovisno o analitičkim potrebama duljina kapilare varira od 6 do 100 cm, kao i promjer kapilare od 20 do 200 μm. Sustav može imati više kapilara, a najčešći su sustavi s 2, 8 ili 12 kapilara. S ciljem osiguranja stalnih temperaturnih uvjeta kapilare su smještene u odgovarajuće nosače koji imaju ulogu hlađenja. Na krajevima kapilara nalazi se detektor koji detektira promjenu apsorpcije svjetlosti u odgovarajućem UV području, najčešće pri 220 nm.

Glavni događaji pri KE-i odvijaju se u kapilari. Znatna elektroendoosmoza glavni je razlikovni čimbenik ovoga tipa elektroforeze od prijašnjih nekapilarnih gel-elektroforeza. Nastaje kao rezultat specifične raspodjele iona oko unutarnje stijenke kapilare izrađene od silikata. Poznato je da je izoelektrična točka silanoilne skupine oko 1,5 te je pri višoj pH vrijednosti unutarnja stijenka kapilare izrazito negativno nabijena. Ovi fiksirani negativni ioni privlače katione, ali s njima i anione otopine čime nastaje gušći sloj mobilnih iona. Potencijal koji se stvara između fiksiranih i mobilnih iona predstavlja elektrokinetički zeta potencijal. Upravo je taj potencijal uključivanjem električnoga polja odgovoran za brzinu elektroosmotskoga toka u kapilari. Ioni vezani za stijenku kapilare uključivanjem električnoga polja ostaju fiksirani, dok se ioni otopine pufera kreću prema elektrodi suprotnoga naboja. Ovaj ionski oblak pokreće i molekule vode. Brzina elektroosmotskoga toka izravno je proporcionalna zeta potencijalu, dielektričnoj konstanti pufera i jačini električnoga polja, a obrnuto proporcionalna viskoznosti otopine u kapilari (33).

Krajnji rezultat razdvajanja ovisi o duljini i promjeru kapilare, karakteristikama pufera (sastavu, pH vrijednosti, ionskoj jakosti), uvjetima pri kojima se uzorak unosi u kapilaru, temperaturi pri kojoj se elektroforeza provodi, elektroosmotskom toku i jakosti električnoga polja. Metoda je brza i osjetljiva inačica elektroforeze koja omogućuje potpunu automatizaciju analitičke faze rada. Ona objedinjuje pojedine karakteristike konvencionalne elektroforeze i tekućinske kromatografije s kapilarnom tehnologijom. Za analizu su potrebne mikrolitarske količine uzorka i pufera. Učinkovitost razdvajanja KE-om očituje se u EPG-u dvama elementima: detekcijom prealbuminske frakcije te razdvajanjem beta frakcije na beta-1 i beta-2 frakciju, odnosno razdvajanjem C3 komponente komplementa i transferina. Premda je varijabilnost u migraciji između kapilara različita, ona ne prelazi 5 % (34). Varijabilnost je nešto veća u prealbuminskoj frakciji što je vjerojatno posljedica niske koncentracije prealbumina u odnosu na ostale proteinske frakcije.

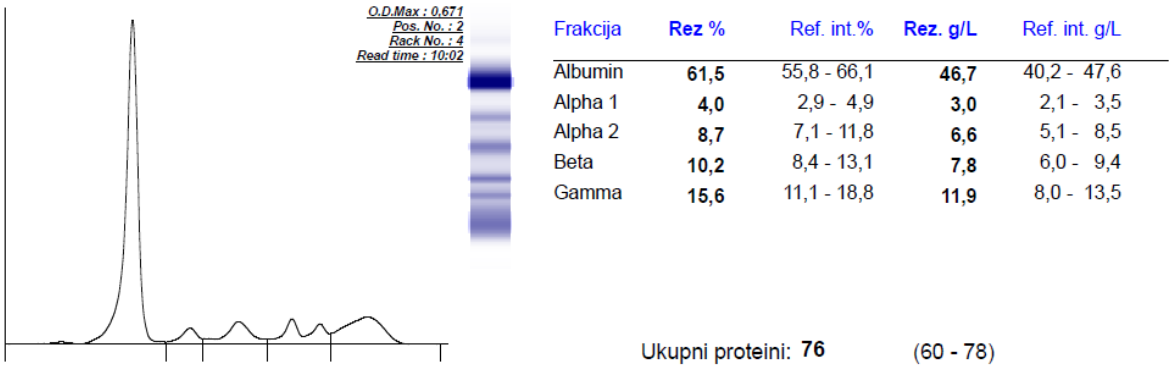
1.3.1.3. M-protein u elektroforeznom obrascu

Kao što je prethodno navedeno (1.3.1.2.), glavni doprinos većoj rezolucijskoj moći KE-e od ranije primjenjivanih nekapilarnih gel-elektroforeza daje elektroosmotski tok i tlak pri kojem se uzorak unosi u kapilare. Ranije je navedeno (pogledati pod 1.3.1) i da M-protein kao produkt jednoga klona plazma stanica predstavlja molekule imunoglobulina jednakih fizikalno-kemijskih osobina što za posljedicu ima njihovo ujednačeno ponašanje u električnom polju.

Zaustavljanje svih monoklonski sintetiziranih molekula na istom mjestu dovodi do njihova nakupljanja i rezultira nastajanjem homogene uske vrpce na elektroforezom nosaču odnosno vrška u EPG-u proporcinalnoga količini M-proteina (Slika 2.) (34).

Kao što je prethodno navedeno (1.3.1.2), KE omogućuje razdvajanje beta migirajućih proteina u dvije proteinske frakcije te se prednost ove metode posebno ističe u kontekstu monoklonskih gamapatija najčešćeg beta migrirajućeg razreda imunoglobulina, IgA.

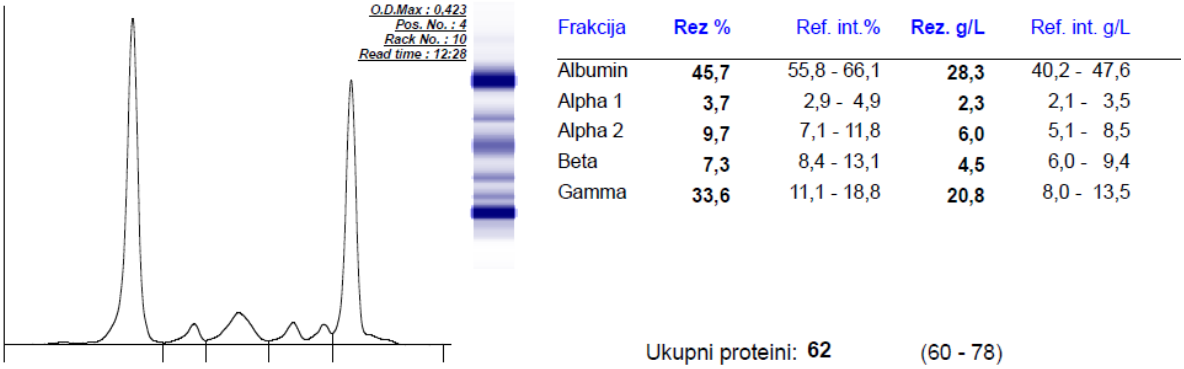
(a)



Frakcija	Rez %	Ref. int.%	Rez. g/L	Ref. int. g/L
Albumin	**61,5**	55,8 - 66,1	**46,7**	40,2 - 47,6
Alpha 1	**4,0**	2,9 - 4,9	**3,0**	2,1 - 3,5
Alpha 2	**8,7**	7,1 - 11,8	**6,6**	5,1 - 8,5
Beta	**10,2**	8,4 - 13,1	**7,8**	6,0 - 9,4
Gamma	**15,6**	11,1 - 18,8	**11,9**	8,0 - 13,5

Ukupni proteini: **76** (60 - 78)

(b)



Frakcija	Rez %	Ref. int.%	Rez. g/L	Ref. int. g/L
Albumin	**45,7**	55,8 - 66,1	**28,3**	40,2 - 47,6
Alpha 1	**3,7**	2,9 - 4,9	**2,3**	2,1 - 3,5
Alpha 2	**9,7**	7,1 - 11,8	**6,0**	5,1 - 8,5
Beta	**7,3**	8,4 - 13,1	**4,5**	6,0 - 9,4
Gamma	**33,6**	11,1 - 18,8	**20,8**	8,0 - 13,5

Ukupni proteini: **62** (60 - 78)

Slika 2. Prikazi elferograma serumskih proteina kapilarnom elektroforezom slobodne otopine. (a) Primjer normalnoga EPG-a uz relativne i apsolutne vrijednosti pojedinih proteinskih frakcija. (b) Primjer karakterističnoga izgleda EPG-a u bolesnika s monoklonskom gamapatijom: prikazuje se visoki uski vršak u gama globulinskoj frakciji uz povećanu relativnu i apsolutnu vrijednost proteina gama globulinske frakcije.

EPG-i su izrađeni u Odjelu za elektroforetsku i imunokemijsku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkoga centra Zagreb.

1.3.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Metoda izbora za određivanje ukupnih proteina u serumu je spektrofotometrijska metoda koja se temelji na biuret reakciji u kojoj reakcijom između dvovalentnih iona bakra u alkalnoj sredini i peptidnih veza proteina nastaje kelatni spoj. Koncentracija nastaloga kompleksa proporcionalna je količini apsorbirane svjetlosti pri 550 nm. Reakcija je brza te zadovoljavajuće točnosti i preciznosti za kliničku praksu (35).

1.3.3. Određivanje koncentracije pojedinih razreda IgG, IgA i IgM

Koncentracija svih razreda imunoglobulina, kako uključenih tako i neuključenih u sintezu M-proteina određuje se izravnim imunokemijskim metodama : imunoturbidimetrijom i imunonefelometrijom. Reagensi za određivanje imunoglobulina sadrže antitijela koja prepoznaju epitope u Fc regijama pojedinog razreda imunoglobulina. Nastajanje specifičnoga imunokompleksa rezultira povećanjem zamućenosti (turbiditeta) otopine odnosno rasipanja ulazne svjetlosti. Metodom imunoturbidimetrije se mjeri smanjenje intenziteta ulazne zrake svjetlosti pod kutom od 180^o kao mjera povećanja zamućenosti reakcijske smjese. Za razliku od turbidimetrije, količinu rasipane svjetlosti mjere nefelometri pri kutom od 30 do 90^o. Čestice imunokompleksa više raspršuju svjetlo pri manjem kutu s obzirom na smjer ulazne svjetlosti te je omjer signala i šuma jači kod manjih kutova raspršene svjetlosti. Laserski nefelometri mjere rasipanje pod malim kutom, dok standardni nefelometri mjere rasipanje pri kutom od 90^o (36).

Odabir između turbidimetrije i nefelometrije ovisi o koncentraciji analita u uzorku. Zbog preciznije detekcije rasipanja svjetlosti, nefelometrija omogućuje kvantifikaciju u nižem mjernom rasponu (1 – 10 μg/L) od turbidimetrije te ima prednost u određivanju specifičnih proteina u specijalnim tjelesnim tekućinama.

Premda se u smjernicama IMWG-a navodi imunonefelometrija kao metoda izbora, ne postoje dokazi o tome da u kliničkom laboratoriju češće primjenjivana imunoturbidimetrija nije dovoljno dobra alternativna metoda za određivanje koncentracije imunoglobulina u serumu (37).

Obje metode su standardizirane, tj. sljedive su do međunarodnoga referentnog materijala serumskih proteina oznake ERM-DA470k/IFCC čime je osigurana usporedivost rezultata (35).

1.3.4. Određivanje koncentracije tipova FLC-a

Uvođenjem određivanja koncentracije tipova FLC-a početkom 21. stoljeća kao prvoga u serumu mjerljivoga i dovoljno osjetljivoga parametra aktivnosti plazma stanica bitno je unaprijeđena obrada bolesnika s monoklonskom gamapatijom (38). Specifična antitijela u reagensu prepoznaju mjesta dostupna samo kada laki lanac nije vezan za teški lanac, tj. ne prepoznaju lake lance u intaktnoj molekuli imunoglobulina.

Budući je koncentracija FLC-a u serumu rezultat ravnoteže između njihove sinteze i bubrežnoga klirensa, porast koncentracije oba tipa lakih lanaca može biti posljedica poliklonskoga humoralnog imunosnog odgovora, ali i neadekvatne reapsorpcije u bubrežnim tubulima. Stoga, isključivo omjer koncentracija FLC predstavlja uvid u zadržavanje fiziološkoga omjera koncentracije lakih lanaca i danas se smatra biljegom klonalnosti plazma stanica. Klinička značajnost određivanja koncentracije tipova FLC kao mjerljivoga pokazatelja bolesti prepoznata je u dijagnostici, prognozi i praćenju bolesnika s monoklonskom gamapatijom te je ovaj analitički postupak postao dio SLiM dijagnostičkoga kriterija i kriterija za procjenu terapijskoga odgovora (detaljnije navedeno pod 1.2.3.1, 1.2.3.5.).

Nedostatak analitike određivanja koncentracije FLC-a nedovoljna je standardiziranost metoda i nepostojanje referentnoga materijala. Više proizvođača čini dostupnim reagense koji se primarno razlikuju u dva elementa: vrsti antitijela (poliklonsko u odnosu na monoklonsko) i načinu detekcije nastalih imunokompleksa (imunoturbidimetrija u odnosu na imunonefelometriju) te brojni objavljeni rezultati upozoravaju na nedovoljnu usporedivost rezultata (39-42).

1.3.5. Imunotipizacija M-proteina

Jedan od prognostičkih čimbenika u bolesnika s monoklonskom gamapatijom jest razred i tip M-proteina. Povoljan prognostički čimbenik jest dokaz M-proteina razreda IgG tipa κ. Nalaz intaknoga M-proteina s lakim lancem tipa λ smatra se nepovoljnijim čimbenikom od nalaza lakoga lanca tipa κ. Naime, činjenica da je sinteza lakih lanaca tipa λ fiziološki zastupljena samo s 1/3 ukupne sinteze lakih lanaca imunoglobulina potvrđuje kako prevladavajuća sinteza M-proteina s lakim lancem tipa λ ima progresivniji tijek bolesti.

Postupke kojima se dokazuje M-protein te tipizira, tj. određuje njegov razred i tip obuhvaća pojam imunotipizacije. Pojam je uveden 1999. godine s ciljem harmonizacije nazivlja u ovom području. Metode kojima se provodi imunotipizacija su imunofiksacija i imunosuptrakcija (2).

Na temelju izgleda EPG-a indikacije za provođenje imunotipizacije jesu:

- postojanje izraženoga vrška u području od alfa-2 do gama globulinske frakcije
- gubitak simetričnosti beta ili gama frakcije
- znatno povišena beta-1 ili beta-2 frakcija i
- izolirani porast beta-2 frakcije (beta-2 ≥ beta-1).

Ostale indikacije jesu:

- postojanje kliničke sumnje na MM iako ne postoji izražen vršak u EPG-u
- nakon primijenjene terapije u bolesnika kod kojih nije vidljiv vršak M-proteina prvi puta od njegova dokazivanja u EPG-u.

1.3.5.1. Imunofiksacija

Imunofiksacija je postupak koji predstavlja „zlatni standard" u kvalitativnoj analizi tj. dokazivanju i tipiziranju M-proteina. Najčešće detektirani M-protein je razreda IgG, rjeđe IgA i IgM, a vrlo rijetko IgD i IgE. Monoklonski IgA najčešće se nalazi u beta globulinskoj frakciji, a IgM u gama globulinskoj frakciji u EPG-u. Monoklonski IgG može se zaustaviti na čitavom području od alfa-2 do gama globulinske frakcije.

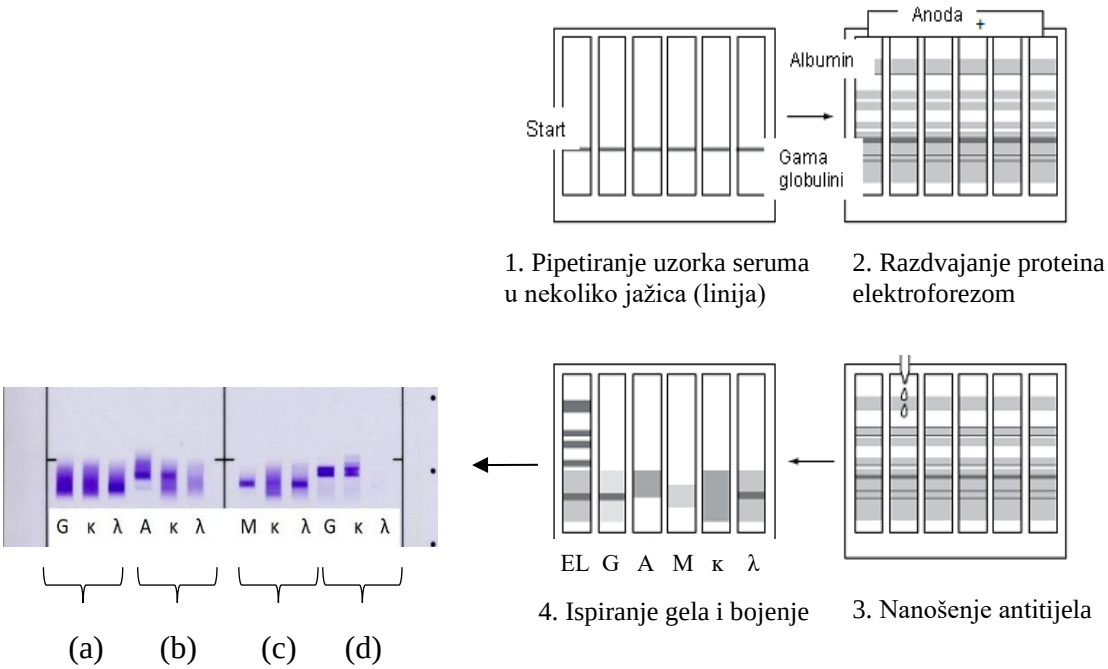
Imunofiksacija se provodi kao poluautomatizirani postupak koji uključuje tri faze:

- elektroforezu proteina na agaroznom gelu
- imunoprecipitaciju i
- vizualizaciju nespecifičnim bojenjem.

Elektroforeza se odvija na gelovima koncentracije agaroze 0,5 – 1,0 %. Niska koncentracija otopine agaroze omogućuje nastanak gela velikih pora i slobodnu migraciju proteina velike molekulske mase. Serumski proteini razdvajaju se paralelno u više linija, ovisno o broju različitih antitijela koja će biti primijenjeni u drugom koraku, imunoprecipitaciji. Na linije razdvojenih proteina pomoću odgovarajućega predloška nanose se specifična antitijela za teške (anti γ, anti α, anti μ) i lake lance (anti κ, anti λ). Antitijela reagiraju s odgovarajućom konstantnom domenom teškoga odnosno lakoga lanca tvoreći kompleks koji ostaje fiksiran u

gelu. Nakon inkubacije, suvišak antitijela uklanja se iz gela, dok se proteini koje antitijela nisu prepoznala ispiru. U sljedećem koraku, primjenom nespecifične boje za proteine samo fiksirani protein postaje vidljiv na gelu (Slika 3.). Kao dokaz da je imunofiksirana intaktna molekula imunoglobulina, tj. da su nastali imunokompleksi posljedica specifične reakcije s antitijelima naspram teškog, odnosno lakog lanca unutar iste imunoglobulinske molekule na gelu se na usporedivom elektroforeznom položaju prikazuju obojene proteinske frakcije (43). Uspješnost imunofiksacije procjenjuje se položajem nastaloga imunokompleksa koji mora biti u istom elektroforeznom području kao i vršak detektiran u standardnom EPG-u. M-protein se prikazuje kao jače izražena uska homogena vrpca na slabije obojenoj pozadini. Prisutnost ili odsutnost difuzne pozadine upozorava na postojanu ili nepostojanu poliklonsku sintezu imunoglobulina istoga razreda (17).

Ukoliko postoji sumnja na prisutnost M-proteina, a nije uočena reakcija s anti-IgG, anti-IgA i anti-IgM antitijelima nastavlja se analiza s anti-IgD i/ili anti-IgE antitijelima.



Slika 3. Shematski prikaz slijeda radnji kod postupka imunofiksacije, od nanošenja uzorka u jažice gela (1.), preko razdvajanja proteina elektroforezom (2.) i inkubacije sa specifičnim antitijelima (3.) do vizualizacije karakterističnih uskih homogenih vrpci koje upućuju na monoklonsku sintezu imunoglobulina (4.); EL – elektroforeza proteina nativnoga seruma; G, A, M, κ, λ – linije proteina seruma nakon nanošenja antitijela specifičnoga za pojedini teški ili laki lanac imunoglobulina. (a) Izražena poliklonska sinteza IgG; (b) Uz poliklonsku sintezu IgA nađen monoklonski IgAκ tipa; (c) Nađen monoklonski IgMλ tipa; (d) Nađen monoklonski IgGκ tipa.

(*preuzeto i prilagođeno iz D. Šegulja. Definiranje razreda i tipa monoklonskoga imunoglobulina metodom imunosuptrakcije. U D. Matišić: Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija-2014, HKMB, Medicinska naklada, Zagreb, 2014:53-58*) (44)

1.3.5.2. Imunosuptrakcija

M-protein je, osim imunofiksacijom, moguće imunotipizirati i postupkom imunosuptrakcije koji se u anglosaksonskoj literaturi nalazi pod nazivima *immunosubtraction* i *immunodisplacement*, a podrazumijeva postupak kojim je moguće ukloniti/izmjestiti frakciju M-proteina iz/u EPG-a.

Još su 1977. godine Aguzzi i Poggi opisali imunosuptrakciju kao metodu koja omogućuje precipitaciju specifičnog proteina inkubirajući serum s antitijela naspram transferina prije izvođenja elektroforeze acetat-celulozi. Uočili su da uklanjanje transferina (imunosuptrakcija)

prije elektroforeze omogućuje lakšu interpretaciju krajnjeg EPG-a (45). Za detekciju M-proteina prvi su imunosuptrakciju upotrijebili White i Attwood (46), a smjernice za kliničku i laboratorijsku evaluaciju bolesnika s monoklonskom gamapatijom iz 1999. godine završavaju opisujući imunosuptrakciju kao perspektivnu metodu za tipiziranje serumskoga M-proteina (47). Imunosuptrakcija se danas provodi kao automatizirani postupak sastavljen od tri koraka:

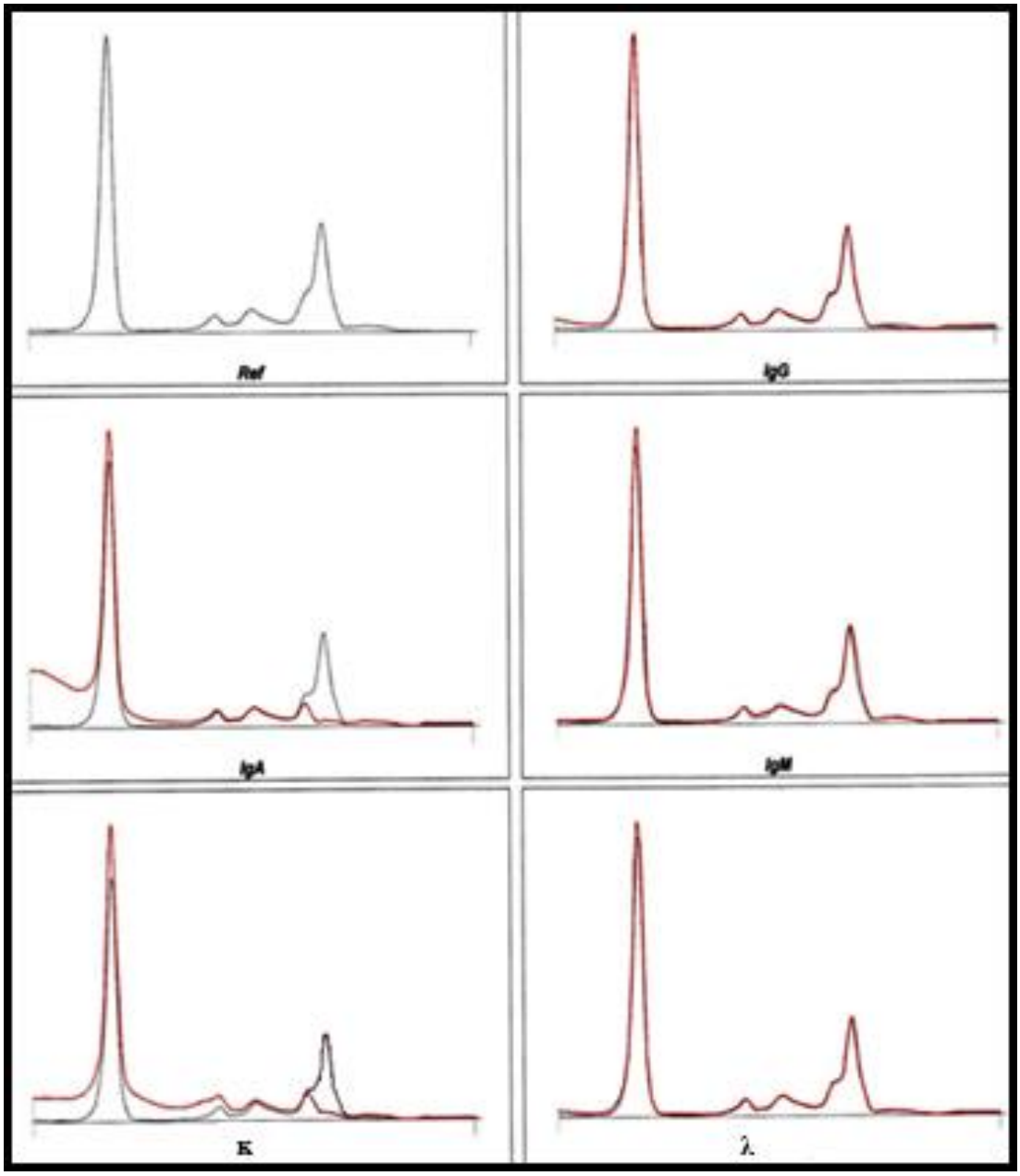
- elektroforeze proteina nativnoga uzorka metodom KE
- imunoprecipitacije i elektroforeze proteina imunoprecipitiranoga uzorka metodom KE te
- spektrofotometrijske detekcije razdvojenih proteina.

U svrhu imunoprecipitacije molekula imunoglobulina koriste se kuglice sefaroze (engl. *sepharose, Separation-Pharmacia-Agarose*) obložene antitijelima specifičnim naspram odgovarajućih teških i lakih lanaca. Nastali imunokompleksi izmještaju vezane proteine u elferogramu u odnosu na elferogram nativnoga uzorka u područje albuminske frakcije (17).

Nestanak ili promjena simetričnosti M-proteinu pripisanoga vrška u elferogramu uzorka inkubiranoga s kuglicama sefaroze obloženim antitijelima upućuje na nastanak imunokompleksa, odnosno dokazuje prisutnost monoklonskih molekula imunoglobulina i pruža informaciju o razredu i tipu prisutnoga M-proteina (Slika 4.).

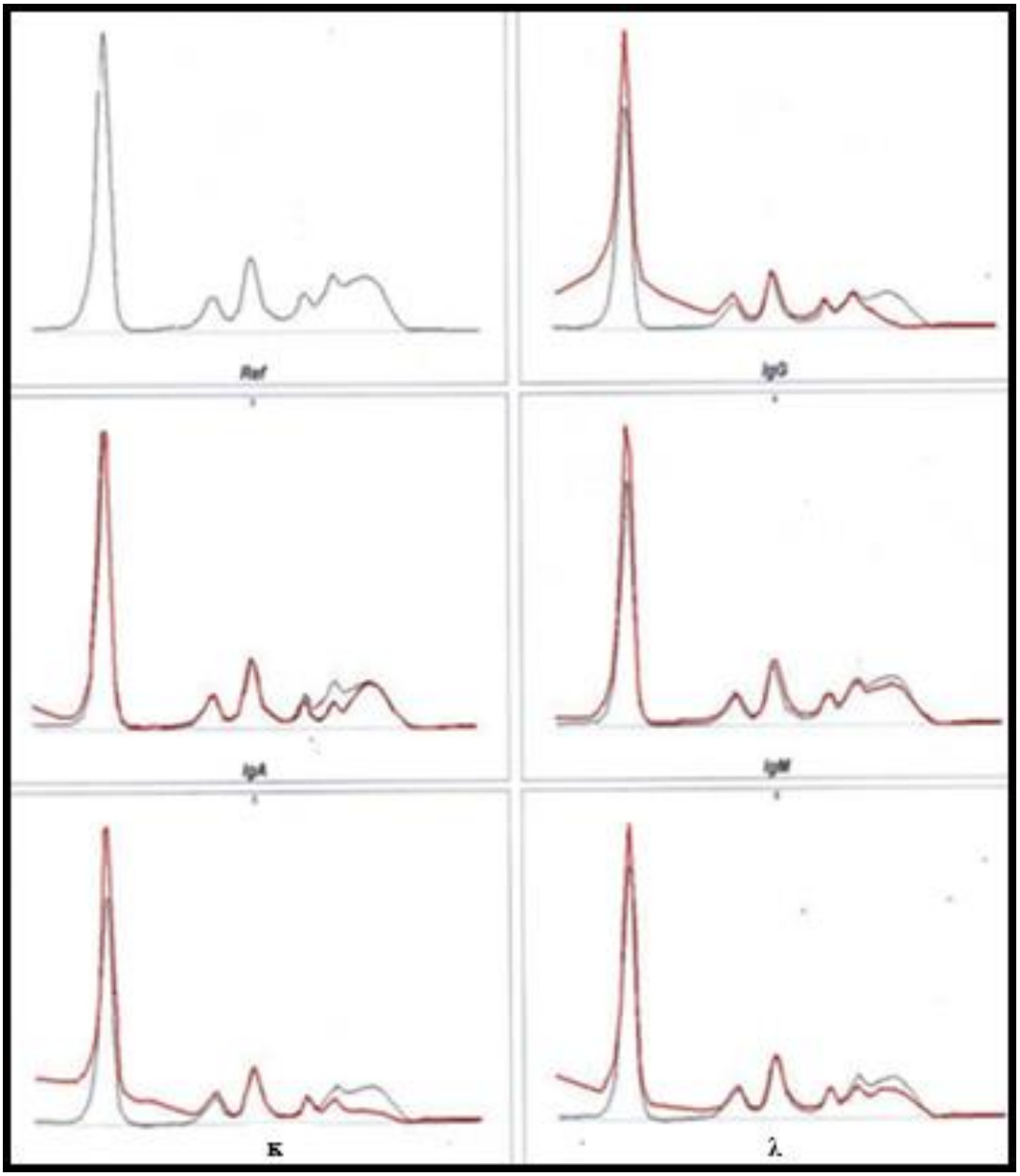
Za reakciju imunoprecipitacije nije nužna prisutnost samo i isključivo M-proteina, već će antitijela stvoriti kompleks i sa specifičnim poliklonski sintetiziranim imunoglobulinom odgovarajućega razreda i tipa (43).

Nakon imunoprecipitacije u elferogramu uzorka s prisutnim poliklonski sintetiziranim imunoglobulinima razreda G, A i M bit će vidljiva najveća promjena u području simetrične zvonolike gamaglobulinske krivulje i odgovarat će IgG koji čini 80% serumskih imunoglobulina i glavninu gama globulinske frakcije. Manje promjene u elferogramu imunoprecipitiranoga uzorka bit će vidljive u području beta globulinske frakcije i odgovarati će IgA koji čini 15 % ukupnih imunoglobulina. Imunoprecipitacija IgM (5 %) očitovat će se najmanje uočljivim promjenama elferograma imunoprecipitiranog uzorka u području gama globulina. Budući da je fiziološki omjer FLC-a 2 : 1, promjena u elferogramu imunoprecipitiranoga uzorka obrađenoga s anti-κ antitijelima biti će dva puta veća od one s anti-λ antitijelima (Slika 5.).



Slika 4. Slikovni prikaz rezultata imunosuptrakcije uzorka s M-proteinom razreda IgA κ tipa. Pregledom elferograma imunoprecipitiranoga uzorka uočava se izmještanje vrška u području beta frakcije u reakciji s antitijelima naspram α teškoga lanac i κ lakoga lanca.

(*preuzeto i prilagođeno iz D. Šegulja. Definiranje razreda i tipa monoklonskoga imunoglobulina metodom imunosuptrakcije. U D. Matišić: Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija-2014, HKMB, Medicinska naklada, Zagreb, 2014:53-58*) (44)



Slika 5. Slikovni prikaz rezultata imunosuptrakcije uzorka s poliklonskom hipergamaglobulinemijom. Pregledom elferograma imunoprecipitiranoga uzorka uočava se zadržana simetrija krivulja u području beta i gama globulinske frakcije. Razlike između referentnoga i imunoprecipitacijskih elferograma odgovaraju fiziološkim odnosima imunoglobulina.

(*preuzeto i prilagođeno iz D. Šegulja. Definiranje razreda i tipa monoklonskoga imunoglobulina metodom imunosuptrakcije. U D. Matišić: Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija-2014, HKMB, Medicinska naklada, Zagreb, 2014:53-58*) (44)

Tablica 2. Usporedni prikaz karakteristika postupaka za imunotipizaciju M-proteina

	Imunotipizacija	
Postupci	Imunofiksacija	Imunosuptrakcija
Tip elektroforeze/nosač	Gel-elektroforeza/agaroza	Kapilarna elektroforeza/Otopina pufera
Mogućnost detekcije razreda M-proteina	IgA, IgG, IgM, IgD, IgE	IgA, IgG, IgM
Mogućnost detekcije tipa M-proteina	κ, λ	κ, λ
Stupanj automatizacije postupka	Poluatomatiziran	Potpuno automatiziran
Vremensko trajanje	1h i 30 min	10 min
Razlike s obzirom na rezultat	Prisutan samo imunofiksirani razred i tip imunoglobulina	Prisutni svi proteini seruma osim imunoprecipitiranoga razreda i tipa imunoglobulina

(*preuzeto i prilagođeno iz D. Šegulja. Definiranje razreda i tipa monoklonskoga imunoglobulina metodom imunosuptrakcije. U D. Matišić: Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija-2014, HKMB, Medicinska naklada, Zagreb, 2014:53-58*) (44)

1.3.6. Određivanje koncentracije albumina i beta-2 mikroglobulina

Za određivanje koncentracije albumina dostupne su spektrofotometrijske i izravne imunokemijske metode, dok je beta-2 mikroglobulin moguće odrediti samo izravnim imunokemijskim metodama. Metode za oba analita su standardizirane: albumin prema ERM-DA470k/IFCC standardnom materijalu, a beta-2 mikroglobulin prema međunarodnom standardu Svjetske zdravstvene organizacije (35).

1.3.7. Kvantifikacija M-proteina

Za određivanje koncentracije M-proteina nije dostupan jednoznačan i široko prihvaćen pristup odnosno metoda (48). Premda smjernice kontinuirano prate nove spoznaje u ovom području, u njima se ne spominju preporučene metode za prikaz i kvantifikaciju serumskoga M-proteina (49). U tu svrhu koriste se dva pristupa, imunokemijski i denzitometrijski.

Najčešće korišteni pristup obuhvaća određivanje koncentracije razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina imunokemijskim metodama. Prema dosadašnjim literaturnim podatcima ovaj pristup često rezultira precijenjenim (50), ali moguće i podcijenjenim vrijednostima koncentracije M-proteina (pogledati pod 1.3.3.).

Drugi pristup temelji se na procjeni površine ispod vrška u EPG-u koji se pripisuje M-proteinu na način da se udio površine krivulje ispod vrška pridruženoga M-proteinu koristeći koncentraciju ukupnih proteina prevodi u apsolutnu koncentraciju izraženu u g/L. EPG, kao rezultat ujednačenoga kretanja molekula u električnom polju, a koje je funkcija strukturnih karakteristika molekula pruža bolji uvid u monoklonalnost, tj. poliklonalnost prisutnih imunoglobulina u odnosu na imunokemijske metode. Kao glavni nedostatak ovoga denzitometrijskog pristupa u dosadašnjim literaturnim podatcima navodi se ograničena mogućnost isključivanja ostatne poliklonske pozadine koja obuhvaća i poliklonski sintetizirane molekule razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina, ali i razrede imunoglobulina koji nisu uključeni u sintezu M-proteina (51). Osim toga, položaj M-proteina u EPG-u često onemogućuje jasno definiranje površine ispod vrška pridruženoga M-proteinu što se najčešće spominje u kontekstu beta frakcije i komigrirajućih proteina transferina i C3 komponente komplementa (37). S ciljem smanjenja utjecaja navedenih faktora na točnost i preciznost kvantifikacije serumskoga M-proteina denzitometrijskom metodom razvijane su različite matematičke modifikacije ovoga pristupa. Najčešće primjenjivani model su ortogonalne projekcije na baznu liniju EPG-a i model linearnoga otklona u točkama tangencije (52).

Znatan napredak u procjeni sinteze M-proteina zabilježen je uvođenjem imunokemijskoga testa za određivanje koncentracije FLC-a. Njihov omjer brojnim je literaturnim podatcima pokazan kao biljeg klonalnosti plazma stanica te se uvođenje ovoga analitičkoga postupka smatra prekretnicom u obradi bolesnika s monoklonskom gamapatijom (38). U bolesnika s M-proteinom < 10 g/L i u svih s nemjerljivo niskom koncentracijom M-proteina umjesto denzitometrijske analize u praćenju terapijskoga odgovora određuje se omjer koncentracija

FLC-a (53, 25). Literaturni podatci upozoravaju na veliku varijabilnost u rezultatima među dostupnim reagensima kao glavni nedostatak određivanja koncentracije tipova FLC-a u svrhu procjene sinteze M-proteina (pogledati pod 1.3.4.).

Daljnji napredak u obradi bolesnika s monoklonskom gamapatijom ostvaruje se primjenom poliklonskih antitijela koja prepoznaju vezna mjesta između teškoga i lakoga lanca i time je omogućeno imunokemijskom metodom odrediti koncentraciju molekula imunoglobulina pojedinoga razreda i tipa (HLC, engl. *heavy light chain*): IgGκ, IgGλ, IgAκ, IgAλ, IgMκ i IgMλ. Dostupni literaturni podatci upućuju na vrijednost omjera koncentracija imunoglobulina istoga razreda, a različitoga tipa te naglašavaju potencijal ovog analitičkog postupka u kontekstu kvantifikacije M-proteina (38). Međutim, nedovoljna standardiziranost i upotreba imunonefelometrijske metode nisu isključile postojeće nedostatke imunokemijskog pristupa (54).

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Računskim postupcima koji koriste podatke dobivene kvalitativnom analizom serumskoga M-proteina metodom imunosuptrakcije u bolesnika s monoklonskom gamapatijom moguće je dobiti kvantitativne podatke o koncentraciji M-proteina. Modelom razvijenim iz podataka rezultata imunosuptrakcije moguće je kvantitativno određivanje M-proteina u serumu.

Glavni cilj istraživanja jest razviti računske postupke za kvantitativno određivanje serumskoga M-proteina u bolesnika s monoklonskom gamapatijom koristeći podatke iz laboratorijskih rezultata kvalitativne metode imunosuptrakcije.

Jedan od ciljeva ovoga doktorskog rada jest učiniti razvidnim da rezultati računskoga modela koji koristi podatke dobivene metodom imunosuptrakcije koreliraju s vrijednostima dobivenima denzitometrijskom analizom EPG-a i imunoturbidimetrijskim određivanjem koncentracije razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina u uzorcima bolesnika s monoklonskom gamapatijom.

Specifični ciljevi obuhvaćaju ispitivanje analitičkih karakteristika razvijenoga modela kvantifikacije M-proteina. Jedan od specifičnih ciljeva jest procjena točnosti računskih modela analizom referentnih materijala te ispitivanje mjernoga raspona analizom i obradom rezultata referentnih materijala u različitim razrjeđenjima.

Utjecaj poliklonske pozadine M-proteina ispitat će se analizom kontrolnih seruma s dodanom poznatom količinom referentnoga materijala u nizu razrjeđenja uobičajenim načinima kvantifikacije M-proteina: denzitometrijskom analizom EPG-a i imunoturbidimetrijskim određivanjem koncentracije razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina. Usporedit će se i preciznost računskoga modela s denzitometrijskom analizom EPG-a uzimajući u obzir varijabilne čimbenike kvantifikacije M-proteina.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb, a odobrilo ga je Etičko povjerenstvo KBC-a Zagreb te Povjerenstva za etičnost eksperimentalnoga rada Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

U razdoblju od rujna 2016. do veljače 2017. godine prikupljani su podatci analiza seruma bolesnika s uputnom dijagnozom monoklonske gamapatije klinički praćenih i terapijski zbrinutih u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb te bolesnika koje su uputili liječnici obiteljske medicine u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku na laboratorijsku obradu sa sumnjom na monoklonsku gamapatiju. Iz istraživanja su isključeni uzorci u kojima nije dokazana prisutnost M-proteina. Za potrebe ovoga istraživanja nisu prikupljani dodatni uzorci biološkoga materijala.

Prva faza istraživanja obuhvatila je analize ukupno 251 uzorka seruma na način da je provedena KE, određena koncentracija ukupnih proteina, koncentracija pojedinih razreda IgG, IgA i IgM te provedena imunofiksacija. Koncentracija pojedinoga razreda imunoglobulina određena imunokemijskom metodom u usporedbenim je analizama predstavljala ukupnu koncentraciju razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina.

U 133 uzorka dokazana je prisutnost M-proteina. U istoj fazi obrađen je komercijalni kontrolni uzorak poznate koncentracije ukupnih proteina koji sadrži M-proteine razreda IgG, IgA i IgM bez prisutne poliklonske pozadine i to na način da je provedena KE, određena koncentracija pojedinih razreda IgG, IgA i IgM te učinjena imunofiksacija. Na isti su način analizirani i referentni materijali, u nativnom obliku i u različitim razrjeđenjima te kontrolni uzorci serumskoga matriksa koji nisu sadržavali M-protein, a u koje je dodavana različita količina referentnoga materijala.

U sljedećoj fazi u svim je uzorcima i materijalima provedena imunosuptrakcija te određena koncentracija M-proteina denzitometrijskom metodom. Analizirani su rezultati imunosuptrakcije kontrolnih i referentnih uzoraka te prepoznati mjerljivi parametri u imunosuptrakcijskom elferogramu na temelju kojih su istraženi računski postupci za kvantifikaciju M-proteina.

U svrhu ispitivanja točnosti i mjernoga raspona računskoga modela analizirani su referentni materijali u različitim razrijeđenjima, dok su za procjenu utjecaja prisutne poliklonske pozadine

na kvantifikaciju M-proteina korišteni kontrolni uzorci serumskoga matriksa koji nisu sadržavali M-protein, a u koji su dodavane različite količine referentnog materijala. Za ispitivanje preciznosti korišteni su uzorci seruma bolesnika s monoklonskom gamapatijom odabrani, s tim da su u obzir uzeti poznati varijabilni faktori za kvantifikaciju M-proteina.

U posljednjoj fazi istraživanja provedena je evaluacija predloženih računskih postupaka usporedbom rezultata ispitivanih postupaka s dosadašnjim postupcima kvantifikacije: denzitometrijskom analizom EPG-a i imunoturbidimetrijskom metodom određivanja koncentracije razreda imunoglobulina uključenoga u monoklonsku sintezu.

3.2. Materijali i oprema

U istraživanju su korišteni materijali te otopine pripremljene kako je u nastavku opisano.

3.2.1. Otopine

- Cell Wash Solution, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska
- 0,9 % natrijev klorid (NaCl), Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu
- Puferska otopina Capillarys pH 9,9±0,5, Sebia, Lysses, Francuska
- Destilirana voda vodljivosti < 3 μS/cm, KZLD
- Otopina za uklanjanje boje pripremljena miješanjem 5 mL koncentrirane otopine s destiliranom vodom do volumena od 5 L (pH 2,0±0,5), Sebia, Lysses, Francuska
- Hydrasys otopina za ispiranje pripremljena miješanjem 80 mL koncentrirane otopine s destiliranom vodom do volumena od 5 L (pH 8,7±0,5), Sebia, Lysses, Francuska
- Otopina za ispiranje pripremljena miješanjem 75 mL koncentrirane otopine sa 750 mL destilirane vode (pH 12,0±0,5), Sebia, Lysses, Francuska
- Capiclean otopina, otopina proteolitičkih enzima za čišćenje kapilara, Sebia, Lysses, Francuska
- 2 – 3 % otopina natrijevoga hipoklorita, Kemika, Zagreb
- Acid violet otopina pripremljena miješanjem koncentrirane otopine s 250 mL destilirane vode (pH 2,0±0,5), Sebia, Lysses, Francuska
- Otopina za razrjeđivanje, bromfenol plavilo (pH 7.5±0,5), Sebia, Lysses, Francuska
- Albumeon, infuzijska otopina ljudskoga albumina 200 g/L, CSL Behring, Marburg, Njemačka

3.2.2. Reagensi i antitijela

- Tinaquant IgA (kozje antitijelo naspram humanog IgA, u TRIS pufer 20 mmol/L, pH 8,0, NaCl 200 mmol/L, polietilenglikol 3,6 %), Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska
- Tinaquant IgG (kozje antitijelo naspram humanog IgG, u TRIS pufer 20 mmol/L, pH 8,0, NaCl 200 mmol/L, polietilenglikol 3,6 %), Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska
- Tinaquant IgM (kozje antitijelo naspram humanog IgM, u TRIS pufer 20 mmol/L, pH 8,0, NaCl 200 mmol/L, polietilenglikol 3,6 %), Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska
- Total proteins (natrijev hidroksid 400 mmol/L, kalij-natrijev tartarat 89 mmol/L, kalijev jodid 61 mmol/L, bakrov sulfat 24,3 mmol/L), Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska
- Anti – α (ovčje antitijelo naspram humanog teškog lanca α), Sebia, Lysses, Francuska
- Anti – γ (ovčje antitijelo naspram humanog teškog lanca γ), Sebia, Lysses, Francuska
- Anti – μ, (ovčje antitijelo naspram humanog teškog lanca μ), Sebia, Lysses, Francuska
- Anti – κ, (ovčje antitijelo naspram humanog lakog lanca κ), Sebia, Lysses, Francuska
- Anti – λ, (ovčje antitijelo naspram humanog lakog lanca λ), Sebia, Lysses, Francuska

3.2.3. Ostali potrošni materijal

- Epruvete Vacuette bez antikoagulansa, s gelom, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austrija
- Epruvete za alikvotiranje, Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka
- Spremnici za jednokratnu upotrebu s pojedinačnim odjeljcima koji sadrže otopinu za razrijeđenje, potrebni za elektroforezu uzoraka, Sebia, Lysses, Francuska
- Spremnici za jednokratnu upotrebu s pojedinačnim odjeljcima koji sadrže otopinu za razrijeđenje i otopine pojedinačnih antitijela, anti – α, anti – γ, anti – μ, anti – κ i anti – λ (ovčja antitijela naspram humanih teških i lakih lanaca imunoglobulina), potrebni za imunosuptrakciju uzorka, Sebia, Lysses, Francuska
- 1,5 % agarozni gel (spreman za upotrebu), komercijalne oznake Hydragel IF 2/4, Sebia, Lysses, Francuska
- Puferirane spužvice (pH 9,1±0,5), Sebia, Lysses, Francuska
- Filtri za filtraciju puferske otopine, destilirane vode i radne otopine za ispiranje, Sebia, Lysses, Francuska
- Aplikatori za nanošenje uzorka, Sebia, Lysses, Francuska
- Nosači antiseruma, Sebia, Lysses, Francuska

- Filtarski papiri (tanki i debeli), Sebia, Lysses, Francuska.

3.2.4. Kontrolni i referentni materijali

- PreciControl ClinChem Multi 1, kontrolni materijal razine 1, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska
- PreciControl ClinChem Multi 2, kontrolni materijal razine 2, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska
- C.f.a.s., standard za određivanje koncentracije ukupnih proteina, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska
- C.f.a.s. Protein, standard za određivanje koncentracije pojedinih razreda imunoglobulina, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska
- Normal Control, kontrolni materijal za elektroforezu serumskih proteina s normogamaglobulinemijom, Sebia, Lysses, Francuska
- Hypergamma Control, kontrolni materijal za elektroforezu serumskih proteina s hipergamaglobulinemijom, Sebia, Lysses, Francuska
- IF/IT Control, kontrolni materijal za imunofiksaciju i imunosuptrakciju seruma, Sebia, Lysses, Francuska
- 243 Gammopathies, uzorci vanjskoga organizatora procjene kontrole kvalitete u području gamapatija INSTAND e.V. Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e. V., Düsseldorf, Njemačka korišteni kao referentni materijali u ovom istraživanju. Referentni materijali upotrebljeni u ovom istraživanju jedinstvenih su oznaka: 2020-11, 2020-31, 2020-32, 2021-11, 2021-12, 2021-31, 2021-32, 2022-11, 2022-12.

3.2.5. Tehnička oprema i računalni programi

- Centrifuga 5415R, Eppendorf, Njemačka
- Automatska pipeta, varijabilna 0,1-1,0 mL, Eppendorf, Njemačka
- Vorteks MS 3 basic, Ika, Japan
- Hladnjak LTH, London, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Uređaj za demineralizaciju vode, Niro VV, Nirosta, Osijek, Hrvatska

- Roche Cobas 6000cee, biokemijsko-imunokemijski analizator, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska
- Capillarys 2, sustav za kapilarnu elektroforezu, Sebia, Lysses, Francuska
- Hydrasys 2 Scan, sustav za gel elektroforezu, Sebia, Lysses, Francuska
- Sebia, programski alat za obradu elferograma, Sebia, Lysses, Francuska
- Microsoft Excel, računalni programski alat, Microsoft Corporation, Redmond, Washington DC, SAD
- MedCalc, statistički programski alat, verzija 20.023, MedCalc Software, Ostend, Belgija.

3.3. Procjena točnosti i mjernoga raspona

Za procjenu točnosti korišteni su referentni materijali organizatora vanjske procjene kvalitete, 243 Gammopathies (INSTAND e.V. Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e. V., Düsseldorf, Njemačka) (55). Nativni uzoci pripremljeni su otapanjem liofilizata u 1 mL destilirane vode. Analizirano je 9 različitih referentnih uzoraka. U svim je uzorcima učinjena elektroforeza proteina, imunofiksacija, imunosuptrakcija, te određene koncentracije ukupnih proteina i koncentracije pojedinih razreda IgG, IgA i IgM.

Mjerni raspon procjenjivan je analizom nativnoga referentnoga materijala i razrijeđenih uzoraka referentnoga materijala pripremljenih miješanjem referentnoga materijala i fiziološke otopine u omjerima 1 : 2, 1 : 3 i 1 : 4. U svim je razrjeđenjima učinjena elektroforeza proteina, imunofiksacija, imunosuptrakcija te određene koncentracije ukupnih proteina i koncentracije pojedinih razreda IgG, IgA i IgM.

3.3.1. Ispitivanje utjecaja poliklonske pozadine na točnost računskih modela

Utjecaj poliklonske pozadine na kvantifikaciju M-proteina računskim modelom ispitan je analizom uzoraka pripremljenih dodavanjem različite količine referentnoga materijala u nativne kontrolne serume. Nativne kontrolne serume činila su tri različita kontrolna seruma s tri razine poliklonske pozadine:

- uzorak s hipogamaglobulinemijom
- uzorak s normogamaglobulinemijom i

- uzorak s poliklonskom hipergamaglobulinemijom.

Uzorci za analizu pripremljeni su na način da je u pojedini alikvotni uzorak volumena (200 μL) svakog od tri nativna kontrolna seruma dodano pet različitih volumena referentnog materijala (Tablica 3.). Navedenim postupkom pripremljeno je za analizu 5 uzoraka s hipogamaglobulinemijom i različitom koncentracijom M-proteina, 5 uzoraka s normogamaglobulinemijom i različitom koncentracijom M-proteina te 5 uzoraka s poliklonskom hipergamaglobulinemijom i također različitom koncentracijom M-proteina.

Tablica 3. Priprema kontrolnih uzoraka seruma s dodanom različitom količinom referentnoga materijala

	Kontrolni serum (μL)	Referentni materijal (μL)
Uzorak 1	200	25
Uzorak 2	200	50
Uzorak 3	200	100
Uzorak 4	200	150
Uzorak 5	200	200

3.4. Ispitivanje linearnosti

Za ispitivanje linearnosti korištena su 3 referentna materijala 243 Gammopathies (INSTAND e.V. Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e. V., Düsseldorf, Njemačka) koja su obuhvatila M-proteine 3 različita razreda imunoglobulina. Uzorci su pripremljeni miješanjem referentnoga materijala i otopine albumina u omjerima 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5 i 1 : 6. U svim je razrjeđenjima učinjena elektroforeza proteina, imunofiksacija, imunosuptrakcija te određene koncentracije ukupnih proteina i koncentracije pojedinih razreda IgG, IgA i IgM.

Različite koncentracije analizirane su u duplikatu, a izmjerene srednje vrijednosti prikazane su linearnom regresijom.

3.5. Ispitivanje preciznosti

U preliminarnom istraživanju provedeno je ispitivanje preciznosti elektroforeze serumskih proteina metodom KE te imunoturbidimetrijskoga određivanja koncentracije pojedinih razreda IgG, IgA i IgM. Ispitivanje je slijedilo preporučeni postupak naveden u CLSI 15-A3 dokumentu (56), a rezultati su interpretirani prema kriterijima prihvatljivosti temeljenim na podatcima o biološkoj varijaciji analita (57-58) navedenima u Tablici 4.

Tablica 4. Kriteriji poželjne preciznosti.

Analit	KV (%)
Albumin	1,6
Alfa-1 globulini	5,7
Alfa-2 globulini	5,2
Beta globulini	5,1
Gama globulini	7,3
IgG	1,8
IgA	2,9
IgM	3,9

KV – koeficijent varijacije

3.5.1. Uzorci seruma za ispitivanje preciznosti računskih modela

Za ispitivanje preciznosti korištena su 4 uzorka seruma bolesnika s monoklonskom gamapatijom sljedećih karakteristika:

- M-protein prikazan u gama globulinskoj frakciji bez prisutnosti poliklonske pozadine
- M-protein prikazan u gama globulinskoj frakciji uz prisutnost poliklonske pozadine
- M-protein prikazan u beta globulinskoj frakciji
- M-protein niske koncentracije prikazan u gama globulinskoj frakciji uz prisutnu izraženu poliklonsku pozadinu.

Mjerenja su provedena u šesteroplikatu. U denzitometrijsko određivanje koncentracije M-proteina bila su uključena dva istraživača kako bi se obuhvatio utjecaj varijacije u ograničavanju površine ispod vrška pripisanoga M-proteinu na preciznost metoda.

3.6. Mjerni postupci

U radu su korišteni mjerni postupci određivanja koncentracije ukupnih proteina, koncentracije pojedinih razreda IgG, IgA i IgM, elektroforeze serumskih proteina, postupci imunotipizacije seruma metodama imunofiksacije i imunosuptrakcije, analize rezultata imunosuptrakcije koja je uključivala detekciju i određivanje mjerljivih parametara imunosuptrakcijskoga elferograma te analizu podataka.

3.6.1. Određivanje koncentracije ukupnih proteina i pojedinih razreda imunoglobulina

Koncentracije proteina određene su na analizatoru Cobas 6000cee (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska) upotrebom spektrofotometrijske metode s biuret reagensom bez slijepe probe, dok su pojedini razredi IgG, IgA i IgM određeni turbidimetrijskom metodom na istom analizatoru koristeći Tinaquant reagense.

3.6.2. Kapilarna elektroforeza proteina seruma

Elektroforeza je provedena primjenom sustava za KE-u Capillarys 2 (Sebia, Lysses, Francuska). Postupak započinje ulaskom razrijeđenoga uzorka u kapilaru na anodnom kraju pri tlaku od 20 mBar u kojoj se tijekom 228 sekundi odvija visokonaponsko razdvajanje proteina pod stalnim uvjetima temperature od 35,5 ^{o}C kontroliranim Peltierovim elementom, pri pH medija od 9,0 i naponu od 7800 V te jakosti električnoga polja od 50 – 830 μA. Razdvojene proteinske frakcije izravno su detektirane pri 200 nm na katodnom kraju kapilare (59).

3.6.3. Imunofiksacija

Imunofiksacija je provedena primjenom poluautomatiziranoga sustava za gel-elektroforezu Hydrasys 2 Scan (Sebia, Lysses, Francuska). Pojedini uzorak seruma pripremljen je prema uputama proizvođača (60) dodatkom odgovarajućeg volumena otopine za razrijeđenje ovisno u primjenjenom antitijelu tijekom imunofiksacije kako je prikazano u Tablici 5.

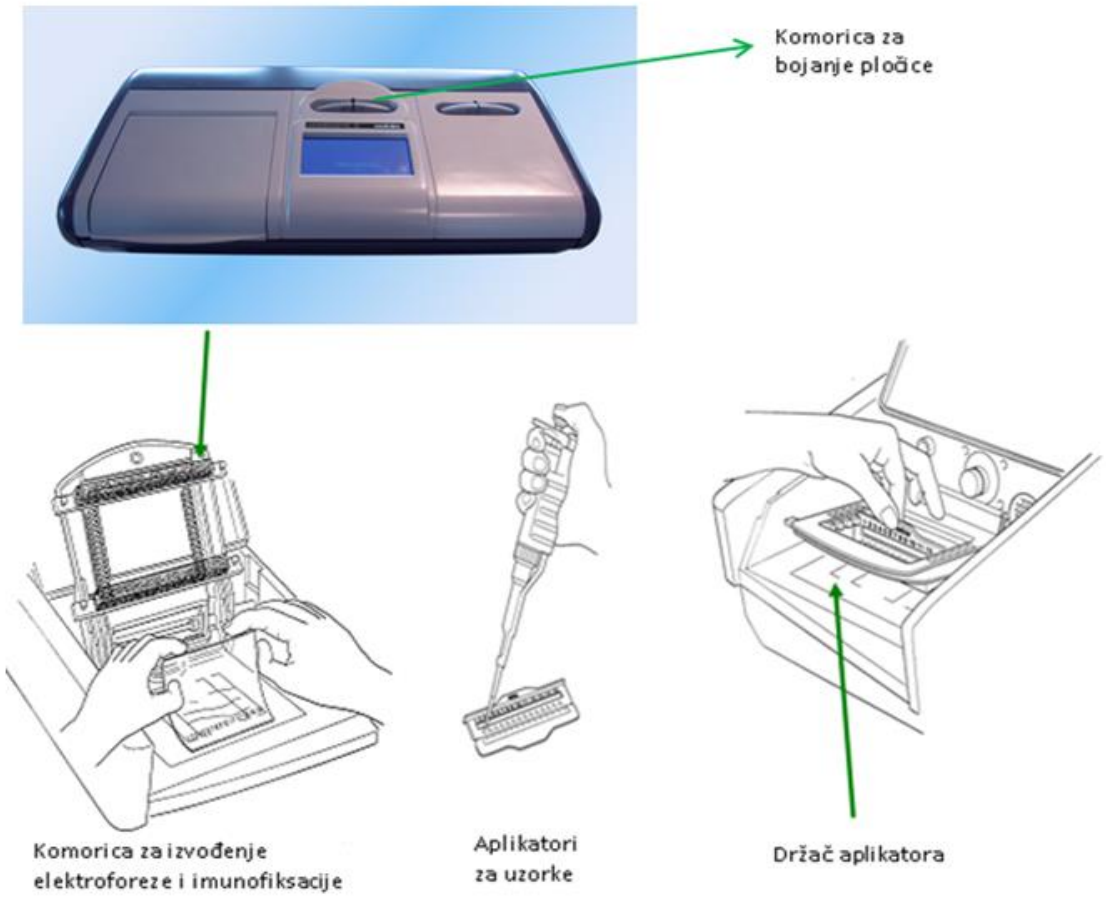
Tablica 5. Volumeni pojedinoga nativnoga uzorka seruma i otopine za razrjeđenje u ovisnosti o primijenjenom antitijelu tijekom imunofikacije

UZORAK NATIVNOGA SERUMA (μL)	OTOPINA ZA RAZRJEĐENJE (μL)	ANTITIJELO PRIMIJENJENO TIJEKOM IMUNOFIKSACIJE
10	50	Anti – γ
15	30	Anti – α Anti – μ Anti – κ Anti – λ

Uzorci pripremljeni na opisani način (10 μL) naneseni su u jažice aplikatora, a puferirane spužvice (pH = 9,1) postavljene su na elektrode. Na podlogu migracijskoga modula (Slika 6.) dodano je 200 μL destilirane vode koja omogućava prijanjanje agaroznoga gela na podlogu nakon čega je na odgovarajuću poziciju postavljen aplikator i pokrenuta elektroforeza pri uvjetima 20 W (do 42 Vh), na 20 ^{o}C tijekom 9 minuta.

Nakon elektroforeznog razdvajanja serumskih proteina uklonjene su puferirane spužvice, na agarozni gel postavljen je nosač antiseruma u čije je jažice otpipetirana standardna količina odgovarajućeg antiseruma (8 μL). Inkubacija se odvijala tijekom 5 minuta na 20 ^{o}C.

Nakon inkubacije slijedilo je upijanje tekućine iz gela pomoću filtarskog papira tijekom 3 minute na 40 °C te sušenje gela na temperaturi od 50 °C tijekom 6 minuta. Osušni gel bojen je u komorici za bojenje uz upotrebu 300 mL otopine za bojenje (acid violet) te obrađen primjenom otopine za odbojavanje (1 L) i otopine za ispiranje (400 mL) (57).



Slika 6. Uređaj za gel-elektroforezu sastoji se od tri modula: komorice za provođenje elektroforeze i imunofiksacije, komorice za bojenje i modula za denzitometriranje. Slika prikazuje slijed radnji u komorici za izvođenje elektroforeze i imunofiksacije.
(djelomično preuzeto i prilagođeno prema Sebia Hydragel 1,2,4 &9 IF Dynamic mask, Instructions for use)(60)

3.6.4. Imunosuptrakcija

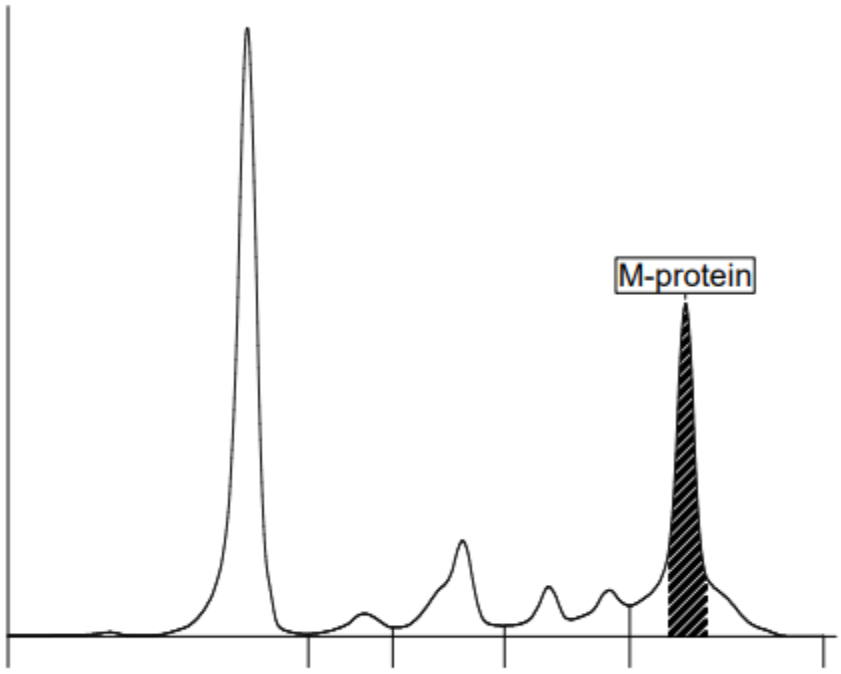
Za izvođenje imunosuptrakcije na uređaju Capillarys 2 (Sebia, Lysses, Francuska) korišteni su originalni spremnici, spremni za upotrebu, s pojedinačnim odjeljcima u kojima se je nalazila otopina za razrjeđenje i otopine pojedinačnih specifičnih antitijela (61). Za analizu jednog uzorka potreban je jedan ovakav spremnik. Dodatkom uzorka za analizu u svaki od odjeljaka spremnika s antitijelima nastaje smjesa koja se razdvaja KE-om pri istim uvjetima pod kojim i elektroforeza proteina nativnih uzoraka seruma opisanim u odjeljku 3.6.2.

3.6.5. Modeli kvantifikacije M-proteina koristeći EPG

Za određivanje koncentracije M-proteina korišteni su denzitometrijski modeli koji uz podatke iz EPG-a uključuju i koncentraciju ukupnih proteina. Površina ispod vrška M-proteina u elferogramu procjenjena je dvjema metodama: metodom ortogonalne projekcije na apscisu EPG-a i metodom linearnoga otklona u točkama tangencije vrška M-proteina.

3.6.5.1. Metoda ortogonalne projekcije na apscisu EPG-a

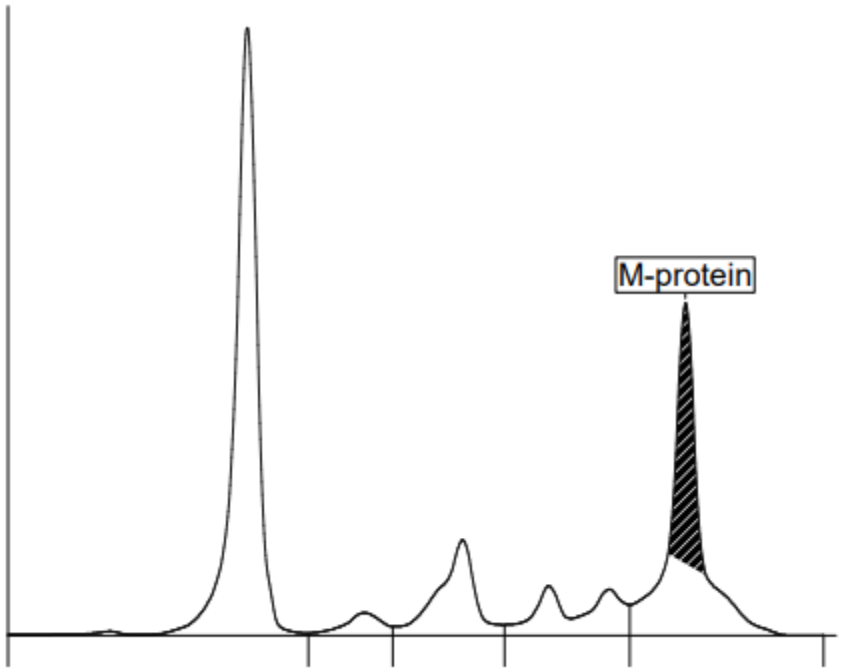
Metoda ortogonalne projekcije na apscisu EPG-a (PD, engl. *Perpendicular drop*) podrazumijeva površinu ispod vrška pripisanoga M-proteinu omeđenu točkama u kojima se vršak izdvaja od poliklonske pozadine te bazne linije u EPG-u (Slika 7.). Umnožak relativnoga udjela omeđene površine krivulje i koncentracije ukupnih proteina predstavlja koncentraciju M-proteina u g/L.



Slika 7. Prikaz modela kvantifikacije serumskoga M-proteina korištenjem metode ortogonalne projekcije na apscisu EPG-a. EPG je izrađen u Odjelu za elektroforetsku i imunokemijsku dijagnostiku Kliničkoga zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb

3.6.5.2. Metoda linearnoga otklona u točkama tangencije vrška M-proteina

Metoda linearnoga otklona u točkama tangencije (TS, engl. *Tangent skimming method*) podrazumijeva površinu ispod vrška pripisanoga M-proteinu omeđenu točkama u kojima se vršak izdvaja od poliklonske pozadine i linije (tangente) koja spaja te dvije točke (Slika 8.). Umnožak relativnoga udjela omeđene površine krivulje i koncentracije ukupnih proteina predstavlja koncentraciju M-proteina u g/L.



Slika 8. Prikaz modela kvantifikacije serumskoga M-proteina korištenjem metode linearnoga otklona u točkama tangencije. EPG je izrađen u Odjelu za elektroforetsku i imunokemijsku dijagnostiku Kliničkoga zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb

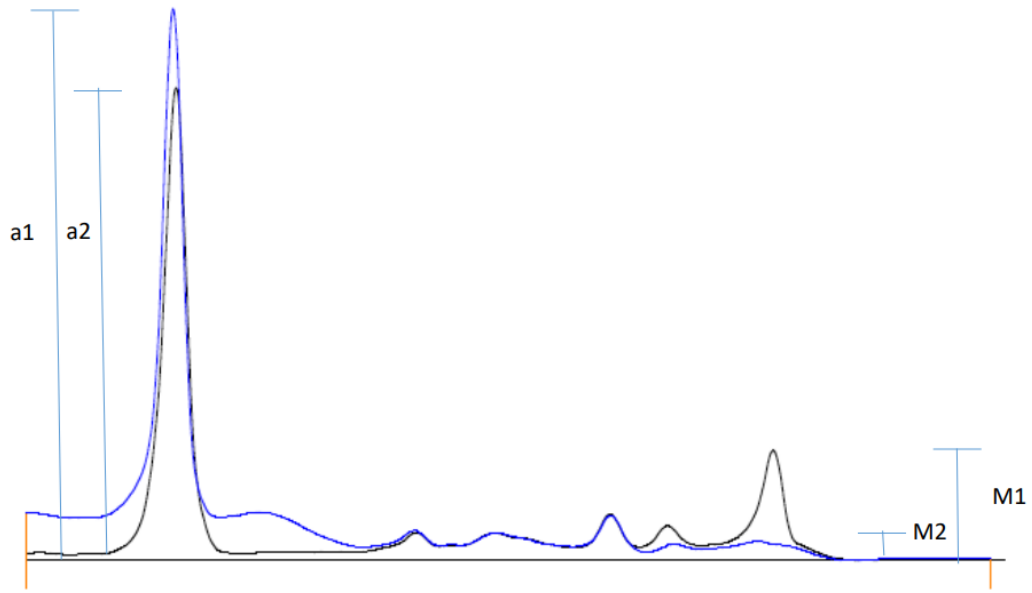
3.6.6. Računski modeli kvantifikacije M-proteina primjenom imunosuptrakcijskog elferograma

U računskim modelima korišteni su uz podatke iz imunosuptrakcijskoga elferograma (IS-EPG) podaci o koncentraciji ukupnih proteina, koncentraciji razreda imunoglobulina uključenog u sintezu M-proteina te globulina. Kao mjerljivi parametar u IS-EPG-u prepoznate su visine

krivulja u nativnim uzorcima i uzorcima u kojima je provedena imunoprecipitacija, na mjestu vrška M-proteina i vrška albumina u jednoznačno određenoj točki (Slika 9.).

Visina vrška M-proteina u nativnom uzorku definirana je amplitudom vrška M-proteina, a mjerena ortogonalnom projekcijom na baznu liniju IS-EPG-a kao udaljenost od najviše točke vrška M-proteina do bazne linije IS-EPG-a. Amplituda krivulje u uzorku u kojem je provedena imunoprecipitacija definirana je udaljenošću globulinskoga dijela krivulje od bazne linije IS-EPG-a ortogonalnom projekcijom u istovjetnoj točki.

Amplitude vrška albuminske frakcije u nativnom uzorku i uzorku u kojem je provedena imunoprecipitacija mjerene su ortogonalnom projekcijom na baznu liniju kao udaljenosti od najviše točke vrška albuminske frakcije do bazne linije IS-EPG-a u istovjetnoj točki.



Slika 9. Prikaz mjerljivih varijabli u imunosuptrakcijskom elferogramu: (a_1) – amplituda vrška albuminske frakcije nakon imunoprecipitacije; (a_2) – amplituda vrška albuminske frakcije nativnog uzorka; (M_1) – amplituda vrška M-proteina nativnog uzorka; (M_2) – amplitude krivulje globulinske frakcije nakon imunoprecipitacije

Ispitani su računski modeli koji su uz mjerljive podatke iz IS-EPG-a uključivali koncentraciju ukupnih proteina, koncentraciju razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina (Ig_{invl}), koncentraciju globulina te podatke dobivene analizom kontrolnoga uzorka IF/IT

Control. U ovom je istraživanju navedeni kontrolni uzorak korišten u svrhu umjeravanja ispitivanoga pristupa kvantifikacije M-proteina kao jedini dostupan materijal koji u istom uzorku sadrži M-proteine razreda IgG, IgA i IgM u odsutnosti poliklonske pozadine.

Primijenjeno je i istraženo osam različitih računskih modela:

- varijabla AD koja je razlika u amplitudama vrška M-proteina nativnoga uzorka i globulinske krivulje elferograma ispitivanog uzorka nakon provedene imunoprecipitacije,

$$AD = (M1 - M2)p$$

- varijabla ADn koja predstavlja omjer AD varijable u ispitivanom uzorku i AD varijable u kontrolnom uzorku IF/IT Control,

$$ADn = \frac{(M1 - M2)p}{(M1 - M2)c}$$

- varijabla AD1nIg koja je produkt ADn varijable, omjera koncentracija ukupnih proteina u ispitivanom uzorku i kontrolnom uzorku IF/IT Control (TP_p/TP_c) te koncentracije razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina u ispitivanom uzorku (Ig_{invl}),

$$AD1nIg = \left[\frac{(M1-M2)p}{(M1-M2)c}\right] x \left(\frac{TPp}{TPc}\right) x\, Iginvl \text{ (g/L)}$$

- varijabla AD2nIg koju čini AD1nIg varijabla s doprinosom podataka albuminske frakcije u obliku razlike u amplitudama vršaka albuminske frakcije nakon provedene imunoprecipitacije i nativnoga uzorka (a1-a2),

$$AD2nIg = \frac{[(M1-M2)p+(a1-a2)p]}{[(M1-M2)c+(a1-a2)c]}\ x\ \left(\frac{TPp}{TPc}\right) x\, Iginvl \text{ (g/L)}$$

- varijabla ADnG koja je produkt ADn varijable i koncentracije globulina u ispitivanom uzorku (G) dobivene iz razlike koncentracija ukupnih proteina i albuminske frakcije,

$$ADnG = \left[\frac{(M1-M2)p}{(M1-M2)c}\right] x\ G \text{ (g/L)}$$

- varijabla D1Ig koja je produkt omjera AD varijable i amplitude vrška M-proteina nativnoga uzorka te koncentracije razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina ispitivanog uzorka (Ig_{invl}),

$$D1Ig = \left[\frac{(M1-M2)}{M1}\right] p\ x\ Iginvl \text{ (g/L)}$$

- varijabla D2Ig koju čini D1Ig varijabla s doprinosom podataka albuminske frakcije u obliku omjera razlike u amplitudama vršaka albuminske frakcije nakon imunoprecipitacije i amplitude u nativnom ispitanom uzorku ([a1-a2]/a2),

$$D2Ig = \left[\left(\frac{M1-M2}{M1}\right)p + \left(\frac{a1-a2}{a2}\right)p\right] x\ Iginvl \quad \text{(g/L)}$$

- varijabla D1nIg koja je produkt omjera AD varijable i amplitude vrška M-proteina nativnoga uzorka i kontrolnoga uzorka IF/IT Control te omjera koncentracija ukupnih proteina u ispitivanom uzorku i kontrolnom uzorku IF/IT Control (TP_p/TP_c) i koncentracije razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina ispitivanog uzorka (Ig_{invl}),

$$D1nIg = \frac{\left[\frac{M1-M2}{M1}\right]p}{\left[\frac{M1-M2}{M1}\right]c} x\ \left(\frac{TPp}{TPc}\right) x\ Iginvl \quad \text{(g/L).}$$

3.7. Statistička obrada

Za sve kvantitativne varijable ispitana je normalnost razdiobe Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Varijable koje odstupaju od normalne razdiobe prikazane su medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR), dok je varijabla (IgM) koja slijedi normalnu raspodjelu prikazana aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Kategoričke su varijable prikazane cijelim brojem i postotkom ako je broj uzoraka u skupini veći od 100 (N (%)) ili udjelom ako je broj uzoraka u skupini manji od 100 (N/udio) (62). Podatci su kategorizirani u dvije skupine s obzirom na prisutnost pozadine, pri čemu su u kategoriju s prisutnom pozadinom svrstani gama migrirajući M-proteini s poliklonskom gama globulinskom pozadinom i svi beta migrirajući M-proteini. Spearmanov koeficijent korelacije (R_s) korišten je za procjenu povezanosti rezultata računskih modela i standardnih načina kvantifikacije M-proteina. Jačina povezanosti interpretirana je kako je navedeno u Tablici 5. (63). Usporedivost rezultata prikazana je Bland-Altmanovom statistikom i Passing-Bablokovom regresijom gdje su vrijednosti nagiba i odsječka na osi y prikazane s 95-postotnim intervalom pouzdanosti (95 % CI). Rezultati Passing-Bablokove regresije interpretirani su na način da ukoliko 95 % CI za odsječak na osi y uključuje vrijednost 0 zaključuje se da ne postoji značajna razlika između vrijednosti odsječka na osi y i nule te ujedno da ne postoji sustavna razlika u rezultatima dviju metoda. Nadalje, ako 95 % CI za nagib pravca uključuje vrijednost 1 zaključuje se da ne postoji značajna razlika između vrijednosti nagiba i 1 te da ne postoji propocionalna razlika u rezultatima dviju metoda. Regresijska analiza čiji rezultati obuhvaćaju oba opisana slučaja

pretpostavlja da je x=y te je tada opravdano zaključiti da se ispitivane metode mogu koristiti naizmjenično (64).

Podatci su obrađeni na način da je denzitometrijska PD metoda smatrana referentnom metodom. Vrijednosti $P < 0,05$ smatrane su statistički značajnima. Za procjenu analitičkih karakteristika računskog modela teorijska koncentracija M-proteina u pripremljenim uzorcima dobivena je stehiometrijskim izračunom. Odstupanja veća od 100 % prikazana su kao > 100 %. Za procjenu linearnosti korištena je linearna regresija, a za kriterij $r \geq 0,980$.

Tablica 5. Interpretacija koeficijenta korelacije

Interpretacija	r
Nema povezanosti	0 – 0,25
Slaba povezanost	0,26 – 0,50
Umjerena do dobra povezanost	0,51 – 0,75
Vrlo dobra do izvrsna povezanost	0,76 – 1,00

3.8. Računalna podrška

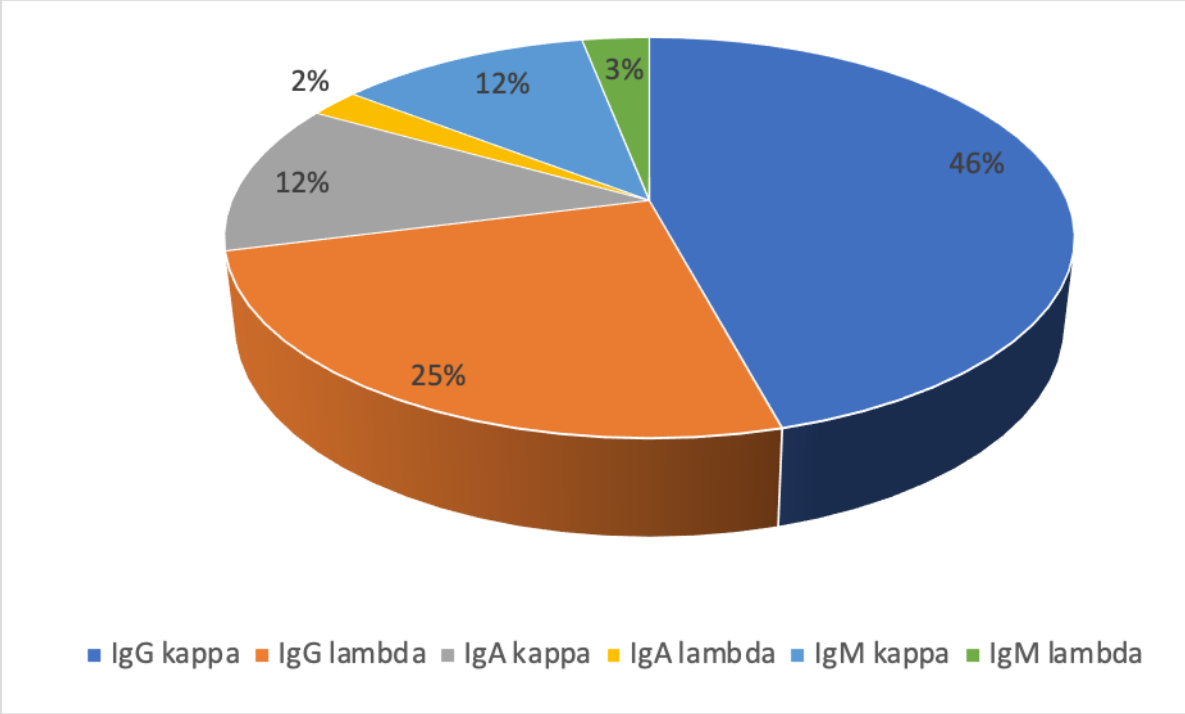
Elferogrami su analizirani programom Sebia (verzija 9.4, Sebia, Lysses, Francuska). Ista je programska podrška korištena za kvantifikaciju M-proteina denzitometrijskom metodom, PD i TS pristupom (pogledati pod 3.6.5.1. i 3.6.5.2). Za izračun vrijednosti računskih modela korišten je Microsoft Excel, računalni programski alat, Microsoft Corporation, Redmond, Washington DC, SAD.

Za statističku obradu podataka korišten je računalni programski alat MedCalc verzije 20.023 (Ostend, Belgija).

4. REZULTATI

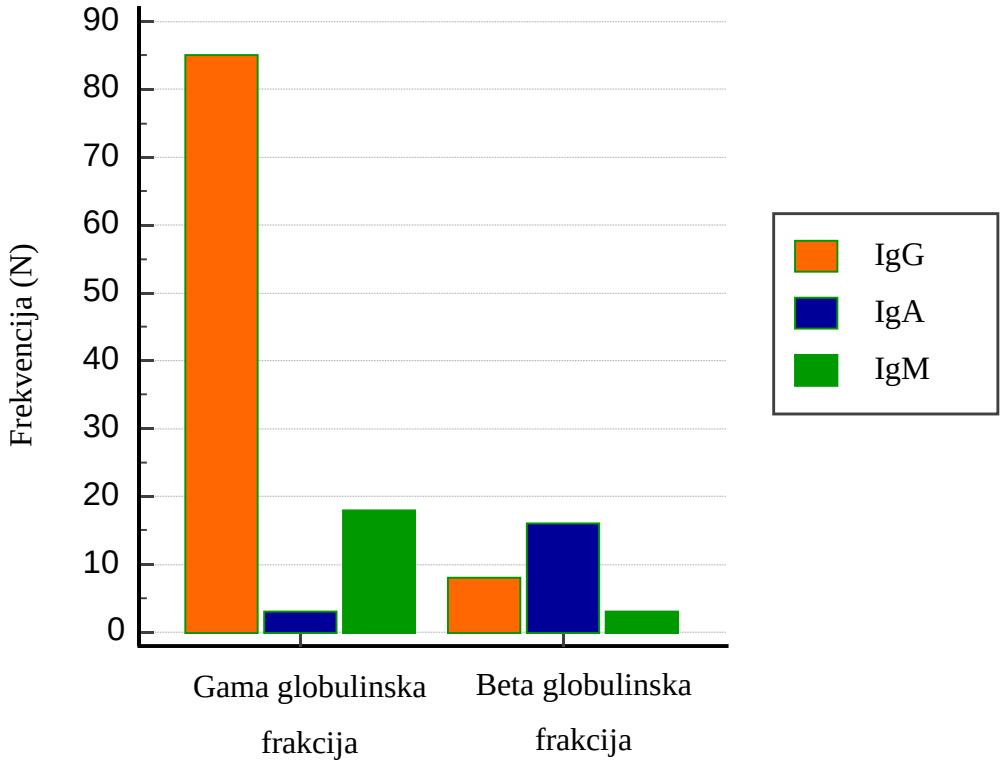
4.1. Razdioba M-proteina prema razredu i tipu te migracijskom položaju u EPG-u

U 133 uzorka seruma potvrđena je prisutnost M-proteina. Monoklonski IgG dokazan je u 71 % uzoraka obuhvaćenih istraživanjem, monoklonski IgA u 14 % te monoklonski IgM u 15 % uzoraka. 30 % M-proteina bilo je λ tipa.



Slika 10. Razdioba M-proteina na temelju razreda teškog lanca i tipa lakog lanca

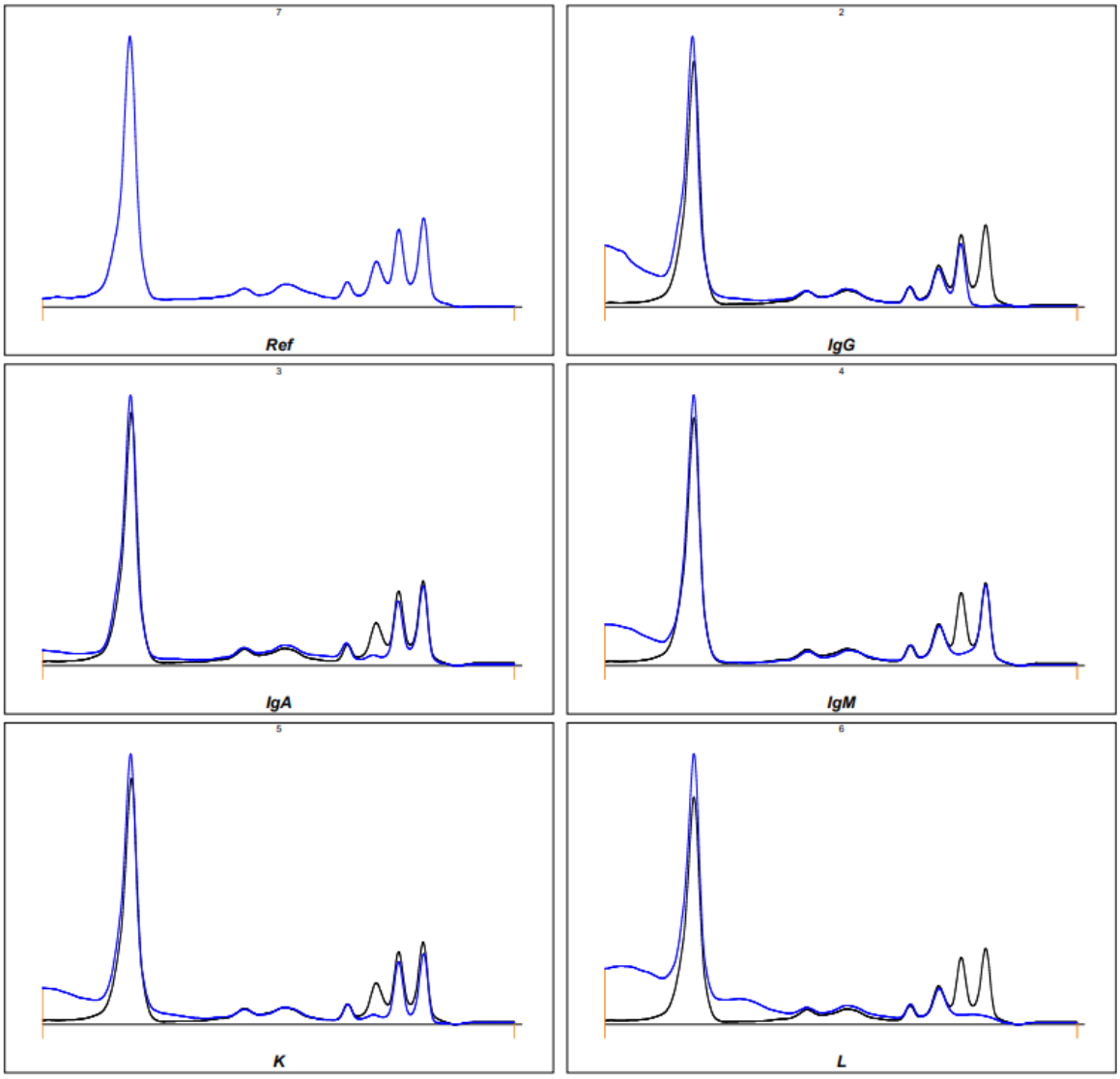
Najučestaliji migracijski položaj M-proteina je gama globulinska frakcija, premda M-proteini sva tri razreda migriraju i u beta i u gama globulinsko područje. Najveći dio M-proteina koji su migrirali u gama području činili su M-proteini razreda IgG, dok je među M-proteinima koji su migrirali u beta području bilo najviše M-proteina razreda IgA.



Slika 11. Razdioba M-proteina prema razredu i migracijskom položaju u EPG-u

4.2. Rezultati analize komercijalnoga kontrolnoga uzorka

Analiziran je komercijalni kontrolni uzorak IF/IT Control (Sebia, Lysses, France) u kojem je imunofiksacijom potvrđena prisutnost M-proteina razreda IgG tipa λ, razreda IgA tipa κ i razreda IgM tipa λ bez prisutnosti poliklonske pozadine. Deklarirana koncentracija ukupnih proteina u uzorku je bila 42 g/L dok je imunoturbidimetrijski određena koncentracija IgG iznosila 7,28 g/L, IgA 2,90, a IgM 6,10 g/L. Denzitometrijskom PD metodom određena je koncentracija IgG od 7,40 g/L, IgA 2,70 g/L i IgM 6,28 g/L.



Slika 12. Prikaz imunosuptrakcijskih elferograma komercijalnoga kontrolnog uzorka IF/IT Control (Sebia, Lysses, France)

4.3. Rezultati procjene preciznosti elektroforeze serumskih proteina

U preliminarnoj fazi istraživanja procjenjena je preciznost elektroforeze serumskih proteina metodom KE-e. Analizirana su dva komercijalna kontrolna uzorka Normal Control (Sebia, Lysses, Francuska) i Hypergamma Control (Sebia, Lysses, Francuska) (pogledati pod 3.2.4) u peteroplikatu tijekom 5 dana.

Tablica 6. Preciznost elektroforeze serumskih proteina metodom kapilarne elektroforeze procjenjena analizom komercijalnih kontrolnih uzoraka Normal Control (Sebia, Lysses, Francuska) i Hypergamma Control (Sebia, Lysses, Francuska)

		Albumin	Alfa-1 globulini	Alfa-2 globulini	Beta globulini	Gama globulini
Normal Control	KV u seriji (%)	0,6	3,1	2,0	1,2	1,0
	KV iz dana u dan (%)	0,1	1,3	0,3	0,3	0,5
Hypergamma Control	KV u seriji (%)	0,6	2,5	3,3	1,7	0,4
	KV iz dana u dan (%)	0,3	1,6	1,4	0,8	0,3

KV – koeficijent varijacije

Rezultati procjene preciznosti elektroforeze serumskih proteina uspoređeni su s analitičkim ciljevima temeljenim na podatcima o biološkoj varijaciji (pogledati pod 3.5.) te je utvrđena prihvatljiva preciznost svih pet elektroforeznih frakcija. Neovisno o razini kontrolnoga materijala najveća preciznost ostvarena je u albuminskoj i gama globulinskoj frakciji. Nepreciznost u navedenim frakcijama je $\leq 1,0$ %.

4.4. Rezultati procjene preciznosti određivanja koncentracije pojedinih razreda IgG, IgA i IgM

U preliminarnoj fazi istraživanja provedena je procjena preciznosti imunoturbidimetrijske metode za određivanje pojedinih razreda imunoglobulina G, A i M. Analizirane su dvije razine komercijalna kontrolnoga uzorka PreciControl ClinChem Multi 1 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska) i PreciControl ClinChem Multi 2 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska) u peteroplikatu tijekom 5 dana.

Tablica 7. Preciznost određivanja koncentracije pojedinih razreda imunoglobulina G, A, M imunoturbidimetrijskom metodom procjenjena analizom komercijalnih kontrolnih uzoraka PreciControl ClinChem Multi 1 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska) i PreciControl ClinChem Multi 2 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švicarska)

		IgG	IgA	IgM
PreciControl ClinChem Multi 1	KV u seriji (%)	0,5	0,6	0,9
	KV iz dana u dan (%)	0,7	0,9	0,4
PreciControl ClinChem Multi 2	KV u seriji (%)	0,9	0,7	0,6
	KV iz dana u dan (%)	1,1	1,0	1,3

KV – koeficijent varijacije

Rezultati procjene preciznosti određivanja koncentracije pojedinih razreda IgG, IgA i IgM uspoređeni su s analitičkim ciljevima temeljenim na podatcima o biološkoj varijaciji (pogledati pod 3.5.) te je utvrđena izvrsna preciznost određivanja s najvišim KV-om od 1,3 %.

4.5. Opisne karakteristike M-proteina obuhvaćenih istraživanjem

U sva 133 uzorka seruma bolesnika s monoklonskom gamapatijom analizom EPG-a određena je migracijska frakcija pojedinoga M-proteina. Denzitometrijskim pristupom (PD i TS metodom) omeđena je površina ispod vrška pripisanoga M-proteinu, koja je iskazana relativnim udjelom površine u ukupnoj površini EPG-a uz koncentraciju ukupnih proteina dovedena u vezu s koncentracijom M-proteina. Koncentracije istraženih M-proteina kategorizirane su na temelju razreda M-proteina, migracijskoga položaja M-proteina u EPG-u te prisutnosti pozadine kako je prikazano u Tablici 8.

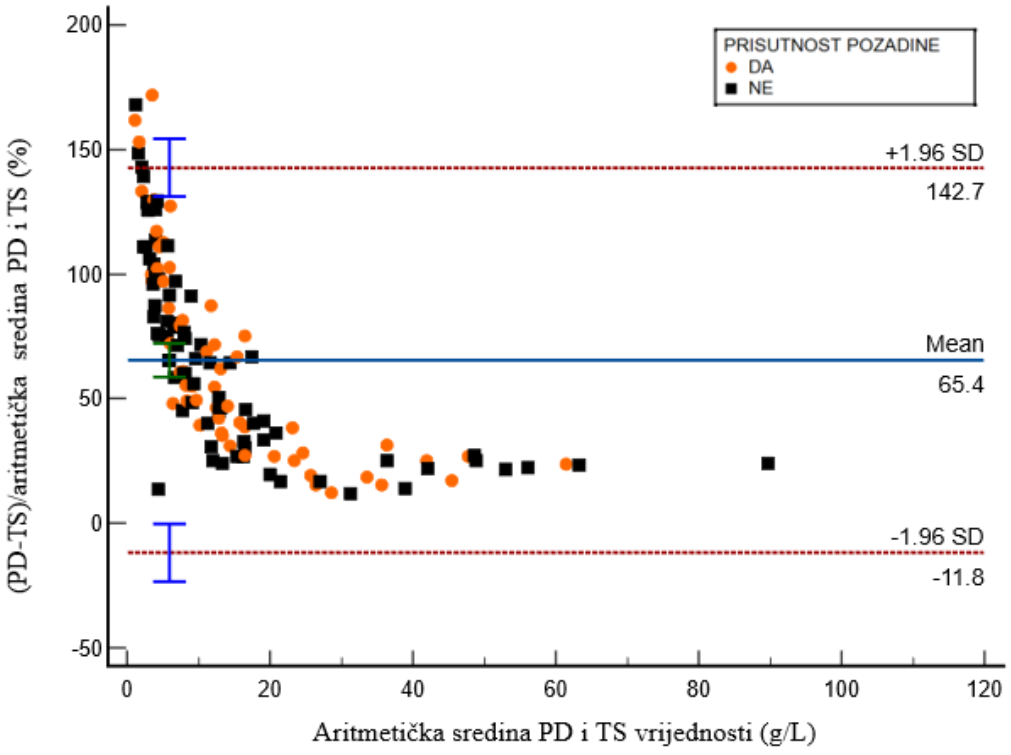
Tablica 8. Opisni prikaz karakteristika M-proteina obuhvaćenih istraživanjem (65)

N=133	n	Median	IQR	Min	Max	P
Ukupni proteini (g/L)	133	76	71-83	53	172	<0,001
IgG_{invl} (g/L)	93	19,05	14,07-30,98	7,99	103,00	<0,001
IgA_{invl} (g/L)	19	13,00	7,30-16,72	3,44	59,20	0,002
IgM_{invl} (g/L)	21	13,15*	8,01*	3,79	34,75	>0,10
PD (g/L)	133	12,15	7,25-20,95	1,90	100,60	<0,001
TS (g/L)	133	6,60	2,58-14,13	0,20	78,90	<0,001
Gama migrirajući M-protein (g/L)	106	17,13	12,23-28,51	3,44	103,00	<0,001
Beta migrirajući M-protein (g/L)	27	16,37	8,38-22,25	4,81	59,20	0,004
M-protein s prisutnom pozadinom (g/L)	57	7,00	5,10-10,15	1,90	20,60	0,040
M-protein u odsutnosti pozadine (g/L)	76	19,00	13,10-29,85	5,20	100,60	<0,001

Ig_{invl} – razred imunoglobulina uključen u sintezu M-proteina čija koncentracija je određena imunokemijskom metodom, PD – denzitometrijska metoda ortogonalne projekcije na aspcisu EPG-a , TS – denzitometrijska metoda linearnoga otklona u točkama tangencije. *Podatci za IgM_{invl} prikazani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom

4.6. Usporedba rezultata denzitometrijskih metoda

Koncentracije M-proteina denzitometrijskim pristupom u uzorcima seruma bolesnika s monoklonskom gamapatijom određene su koristeći metodu ortogonalne projekcije na apscisu EPG-a (PD) i metodu linearnog otklona u točkama tangencije (TS). Razlike u rezultatima PD i TS denzitometrijske metode u odnosu na aritmetičku sredinu vrijednosti obiju metoda kategorizirane su s obzirom na prisutnost pozadine i prikazane Bland-Altmanovim grafičkim prikazom (Slika 13.). Nadalje, ispitan je i opisan odnos između rezultata denzitometrijskih metoda u ovisnosti o prisutnosti pozadine, migracijskom položaju i razredu M-proteina dok je usporedivost pojedinih koncentracija M-proteina između denzitometrijskih metoda u ovisnosti o prisutnoj pozadini prikazana Passing-Bablokovom regresijskom analizom.



Slika 13. Prikaz razlika u koncentracijama M-proteina određenih metodom ortogonalne projekcije na apscisu elferograma (PD) i metodom linearnoga otklona u točkama tangencije (TS) u odnosu na aritmetičku sredinu koncentracija obiju metoda (65)

Usporedbom rezultata denzitometrijskih metoda utvrđeno je pozitivno odstupanje u vrijednostima dobivenima PD metodom u odnosu na aritmetičku sredinu obiju denzitometrijskih metoda sa srednjom razlikom od 65,4 (58,7 – 72,2) %; $P < 0,001$ što upućuje

na više koncentracije M-proteina primjenom denzitometrijske PD metode. Nadalje, više vrijednosti nađene su u objema skupinama, neovisno o prisutnosti pozadine. U skupini s prisutnom pozadinom utvrđena je srednja razlika od 99,5 (90,9 – 108,1)%; P < 0,001 dok je u skupini bez detektirane pozadine M-proteina utvrđena srednja razlika od 39,9 (35,3 – 44,6) %; P < 0,001. Navedeno upućuje na veće razlike u koncentracijama M-proteina u skupini s prisutnom pozadinom dok su manje razlike u koncentraciji M-proteina između denzitometrijske PD i TS metode nađene u skupini u kojoj nije bila prisutna pozadina.

Rezultati korelacijskih analiza prikazani u Tablici 9. upućuju na izvrsnu jačinu povezanosti rezultata obiju denzitometrijskih metoda neovisno o prisutnosti pozadine i migracijskom položaju M-proteina. Nadalje, rezultati pokazuju i da je odstupanje u koncentraciji M-proteina između denzitometrijskih metoda manje kada je M-protein razreda IgG, nego razreda IgA i IgM (Tablica 10.), kao i da su manja odstupanja u koncentraciji M-proteina prikazanom u gama globulinskom području naspram prikazanog u beta globulinskom području (Tablica 11.).

Tablica 9. Korelacijska analiza rezultata denzitometrijskih metoda u ovisnosti o prisutnosti pozadine i migracijskom položaju M-proteina

PD			
		R_s	P vrijednost
TS	PRISUTNOST POZADINE		
	DA	0,906	< 0,001
	NE	0,981	< 0,001
	MIGRACIJSKI POLOŽAJ		
	BETA	0,979	< 0,001
	GAMA	0,974	< 0,001

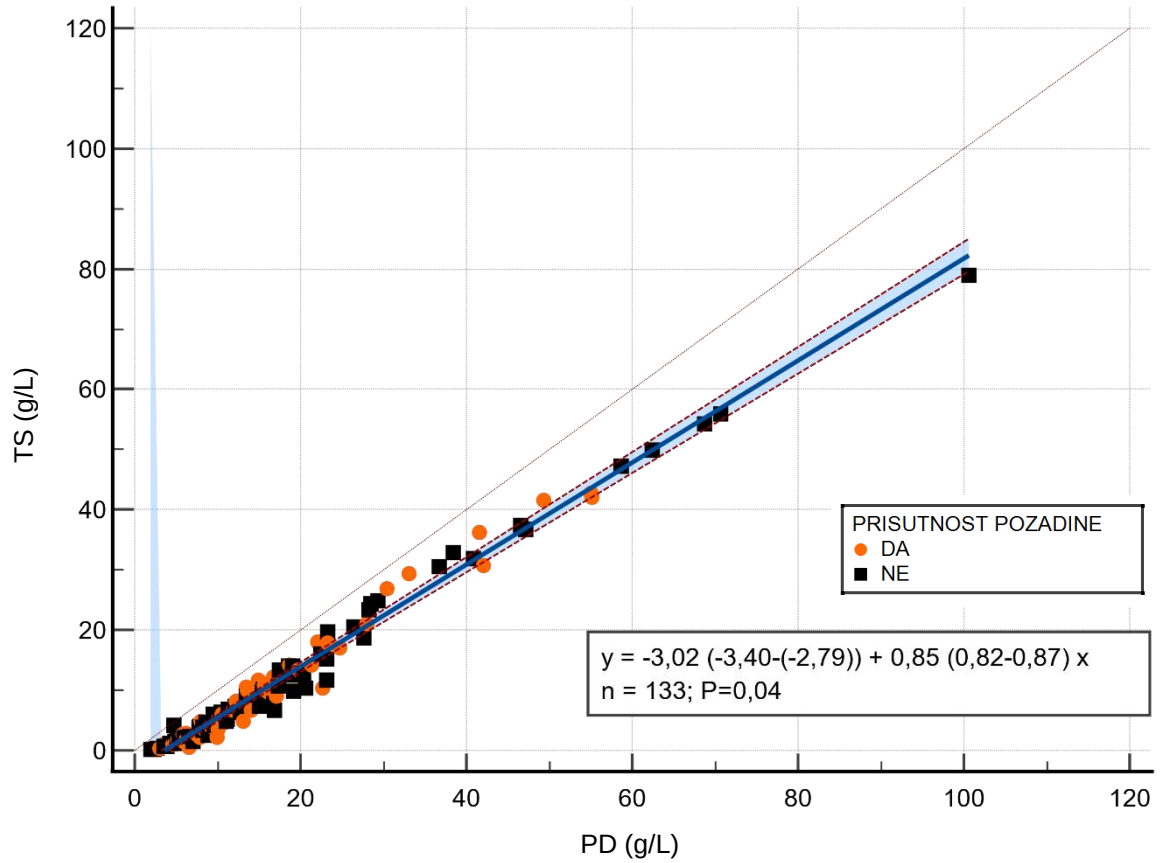
PD – denzitometrijska metoda ortogonalne projekcije na aspcisu EPG-a, TS – denzitometrijska metoda linearnoga otklona u točkama tangencije, R_s – Spearmanov koeficijent korelacije

Tablica 10. Prikaz razlika koncentracija M-proteina određenih metodom ortogonalne projekcije na aspcisu EPG-a (PD) i metodom linearnoga otklona u točkama tangencije (TS) u ovisnosti o razredu M-proteina

Razred M-proteina	Prosječno odstupanje (%) 95% CI	P vrijednost
IgG	57,59 (49,66 – 65,62)	<0 ,001
IgA	85, 42 (65,87 – 104,97)	< 0,001
IgM	81,88 (68,10 – 95,78)	< 0,001

Tablica 11. Prikaz razlika koncentracija M-proteina određenih metodom ortogonalne projekcije na aspcisu EPG-a (PD) i metodom linearnoga otklona u točkama tangencije (TS) u ovisnosti o migracijskom položaju M-proteina

Migracijski položaj M-proteina	Prosječno odstupanje (%) 95 % CI	P vrijednost
Gama globulinska frakcija	63,86 (56,04 – 71,68)	< 0,001
Beta globulinska frakcija	71,67 (58,07 – 85,26)	< 0,001

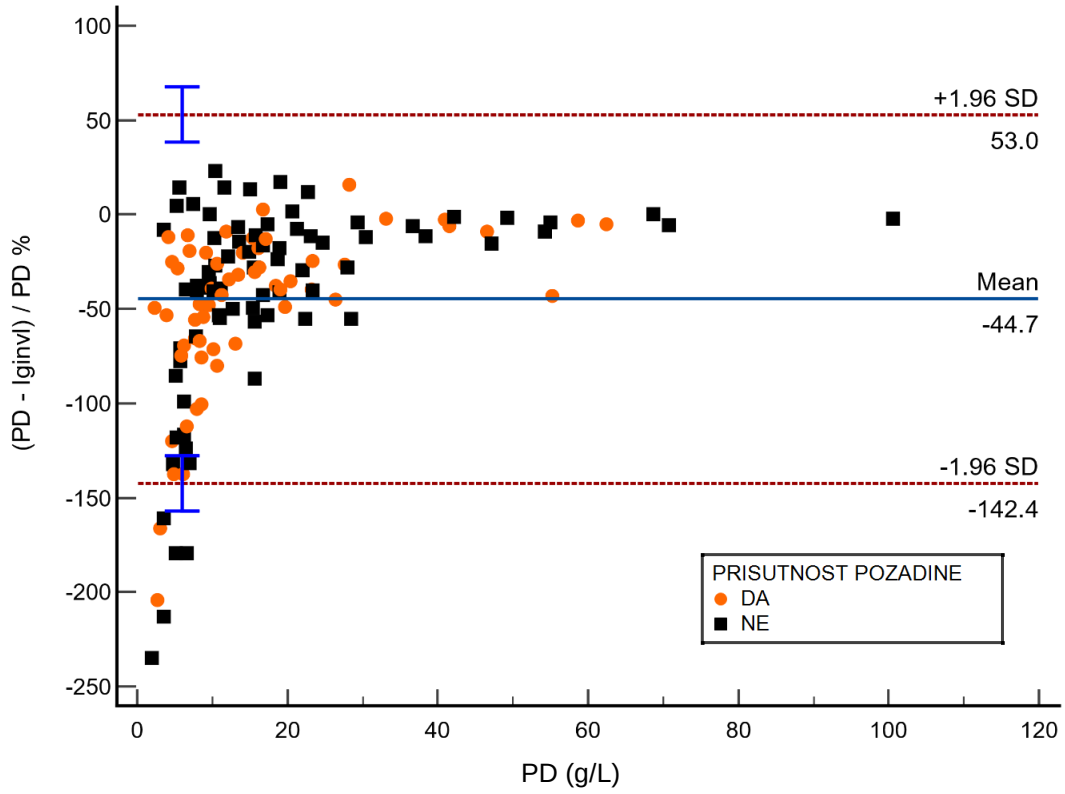


Slika 14. Passing-Bablokova regresijska analiza rezultata denzitometrijskih metoda, metode ortogonalne projekcije na apscisu elferograma (PD) i metode linearnoga otklona u točkama tangencije (TS) (65)

Između rezultata PD i TS metode postoji izvrsna korelacija vrijednosti (R_s = 0,978; P < 0,001), no vrijednosti nagiba pravca i odsječka na osi y Passing-Bablokove regresijske analize upućuju na postojanje proporcionalne i sustavne razlike u vrijednostima među ispitivanim metodama (pogledati pod 3.7.), što onemogućava naizmjeničnu primjenu PD i TS metode za kvantifikaciju M-proteina.

4.7. Usporedba rezultata imunokemijske s denzitometrijskom PD metodom

U sva 133 uzorka seruma bolesnika s monoklonskom gamapatijom imunokemijskom je metodom određena koncentracija razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina (Ig_{invl}). Tako dobiveni rezultati imunokemijske metode kategorizirani su s obzirom na prisutnost pozadine te su razlike u rezultatima u odnosu na rezultate PD metode prikazane Bland-Altmanovim grafičkim prikazom (Slika 15.). Nadalje, ispitan je i opisan odnos između rezultata imunokemijske i PD denzitometrijske metode u ovisnosti o prisutnosti pozadine, migracijskom položaju i razredu M-proteina dok je usporedivost pojedinih koncentracija M-proteina između obiju metoda u ovisnosti o prisutnoj pozadini prikazana Passing-Bablokovom regresijskom analizom.



Slika 15. Prikaz razlika koncentracija M-proteina određenih denzitometrijskom (PD) i imunokemijskom metodom (Ig_{invl})

Usporedbom koncentracija M-proteina imunokemijskom i denzitometrijskom metodom utvrđeno je negativno odstupanje u koncentracijama određenim denzitometrijskom metodom u odnosu na imunokemijsku metodu sa srednjom razlikom od -44,69 (-53,25 do -36,15) %; P < 0,001, što upućuje na niže koncentracije M-proteina primjenom PD metode naspram imunokemijske. Nadalje, niže denzitometrijske vrijednosti nađene su u objema skupinama, neovisno o prisutnosti pozadine. U skupini s prisutnom pozadinom utvrđena je srednja razlika od -73,00 (-89,12 do -56,89) %; P < 0,001, a u skupini bez prisutne pozadine M-proteina -23,46 (-28,85 do -18,09) %; P < 0,001. Navedeno upućujeje na veće razlike u koncentracijama M-proteina u skupini s prisutnom pozadinom dok su manje razlike u koncentraciji M-proteina nađene u skupini u kojoj nije bila prisutna pozadina.

Rezultati korelacijskih analiza prikazani u Tablici 12. upućuju na to da je jačina povezanosti između rezultata imunokemijske i denzitometrijske PD analize slabija u M-proteina s detektiranom prisutnom pozadinom. Migracijski položaj nije značajnije utjecao na izvrsnu jačinu povezanosti rezultata obiju denzitometrijskih metoda. Nadalje, rezultati (Tablica 13.) upućuju i na to da je odstupanje u koncentraciji M-proteina između imunokemijske i denzitometrijske PD metode manje kada je M-protein razreda IgA i IgM, nego razreda IgG, kao i da su manja odstupanja u koncentraciji M-proteina prikazanom u beta globulinskom području naspram u gama globulinskom području (Tablica 14.).

Tablica 12. Korelacijska analiza rezultata denzitometrijske i imunokemijske metode u ovisnosti o prisutnosti pozadine i migracijskom položaju M-proteina

PD			
		R_s	P vrijednost
Ig_{invl}	PRISUTNOST POZADINE		
	DA	0,754	< 0,001
	NE	0,958	< 0,001
	MIGRACIJSKI POLOŽAJ		
	BETA	0,937	< 0,001
	GAMA	0,903	< 0,001

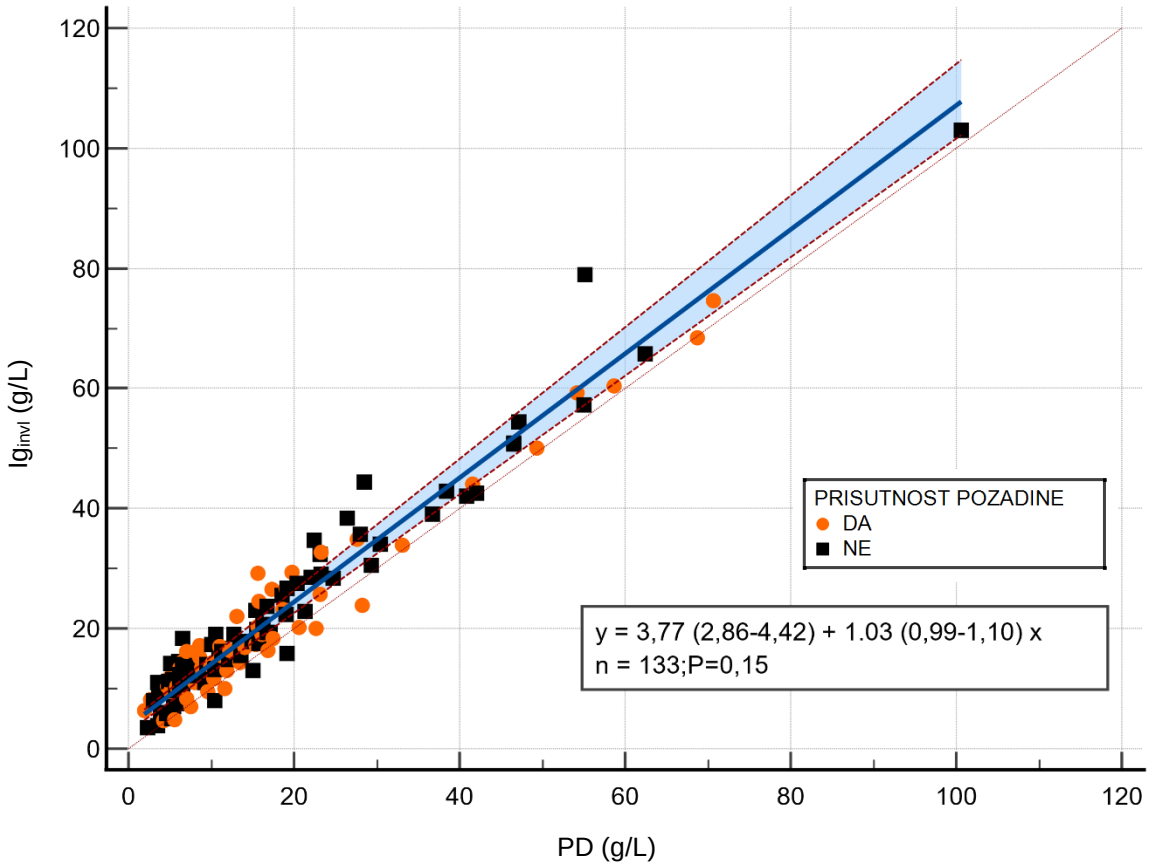
PD – denzitometrijska metoda ortogonalne projekcije na aspcisu EPG-a, Ig_{invl} – razred imunoglobulina uključen u sintezu M-proteina čija je koncentracija određena imunokemijskom metodom, R_s – Spearmanov koeficijent korelacije

Tablica 13. Prikaz razlika koncentracija M-proteina određenih denzitometrijskom PD metodom i imunokemijskom metodom u ovisnosti o razredu M-proteina

Razred M-proteina	Prosječno odstupanje (%) 95 % CI	P vrijednost
IgG	-51,88 (-62,49 do -41,26)	< 0,001
IgA	-27,46 (-54,15 do -0,76)	0,044
IgM	-28,49 (-39,89 do -17,09)	< 0,001

Tablica 14. Prikaz razlika koncentracija M-proteina određenih denzitometrijskom PD metodom i imunokemijskom metodom u ovisnosti o migracijskom položaju M-proteina

Migracijski položaj M-proteina	Prosječno odstupanje (%) 95 % CI	P vrijednost
Gama globulinska frakcija	-50,44 (-59,82 do -41,05)	< 0,001
Beta globulinska frakcija	-22,15 (-41,40 do -2,90)	0,026

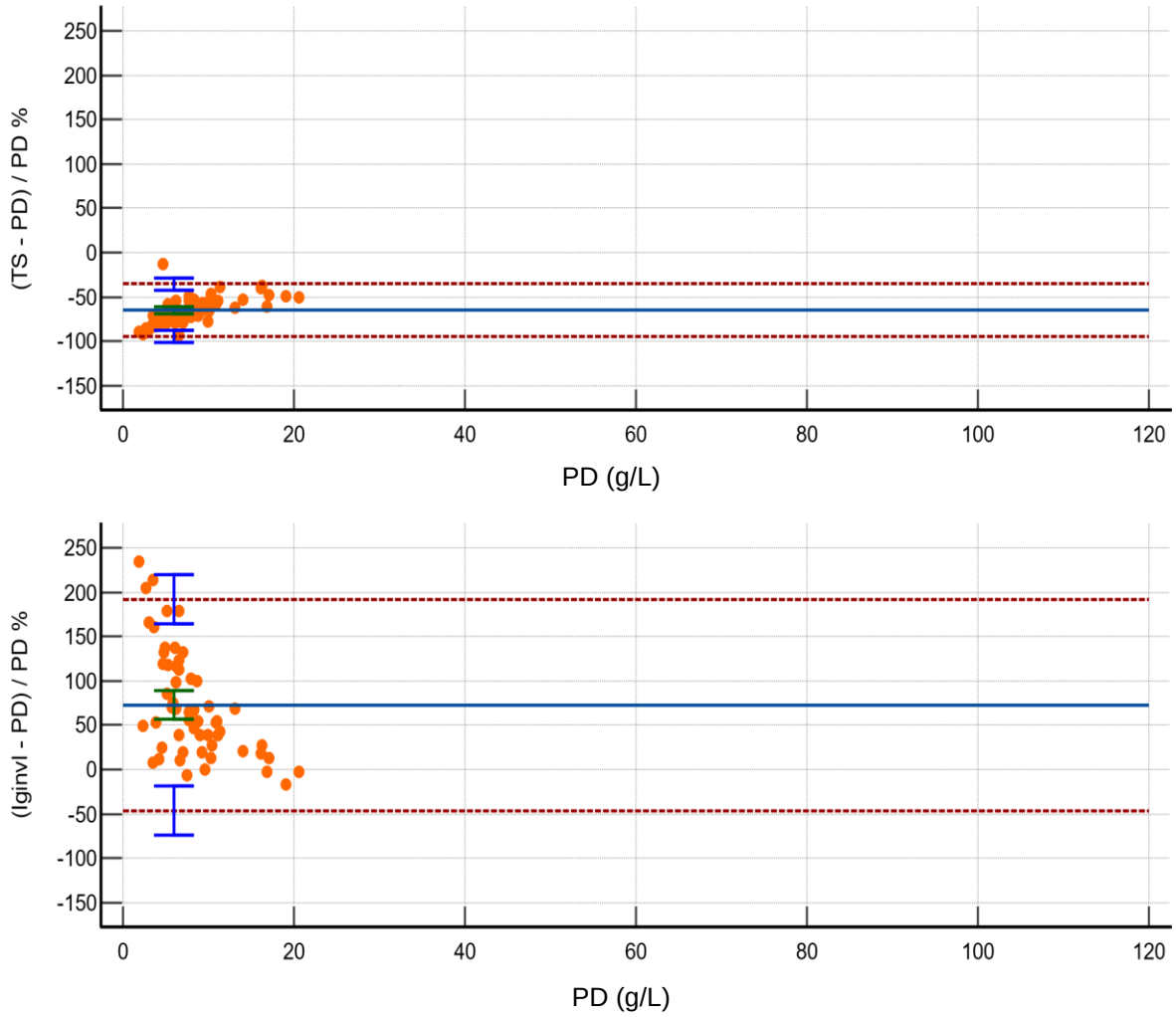


Slika 16. Passing-Bablokova regresijska analiza rezultata denzitometrijske (PD) i imunokemijske (Ig_{invl}) metode određivanja koncentracije M-proteina

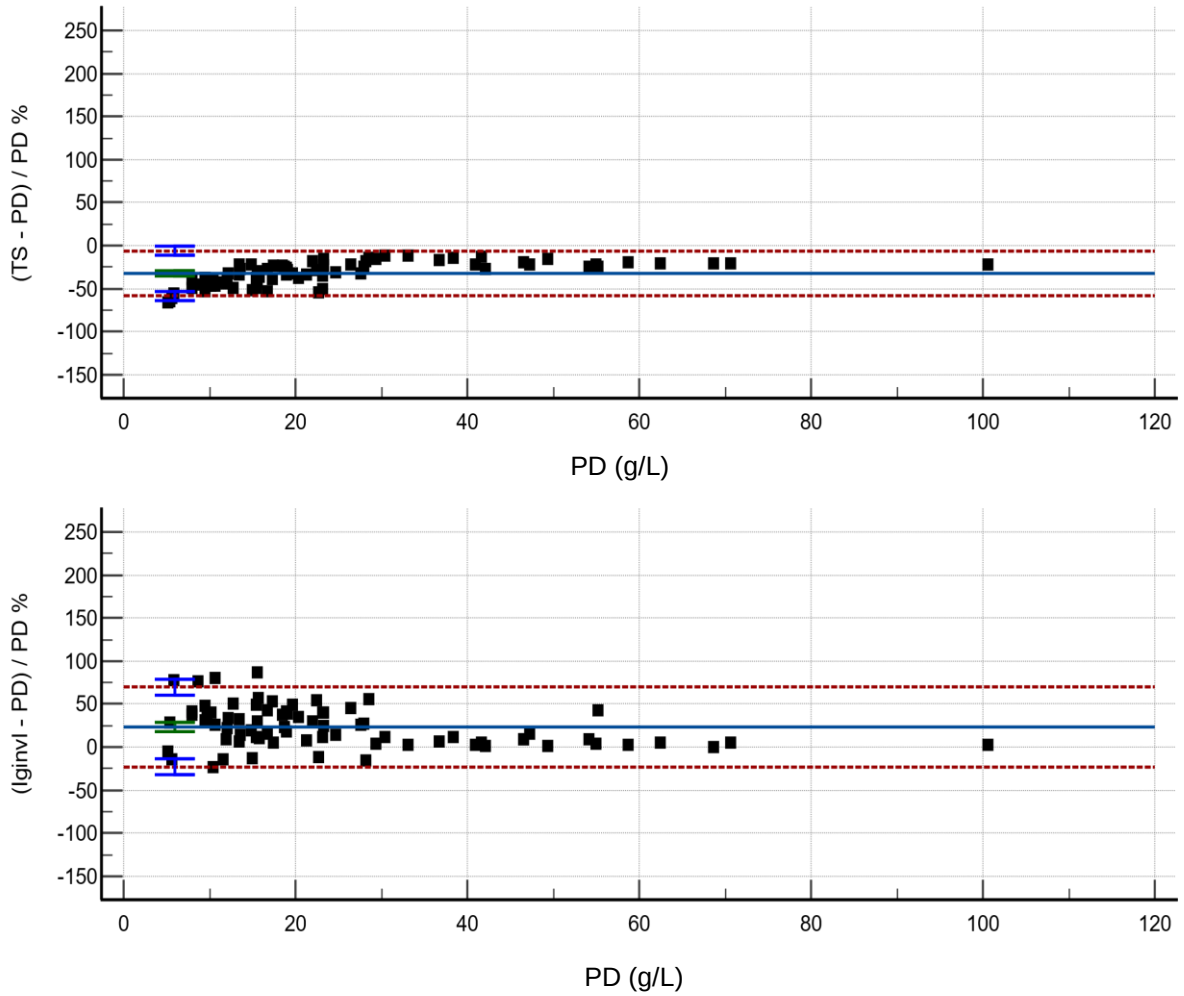
Između PD i Ig_{invl} metode određivanja koncentracije M-proteina utvrđena je izvrsna korelacija vrijednosti (R_s = 0,929; P < 0,001), no vrijednosti nagiba pravca i odsječka na osi y Passing-Bablokove regresijske analize upućuju na postojanje sustavne razlike u rezultatima, dok proporcionalna razlika nije utvrđena (pogledati pod 3.7). Navedeno onemogućava naizmjeničnu primjenu denzitometrijske PD i imunokemijske metode za kvantifikaciju M-proteina.

4.8. Prikaz odstupanja rezultata denzitometrijske TS i imunokemijske metode od rezultata denzitometrijske PD metode u ovisnosti o prisutnosti pozadine

U skupinama rezultata kategoriziranima na temelju prisutnosti pozadine M-proteina razlika u rezultatima koncentracija M-proteina denzitometrijske TS metode i imunokemijske s denzitometrijskom PD metodom prikazana je koristeći Bland-Altmanovu statistiku.



Slika 17. Prikaz razlika koncentracija M-proteina denzitometrijskom metodom linearnoga otklona u točkama tangencije (TS) i imunokemijskim određivanjem koncentracije razreda imunoglobulina uključenog u sintezu M-proteina (Ig_{invl}) s denziometrijskom metodom ortogonalne projekcije na apscisu EPG-a (PD) u skupini s prisutnom pozadinom M-proteina.



Slika 18. Prikaz razlika koncentracija M-proteina denzitometrijskom metodom linearnoga otklona u točkama tangencije (TS) i imunokemijskim određivanjem koncentracije razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina (Ig_{invl}) s denzitometrijskom metodom ortogonalne projekcije na apscisu EPG-a (PD) u skupini bez prisutne pozadine M-proteina.

Prikazani rezultati upućuju da su koncentracije M-proteina primjenom denzitometrijske TS metode niže i u skupini s prisutnom pozadinom i u skupini bez prisutne pozadine. Jasno se može uočiti veće rasipanje razlika rezultata primjenom imunokemijske metode u skupini s prisutnom pozadinom, kao i manje rasipanje razlika u koncentraciji i imunokemijske i denzitometrijske TS metode u skupini bez prisutne pozadine nego u skupini s prisutnom pozadinom.

4.9. Povezanost rezultata računskih modela s rezultatima denzitometrijske PD i imunokemijske metode

Za sva 133 uzorka bolesnika sa monoklonskom gamapatijom proveden je računski izračun 8 varijabli detaljno opisanih u poglavlju 3.6.6. Sve derivirane varijable su uključile podatke iz IS-EPG-a, a pojedine (3.6.6.) i koncentraciju ukupnih proteina, koncentraciju razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina te koncentraciju globulina. Jačina povezanosti vrijednosti računskih varijabli s koncentracijom M-proteina određenom imunokemijskom metodom (Ig_{invl}) ispitana je korelacijskom analizom čiji rezultati su prikazani u Tablici 15.

Tablica 15. Korelacijska analiza rezultata računskih modela s rezultatima denzitometrijske PD i imunokemijske metode (Ig_{invl})

	PD		Ig_{invl}	
	Rs	P vrijednost	Rs	P vrijednost
AD	0,882	< 0,001	0,839	< 0,001
ADn	0,743	< 0,001	0,607	< 0,001
AD1nIg	0,930	< 0,001	0,881	< 0,001
AD2nIg	0,927	< 0,001	0,695	< 0,001
ADnG	0,828	< 0,001	0,723	< 0,001
D1Ig	0,902	< 0,001	0,979	< 0,001
D2Ig	0,808	< 0,001	0,969	< 0,001
D1nIg	0,929	< 0,001	0,970	< 0,001

AD – razlika amplituda; ADn – razlika amplituda u odnosu na razliku amplituda u umjernom materijalu, AD1nIg – uz ADn uključuje podatke o ukupnim proteinima i Ig_{invl} u serumskom i umjernom materijalu, AD2nIg – uz AD1nIg uključuje podatke o albuminskoj frakciji, ADnG – uz ADn uključuje podatak o koncentraciji globulina, D1Ig – delta amplitude povezana s Ig_{invl}, D2Ig – uz D1Ig uključuje podatke o albuminskoj frakciji, D1nIg – uz deltu amplitude uključuje podatke o ukupnim proteinima i Ig_{invl} u serumskom i umjernom materijalu, PD – denzitometrijska metoda ortogonalne projekcije na aspcisu EPG-a, Ig_{invl} – razred imunoglobulina uključen u sintezu M-proteina čija je koncentracija određena imunokemijskom metodom, R_s – Spearmanov koeficijent korelacije

Između koncentracije M-proteina određene denzitometrijskom PD i imunokemijskom (Ig_{invl}) metodom te vrijednosti AD varijable koja predstavlja razliku amplituda krivulja u IS-EPG-u na mjestu vrška M-proteina postoji vrlo dobra povezanost. Uključivanje podataka iz umjernoga materijala u ADn varijabli nije rezultiralo jačom povezanošću s rezultatima uspoređivanih metoda. Vrijednosti dobivene računskim modelima, AD1nIg i AD2nIg, koji su uz podatke iz umjernoga materijala uključili koncentraciju ukupnih proteina i Ig_{invl} jače su povezane s denzitometrijski određenim koncentracijama nego s imunokemijski određenim koncentracijama. Vrijednosti varijable koja je uključila podatak o koncentraciji globulina, ADnG, ostvarile su umjerenu do vrlo dobru povezanost s koncentracijom M-proteina, ali nisu ostvarile jaču povezanost u odnosu na ostale varijable niti s rezultatima denzitometrijske niti imunokemijske metode. Izvrsna povezanost rezultata računskih modela i s rezulatima denzitometrijske kao i imunokemijske metode utvrđena je u rezultatima varijabli koje su uključivale podatak o udjelu promjene amplitude vrška M-proteina u IS-EPG-u, D1Ig, D2Ig i D1nIg. Jača povezanost tih varijabli uočena je s imunokemijskom metodom. Optimalni rezultati korelacije i s denzitometrijskom PD i s imunokemijskom metodom utvrđeni su u rezultatima varijabli D1nIg i D1Ig. Uključivanje podataka albuminske frakcije u varijablama AD2nIg i D2nIg nije dalo doprinos jačini povezanosti rezultata niti s denzitometrijskom niti s imunokemijskom metodom.

4.10. Povezanost rezultata računskih modela s rezultatima denzitometrijske PD i imunokemijske metode u ovisnosti o prisutnosti pozadine M-proteina

Nakon što su svi rezultati kategorizirani u dvije skupine ovisno o prisutnosti pozadine M-proteina ispitivana je jačina povezanosti vrijednosti računskih varijabli s koncentracijom M-proteina određenom denzitometrijskom PD i imunokemijskom metodom (Ig_{invl}) te su rezultati korelacijskih analiza prikazani u Tablici 16.

Tablica 16. Korelacijska analiza rezultata računskih modela s rezultatima denzitometrijske PD i imunokemijske metode (Ig_{invl}) kategoriziranih prema kriteriju prisutnosti pozadine

		PD		Ig_{invl}	
	PRISUTNOST POZADINE	R_s	P vrijednost	R_s	P vrijednost
AD	DA	0,721	< 0,001	0,667	< 0,001
	NE	0,836	< 0,001	0,793	< 0,001
ADn	DA	0,625	< 0,001	0,317	0,017
	NE	0,679	< 0,001	0,568	< 0,001
AD1nIg	DA	0,856	<0,001	0,694	<0,001
	NE	0,957	<0,001	0,920	<0,001
AD2nIg	DA	0,634	<0,001	0,361	0,006
	NE	0,834	<0,001	0,737	<0,001
ADnG	DA	0,673	<0,001	0,444	0,001
	NE	0,851	<0,001	0,757	<0,001
D1Ig	DA	0,673	<0,001	0,951	<0,001
	NE	0,931	<0,001	0,983	<0,001
D2Ig	DA	0,599	<0,001	0,913	<0,001
	NE	0,931	<0,001	0,973	<0,001
D1nIg	DA	0,793	<0,001	0,934	<0,001
	NE	0,957	<0,001	0,983	<0,001

AD – razlika amplituda; ADn – razlika amplituda u odnosu na razliku amplituda u umjernom materijalu, AD1nIg – uz ADn uključuje podatke o ukupnim proteinima i Ig_{invl} u serumskom i umjernom materijalu, AD2nIg – uz AD1nIg uključuje podatke o albuminskoj frakciji, ADnG – uz ADn uključuje podatak o koncentraciji globulina, D1Ig – delta amplitude povezana s Ig_{invl}, D2Ig – uz D1Ig uključuje podatke o albuminskoj frakciji, D1nIg – uz deltu amplitude uključuje podatke o ukupnim proteinima i Ig_{invl} u serumskom i umjernom materijalu, Ig_{invl} – razred imunoglobulina uključen u sintezu M-proteina čija je koncentracija određena imunokemijskom metodom, R_s – Spearmanov koeficijent korelacije

Rezultati svih računskih modela bolje koreliraju s koncentracijom M-proteina određenom denzitometrijskom PD i imunokemijskom metodom u skupini koja nema prisutnu pozadinu M-proteina. Vrlo dobra do izvrsna povezanost rezultata računskih modela i s rezultatima denzitometrijske i imunokemijske metode u skupinama definiranim na temelju prisutnosti

pozadine M-proteina utvrđena je u varijablama AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg. Prema prikazanim skupinama, rezultati AD1nIg varijable bolje koreliraju s rezultatima denzitometrijske PD metode dok rezultati D1Ig, D2Ig i D1nIg varijabli ostvaruju jaču povezanost s rezultatima imunokemijske metode.

4.11. Povezanost rezultata računskih modela s rezultatima denzitometrijske PD i imunokemijske metode u ovisnosti o migracijskom položaju M-proteina

Svi su rezultati kategorizirani u dvije skupine ovisno o migracijskom položaju M-proteina te je ispitana jačina povezanosti rezultata računskih varijabli s koncentracijom M-proteina određenom denzitometrijskom PD i imunokemijskom metodom (Ig_{invl}). Rezultati korelacijskih analiza prikazani u Tablici 17.

Tablica 17. Korelacijske analize rezultata računskih modela s denzitometrijskom PD i imunokemijskom metodom (Ig_{invl}) kategoriziranih prema kriteriju migracijskoga položaja u EPG-u

		PD		Ig_{invl}	
	MIGRACIJSKI POLOŽAJ	R_s	P vrijednost	R_s	P vrijednost
AD	GAMA	0,872	< 0,001	0,825	<0 ,001
	BETA	0,862	< 0,001	0,933	< 0,001
ADn	GAMA	0,803	<0,001	0,716	<0,001
	BETA	0,501	0,011	0,422	0,036
AD1nIg	GAMA	0,942	<0,001	0,913	<0,001
	BETA	0,832	<0,001	0,812	<0,001
AD2nIg	GAMA	0,840	<0,001	0,767	<0,001
	BETA	0,642	<0,001	0,561	0,004
ADnG	GAMA	0,843	<0,001	0,772	0,001
	BETA	0,723	<0,001	0,635	<0,001
D1Ig	GAMA	0,910	<0,001	0,977	<0,001
	BETA	0,872	<0,001	0,925	<0,001
D2Ig	GAMA	0,894	<0,001	0,968	<0,001
	BETA	0,914	<0,001	0,981	<0,001
D1nIg	GAMA	0,929	<0,001	0,973	<0,001
	BETA	0,885	<0,001	0,925	<0,001

AD – razlika amplituda; ADn – razlika amplituda u odnosu na razliku amplituda u umjernom materijalu, AD1nIg - uz ADn uključuje podatke o ukupnim proteinima i Ig_{invl} u serumskom i umjernom materijalu, AD2nIg - uz AD1nIg uključuje podatke o albuminskoj frakciji, ADnG - uz ADn uključuje podatak o koncentraciji globulina, D1Ig - delta amplitude povezana s Ig_{invl}, D2Ig - uz D1Ig uključuje podatke o albuminskoj frakciji, D1nIg - uz deltu amplitude uključuje podatke o ukupnim proteinima i Ig_{invl} u serumskom i umjernom materijalu, Ig_{invl} – razred imunoglobulina uključen u sintezu M-proteina čija je koncentracija određena imunokemijskom metodom, R_s – Spearmanov koeficijent korelacije

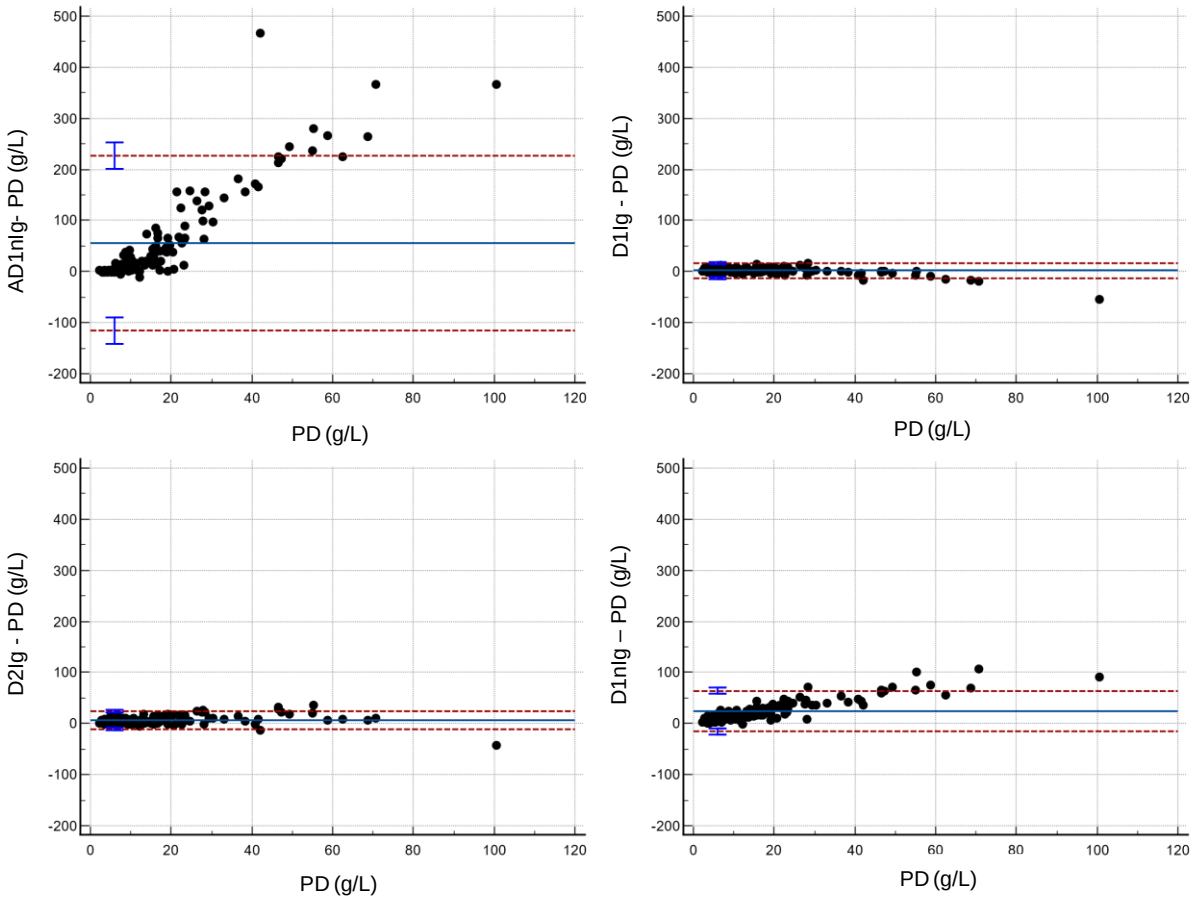
Rezultati računskih modela AD, ADn, AD1nIg, AD2nIg, ADnG, D1Ig i D1nIg jače su povezani s rezultatima denzitometrijske metode kada je M-protein smješten u gama globulinskoj frakciji dok su rezultati D2Ig varijable jače povezani s rezultatima denzitometrijske metode u skupini

beta migrirajućih M-proteina. Uspoređujući s imunokemijskom metodom, rezultati AD i D2Ig varijable ostvaruju bolju povezanost s rezultatima beta migrirajućih M-proteina. Vrlo dobra do izvrsna povezanost rezultata računskih modela s objema uspoređivanim metodama u skupinama definiranim prema kriteriju migracijskoga položaja ostvarena je u varijablama AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg. Derivirana varijabla AD1nIg ostvaruje jaču povezanost s denzitometrijskom metodom, dok varijable D1Ig, D2Ig i D1nIg ostvaruju jaču povezanost s imunokemijskom metodom. Koncentracije M-proteina dobivene računskim modelima D1Ig, D2Ig i D1nIg izvrsno koreliraju i s rezultatima denzitometrijske i s imunokemijske metode u obje skupine.

4.12. Prikaz razlika rezultata računskih modela u odnosu na denzitometrijsku PD metodu

Prethodna obrada rezultata računskih varijabli o povezanosti rezultata sa denzitometrijskom PD i imunokemijskom metodom (4.10., 4.11) upućuje na najaču povezanost rezultata varijabli AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg te su ostale derivirane varijable isključene iz daljnje procjene usporedivosti rezultata s uobičajenim načinima kvantifikacije M-proteina.

Bland-Altmanovom statistikom prikazana je razlika u rezultatima koncentracija M-proteina određena računskim varijablama AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg u odnosu na rezultate denzitometrijske PD metode.



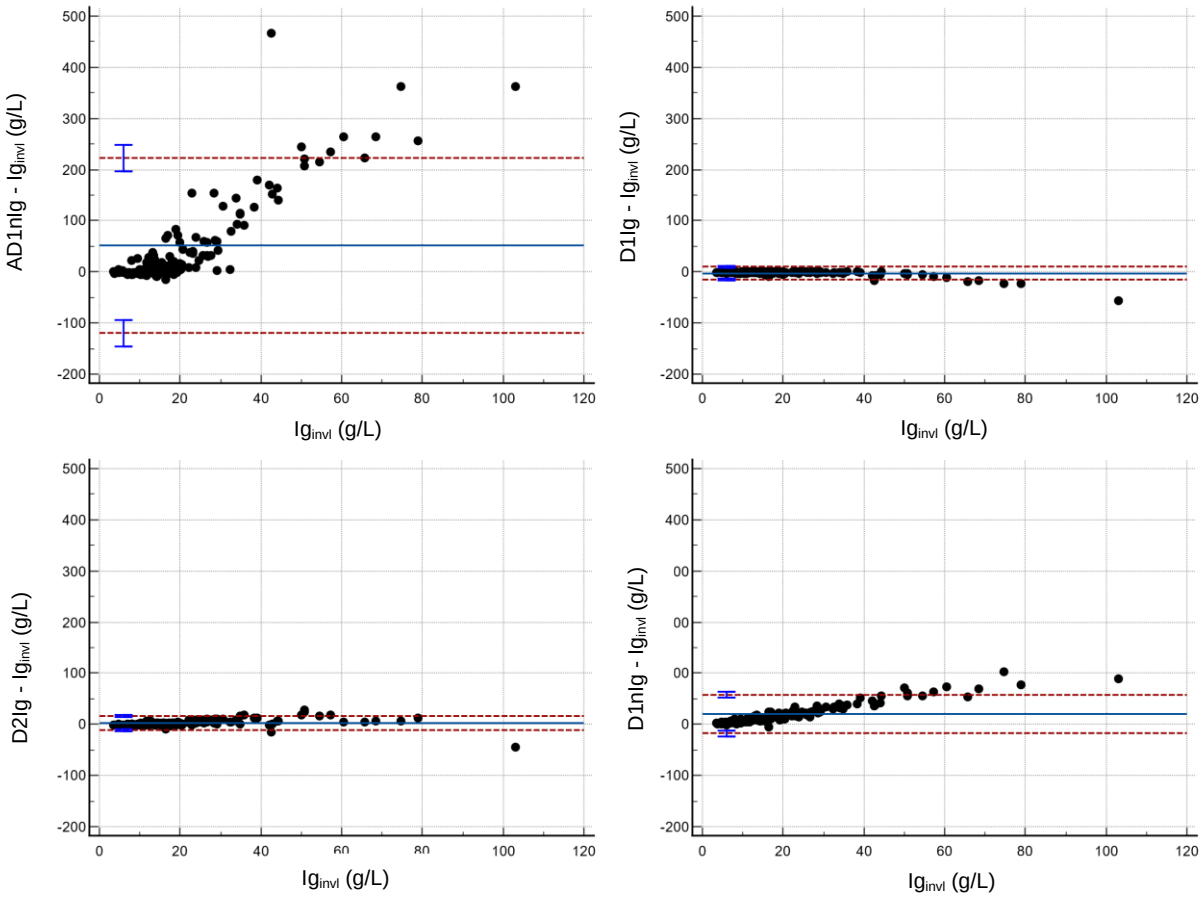
Slika 19. Bland-Altmanov usporedni grafički prikaz razlika vrijednosti varijabli AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg u odnosu na rezultate denzitometrijske metode ortogonalne projekcije na apscisu EPG-a (PD). U rezultatima varijabli koje uključuju podatke umjernoga materijala, AD1nIg i D1nIg, razvidan je trend povećanja razlike u vrijednostima s porastom koncentracije M-proteina.

Grafički prikazani rezultati (Slika 19.) upućuju na jače rasipanje razlika rezultata računske varijable AD1nIg u odnosu na rezultate denzitometrijske PD metode. Trend povećanja razlike s porastom koncentracije M-proteina utvrđen je u rezultatima varijabli AD1nIg i D1nIg. Jasno se može uočiti minimalni rasap razlika vrijednosti računskih modela D1Ig i D2Ig naspram rezultata denzitometrijske PD metode.

4.13. Prikaz razlika rezultata računskih modela u odnosu na imunokemijsku metodu

Ranije je navedeno (pogledati pod 4.12) kako je na temelju prethodne obrade rezultata računskih varijabli prikaz razlika rezultata računskih modela obuhvatio 4 računske varijable: AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg.

Bland-Altmanovom statistikom prikazana je razlika u rezultatima koncentracija M-proteina između varijabli AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg i imunokemijske metode (Ig_{invl}).



Slika 20. Bland-Altmanov usporedni grafički prikaz razlika vrijednosti varijabli AD1nI, D1Ig, D2Ig i D1nIg u odnosu na rezultate imunokemijske metode (Ig_{invl}). U rezultatima varijabli koje uključuju podatke umjernoga materijala, AD1nIg i D1nIg, razvidan je trend povećanja razlike s porastom koncentracije M-proteina (65)

Prikazani rezultati upućuju na veći rasap razlika između rezultata računske varijable AD1nIg i imunokemijske metode kao i trend povećanja razlike u vrijednostima s porastom koncentracije M-proteina. Iz grafičkog prikaza (Slika 20.) jasno se može uočiti minimalan rasap razlika vrijednosti računskih modela D1Ig i D2Ig uspoređujući ih s rezultatima denzitometrijske PD metode.

4.14. Regresijska analiza rezultata računskih modela

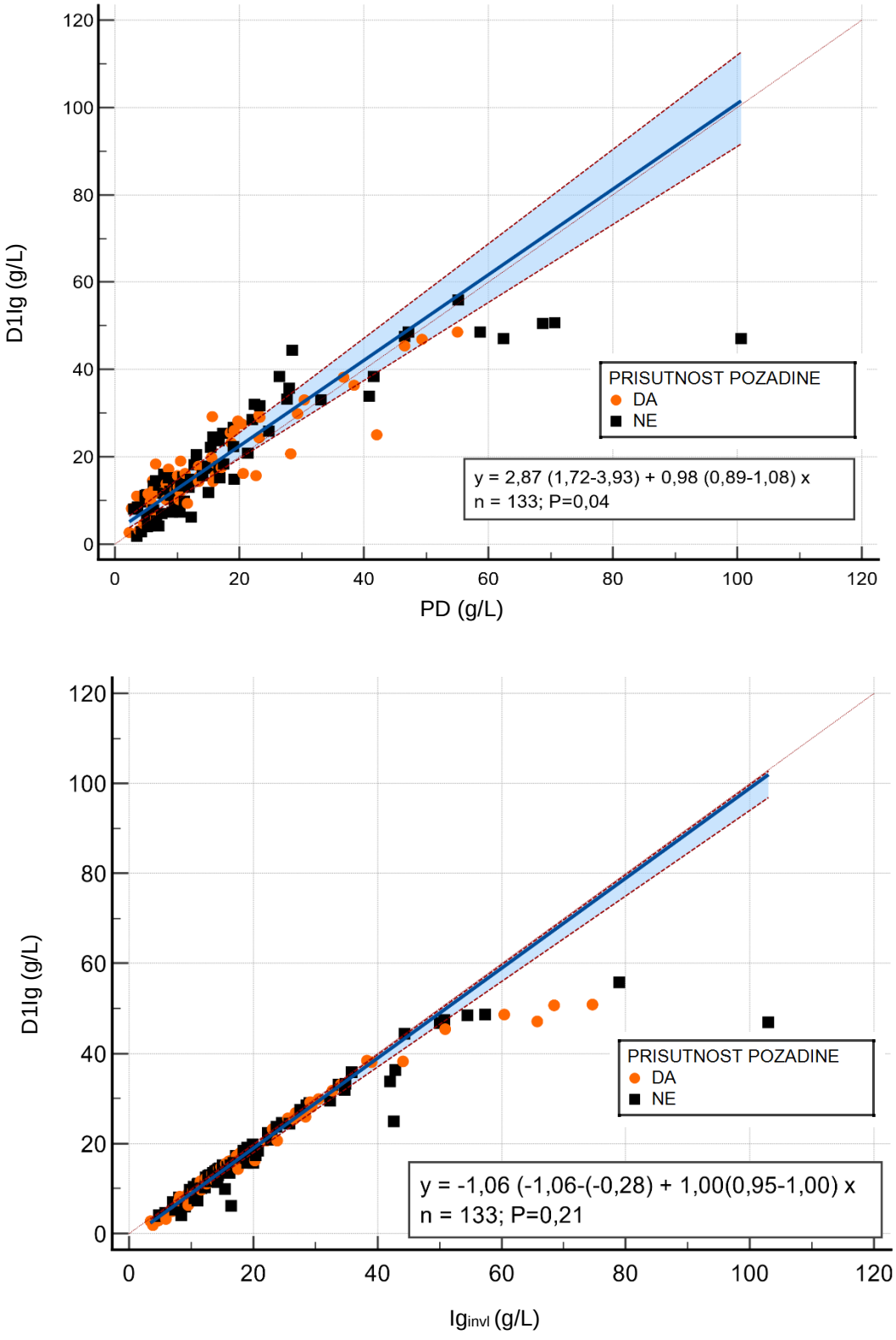
Koncentracije M-proteina dobivene računskim postupkom četiriju deriviranih varijabli, AD1nI, D1Ig, D2Ig i D1nIg, kategorizirane su u dvije skupine na temelju kriterija prisutnosti pozadine te su rezultati svake varijable i svake kategorije uspoređeni s koncentracijama izmjerenim i denzitometrijskom PD i imunokemijskom metodom (Ig_{invl}). Rezultati usporedbi provedenih Passing-Bablokovih statističkih analiza prikazani su u Tablici 18.

Rezultati regresijskih analiza pokazali su najmanja odstupanja u koncentraciji M-proteina primjenom računskih modela D1Ig i D2Ig te je odnos rezultata ovih računskih modela naspram rezultata imunokemijske (Ig_{invl}) i denzitometrijske metode prikazan grafički s naznačenom pripadnošću kategorijama prisutne i odsutne pozadine M-proteina u EPG serumskih proteina (Slika 21. i 22.)

Tablica 18. Passing-Bablokove regresijske analize rezultata računskih modela u odnosu na rezultate denzitometrijske i imunokemijske metode (65)

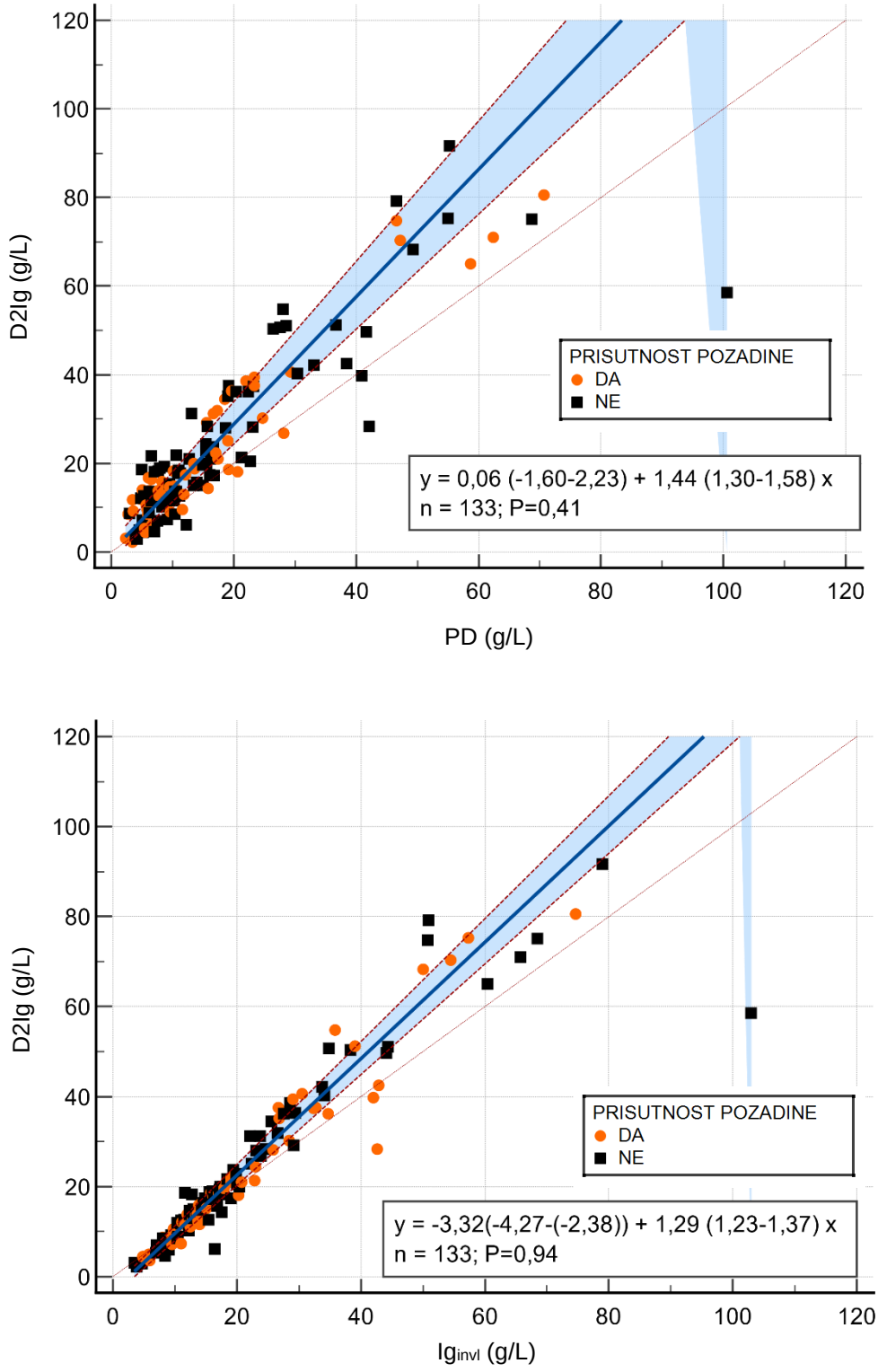
	M-protein s prisutnom pozadinom (n=57)			M-protein bez prisustva pozadine (n=76)*		
	Odsječak na osi y 95 % CI	Nagib 95 % CI	P vrijednost	Odsječak na osi y 95 % CI	Nagib 95 % CI	P vrijednost
Denzitometrijska metoda (PD)						
AD1nIg	3,73 2,88 do 4,24	0,23 0,17 do 0,33	P=0,100	-45,42 -72,46 do -27,09	5,84 4,59 do 7,58	P=0,530
D1Ig	2,24 -2,12 do 4,38	1,19 0,89 do 1,65	P=0,190	3,48 1,00 do 5,11	0,94 0,84 do 1,06	P=0,350
D2Ig	-0,26 -5,63 do 3,64	1,59 1,15 do 2,35	P=0,050	-1,21 -4,47 do 1,89	1,50 1,31 do 1,71	P=0,050
D1nIg	0,03 -5,46 do 4,18	2,81 2,35 do 3,44	P=0,100	-11,17 -23,04 do -5,66	3,19 2,68 do 4,03	P=0,150
Imunokemijska metoda (Ig_{invl})						
AD1nIg	-24,89 -56,05 do -13,22	3,37 2,17 do 5,93	P=0,050	-33,94 -55,33 do -20,18	3,71 2,97 do 5,12	P=0,800
D1Ig	-1,28 -2,28 do -1,06	1,00 0,98 do 1,07	P=0,930	0,00 -0,19 do 0,00	1,00 1,00 do 1,01	NP
D2Ig	-3,29 -5,13 do -2,02	1,29 1,19 do 1,43	P=0,740	-3,24 -4,64 do -1,25	1,28 1,88 do 1,38	P=0,880
D1nIg	-5,14 -8,96 do -2,77	2,12 1,91 do 2,43	P=0,740	-3,60 -6,34 do -1,41	2,06 1,88 do 2,20	P=0,800

*u usporedbu umjerenih vrijednosti uključeni su samo uzorci s koncentracijom M-proteina <20 g/L (n=40); NP – nije primjenjivo, PD – metoda ortogonalne projekcije na apscisu EPG-a, Ig_{invl} – razred imunoglobulina uključen u sintezu M-proteina



Slika 21. Passing-Bablokova regresijska analiza rezultata D1Ig varijable u odnosu na rezultate denzitometrijske metode ortogonalne projekcije na apscisu EPG-a (PD) i imunokemijskom metodom određene koncentracije razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina (Ig_{invl})

Rezultati korelacijske analize upućuju na izvrsnu povezanost (R_s=0,900; P<0,001; R_s=0,979; P<0,001) rezultata varijable D1Ig s denzitometrijskom PD i imunokemijskom (Ig_{inv}) metodom dok vrijednosti nagiba pravca i odsječka na osi y (pogledati pod 3.7.) Passing-Bablokove regresijske analize pokazuju da proporcionalna razlika u rezultatima između varijable D1Ig i imunokemijske metode za kvantifikacije M-proteina nije utvrđena, već je utvrđena manja sustavna razlika u rezultatima usporedbe s obje metode. U grafičkom prikazu regresijske analize (Slika 21.) valja uočiti da je usporedivost rezultata ograničena na mjerno područje do 60 g/L.

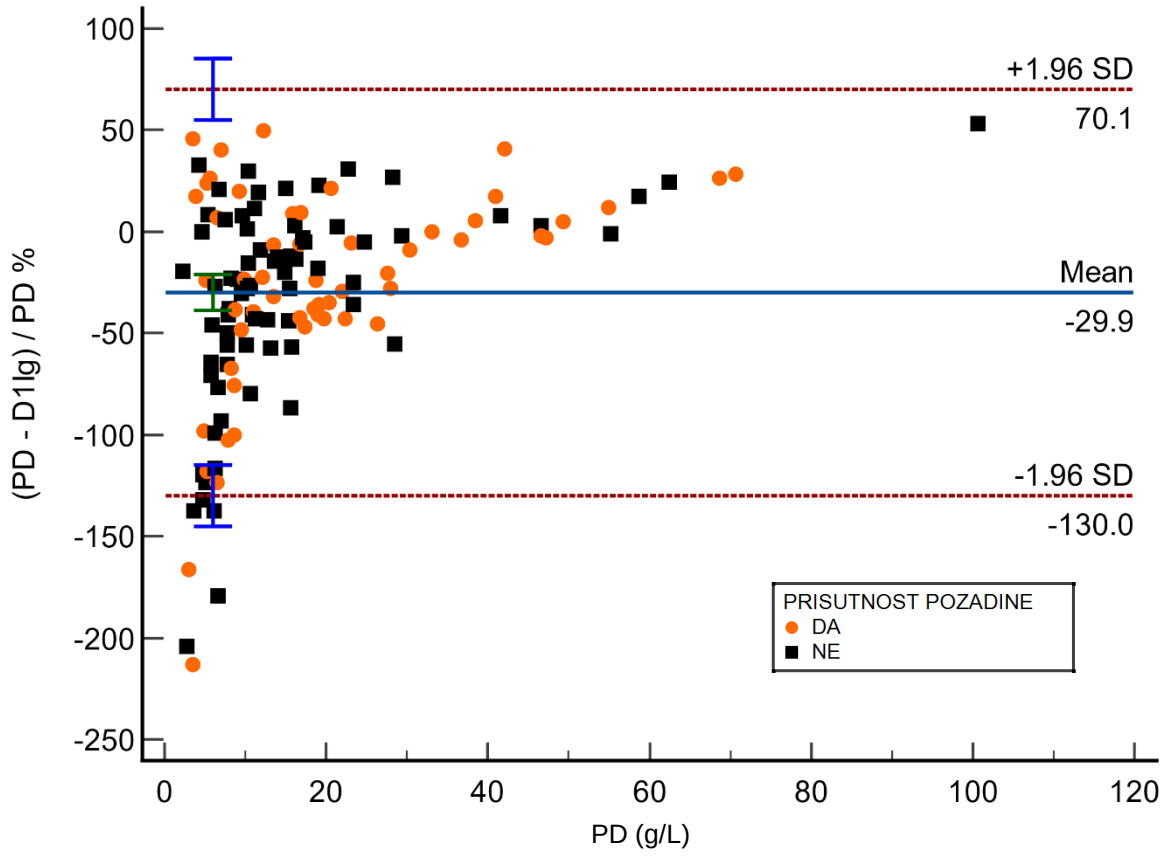


Slika 22. Passing-Bablokova regresijska analiza rezultata D2Ig varijable u odnosu na rezultate denzitometrijske metode ortogonalne projekcije na apscisu EPG-a (PD) i imunokemijske metode određivanja koncentracije razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina (Ig_{invl})

Rezultati korelacijske analize upućuju na izvrsnu povezanost (R_s=0,885; P<0,001; R_s=0,969; P<0,001) rezultata varijable i s denzitometrijskom PD i imunokemijskom (Ig_{inv}) metodom dok vrijednosti nagiba pravca i odsječka na osi y (pogledati pod 3.7.) Passing-Bablokove regresijske analize upućuju na postojanje proporcionalne razlike u usporedbi rezultata varijable D2Ig s obje uspoređivane metode. Sustavna je razlika u rezultatima utvrđena samo u usporedbi s imunokemijskom metodom (Ig_{invl}).

4.15. Prikaz odstupanja rezultata D1Ig računskoga modela od rezultata denzitometrijske metode

Premda je utvrđena manja sustavna razlika, proporcionalna razlika u rezultatima računske varijable D1Ig i obiju standardnih metoda kvantifikacije M-proteina nije utvrđena (Slika 21.) te je koristeći Bland-Altmanovu statistiku prikazana razlika u rezultatima koncentracija M-proteina između derivirane varijable D1Ig i denzitometrijske PD metode.

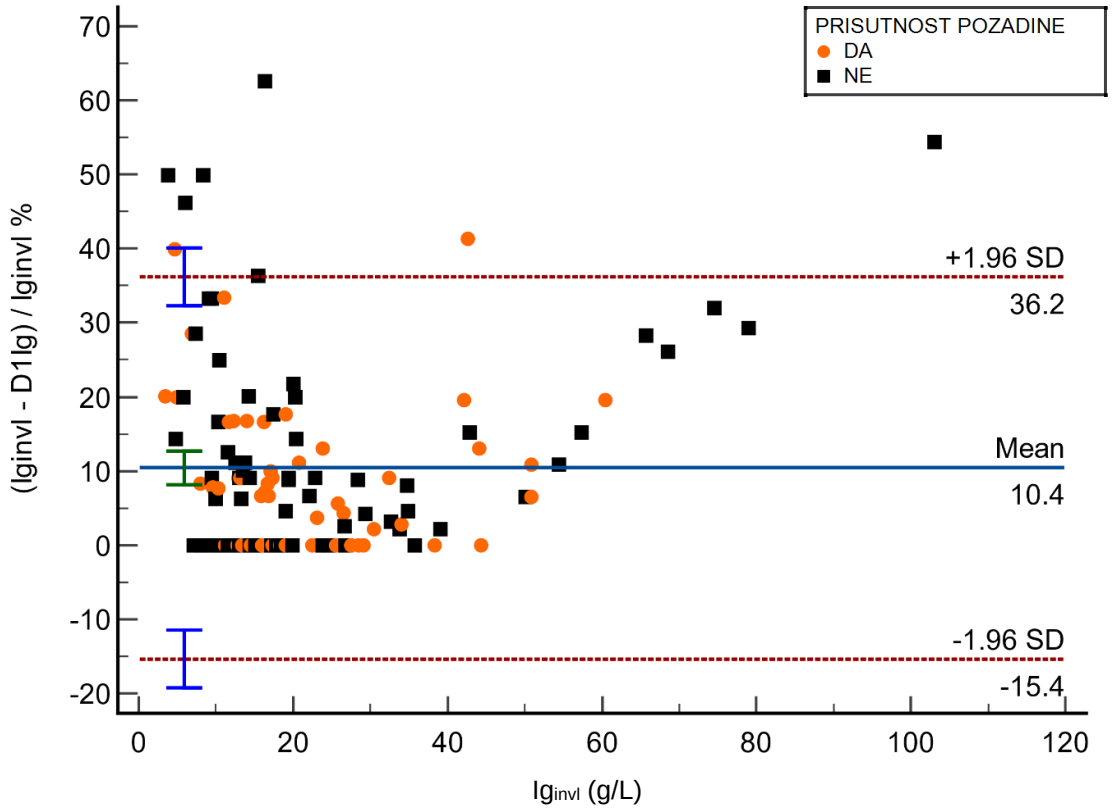


Slika 23. Prikaz razlika koncentracija M-proteina određenih računskim modelom D1Ig i denzitometrijskom PD metodom

Grafički prikaz (Slika 23.) razlika koncentracija M-proteina određenih D1Ig računskim modelom i denzitometrijskom PD metodom upućuje na više vrijednosti primjenom D1Ig računskoga modela. Utvrđena je srednja razlika od -29,94 (-38,77 do -21,12) %; P<0,001, između denzitometrijski određenih vrijednosti i D1Ig modela. Nadalje, niže vrijednosti PD metodom utvrđene su u objema skupinama, neovisno o prisutnosti pozadine. U skupini s prisutnom pozadinom utvrđena je srednja razlika od -51,60 (-68,72 do -34,41) %; P<0,001, a u skupini bez prisutne pozadine M-proteina -13,80 (-20,75 do -6,86) %; P<0,001. Navedeno upućuje na veće razlike u koncentracijama M-proteina primjenom derivirane varijable D1Ig u odnosu na rezultate denzitometrijske PD metode u skupini s prisutnom pozadinom dok su manje razlike u koncentraciji M-proteina nađene u skupini u kojoj nije bila prisutna pozadina.

4.16. Prikaz odstupanja rezultata D1Ig računskoga modela od rezultata imunokemijske metode

Premda je utvrđena manja sustavna razlika, proporcionalna razlika u rezultatima računske varijable D1Ig i obiju standardnih metoda kvantifikacije M-proteina (Slika 21.) nije utvrđena te je koristeći Bland-Altmanovu statistiku prikazana razlika u rezultatima koncentracija M-proteina između derivirane varijable D1Ig i imunokemijske metode (Ig_{invl}).



Slika 24. Prikaz razlika koncentracija M-proteina određenih računskim modelom D1Ig i imunokemijskom (Ig_{invl}) metodom

Grafički prikaz (Slika 24.) razlika koncentracija M-proteina određenih D1Ig računskim modelom i imunokemijskom metodom (Ig_{invl}) upućuje na niže vrijednosti primjenom D1Ig računskoga modela. Utvrđena je srednja razlika od 10,41 (8,14 do -12,69) %; P<0,001. Nadalje, utvrđene su niže vrijednosti u rezultatima imunokemijske metode u objema skupinama, neovisno o prisutnosti pozadine. U skupini s prisutnom pozadinom utvrđena je srednja razlika od 12,70 (9,00 do 16,40) %; P<0,001, a u skupini bez prisutne pozadine M-proteina 8,71 (5,85 do 11,57) %; P<0,001.

4.17. Rezultati analize referentnih uzoraka

Analizirano je 9 različitih referentnih uzoraka 243 Gammopathies (INSTAND e.V. Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e. V., Düsseldorf, Njemačka). Četiri od devet (4/9) uzorka sadržavala su M-protein razreda IgG, dva

od devet (2/9) razreda IgA te tri od devet (3/9) razreda IgM. Medijan koncentracija M-proteina bio je 26,75 (IQR 24,74 – 31,32) g/L, a ukupnih proteina 56 (IQR 53 – 57) g/L.

4.17.1. Rezultati analiza nativnih referentnih uzoraka

Kvantifikacija M-proteina primjenom računskih modela AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg učinjena je u 9 različitih referentnih uzoraka s certificiranom koncentracijom M-proteina vanjskog organizatora procjene kvalitete INSTAND. Odstupanja koncentracija M-proteina računskih varijabli u odnosu na deklarirnu vrijednost prikazana su u Tablici 19.

Tablica 19. Odstupanja rezultata računskih modela dobivena analizom nativnih referentnih uzoraka

Oznaka referentnoga materijala	Razred	Deklarirana vrijednost organizatora INSTAND	AD1nIg (g/L) odstupanje (%)	D1Ig (g/L) odstupanje (%)	D2Ig (g/L) odstupanje (%)	D1nIg (g/L) odstupanje (%)
2020-31	IgM	22,39	>100	-5	81	55
2020-32	IgG	32,68	>100	-11	53	12
2020-11	IgM	27,91	>100	-7	42	49
2021-31	IgG	31,60	>100	-7	49	26
2021-32	IgA	25,52	>100	-3	41	72
2021-11	IgG	31,22	>100	-5	68	27
2021-12	IgM	20,96	>100	1	92	65
2022-11	IgG	25,64	>100	-3	19	22
2022-12	IgA	26,75	>100	-6	26	89

Rezultati analize referentnih uzoraka upućuju na znatnije odstupanje rezultata računskoga modela AD1nIg dok je minimalno odstupanje nađeno primjenom D1Ig modela. U D2Ig i D1nIg računskim modelima odstupanja u rezultatima variraju od 12-92 %. Najmanja odstupanja u D1nIg računskom modelu nađena su u materijalima 2020-32, 2021-31, 2021-11, 2022-11 u kojima je M-protein bio razreda IgG, dok su najveća odstupanja nađena u uzorcima razreda IgA

2021-32 i 2022-12. U ostalim računskim modelima nije uočena povezanost odstupanja s razredom M-proteina.

4.17.2. Rezultati analiza različitih razrijeđenja referentnih uzoraka

Pripremljena su i analizirana razrjeđenja 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4 devet referentnih uzoraka (INSTAND e.V. Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e. V., Düsseldorf, Njemačka). Medijan koncentracija ukupnih proteina u razrjeđenju 1 : 2 bio je 27 (IQR 25,75 – 27,25) g/L, a u uzorcima razrijeđenja 1 : 3 17 (IQR 16,75 – 18,00) g/L te 1 : 4 14 (IQR 13,00 – 14,25) g/L.

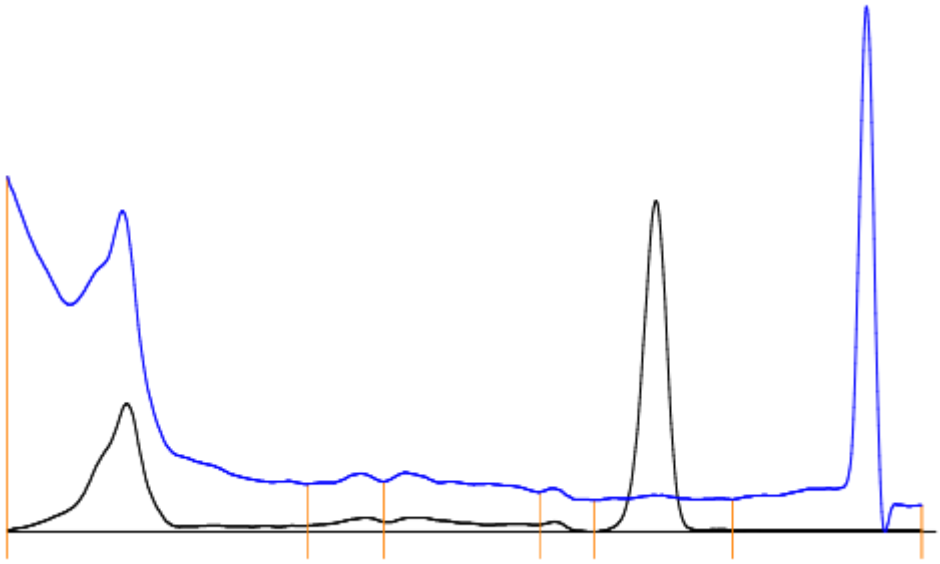
Kvantifikacija M-proteina primjenom računskih modela AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg učinjena je u referentnim uzorcima razrijeđenja 1 : 2 i 1 : 3. Odstupanja koncentracija M-proteina računskih varijabli u odnosu na teorijsku koncentraciju izračunatu prema deklariranoj vrijednosti vanjskog organizatora procjene kvalitete INSTAND prikazana su u Tablici 20.

Tablica 20. Odstupanja rezultata računskih modela AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg dobivena analizom razrjeđenih referentnih uzoraka

Oznaka referentnoga materijala	Teorijska vrijednost prema organizatoru INSTAND 1:2	AD1nIg (g/L) odstupanje (%)	D1Ig (g/L) odstupanje (%)	D2Ig (g/L) odstupanje (%)	D1nIg (g/L) odstupanje (%)
2020-31	11,20	>100	14	>100	-11
2020-32	16,34	-21	-34	13	-58
2020-11	13,96	>100	13	72	-12
2021-31	15,80	62	6	71	-32
2021-32	12,76	>100	-23	17	-33
2021-11	15,61	59	2	81	-34
2021-12	10,48	>100	14	>100	-7
2022-11	12,82	43	-1	23	-41
2022-12	13,38	>100	-12	20	-12
Oznaka referentnoga materijala	Teorijska vrijednost prema organizatoru INSTAND 1:3	AD1nIg (g/L) odstupanje (%)	D1Ig (g/L) odstupanje (%)	D2Ig (g/L) odstupanje (%)	D1nIg (g/L) odstupanje (%)
2020-31	7,46	94	13	>100	-42
2020-32	10,89	-40	-35	13	-75
2020-11	9,30	39	10	68	-46
2021-31	10,53	7	0	61	-57
2021-32	8,51	>100	-22	13	-58
2021-11	10,41	9	2	80	-60
2021-12	6,99	>100	13	>100	-42
2022-11	8,55	-2	0	23	-60
2022-12	8,92	>100	-10	20	-44

Razrjeđivanjem fiziološkom otopinom, u radnim uzorcima smanjivana je koncentracija ukupnih proteina do 14 g/L. Time je i koncentracija albumina u uzorcima razrijeđenja 1 : 4

dovedena na razinu od najviše 7 g/L što je prema rezultatima imunosuptrakcije nedovoljna koncentracija za adekvatno pozicioniranje albuminske frakcije u IS-EPG-u.



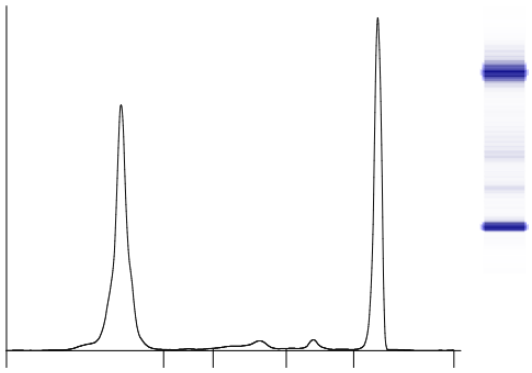
Slika 25. Prikaz imunosuptrakcijskog elferograma u razrjeđenju fiziološkom otopinom 1 : 4

4.17.3. Rezultati analiza kontrolnih uzoraka s dodanom različitom količinom referentnoga uzorka

Referentni materijal jedinstvene oznake 243 Gammopathies, 2022-32 (pogledati pod 3.2.4.) koji je dodavan u kontrolne uzorke seruma bila je otopina čijeg 91,7 % proteinskoga sastava čine albumin i M-protein s deklariranom koncentracijom M-proteina od 25,70 g/L. Uzorak je sadržavao M-protein razreda IgG. Različiti volumeni (5) opisanog referentnog materijala su dodavani u alikvotni uzorak svakog od 3 nativna kontrolna seruma (pogledati pod 3.3.1.).

Nativni kontrolni serum s hipogamaglobulinemijom sadržavao je 2,26 g/L IgG, <0,05 g/L IgA i 0,14 g/L IgM. Nativni kontrolni serum s normogamaglobulinemijom sadržavao je 9,75 g/L IgG, 1,42 g/L IgA i 1,36 g/L IgM dok je u nativnom kontrolnom serumu s hipergamaglobulinemijom određen IgG od 16,63 g/L, IgA 3,68 g/L i IgM 4,26 g/L.

ISE-EPG-i svih 15 uzoraka pripremljenih na već spomenuti način (pogledati pod 3.3.1.). prikazani su na Slici 28. U svih je 15 uzoraka učinjena kvantifikacija M-proteina primjenom računskih modela AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg dok su odstupanja koncentracija M-proteina računskih varijabli u odnosu na teorijsku koncentraciju M-proteina izračunatu stehiometrijskim računom prikazana u Tablici 21.

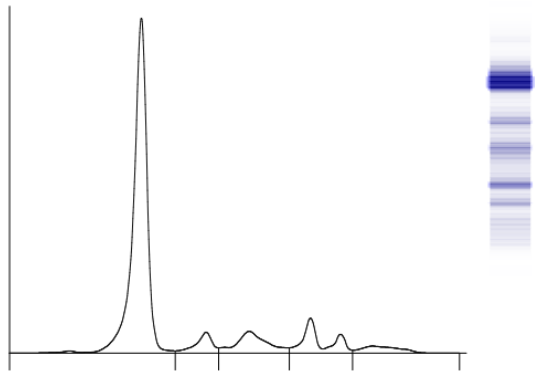


Frakcija	Rez %	Ref. int.%	Rez. g/L	Ref. int. g/L
Albumin	**52,7**	55,8 - 66,1	**27,9**	40,2 - 47,6
Alpha 1	**1,0**	2,9 - 4,9	**0,5**	2,1 - 3,5
Alpha 2	**4,5**	7,1 - 11,8	**2,4**	5,1 - 8,5
Beta	**2,8**	8,4 - 13,1	**1,5**	6,0 - 9,4
Gamma	**39,0**	11,1 - 18,8	**20,7**	8,0 - 13,5

Ukupni proteini: **53** (60 - 78)

Slika 26. Prikaz elferograma referentnoga materijala INSTAND 243 Gammopathies, 2022-12 postupkom kapilarne elektroforeze slobodne otopine koji je dodavan u nativne kontrolne uzorke seruma

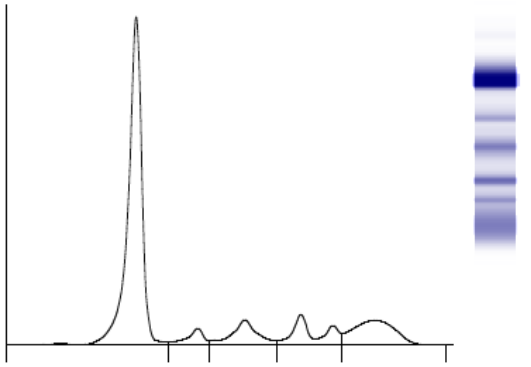
(a)



Frakcija	Rez %	Ref. int.%	Rez. g/L	Ref. int. g/L
Albumin	**70,5**	55,8 - 66,1	**40,9**	40,2 - 47,6
Alpha 1	**5,2**	2,9 - 4,9	**3,0**	2,1 - 3,5
Alpha 2	**9,9**	7,1 - 11,8	**5,7**	5,1 - 8,5
Beta	**10,3**	8,4 - 13,1	**6,0**	6,0 - 9,4
Gamma	**4,1**	11,1 - 18,8	**2,4**	8,0 - 13,5

Ukupni proteini: **58** (60 - 78)

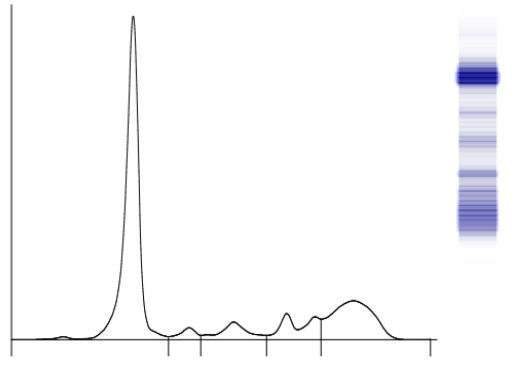
(b)



Frakcija	Rez %	Ref. int.%	Rez. g/L	Ref. int. g/L
Albumin	**63,1**	55,8 - 66,1	**42,9**	40,2 - 47,6
Alpha 1	**3,7**	2,9 - 4,9	**2,5**	2,1 - 3,5
Alpha 2	**8,7**	7,1 - 11,8	**5,9**	5,1 - 8,5
Beta	**10,1**	8,4 - 13,1	**6,9**	6,0 - 9,4
Gamma	**14,4**	11,1 - 18,8	**9,8**	8,0 - 13,5

Ukupni proteini: **68** (60 - 78)

(c)



Frakcija	Rez %	Ref. int.%	Rez. g/L	Ref. int. g/L
Albumin	**59,5**	55,8 - 66,1	**48,8**	40,2 - 47,6
Alpha 1	**2,6**	2,9 - 4,9	**2,1**	2,1 - 3,5
Alpha 2	**6,3**	7,1 - 11,8	**5,2**	5,1 - 8,5
Beta	**9,6**	8,4 - 13,1	**7,9**	6,0 - 9,4
Gamma	**22,0**	11,1 - 18,8	**18,0**	8,0 - 13,5

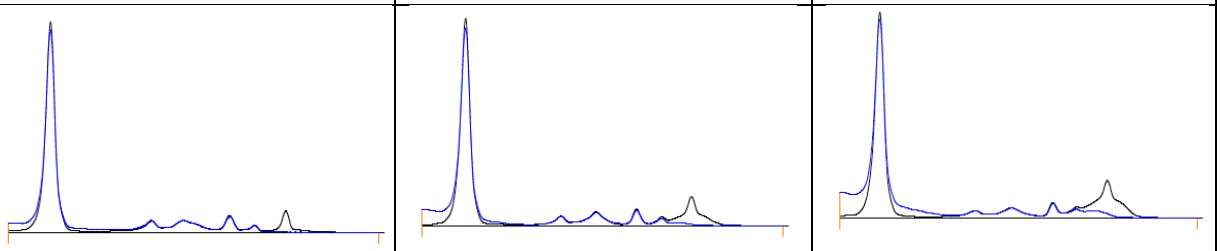
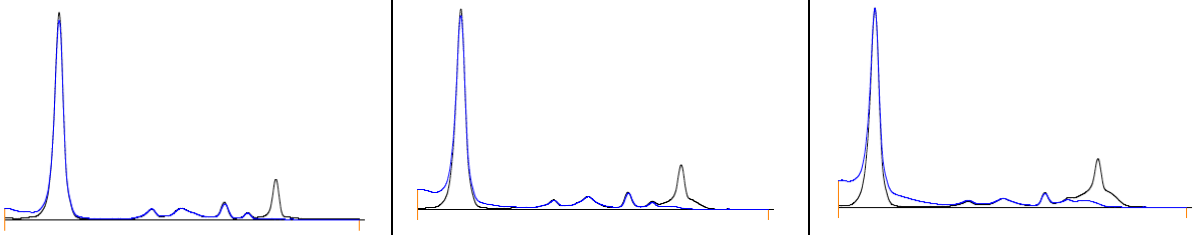
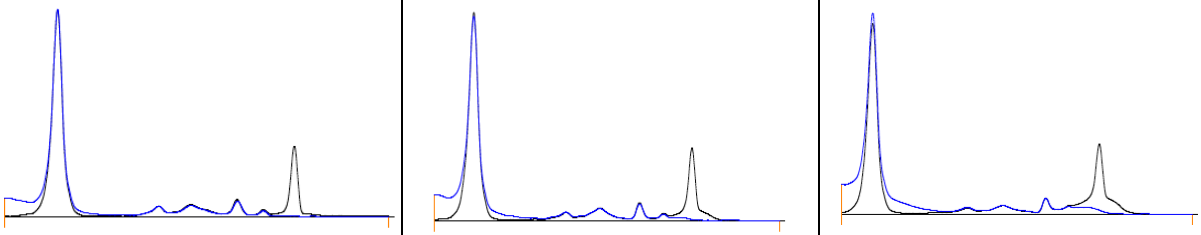
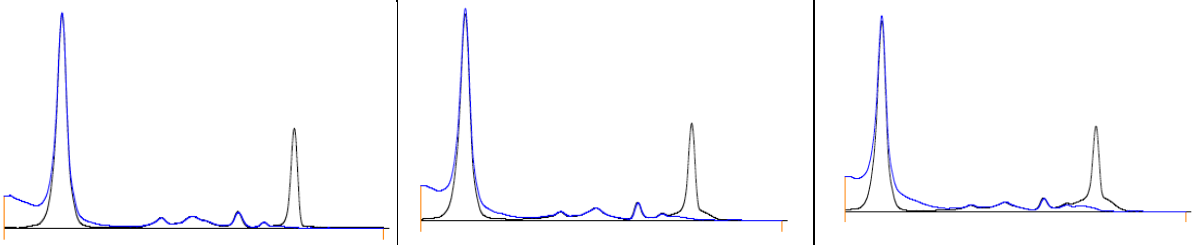
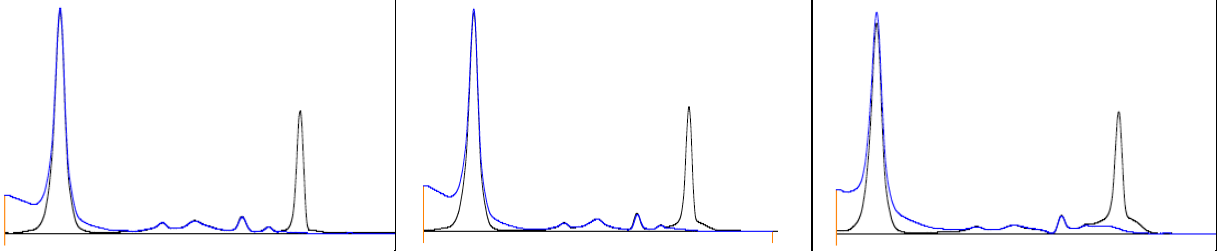
Ukupni proteini: **82** (60 - 78)

Slika 27. Prikaz elferograma proteina nativnih kontrolnih seruma s različitom koncentracijom poliklonski sintetiziranih imunoglobulina (pozadinom): hipogamaglobulinemijom (a), normogamaglobulinemijom (b) i hipergamaglobulinemijom (c) postupkom kapilarne elektroforeze slobodne otopine u koje je dodavan referentni materijal

Tablica 21. Odstupanja rezultata računskih modela AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg od teorijske koncentracije M-proteina u uzorcima s različitom razinom poliklonski sintetiziranih imunoglobulina nakon dodavanja različite količine referentnoga materijala

Gamaglobulinska frakcija nativnoga kontrolnoga uzorka		Teorijska koncentracija M-proteina	AD1nIg (g/L) odstupanje (%)	D1Ig (g/L) odstupanje (%)	D2Ig (g/L) odstupanje (%)	D1nIg (g/L) odstupanje (%)
Hipo-gamaglobulinemija	1	4,84	-64	1	6	27
	2	6,96	-32	7	12	30
	3	10,07	14	9	9	31
	4	12,31	55	7	7	28
	5	13,98	76	4	5	25
Normo-gamaglobulinemija	1	10,36	-55	-8	-3	30
	2	12,96	-26	-10	-5	29
	3	15,07	17	-7	-3	28
	4	16,60	46	-7	-3	25
	5	17,73	75	-5	-3	25
Hiper-gamaglobulinemija	1	15,88	-27	-6	-2	42
	2	18,48	-7	-12	-11	37
	3	19,67	40	-4	3	40
	4	20,51	59	-8	-6	34
	5	21,18	101	-4	0	34

Najveća odstupanja od teorijske koncentracije dobivena su primjenom računskoga modela AD1nIg. Primjenom D1Ig i D2Ig računskih modela dobiveno je najveće odstupanje do 12 %, dok rezultati upućuju na sustavno odstupanje od 25 – 40 % primjenom D1nIg računskoga modela. U analiziranim uzorcima nije dokazana ovisnost odstupanja rezultata ispitivanih računskih modela o razini poliklonski sintetiziranih imunoglobulina.

	Imunosuptrakcijski elferogrami kontrolnoga seruma s		
	hipogamaglobulinemijom i dodanim različitim količinama referentnoga materijala	normoglobulinemijom i dodanim različitim količinama referentnoga materijala	hipergamaglobulinemijom i dodanim različitim količinama referentnoga materijala
1			
2			
3			
4			
5			

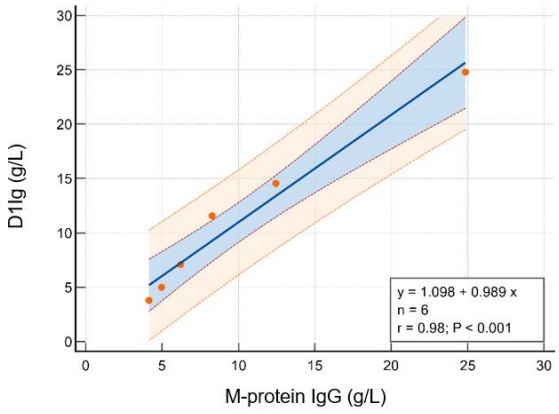
Slika 28. Prikaz imunosuptrakcijskih elferograma proteina kontrolnih seruma nakon dodatka različitih količina referentnoga materijala INSTAND 243 Gammopathies, jedinstvene oznake 2022-12. Analizirani uzorci (1-5) su pripremljeni na način da je u alikvotne uzorke svakog kontrolnog seruma (s hipo-, normo- i hipergamaglobulinemijom) volumena (200 µL) dodavan rastući volumen referentnog materijala (uzorak 1 – 25 µL, uzorak 2 – 50 µL, uzorak 3 – 100 µL, uzorak 4 – 150 µL, uzorak 5 – 200 µL).

4.18. Rezultati procjene linearnosti D1Ig računskoga modela

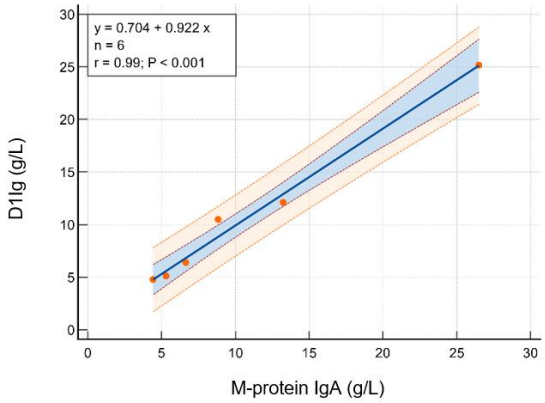
Linearnost računskoga modela D1Ig za pojedini razred M-proteina procjenjena je analizom različitih razrjeđenja 3 referentna materijala s infuzijskom otopinom albumina u omjerima 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5 i 1 : 6 (pogledati pod 3.4.). U svih 15 pripremljenih uzoraka je učinjena kvantifikacija M-proteina primjenom računskog modela D1nIg. Rezultati su prikazani (Slika 29.) linearnom regresijom u odnosu na teorijsku koncentraciju M-proteina izračunatu prema deklariranoj vrijednosti vanjskog organizatora procjene kvalitete INSTAND, a interpretirani prema kriteriju $r \geq 0{,}980$ (pogledati pod 3.7.).

Utvrđeno je da su rezultati računskog modela D1Ig linearni u koncentracijskom području M-proteina od 5-25 g/L za sva tri razreda imunoglobulina, IgG, IgA i IgM.

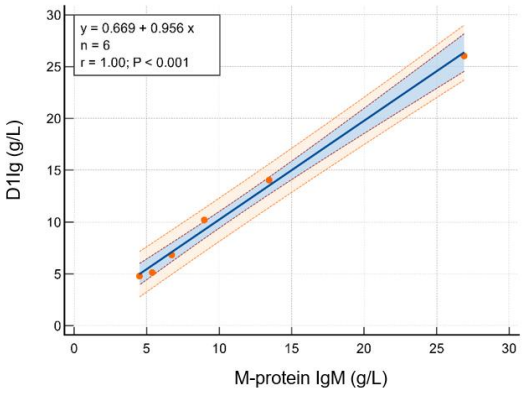
(a)



(b)



(c)



Slika 29. Prikaz rezultata procjene linearnosti računskoga modela D1Ig. Analizirana su tri nativna referentna materijala (INSTAND 243 Gammopathies, jedinstvenih oznaka 2021-11, 2021-12 i 2021-31) koji su obuhvatili M-proteine razreda (a) IgG, (b) IgA i (c) IgM te uzorci pripremljeni miješanjem navedenih referentnih materijala i otopine albumina u omjerima 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5 i 1 : 6. Svi su uzorci analizirani u duplikatu, a srednje vrijednosti koncentracija računske varijable D1Ig prikazane su linearnom regresijom u odnosu na teorijsku koncentraciju M-proteina odgovarajućega razreda izračunatu na temelju deklarirane vrijednosti vanjskog organizatora procjene kvalitete INSTAND

4.19. Rezultati procjene preciznosti računskih modela

Za procjenu preciznosti računskih modela AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg korištena su 4 uzorka seruma bolesnika s monoklonskom gamapatijom (detaljnije opisana pod 3.5.1.) u kojima su koncentracije M-proteina određene denzitometrijskom PD metodom iznosile od 4,1 – 18,4 g/L. U postupak kvantifikacije M-proteina denzitometrijskim metodama PD i TS, a s ciljem

obuhvaćanja poznatih izvora varijabilnosti, uključena su dva istraživača. Koncentracija M-proteina određena je u šesteroplikatu, a dobiveni rezultati su prikazni u Tablici 22.

Tablica 22. Rezultati procjene preciznosti računskih modela AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg u uzorcima seruma bolesnika s monoklonskom gamapatijom. Odabrana 4 uzorka seruma karakteristikama predstavljaju poznate izvore varijabilnosti u kvantifikaciji M-proteina.

	PD (g/L)	TS (g/L)	PD KV (%)	TS KV (%)	AD1nIg KV (%)	D1Ig KV (%)	D2Ig KV (%)	D1nIg KV (%)
M-protein u gama globulinskoj frakciji bez poliklonske pozadine	16,6	12,5	2,3	8,5	1,0	0,5	0,9	0,6
M-protein u gama globulinskoj frakciji uz prisustvo poliklonske pozadine	18,4	11,8	6,6	16,8	2,5	3,1	3,0	2,6
M-protein u beta globulinskoj frakciji	10,9	4,5	8,3	27,8	2,7	1,3	1,4	1,1
M-protein u gama globulinskoj frakciji s izraženom poliklonskom pozadinom	4,1	0,8	14,4	37,7	2,2	2,0	2,6	2,2

PD – denzitometrijska metoda ortogonalne projekcije na aspcisu EPG-a, TS – denzitometrijska metoda linearnoga otklona u točkama tangencije, KV – koeficijent korelacije

Uspoređujući koeficijente varijacije (KV) računskih modela AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg s KV-ima denzitometrijskih metoda utvrđeno je da su svi KV-i računskih varijabli, neovisno o koncentraciji M-proteina, poliklonskoj pozadini ili migracijskom položaju niži od KV-a denzitometrijskih metoda (najviši KV 3,1%). Rezultati pokazuju da je najlošija preciznost postupka kvantifikacije M-proteina primjenom TS denzitometrijskog pristupa s KV-ima koji iznose 8,5 – 37,7 %. Nadalje, viši KV-i denzitometrijskih metoda (8,3 – 37,7 %) u uzorku s M-proteinom koji se prikazuje u beta globulinskom području te uzorku sa M-proteinom

prikazanom u gama globulinskom području i prisutnom izraženom poliklonskom pozadinom pokazuju da pozadina (komigirirajući proteini u beta globulinskoj frakciji i poliklonski sintetizirani imunoglobulini u gama globulinskom području) značajno utječu na preciznost denzitometrijskih metoda.

Premda je utvrđena preciznost određivanja koncentracije pojedinog razreda imunoglobulina imunokemijskom metodom u preliminarnom istraživanju (pogledati pod 4.4.) uputila na izvrsnu preciznost s najvišim KV-om od 1,3 %, zbog obuhvaćanja koncentracije i poliklonski sintetiziranih imunoglobulina razreda uključenoga u sintezu M-proteina ne može se dovesti u vezu s preciznošću kvantifikacije M-proteina.

5. RASPRAVA

U ovom je radu ispitivan potencijal laboratorijskih podataka imunosuptrakcije kao izvora kvantitativnih podataka koji bi udruženi s koncentracijom ukupnih proteina i pojedinih razreda imunoglobulina uključenih u sintezu M-proteina unaprijedili kvantifikaciju M-proteina. Koncentracija M-proteina izravno korelira s aktivnošću stanja u bolesnika s monoklonskom gamapatijom i standardno se određuje denzitometrijskom analizom EPG-a ili imunokemijskim određivanjem koncentracije razreda imunoglobulina uključenog u sintezu M-proteina, Ig_{invl}. Kako je već spomenuto, napredak u terapijskom pristupu bolesnika s monoklonskom gamapatijom početkom 21. stoljeća doveo je do potrebe za unaprijeđenjem analitičkih mogućnosti praćenja aktivnosti bolesti. U tu svrhu razvijeni su imunokemijski mjerni postupci za određivanje koncentracije FLC-a i HLC-a. Valja primjetiti da su oba mjerna postupka usmjerena k određivanju koncentracije i poliklonski i monoklonski sintetiziranih imunoglobulina odnosno dijela imunoglobulinske molekule (66). Brojni objavljeni radovi upućuju na kliničku korisnost ovih mjernih postupaka no opisani su i slučajevi neprepoznatih epitopa na molekuli M-proteina kao i precjenjenih vrijednosti koje su posljedica polimerizacije imunoglobulinskih lanaca (54, 67-69). Nadalje, tehnološki napredak analitičkih metoda omogućio je i primjenu sustava tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrom masa u svrhu tipizacije i kvantifikacije M-proteina čija primjena predstavlja daljnji izazov u ovom području (70-71). Upravo je razvoj novih mjernih postupaka skrenuo fokus znanstvene i kliničke javnosti s postojećih metoda i njihovih nedovoljno iskorištenih potencijala za unaprjeđenje kvantifikacije M-proteina. Imunosuptrakcija je kvalitativna metoda koja objedinjuje elektroforezno razdvajanje serumskih proteina s imunokemijskom metodom definiranja razreda i tipa imunoglobulina te navedenime za razliku od imunoturbidimetrijske metode omogućuje vizualizaciju nakupljanja fizikalno-kemijski sličnih molekula u IS-EPG-u.
Provedeno istraživanje obuhvatilo je u reprezentativnom omjeru tri najčešća razreda M-proteina. U studiji Mayo klinike koja je uključila 1027 bolesnika s novodijagnosticiranim MM-om najučestaliji detektirani M-protein bio je razreda IgG, zatim IgA te IgM (11). Rezultati razdiobe M-proteina na temelju razreda teškog i tipa lakog lanca u ovom istraživanju pokazali su podjednaku zastupljenost M-proteina razreda IgA i IgM te odgovaraju literaturnim podatcima o razdiobi M-proteina u MGNZ-u (IgG 59 %, IgA 12 %, IgM 18 %, IgD 0,5 %, 10,5 % biklonalne gamapatije i FLC-a) (72). Veći udio M-proteina razreda IgM u skupini s MGNZ-om u odnosu na skupinu s MM-om može se pripisati opisanoj povezanosti prisutnosti monoklonskoga IgM sa širokim spektrom bolesti, najčešće autoimune etiologije (73-75). U ranije spomenutoj studiji (11) predominantni migracijski položaj M-proteina u EPG-u je

područje beta i gama globulina kao što pokazuju i rezultati ovoga rada. Istraživanjem obuhvaćeni M-proteini prate fiziološki, poliklonski, predominantni migracijski položaj razreda IgG - gama globulinski, razreda IgA - beta globulinski (76). No, budući je riječ o produktu tumorski promjenjene plazma stanice, jasno je da izostaje bilo koje pravilo u smislu migracijskoga položaja (77). U istoj studiji (11) 1 % obrađenih M-proteina nađen je u alfa-2 globulinskom području, dok nije nađen M-protein u području alfa-1 globulinske i albuminske frakcije što ujedno potvrđuje premisu imunosuptrakcijske metode. Naime, nastali kompleksi sefaroza čestica s molekulama serumskih imunoglobulina u IS-EPG-u prikazuju se upravo u području alfa-1 globulinske i albuminske frakcije.

Primjena i automatizacija KE-e značajno su unaprijedile analitičke karakteristike izvođenja elektroforeze serumskih proteina (75-79). Preciznost automatiziranih imunokemijskih metoda za određivanje koncentracije pojedinog razreda imunoglobulina već nekoliko desetljeća nije upitna (80). U kontekstu kvantifikacije M-proteina, imunokemijski određena koncentracija predstavlja zbroj poliklonski i monoklonski sintetiziranih molekula imunoglobulina istoga razreda što pridonosi, kako je već ranije spomenuto, često precijenjenim vrijednostima koncentracije M-proteina (50-51).

Malo je literaturnih podataka o imunosuptrakciji kao izvoru kvantitativnih podataka, a nisu brojni niti oni koji prikazuju analitičke karakteristike denzitometrijske analize EPG-a. I ranije se računskim postupcima pokušavalo umanjiti utjecaj prepoznatih nedostatka standardno prihvaćene PD denzitometrijske metode uvođenjem korekcijske PD metode (37) te razvojem TS metode (52). TS metoda razvijena je kao odgovor na precjenjene vrijednosti u prisutnu pozadinu uklopljenih M-proteina. Upravo rezultati ovoga istraživanja upućuju na veće razlike u vrijednostima TS i PD metode u skupini s prisutnom pozadinom u odnosu na skupinu M-proteina bez prisutne pozadine čime čine razvidnim manji doprinos prisutne pozadine kvantifikaciji M-proteina koristeći TS metodu. Pokazano je i da migracijski položaj nema utjecaja na razliku u vrijednostima između TS i PD metode, ali i da je razlika u koncentracijama manja ukoliko je M-protein razreda IgG. To je logično, budući se M-protein razreda IgG s najvećom učestalošću nalazi u gama globulinskom području gdje se češće i nalaze M-proteini bez prisutne pozadine odnosno gdje je doprinos prisutne pozadine manji. U literaturnim podatcima se navodi prednost primjene TS metode u beta globulinskoj frakciji no rezultati čine razvidnim da je ključna razina pozadine, a ne migracijski položaj. Cárdenas Fernández i suradnici su uspoređivali rezultate PD i TS denzitometrijskih metoda na 24 uzorka seruma i pokazali da postoji sustavna, a ponekad i proporcionalna razlika u rezultatima ovih dviju

denzitometrijskih metoda, te da se, kao i u rezultatima ovoga rada, precizniji rezultati ostvaruju koristeći PD pristup. Nadalje, u njihovom istraživanju, preciznost TS pristupa značajno opada kod koncentracije M-proteina <10 g/L (81). Detektirane razlike u rezultatima onemogućavaju naizmjeničnu primjenu ovih denzitometrijskih metoda u praćenju bolesnika s monoklonskom gamapatijom. Kao glavni uzrok nepreciznosti spomenutih denzitometrijskih metoda kvantifikacije M-proteina spominje se nedovoljna objektivnost u označavanju površine ispod vrška krivulje koji se pripisuje M-proteinu, posebice onih u beta globulinskom području. U ovom je radu pokazano da amplituda krivulja u IS-EPG-u na mjestu vrška M-proteina kao jednoznačno definirana točka pridonosi boljoj preciznosti ispitivanoga računskoga modela. Upotreba podataka o amplitudi krivulja isključuje subjektivnost u označavanju površine u EPG-u ispod vrška pripisanoga M-proteinu te time dovodi do manje varijacije u rezultatima u usporedbi s rezultatima PD i TS denzitometrijskih metoda.

Rezultati usporedbe PD denzitometrijske i imunokemijske metode očekivano su pokazali bolju usporedivost u skupini bez prisutne pozadine dok je najveće prosječno odstupanje u vrijednostima nađeno kod M-proteina razreda IgG te onih gama migrirajućih. Uzrok većega odstupanja u koncentraciji monoklonskoga IgG može biti izrazito visoka koncentracija određena imunokemijski (najviša vrijednost 103 g/L), ali i podatak da je M-protein razreda IgG najučestaliji u gama globulinskom području u kojem se zaustavljaju i poliklonski sintetizirani imunoglobulini koji doprinose povećanju razlike u određivanju koncentracije M-proteina imunokemijskom i denzitometrijskom metodom. Ranije objavljeni rezultati upućuju na nelinearni odnos koncentracije M-proteina određene denzitometrijskom i imunokemijskom metodom u području visokih koncentracija (82), a opisan je i nelinearni odnos koji ne ovisi isključivo o koncentraciji M-proteina već i o podrijetlu antitijela u reagensu (50).

Značajno je rasipanje odstupanja rezultata između denzitometrijske PD i imunokemijske metode u skupini s prisutnom pozadinom što upućuje na ograničenje longitudinalnog praćenja bolesnika i sugerira potrebu za praćenjem koncentracije M-proteina u istoj ustanovi istom metodom. S ciljem smanjenja razlika između metoda, Bergon i Miravalles su pokušali računskim modelom primjenjujući empirijske faktore procjeniti koncentraciju M-proteina koristeći koncentracije pojedinih razreda imunoglobulina (83).

Prvi literaturni podatci o imunosuptrakciji kao kvantitativnoj metodi jesu rezultati Schroedera i suradnika (84) koji su izvezli rezultate EPG-a i IS-EPG-a u dodatno programsko rješenje gdje su oduzimanjem površine ispod vrška M-proteina određene TS denzitometrijskom metodom došli do koncentracije M-proteina. Eksperiment su proveli analizirajući 3 uzorka seruma

različitih koncentracija M-proteina. U lipnju 2022. godine objavljen je rad grupe autora koji su predložili drugačiji način integracije površine ispod krivulja u IS-EPG-u i naglasili vrijednost IS-EPG-a u kvantifikaciji M-proteina, osobito onih niže koncentracije te beta migrirajućih (85). U ovom istraživanju u svrhu umjeravanja rezultata, a s ciljem dovođenja u što jaču vezu koncentracije M-proteina i vrijednosti dobivene računskim modelom koji uključuje laboratorijske rezultate imunosuptrakcije, korišten je komercijalni kontrolni materijal. Međutim, rezultati računskih modela koji su uključili podatke iz umjernoga materijala (AD1nIg i D1nIg) pokazuju da odstupanja u koncentraciji M-proteina u odnosu na standardne metode rastu s porastom koncentracije M-proteina. Pretpostavka je da je razlog tome koncentracija M-proteina u korištenom materijalu. Naime, medijan koncentracije M-proteina je bio 12,15 (IQR 7,25-20,95), dok je u korištenom umjernom materijalu najviša koncentracija M-proteina bila 7,4 g/L. Budući je koncentracija M-proteina najčešće >10 g/L (11), potrebno je pronaći prikladniji materijal i dodatno ispitati postavljenu tezu.

Nakon što je korelacijskom analizom pokazano da su vrijednosti razlika u amplitudi vrška M-proteina u IS-EPG-u vrlo dobro povezane i s rezultatima denzitometrijske i imunokemijske metode ispitivani su računski modeli koji su uključili i standardne biokemijske parametre (koncentraciju ukupnih proteina i pojedinih razreda imunoglobulina). Računski modeli koji su uključivali razliku amplituda pokazali su bolju povezanost s rezultatima denzitometrijske nego imunokemijske metode, dok modeli koji su uključivali udio promjene (delta vrijednost) amplitude nisu pokazali razliku u povezanosti između denzitometrijske i imunokemijske metode. Budući je IS-EPG relativan grafički prikaz jasno je prikazano ograničenje razlike naspram promjene udjela (delte) varijabli proizašlih iz IS-EPG-a. Od ispitivanih modela koji su uključivali razliku u amplitudi, samo su rezultati derivirane varijable AD1nIg ostvarili dobru do izvrsnu povezanost s obje standardne metode. Bolji rezultati korelacijske analize računskoga modela AD1nIg ostvareni s rezultatima denzitometrijske nego imunokemijske metode posljedica su uključenosti podatka o koncentraciji ukupnih proteina u računski model koji je ujedno i dio denzitometrijske analize.

Izvrsna povezanost s rezultatima imunokemijske metode ostvarena je sa sva tri računska modela koja su uključivala delta vrijednost amplitude vrška M-proteina, D1Ig, D1nIg i D2Ig. U računskim modelima koji su uključivali delta vrijednost amplitude, D1Ig, D1nIg i D2Ig nađena je bolja povezanost s rezultatima imunokemijske nego denzitometrijske metode što je posljedica izračuna računskoga modela koji je uključivao Ig_{invl}. Nadalje, s istim modelima

ostvarena je i izvrsna povezanost s rezultatima denzitometrijske metode u skupini u kojoj nije bila prisutna pozadina.

Varijabla za koju je osim Ig_{invl} bilo ispitivano može li doprinijeti kvantifikaciji M-proteina računskim modelom jest koncentracija globulina iz EPG-a. No, rezultati istraživanja nisu pokazali korisnost primjene koncentracije globulina u istraživanim računskim modelima. Migracijski položaj nije značajnije utjecao na rezultate korelacija sa standardnim metodama. Viši korelacijski koeficijenti (R_s) pripisani gama migrirajućem položaju mogu biti i posljedica statističke obrade većeg broja rezultata u toj skupini.

Odnos koncentracija M-proteina standardnih metoda i računskih modela AD1nIg, D1Ig, D1nIg i D2Ig ispitan je Passing-Bablokovom regresijskom analizom koja je pokazala da se primjenom D1Ig računskoga modela mogu smanjiti razlike između koncentracija određenih denzitometrijskom i imunokemijskom metodom. U odnosu na denzitometrijsku analizu, ovaj se model može primijeniti bez proporcionalne i sustavne razlike kod bolesnika s monoklonskom gamapatijom karakteriziranom nalazom M-proteina s prisutnom pozadinom. Isti se model može primijeniti i za kvantifikaciju M-proteina bez prisutnosti pozadine isključujući proporcionalne i sustavne razlike u odnosu na imunokemijsku metodu. Rezultati analize D2Ig modela upućuju na to da podatci o delti amplitude albuminske frakcije iz IS-EPG-a ne pridonose točnosti kvantifikacije M-proteina ispitivanim modelom. Računski model koji je uključio razliku u amplitudama pokazao je neprimjenjivost u koncentracijama M-proteina >20 g/L zbog odstupanja većega od dva puta kako u odnosu na rezultate denzitometrijske tako i u odnosu na rezultate imunokemijske metode. Trend u razlici rezultata uočen je i kod D1nIg modela no on nije bio tako izražen kao u modelu s uključenom razlikom amplitude.

Analizom rezultata D1Ig računskoga modela dokazane su manje razlike u rezultatima s obje standardne metode, nego između samih standardnih metoda, denzitometrijske i imunokemijske. D1Ig vrijednosti su više (29,94 %) od onih denzitometrijskih, ali niže (10,41 %) od imunokemijski određenih te time pridonose smanjenju razlika tj. usporedivosti rezultata između dosad primjenjivanih metoda i osiguravaju primjenu jedinstvenoga modela u svih bolesnika s monoklonskom gamapatijom s prihvatljivom netočnošću. Nesrazmjer u većim koncentracijama može se pripisati uključenoj varijabli Ig_{invl}, čiji su nedostaci u visokom koncentracijskom rasponu ranije spomenuti.

Rezultati ispitivanja točnosti koristeći jedini materijal s certificiranom vrijednosti koncentracije M-proteina različitih razreda pokazali su najmanja odstupanja (do 11 %) u rezultatima primjenom D1Ig računskoga modela. Ispitivanjem točnosti, priređivanjem različitih

razrijeđenja referentnih materijala pokazano je da izgled IS-EPG-a ovisi o koncentraciji albumina što do tada nije bilo poznato. Naime, za kvalitativnu metodu namijenjenu analizi serumskoga uzorka nije u uputama proizvođača navedena minimalna koncentracija albumina u uzorku. Koncentracija albumina u priređenim razrjeđenjima je bila izrazito niska (do 7 g/L) i nespojiva sa životom. Ovaj podatak ne ograničava namijenjenu primjenjivost kvalitativne metode, ali je vrijedna nova spoznaja otkrivena prilikom ispitivanja analitičkih karakteristika istraživanih računskih modela.

Pripremom razrjeđenja s otopinom albumina potvrđena je linearnost rezultata D1Ig računskoga modela za sva tri razreda M-proteina u koncentracijskom rasponu od 5 – 30 g/L. Vrijednost prepoznate amplitude kao jednoznačnoga i mjerljivoga parametra u IS-EPG-u uz rezultate preciznosti očituje se i rezultatima ispitivanja utjecaja pozadine na rezultate računskoga modela. Naime, dodavanjem različite količine referentnoga materijala u kontrolne uzorke seruma različitih razina poliklonske pozadine pokazano je da su vrijednosti računskih modela s uključenom delta vrijednosti amplitude vrška neovisne o razini prisutne pozadine.

Uspoređujući analitičke karakteristike standardnih metoda za kvantifikaciju M-proteina i predloženih i ispitanih računskih modela može se zaključiti da računski modeli koristeći podatke iz IS-EPG-a, kvalitativne metode, mogu unaprijediti kvalitetu laboratorijskoga praćenja bolesnika s monoklonskom gamapatijom. D1Ig računski model je osim izvrsne usporedivosti s objema dosadašnjim metodama, pokazao izvanrednu preciznost (KV do 3,1 %) neovisnu o migracijskom položaju, koncentraciji M-proteina i razini prisutne pozadine. U literaturnim izvorima ne nalaze se podatci o ispitivanju mjernoga raspona denzitometrijske i imunokemijske metode u smislu kvantifikacije M-proteina, vjerojatno zbog nemogućnosti isključenja komigrirajućih proteina, poliklonski sintetiziranih imunoglobulina i beta migrirajućih proteina. Vavricka je opisao zanimljiv postupak uklanjanja C3 komponente komplementa i transferina iz seruma, kojim bi se unaprijedila točnost određivanja beta migrirajućih M-proteina (76). U Nizozemskoj je putem organizatora vanjske procjene kvalitete ispitivana točnost određivanja koncentracije M-proteina od 5 g/L. Ostvarena odstupanja između laboratorija bila su do 40 % (86).

Trenutno ne postoji jedinstvena metoda kojom se može pouzdano u svih bolesnika s monoklonskom gamapatijom pratiti koncentracija M-proteina (72). S ciljem uvida u pouzdanost određivanja standardnim metodama organizirana je međunarodna studija koja je uključila 16 institucija, a čiji su rezultati pokazali zadovoljavajuću unutarlaboratorijsku varijabilnost uz viši KV u laboratorijima koji su koristili TS nego u onima s primjenjenom PD

denzitometrijskom metodom (87). Međutim, razlike u kvantifikaciji M-proteina između laboratorija bile su velike te je izostala preporuka o mogućnosti uspoređivanja rezultata čak ni laboratorija koji su koristili istu metodu (88) kako se ne bi ugrozila sigurnost bolesnika budući se koncentracija koristi za procjenu terapijskoga učinka i jedan je od kriterija za uključivanje bolesnika u kliničke studije (89).

Preduvjet za primjenu predloženih računskih modela je detekcija vrška M-proteina u IS-EPG-u kao i razredi M-proteina G, A i M. To ujedno znači da za određivanje monoklonskih sintetiziranih lakih lanaca imunoglobulina koji se u EPG-u ne uočavaju kao vršak neće biti moguće primijeniti ispitivane računske modele. Nadalje, računski modeli uključuju Ig_{invl} čija je sinteza tada suprimirana. Navedeno ne predstavlja značajno ograničenje predloženih računskih modela budući da su dostupni osjetljivi FLC mjerni postupci za praćenje bolesnika s monoklonskom gamapatijom lakih lanaca (1.3.4.). Iz istoga razloga istraživani pristup isključuje mogućnost kvantifikacije M-proteina razreda IgD i IgE, premda je monoklonska sinteza IgD i IgE vrlo rijetka (do 1,8 % monoklonskih gamapatija) (90) i najčešće se dokazuje i prati u malobrojnim hematološkim centrima izvrsnosti.

Ispitivani modeli ne isključuju u potpunosti poznate nedostatke imunokemijske metode kao što je rijetko neprepoznavanje epitopa na molekuli M-proteina, no upravo prepoznavanje nakupljanja molekula iste elektroforezne pokretljivosti omogućuje detekciju navedenoga nedostatka. S ciljem smanjenja utjecaja navedenoga nedostatka ispitivani su modeli koji uz Ig_{invl} uključuju i koncentraciju ukupnih proteina, AD1nIg i D1nIg. Kako je već spomenuto, varijable s uključenom delta vrijednosti amplitude doprinose korelaciji rezultata sa standardnim metodama te bi varijablu D1nIg koja uključuje i koncentraciju ukupnih proteina bilo vrijedno u budućnosti dalje istražiti koristeći primjereniji umjerni materijal.

6. ZAKLJUČCI

Za određivanje koncentracije M-proteina nije dostupan jednoznačan i široko prihvaćen pristup odnosno metoda. U ovom doktorskom radu opisani su i istraženi različiti računski postupci za kvantitativno određivanje serumskoga M-proteina u bolesnika s monoklonskom gamapatijom metodom imunosuptrakcije čime je ostvaren glavni cilj istraživanja. Rezultati procjene analitičkih karakteristika predloženih računskih modela pokazuju da su ostvareni i specifični ciljevi ovoga istraživanja. Stoga, rezultati slijedom provedenoga istraživanja potvrđuju postavljenu hipotezu da je modelom razvijenim iz podataka rezultata imunosuptrakcije moguće kvantitativno određivanje M-proteina u serumu te upućuju na sljedeće zaključke.

- Povezujući kvantitativne podatke kvalitativne metode imunosuptrakcije s koncentracijom ukupnih proteina i koncentracijom razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina, moguće je odrediti koncentraciju M-proteina.
- Računski modeli koji uključuju promjenu vrijednosti amplitude (delta vrijednost), D1Ig, D2Ig i D1nI, ostvaruju bolje rezultate usporedbi sa standardnim metodama za kvantifikaciju M-proteina nego računski modeli koji uključuju razliku u amplitudi krivulja u IS-EPG-a, AD, ADn, AD1nIg, AD2nIg i ADnG.
- Koncentracija globulina ne pridonosi jačini povezanosti rezultata ispitivanih računskih modela sa rezultatima standardnih metoda.
- Koncentracije M-proteina u umjernom materijalu ograničavaju mjerni raspon istraženih računskih modela.
- Računski model D1Ig, koji uz podatke iz IS-EPG-a obuhvaća koncentraciju $Ig_{invl,}$ može se koristiti naizmjenično s denzitometrijskom metodom za određivanje koncentracije M-proteina koji se prikazuje uz prisutnu pozadinu.
- Računski model D1Ig, koji uz podatke iz IS-EPG-a obuhvaća koncentraciju Ig_{invl}, može se koristiti naizmjenično s imunokemijskom metodom za određivanje koncentracije M-proteina koji se prikazuje bez prisutne pozadine.
- Primjena D1Ig računskoga modela pridonosi boljoj usporedivosti rezultata koncentracije M-proteina naspram primjene denzitometrijske i imunokemijske metode.
- Podatci amplituda albuminske frakcije iz IS-EPG-a nisu unaprijedili usporedivost rezultata računskih modela s denzitometrijskom metodom.
- Mjerni raspon računskih modela AD1nIg, D1Ig, D2Ig, D1nIg ovisi o koncentraciji albumina.
- Točnost određivanja koncentracije M-proteina primjenom istraženih računskih modela AD1nIg, D1Ig, D2Ig, D1nIg ne ovisi o prisutnosti pozadine.

- Linearnost D1Ig računskoga modela do koncentracije od 25 g/L ne ovisi o razredu M-proteina.
- Veća je preciznost određivanja koncentracije M-proteina istraženim računskim modelima AD1nIg, D1Ig, D2Ig, D1nIg naspram denzitometrijske metode.
- Preciznost računskih modela AD1nIg, D1Ig, D2Ig, D1nIg, za razliku od standardnih denzitometrijskih načina kvantifikacije M-proteina (PD i TS), ne ovisi o migracijskom položaju M-proteina niti o prisutnoj poliklonskoj gama globulinskoj pozadini.
- D1Ig računski model moguće je primjeniti kao jedinstveni pristup kvantifikaciji M-proteina u bolesnika s monoklonskom gamapatijom razreda IgG, IgA i IgM s prepoznatljivim vrškom u IS-EPG-u, neovisno o prisutnoj pozadini.

7. LITERATURA

1. Kyle RA. Multiple myeloma: how did it begin? Mayo Clin Proc. 1994;69:680–83.

2. Rajkumar SV. Multiple myeloma. Curr Probl Cancer. 2009;33:7–64.

3. Rajkumar SV. Updated diagnostic criteria and staging system for multiple myeloma. Am Soc Clin Oncol Educ B. 2016;36:418–23.

4. HZJZ. HZJZ, Registar za rak – Croatian National Cancer Registry INCIDENCIJA RAKA U HRVATSKOJ Bilten 2019. Bilten. 2019;44.

5. Wadhera RK, Rajkumar SV. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance: A systematic review. Mayo Clin Proc. 2010;85:933–42.

6. Mouhieddine TH, Weeks LD, Ghobrial IM. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Blood. 2019;133:2484–94.

7. Landgren O, Kristinsson SY, Goldin LR, Caporaso NE, Blimark C, Mellqvist UH i sur. Risk of plasma cell and lymphoproliferative disorders among 14 621 first-degree relatives of 4458 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance in Sweden. Blood. 2009;114:791–5.

8. Kazandjian D, Branch LM. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. Semin Oncol. 2017;43:676–81.

9. Rögnvaldsson S, Love TJ, Thorsteinsdottir S, Reed ER, Óskarsson JÞ, Pétursdóttir Í i sur. Iceland screens, treats, or prevents multiple myeloma (iStopMM): a population-based screening study for monoclonal gammopathy of undetermined significance and randomized controlled trial of follow-up strategies. Blood Cancer J. 2021;11.

10. The PROMISE study [Internet]. Dostupno na: https://www.enroll.promisestudy.org/

11. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A i sur. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. Mayo Clin Proc. 2003;78:21–33.

12. Turesson I, Bjorkholm M, Blimark CH, Kristinsson S, Velez R, Landgren O. Rapidly changing myeloma epidemiology in the general population: Increased incidence, older patients, and longer survival. Eur J Haematol. 2018;101:237–44.

13. Lynch HT, Sanger WG, Pirruccello S, Quinn-Laquer B, Weisenburger DD. Familial multiple myeloma: A family study and review of the literature. J Natl Cancer Inst. 2001;93:1479–83.

14. Grass S, Preuss KD, Thome S, Weisenburger DD, Witt V, Lynch J i sur. Paraproteins of familial MGUS/multiple myeloma target family-typical antigens: Hyperphosphorylation of autoantigens is a consistent finding in familial and sporadic MGUS/MM. Blood. 2011;118:635–7.

15. Zwick C, Held G, Auth M, Bernal-Mizrachi L, Roback JD, Sunay S i sur. Over one-third of African American MGUS and multiple myeloma patients are carriers of hyperphosphorylated paratarg-7, an autosomal dominantly inherited risk factor for MGUS/MM. Int J Cancer. 2014;135:934–8.

16. Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, Cole P, Mandel JS, Oken MM i sur. Multiple myeloma: A review of the epidemiologic literature. Int J Cancer. 2007;120:40–61.

17. Keren DF. Immunofixation technique. U: High-resolution electrophoresis and immunofixation: techniques and interpretation. 2. izd. Newton, SAD: Butterworth-Heinemann; 1994:107-30.

18. Çiftçiler R, Göker H, Demiroğlu H, Haznedaroğlu İC, Sayınalp N, Aksu S i sur. Evaluation of prognostic significance of the international staging system according to glomerular filtration rate in newly diagnosed multiple myeloma patients eligible for autologous stem cell transplantation. Turkish J Hematol. 2021;38:33–40.

19. Sakhuja V, Jha V, Varma S, Joshi K, Gupta KL, Sud K i sur. Renal involvement in multiple myeloma: A 10-year study. Ren Fail. 2000;22:465–77.

20. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK i sur. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. Blood. 2008;111:2516–20.

21. Bird SA, Boyd K. Multiple myeloma: an overview of management. Palliat Care Soc Pract. 2019;13:1–13.

22. Hoda D, Richards R, Faber EA, Deol A, Bradley D, Crivera C i sur. Process, resource and success factors associated with chimeric antigen receptor T-cell therapy for multiple myeloma. Future Oncol. 2022;18:2415-31.

23. Wu L, Huang Y, Sienkiewicz J, Sun J, Guiang L, Li F i sur. Bispecific BCMA-CD3 antibodies block multiple myeloma. Cancers (Basel). 2022;14:2518.

24. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response

assessment of multiple myeloma. Leukemia. 2009;23:3-9.

25. Rajkumar SV. Updated diagnostic criteria and staging system for multiple myeloma. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2016;35:418-23.

26. Hart AJ, Jagasia MH, Kim AS, Mosse CA, Savani BN, Kassim A. Minimal residual disease in myeloma: are we there yet? Biol Blood Marrow Transplant. 2012;18:1790–9.

27. Kyle RA, Vincent Rajkumar S. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Br J Haematol. 2006;134:573–89.

28. Baker KR. Light chain amyloidosis: epidemiology, staging, and prognostication. Methodist Debakey Cardiovasc J. 2022;18:27–35.

29. Girard LP, Soekojo CY, Ooi M, Poon LM, Chng WJ, de Mel S. Immunoglobulin M paraproteinaemias. Cancers (Basel). 2020;12:1–21.

30. Askari E, Rodriguez S, Garcia-Sanz R. Waldenström's macroglobulinemia: An exploration into the pathology and diagnosis of a complex B-cell malignancy. J Blood Med. 2021;12:795–807.

31. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, Rajkumar S V, San Miguel J, Chanan-Khan A i sur. International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. Blood. 2011;117:4701-5.

32. Howard BM, Kuh A, Rezavi LA, Caturegli P. A Comparison of gel (Hydragel 30) and capillary (Capillarys III Tera) electrophoresis for the characterization of human serum proteins. Pract Lab Med. 2021;25:e00233.

33. Kostal V, Katzenmeyer J, Arriaga EA. Capillary electrophoresis in bioanalysis. Anal Chem. 2008;80:4533–50.

34. Henskens YMC, Van Dieijen-Visser MP. Capillary zone electrophoresis as a tool to detect proteins in body fluids: Reproducibility, comparison with conventional methods and a review of the literature. Ned Tijdschr voor Klin Chemie. 2000;25:219–29.

35. Method Insert Package for Cobas 6000 analyzer series, 2008-04, V 1.0, Roche Diagnostics 2008.

36. Tetrault GA. Nephelometry and turbidimetry. U: Haven M, Tetrault G, Schenken J, ur.

Laboratory Instrumentation. 4. izd. New York, SAD: Wiley; 1995.

37. Keren DF, Schroeder L. Challenges of measuring monoclonal proteins in serum. Clin Chem Lab Med. 2016;54:947-61.

38. Batinić J, Perić Z, Segulja D, Last J, Prijić S, Dubravčić K i sur. Immunoglobulin heavy/light chain analysis enhances the detection of residual disease and monitoring of multiple myeloma patients. Croat Med J. 2015;56:263-71.

39. Fleming CKA, Swarttouw T, De Kat Angelino CM, Jacobs JFM, Russcher H. Method comparison of four clinically available assays for serum free light chain analysis. Clin Chem Lab Med. 2019;58:85–94.

40. Jenner E. Serum free light chains in clinical laboratory diagnostics. Clin Chim Acta. 2014;427:15-20.

41. Di Noto G, Cimpoies E, Dossi A, Paolini L, Radeghieri A, Caimi L i sur. Polyclonal versus monoclonal immunoglobulin-free light chains quantification. Ann Clin Biochem. 2015;52:327–36.

42. Šegulja D, Matišić D, Barišić K, Rogić D. Verification study of free light chains assays on reagent-optimized analyser. Biochem Med. 2019;29:1–8.

43. Immunofixation, immunosubtraction, and immunoselection techniques. U: Keren DF. Protein electrophoresis in clinical diagnosis. Hodder Arnold, London, V. Britanija; 2003:33-62.

44. Šegulja D. Definiranje razreda i tipa monoklonskoga imunoglobulina metodom imunosuptrakcije. U: Matišić D, ur. Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija-2014. HKMB, Medicinska naklada; 2014:53–8.

45. Aguzzi F, Poggi N. "Immunosubtraction" electrophoresis: a simple method for identifying specific proteins producing the cellulose acetate electrophoretogram. Boll Ist Sieroter Milan. 1977;56:212-6 .

46. White WA, Attwood EC. Immunofixation and immunosubtraction on agarose gel: an aid in the typing of monoclonal gammopathies. Ann CLin Biochem 1984;21:467-70

47. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA, Gorevic PD, Kyle RA, Tomar RH. Guidelines for clinical and laboratory evaluation patients with monoclonal gammopathies. Arch Pathol

Lab Med. 1999;123:106-7.

48. Tate JR, Smith JD, Wijeratne N, Mollee P. Proposed addendum to 2012 recommendations for standardised reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. Clin Biochem Rev. 2019;40:23–30.

49. Sthaneshwar P, Thambiah SC, Mat Salleh MJ, Nasuruddin DN, Ahmad Zabidi NF, Jelani AM i sur. Survey on serum protein electrophoresis and recommendations for standardised reporting. Malays J Pathol. 2021;43:281–90.

50. Riches PG, Sheldon J, Smith AM, Hobbs JR. Overestimation of monoclonal immunoglobulin by immunochemical methods. Ann Clin Biochem. 1991;28:253–9.

51. Murray DL, Ryu E, Snyder MR, Katzmann JA. Quantitation of serum monoclonal proteins: Relationship between agarose gel electrophoresis and immunonephelometry. Clin Chem. 2009;55:1523–9.

52. Schild C, Wermuth B, Trapp-Chiappini D, Egger F, Nuoffer JM. Reliability of M protein quantification: Comparison of two peak integration methods on Capillarys 2. Clin Chem Lab Med. 2008;46:876–7.

53. Tate JR, Graziani MS, Mollee P, Merlini G. Protein electrophoresis and serum free light chains in the diagnosis and monitoring of plasma cell disorders: Laboratory testing and current controversies. Clin Chem Lab Med. 2016;6:899-905.

54. Valentine HDA. The effect of paraprotein polymerisation on quantitation by capillary zone electrophoresis and Hevylite®. Ann Clin Biochem. 2021;58:586-92.

55. INSTAND e.V. Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e. V. INSTAND [Internet]. Dostupno na: https://www.instand-ev.de/en/instand-eqas/eqa-program/

56. Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of precision and estimation of bias; approved guideline. 3. izd. Wayne, PA, SAD: CLSI; 2014. CLSI document EP15-A3.

57. Desirable Biological Variation Database specifications [Internet]. Dostupno na: https://www.westgard.com/biodatabase1.htm

58. The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)

Biological Variation Database. Dostupno na: https://biologicalvariation.eu/

59. Capillarys Protein(e) 6, Instructions for use. Sebia, Lisses, Francuska, 07/2018

60. Hydragel 1,2,4 &9 IF Dynamic mask, Instructions for use. Sebia Lisses, Francuska, 6/2018

61. Capillarys Immunotyping, Instructions for use. Sebia, Lysses, Francuska; 4/2019

62. Simundic AM. Practical recommendations for statistical analysis and data presentation in Biochemia Medica journal. Lessons in biostatistics. Biochem Med 2012;22:15–23.

63. Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. What we need to know when calculating the coefficient of correlation? 2007;17:10–5.

64. Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. Biochem Med 2011;21:49-52

65. Šegulja D, Matišić D, Barišić K, Rogić D. A novel approach for more precise quantification of M-protein using variables derived from immunosubtraction electropherogram and associated biochemistry analytes. Biochem Med 2022;32:030703 (prije tiska)

66. Paolini L, Di Noto G, Maffina F, Martellosio G, Radeghieri A, Luigi C i sur. Comparison of HevyliteTM IgA and IgG assay with conventional techniques for the diagnosis and follow-up of plasma cell dyscrasia. Ann Clin Biochem. 2015;52:337–45.

67. Ting HY, Sthaneshwar P, Bee PC, Shanmugam H, Lim M. Heavy/light chain assay in the monitoring of multiple myeloma. Pathology. 2019;51:507–11.

68. Jacobs JFM, Haagen I-A, Lodder A, van der Kroft C, de Kat Angelino CM, Croockewit S i sur. Analytical validation of the Hevylite assays for M-protein quantification. Clin Chem Lab Med. 2018;56:1169–75.

69. Cigliana G, Gulli F, Napodano C, Pocino K, De Santis E, Colacicco L i sur. Serum free light chain quantitative assays: Dilemma of a biomarker. J Clin Lab Anal. 2018 Feb;32:e22243.

70. Lavatelli F, Palladini G, Merlini G. Perspectives in developments of mass spectrometry for improving diagnosis and monitoring of multiple myeloma and other plasma cell disorders. Clin Chem Lab Med. 2021;59:633–5.

71. Murray DL, Puig N, Kristinsson S, Usmani SZ, Dispenzieri A, Bianchi G i sur. Mass spectrometry for the evaluation of monoclonal proteins in multiple myeloma and related disorders: an International Myeloma Working Group Mass Spectrometry Committee Report. Blood Cancer J. 2021;11:4–9.

72. Willrich MAV, Katzmann JA. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. Clin Chem Lab Med. 2016;54:907-19

73. Cao X, Meng Q, Mao Y, Su W, Zhen J, Shen K i sur. The clinical spectrum of IgM monoclonal gammopathy: A single center retrospective study of 377 patients. Leuk Res. 2016;46:85-8

74. Carlizzi G, Ciarla MV, Di Luzio A, Labriola R, Frattolillo D, Spiridigliozzi P i sur. Autoantibodies in patients with monoclonal gammopathies. Ann N Y Acad Sci. 2007 Jun;1107:206–11.

75. Agnello V. The etiology and pathophysiology of mixed cryoglobulinemia secondary to hepatitis C virus infection. Springer Semin Immunopathol. 1997;19:111–29.

76. Vavricka SR, Burri E, Beglinger C, Degen L, Manz M. Serum protein electrophoresis: an underused but very useful test. Digestion. 2009;79:203–10.

77. Whicher JT, Calvin J, Riciies P, Warren C. The laboratory investigation of paraproteinaemia. Ann Clin Biochem. 1987;24:119–32.

78. Bossuyt X. Separation of serum proteins by automated capillary zone electrophoresis. Clin Chem Lab Med 2003;41:762-72.

79. Šegulja D, Šparakl T, Rogić D. Applied capillary electrophoresis system affects screening for monoclonal gammopathy in serum: verification study of two eight-capillary systems. Scand J Clin Lab Invest. 2022;82:85-89.

80. Secchiero S, Sciacovelli L, Plebani M. Performance evaluation of 14 specific proteins measurement checked by an External Quality Assessment Scheme. Clin Chim Acta. 2020;502:73–83.

81. Cárdenas Fernández MC, Pérez Surribas D, Pérez Garay R, Jiménez Jiménez J, Gella Concustell A, Zapico Muñiz E i sur. Vertical cutoff methods in serum protein electrophoresis for the measurement of monoclonal protein concentrations: Which is

best? Clin Chim Acta. 2020;510:573–80.

82. 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. Arch Pathol Lab Med. 2021;145:1552–7.

83. Bergón E, Miravalles E. Estimation of serum M-protein concentration from polyclonal immunoglobulins: An alternative to serum protein electrophoresis and standard immunochemical procedures. Clin Chem Lab Med. 2008;46:1156–62.

84. Schroeder LF, Huls F, Williams CL, Li SH, Keren DF. A novel approach to estimating M-protein concentration: capillary electrophoresis quantitative immunosubtraction. J Appl Lab Med. 2018;2:914–9.

85. Cho H, Jung J, Chae H, Joong Lee J, Kim M, Oh E-J i sur. Assessment of M-protein quantification using capillary electrophoresis and immunosubtraction-based integration in clinical samples with low M-protein concentrations. Clin Biochem. 2022 Jun 1:S0009-9120(22)00140-0. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2022.05.011. Epub prije tiska.

86. de Kat Angelino CM, Jacobs JFM. External quality assessment of M-protein diagnostics: a realistic impression of the accuracy and precision of M-protein quantification. Clin Chem Lab Med. 2021;59:1063-68.

87. Turner KA, Frinack JL, Ettore MW, Tate JR, Graziani MS, Jacobs JFM i sur. An international multi-center serum protein electrophoresis accuracy and M-protein isotyping study. Part I: Factors impacting limit of quantitation of serum protein electrophoresis. Clin Chem Lab Med. 2020;58:533–46.

88. Jacobs JFM, Turner KA, Graziani MS, Frinack JL, Ettore MW, Tate JR i sur. An international multi-center serum protein electrophoresis accuracy and M-protein isotyping study. Part II: limit of detection and follow-up of patients with small M-proteins. Clin Chem Lab Med. 2020;58:547–59.

89. Plebani M. New insights on the analytical performances for detecting and quantifying monoclonal proteins. Clin Chem Lab Med. 2020;58:457–9.

90. Vladutiu AO. Immunoglobulin D: Properties, measurement, and clinical relevance. Clin Diagn Lab Immunol. 2000;7:131–40.

8. POPIS KRATICA

a1 – amplituda vrška albuminske frakcije poslije imunoprecipitacije

a2 – amplituda vrška albuminske frakcije nativnoga uzorka

AD – računski model, razlika u amplitudi M–vrška u imunosuptrakcijskom elferogramu

ADn – računski model, razlika u amplitudi M–vrška u imunosuptrakcijskom elferogramu u odnosu na razliku amplitude u umjernom materijalu

AD1nIg – računski model koji uz podatke iz ADn modela uključuje podatke o ukupnim proteinima i koncentraciji izotipa teškoga lanca imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina u serumskom i umjernom materijalu

AD2nIg – računski model koji uz podatke iz AD1nIg modela uključuje podatke o amplitudi albuminske frakcije u imunosuptrakcijskom elferogramu

ADnG – računski model koji uz podatke iz ADn modela uključuje podatak o koncentraciji globulina

BJP – Bence Jones protein

CAR-T (engl. *Chimeric antigen receptor T cells*) – limfociti T s kimeričnim antigenom dobiveni genetičkim inženjerstvom

CI (engl. *Confidence interval*) – interval pouzdanosti

CR (engl. *Complete response)* – kompletan terapijski odgovor

CRAB (engl. *Hipercalcemia, renal insufficiency, anemia, osteolytic lessions*) – hiperkalcemija, renalna insuficijencija, anemija, osteolitička žarišta

CT – kompjutorska tomografija

D1Ig – računski model koji povezuje deltu amplitude M-vrška u imunosuptrakcijskom elferogramu s koncentracijom razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina

D1nIg – računski model koji uz deltu amplitude M-vrška uključuje podatke o ukupnim proteinima i koncentraciji razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina u serumskom i umjernom materijalu

D2Ig – računski model koji uz podatke iz D1Ig modela uključuje podatke o amplitudi albuminske frakcije u imunosuptrakcijskom elferogramu

del(17p) – delecija kromosoma 17 na kraćem (p) kraku kromosoma

EPG – elferogram serumskih proteina

Fc fragment (engl. *Fragment crystallizable region)* – Fc fragment imunoglobulina čine dva teška lanca

FLC (engl. *Free light chains kapa and lambda*) – slobodni laki lanci imunoglobulina kapa i lambda

HIV – virus humane imunodeficijencije

HLC (engl. *Heavy light chain*) – imunoglobulin odgovarajućega razreda i tipa

IgA – imunoglobulin razreda A

IgAκ – imunoglobulin razreda A i kapa tipa

IgAλ – imunoglobulin razreda A i lambda tipa

IgD – imunoglobulin razreda D

IgE – imunoglobulin razreda E

IgG – imunoglobulin razreda G

IgGκ – imunoglobulin razreda G i kapa tipa

IgGλ – imunoglobulin razreda G i lambda tipa

IgM – imunoglobulin razreda M

Ig_{invl} – razred imunoglobulina uključen u sintezu M-proteina

IMWG (engl. *International Myeloma Working Group*) – Međunarodna radna skupina za multipli mijelom

IQR – interkvartilni raspon

IS-EPG – imunosuptrakcijski elferogram

ISS sustav (engl. *International Staging System*) – međunarodni sustav klasifikacije bolesti

iSTOPMM (engl. *Iceland Screens Treats and Prevents Multiple Myeloma*) – Island pretražuje, liječi i prevenira multipli mijelom

KE – kapilarna elektroforeza

KV – koeficijent varijacije

KZLD – Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku

M1 – amplituda vrška M-proteina nativnoga uzorka

M2 – amplituda globulinske krivulje na mjestu vrška M-proteina poslije imunoprecipitacije

MGNZ – monoklonska gamapatija neutvrđenoga značenja

MM – multipli mijelom

M-protein – monoklonski protein

MR – magnetska rezonancija

PET-CT – pozitronska emisijska tomografija udružena s kompjutorskom tomografijom

PD (engl. *Perpendicular drop method*) – denzitometrijska metoda ortogonalne projekcije na baznu liniju elferograma serumskih proteina

pP-7 – Paratarg-7 protein

PR (engl. *Partial response*) – djelomični terapijski odgovor

PROMISE (engl. *Predicting Progression of Developing Myeloma in a High-Risk Screened Population*) – studija predviđanja progresije razvoja mijeloma u visoko rizičnoj populaciji

r – Pearsonov koeficijent korelacije

R_s – Spearmanov koeficijent korelacije

RISS (engl. *Revised International Staging System*) – revidirani međunarodni sustav klasifikacije bolesti

sCR (engl. *Stringent complete response*) – kompletan terapijski odgovor u restriktivnim uvjetima

Sefaroza (engl. *Sepharose, Separation-Pharmacia-Agarose)* – polisaharidni polimer

t(4;14), t(14;16), t(11;14) – translokacije kromosoma (npr. 4 na 14 i sl.)

TS (engl. *Tangent skimming method*) – metoda linearnoga otklona u točkama tangencije M-proteina

VGPR (engl. *Very good partial response*) – vrlo dobar djelomični odgovor

κ – laki lanci imunoglobulina tipa kapa

λ – laki lanci imunoglobulina tipa lambda

κ – porodica gena koja kodira lake lance imunoglobulina tipa kapa

λ – porodica gena koja kodira lake lance imunoglobulina tipa lambda

H – porodica gena koja kodira teške lance imunoglobulina

9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Dragana Šegulja rođena je 27. lipnja 1981. u Rijeci. Osnovnu školu pohađala je u Novom Vinodolskom, opću gimnaziju u Srednjoj školi dr. Antuna Barca u Crikvenici, a studirala Medicinsku biokemiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 2004. god. nakon izrade praktičnoga dijela diplomskoga rada na Fakultetu za farmaciju u Ljubljani u sklopu programa razmjene studenata CEEPUS. Specijalizaciju iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine započinje 2012. god. Poslijediplomski specijalistički studij Medicinska biokemija i laboratorijska medicina završava 2015. god., a specijalistom medicinske biokemije i laboratorijske dijagnostike postaje 2017. god.

Od 2004. god. do 2010. god. radila je u Medicinsko-biokemijskom laboratoriju Klinike za plućne bolesti Jordanovac. Od 2010. god. do danas radi u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb gdje su joj područja interesa dijagnostika monoklonskih gamapatija, krioglobulinemija, hemoglobinopatija, bolesti bubrega i malignih bolesti te nove elektroforetske tehnike i imunokemijske metode. Aktivno je sudjelovala u pripremi laboratorija za ispunjenje zahtjeva norme HR ISO 15189.

Član je strukovnih udruženja: Hrvatskoga društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (član Povjerenstva za trajno usavršavanje u periodu 2012.-2014.), Hrvatske komore medicinskih biokemičara, Registra europskih specijalista laboratorijske medicine te EFLM Akademije. Od 2014. god. do 2015. god. bila je voditelj radne grupe Distance education and e-learning pri Europskoj federaciji za laboratorijsku medicinu (EFLM).

Sudjeluje u nastavnom procesu više kolegija Zdravstvenoga veleučilišta, Medicinskoga fakulteta i Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta u Zagrebu.

Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Autor je i koautor 14 članaka objavljenih u časopisima indeksiranim u Current Contents bazi, 7 sažetaka kongresnih priopćenja objavljenih u časopisima s međunarodnom recenzijom te 3 poglavlja u udžbenicima i priručnicima.

Popis objavljenih radova i kongresnih priopćenja

Radovi objavljeni u časopisima indeksiranima u bazama

Current Contents i *Web of Science Core Collection*

1. Lapić I, Rogić D, Šegulja D, Kozmar A, Kmet M, Đerek L, et al. Unusual total anti-SARS-CoV-2 antibody kinetics observed during longitudinal monitoring after BNT162b2 vaccination. Scand J Clin Lab Invest 2022, DOI: 10.1080/00365513.2022.2123388 Ahead of print

2. Šegulja D, Matišić D, Barišić K, Rogić D. A novel approach for more precise quantification of M-protein using variables derived from immunosubtraction electropherogram and associated biochemistry analytes. Biochem Med 2022;32:030703

3. Lapić I, Šegulja D, Dukić K, Bogić A, Lončar Vrančić A, Komljenović S, et al. Analytical validation of 39 clinical chemistry tests and 17 immunoassays on the Alinity analytical system. Scand J Clin Lab Invest 2022;82:199-209

4. Šegulja D, Šparakl T, Rogić D. Applied capillary electrophoresis system affects screening for monoclonal gammopathy in serum: verification study of two eight-capillary systems. Scand J Clin Lab Invest 2022;82:85-9

5. Krbot Skorić M, Rogić D, Lapić I, Šegulja D, Habek M. Humoral immune response to COVID-19 vaccines in people with secondary progressive multiple sclerosis treated with siponimod. Correspondence in Mult Scler Relat Disord 2022;57:103435

6. Lapić I, Rogić D, Šegulja D, Zaninović Lj, Antibody response and self-reported adverse reactions following vaccination with Comirnaty: a pilot study from a Croatian university hospital. J Clin Pathol 2021;0:1–5

7. Habek M, Brecl GJ, Bašić Kes V, Rogić D, Barun B, Gabelić T, Emeršič A, Horvat Ledinek A, Grbić N, Lapić I, Šegulja D, Đurić K, Adamec I, Krbot Skorić M. Humoral immune response in convalescent COVID-19 people with multiple sclerosis treated with high-efficacy disease-modifying therapies: A multicenter, case-control study. J Neuroimmunol, 2021;359:577696

8. Lapić I, Šegulja D, Rogić D. Assessment of salivary antibody response to BNT162b2mRNA COVID-19 vaccination. Letter to the Editor in J Med Virol, 2021;1–3

9. Lapić I, Rogić D, Šegulja D, Kralik Oguić S, Knežević J. The reliability of SARS-Cov-2 IgG antibody testing - a pilot study in asymptomatic healthcare workers in a Croatian university hospital. Croat Med J, 2020;61:485-90

10. Šegulja D, Matišić D, Barišić K, Rogić D. Verification study of free light chains assays on reagent-optimized analysers. Biochem Med, 2019; 29:3, 579-86

11. Šegulja D, Matišić D, Honović L, Batinić J, Rogić D. Unusual pattern in haemoglobin electrophoresis in Croatian population: a case report. Biochem Med, 2016;3:451-6

12. Miler M, Nikolac N, Šegulja D, Kackov Maslac S, Čelap I, Altabas K, Šefer S, Šimundić AM. Is peritoneal dialysis causing a measurable burden of inflammatory and endothelial injury on top of metabolic syndrome? J Endocrinol Invest, 2016; 40:163-8

13. Batinić J, Perić Z, Šegulja D, Last J, Prijić S, Dubravčić K, Volarić L, Sertić D, Radman I, Bašić-Kinda S, Matišić D, Batinić D, Labar B, Nemet D. Immunoglobulin heavy/light chain analysis enhances the detection of residual disease and monitoring of multiple myeloma patients. Croat Med J, 2015;56:263-71

14. Špehar M, Zovko V, Šegulja D, Zrinski Topić R, Dodig S. Examination of seasonal difference in serum interleukin-17 and interleukin-5 concentration in ragweed-sensitized children. Aerobiologia 2011:1-7

Sažeci kongresnih priopćenja objavljeni u knjigama sažetaka s međunarodnom recenzijom

1. Šparakl T, Šegulja D, Rogić D. Analytical issues in lipoprotein(a) determination and their impact on assessing the therapeutic effect. Clin Chem Lab Med 2021;59:S182

2. Sertić Z, Lucijanic M, Bašić-Kinda S, Serventi Seiwerth R, Periša V, Sertić D, Coha B, Pulanic D, Šegulja D, Rogić D, Valkovic T, Aurer I, Durakovic N. Serologic Responses Following Sars-Cov-2 Vaccination and Factors Influencing It in Patients with Hematological Malignant and Non-Malignant Diseases - a Prospective Multicentric Study. Blood 2021;138:47

3. Radišić Biljak V, Čičak H, Šegulja D, Šimundić AM. An Unusually High Plasma Cobalamin in a Male Patient. Clin Chem 2020;6:858-9

4. Dojder A, Vuljanić D, Kuktić I, Radišić Biljak V, Šegulja D, Nikolac Gabaj N, Šimundić A. Dealing with interferences caused by presented M- protein. Clin Chem Lab Med 2019;104

5. Segulja D, Matisic D, Rogic D, Tesija Kuna A, Vukasovic I, Vrkic N, Batinic J, Nemet D. Quantitative assay of immunoglobulin free light chains (FLC): Evaluation of monoclonal versus polyclonal antibody and immunoturbidimetric versus immunonephelometric detection technology. Blood 2014;124:21

6. Batinic J, Peric Z, Segulja D, Last J, Perkovic S, Dubravcic K, Volaric L, Sertic D, Radman I, Basic Kinda S, Matisic D, Batinic D, Labar B, Nemet D. Clinical utility of heavy/light chain assay for evaluation and prognostication in multiple myeloma patient. Blood 2014;124:21

7. Matisic, D; Segulja, D; Sertic, J. Detection and the characterization of monoclonal proteins in serum: immunofixation electrophoresis (IFE) or immunosubtraction electrophoresis (ISE). Clin Chem Lab Med 2011;49, S1124

Poglavlja u udžbenicima i priručnicima

1. Šegulja Dragana, Matišić Danica. Laboratorijska dijagnostika krioglobulinemija. U Klinička biokemija i molekularna dijagnostika, Sertić, Jadranka (ur.), Medicinska Naklada, 2015., str. 485-9

2. Šegulja Dragana. Definiranje razreda i tipa monoklonskoga imunoglobulina metodom imunosuptrakcije. U Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija 2014, Matišić, Danica (ur.), Medicinska Naklada za HKMB, 2014.

3. Šegulja Dragana, Peroš-Golubičić Tatjana. Serum pneumoproteins as biomarkers of interstitial lung disease. U Lung in non-pulmonary and systemic disease, Peroš-Golubičić, Tatjana (ur.), Medicinska Naklada, 2013., str. 257-60

10. PRILOG

A novel approach for more precise quantification of M-protein using variables derived from immunosubtraction electropherogram and associated biochemistry analytes

Dragana Šegulja*[1], Danica Matišić[2], Karmela Barišić[3], Dunja Rogić[1,3]

[1]Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia
[2]Salzer Polyclinic, Zagreb, Croatia
[3]Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

*Corresponding author: dragana.segulja@gmail.com

Abstract

Introduction: Due to limitations in currently used methodologies, the widely acknowledged approach for quantifying M-protein (MP) is not available. If employed as a source of quantitative data, the immunosubtraction electropherogram (IS-EPG), a qualitative analysis of MP, has the potential to overcome known analytical issues. The aim of this study is to explore measured and derived variables obtained from immunosubtraction electropherogram as a tool for quantifying MP and to compare the derived results to currently available methods.

Materials and methods: Measurands were amplitudes of MP and albumin fractions. Assessed derived variables included also immunoglobulin (Ig) G, IgA, IgM and total protein data. Capillary electrophoresis was used for determination of MP (in % of total protein concentration, or concentration of MP in g/L) by perpendicular drop and tangent skimming method.

Results: Passing-Bablok analysis showed the most comparable results in D1Ig and D1nIg variables, and the largest discrepancies in AD1nIg and AD2nIg variables. The background presence had greater impact on D1nIg comparison results than did on D1Ig results. The contribution of albumin fraction data did not improve the comparability of the results. The coefficients of variation of derived variables were lower (maximum 3.1%) than those obtained by densitometric measurements, regardless of MP concentration, polyclonal background, or migration pattern (2.3-37.7%).

Conclusion: The amplitude of MP spike in IS-EPG is an valuable measurand to compute derived variables for quantifying MP. The most comparable results were achieved with the D1Ig variable. Patients with monoclonal gammopathy can benefit from increased precision employing an objective and background independent measurand, especially during longitudinal follow-up.

Keywords: capillary electrophoresis; M-protein; monoclonal gammopathy; multiple myeloma; serum protein electrophoresis; immunosubtraction electrophoresis

Submitted: March 19, 2022 *Accepted: June 14, 2022*

Introduction

In the Western world, multiple myeloma is the second most common hematological malignancy (1). The International Myeloma Working Group maintains diagnostic and response criteria up to date, recognizing the need for M-protein (MP) quantification (2). Although diagnostic and follow-up options in this field have vastly advanced over the last decade, from kappa/lambda ratio measurement to introduction of heavy/light chain assays in laboratory protocols, there is no widely accepted approach for quantification of MP (3-5). Considering MP is produced by tumor-altered cells, its structure varies, making quantification challenging and explaining the lack of standard material in this field.

©Copyright by Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) which permits users to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of these articles in any medium or format and to remix, transform and build upon the material, provided the original work is properly cited and any changes properly indicated.

One of the most commonly used approach is to measure total concentration of immunoglobulin (Ig) isotype involved in monoclonal synthesis (Ig_{invl}) using turbidimetry or nephelometry. This approach frequently yields overstated monoclonal immunoglobulin concentration. The approach which enables estimation of monoclonal fraction is densitometry. This methodology is appropriate if MP is found in the gamma globulin fraction. Factors including a high polyclonal background, the positioning of MP in the beta fraction, and the polimerization of immunoglobulin molecules limit its effectiveness. Additionally, the fact that densitometric measurement can be done using one of two models: tangent skimming or perpendicular drop, both which lack the objectivity, contributes to the variability of results (6,7).

Immunosubtraction is a fully automated method for characterizing MP. The method utilizes capillary electrophoresis in combination with immunoprecipitation. Antisera are coupled to sepharose beads which alter mobility in an electric field by binding to immunoglobulin molecules and forming immunocomplexes. Comparison of electropherograms (EPGs) before and after immunoprecipitation enables detection and characterization of MP (8). In addition, the level of polyclonal background and comigrating beta fraction proteins can be assessed by comparing EPGs. Detected differences could be described by measured and derived variables. The aim of this study was to explore measured and derived variables obtained from immunosubtraction electropherogram (IS-EPG) as a tool for quantifying MP and to compare the derived results to currently available methods.

Materials and methods

A total of 133 patient samples with monoclonal gammopathy were included in this study. Only serum samples with the requested serum protein electrophoresis were used. There was no additional sample taken particularly for this investigation. The study has been approved by the ethical committee of a tertiary care hospital (8.1-17/55-2).

Total immunoglobulins G, A, and M were determined in all samples, and capillary electrophoresis, immunofixation, and immunosubtraction were conducted. Using Tina-quant reagents, immunoglobulins were determined turbidimetrically on Cobas 6000cee analyser (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). The Capillarys 2 system (Sebia, Lysses, France) was used for serum protein electrophoresis and immunosubtraction utilizing Capillarys Protein(e) 6 buffer and Capillarys Immunotyping antisera kit (Sebia, Lysses, France). Immunofixation electrophoresis on Hydrasys2Scan with the reagent set Hydragel IF 2/4 was conducted to confirm MPs (Sebia, Lysses, France). All the tests were carried out according to the manufacturer's instructions. To normalize patient data, the IF/IT Control (Sebia, Lysses, France) sample was employed. M-proteins: IgG lambda, IgA kappa, and IgM lambda were verified in the absence of a polyclonal background in utilized control sample which comprised total protein of 42 g/L, turbidimetrically determined IgA of 2.90, IgG 7.28, IgM 6.28 g/L and densitometrically measured MP IgA of 2.70, IgG 7.40 and IgM 6.10. Precision testing was carried out on serum samples, with four known variable factors in MP quantification taken into account: migration pattern, polyclonal background, MP concentration, and gating method. The measurements are performed in hexaplicate, and two observers were included to inspect variation in gating strategy.

Calculations

Monoclonal fraction was obtained from standard EPG densitometrically by two mathematical approches. A perpendicular drop (PD) in points where the M-spike meets the polyclonal region, as well as a tangent skimming procedure (TM) that eliminates the polyclonal background and quantifies just the M-spike above given points, are used to determine the area under the curve (Figure 1a). The percentage of the area under the curve attributed to MP and albumin fraction together with the total protein concentration obtained by the biuret method on Cobas 6000cc (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) were used to compute absolute concentrations.

The amplitude of MP and albumin fraction in IS-EPG (Figure 1b) were described with the measured variables M1, M2, a1 and a2. The derived variables are calculated in MS Excel (Microsoft, Redmond, USA) as follows:

AD - the difference in the amplitude of MP spike before and after immunoprecipitation generated from the IS-EPG, $(M_1 - M_2)$;

ADn - the ratio of the AD in patient sample and the AD in the control sample, $(M_1 - M_2)_p / (M_1 - M_2)_c$;

AD1nIg – the product of ADn, total protein concentration ratio in patient and control sample (TP_p / TP_c) and total concentration of immunoglobulin isotype involved in monoclonal synthesis in patient sample (Ig_{invl}), $((M_1 - M_2)_p / (M_1 - M_2)_c) \times (TP_p / TP_c) \times Ig_{invl}$ (g/L);

AD2nIg – the AD1nIg with added difference in albumin fraction amplitude generated from IS-EPG (a1-a2), $((M_1 - M_2)_p + (a1 - a2)_p) / ((M_1 - M_2)_c + (a1 - a2)_c) \times (TP_p / TP_c) \times Ig_{invl}$ (g/L);

ADnG – the product of ADn and globulin concentration (G), obtained as total protein - albumin fraction, $((M_1 - M_2)_p / (M_1 - M_2)_c) \times G$ (g/L);

D1Ig – the ratio of AD and MP amplitude before immunoprecipitation generated from IS-EPG multiplied by total concentration of immunoglobulin

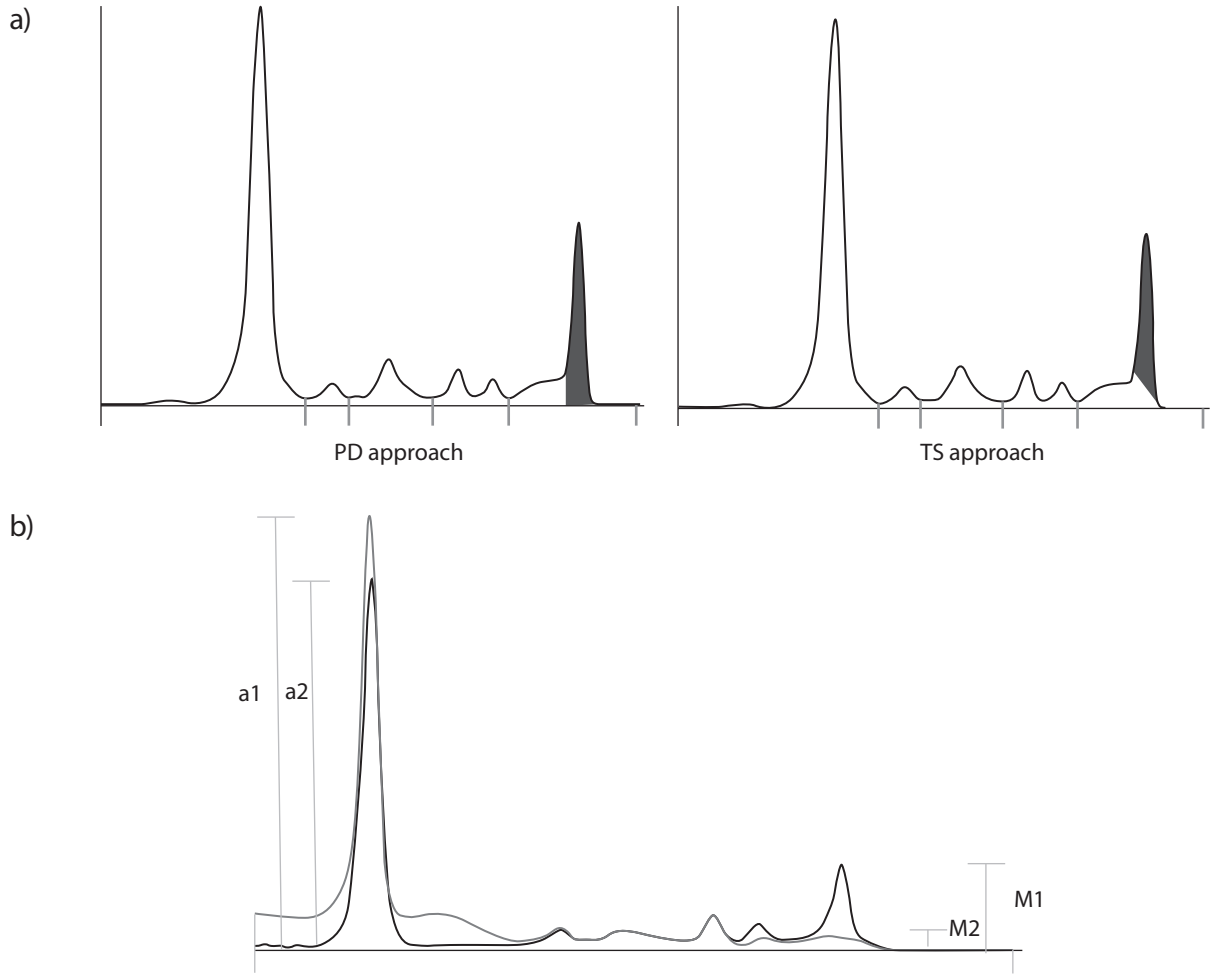


Figure 1. (a) Currently used densitometric approaches to quantify MP are perpendicular drop (PD) and tangent skimming method (TS). (b) Parameters generated from an immunosubtraction electropherogram that were employed in eight evaluated M-protein quantification models. MP – M-protein. M1 - the amplitude of M spike before immunoprecipitation. M2 - the amplitude of the globulin fraction after immunoprecipitation. a2 - the amplitude of albumin fraction before immunoprecipitation. a1 - the amplitude of albumin fraction after immunoprecipitation.

isotype involved in monoclonal synthesis in patient sample (Ig_{invl}), $(M_1 - M_2) / M_1 \times Ig_{invl}$ (g/L);

D2Ig – the D1Ig with added albumin fraction data generated from IS-EPG and multiplied by total concentration of immunoglobulin isotype involved in monoclonal synthesis in patient sample (Ig_{invl}), $((M_1 - M_2) / M_1 + (a_1 - a_2) / a_2) \times Ig_{invl}$ (g/L);

D1nIg – the ratio of AD and MP amplitude before immunoprecipitation generated from IS-EPG in patient and control sample multiplied by TP_p / TP_c and by total concentration of immunoglobulin isotype involved in monoclonal synthesis in patient sample, $((M_1 - M_2) / M_1)_p / ((M_1 - M_2) / M_1)_c \times (TP_p / TP_c) \times Ig_{invl}$ (g/L).

Statistical analysis

All data sets were tested for normality using Kolmogorov-Smirnov test and presented with median and interquartile range (IQR), except IgM data which follow normal distribution and are presented with arithmetic mean and standard deviation. Comparison results are presented by Bland-Altman statistics and Passing-Bablok regression where slope and intercept values are listed with 95% confidence interval (95%CI). The values $P < 0.05$ were considered statistically significant. All statistics were done by MedCalc statistical software, version 20.023 (MedCalc, Ostend, Belgium).

Results

Monoclonal IgG was detected in 70% of examined samples. Monoclonal IgA was detected in 14% of samples, and monoclonal IgM in 16%. Altogether 30% of detected MPs were lambda type. The majority of IgG MPs were found in the gamma fraction (91%), IgA MPs in the beta fraction (84%), and monoclonal IgM in the gamma fraction (86%). Background, polyclonal or beta fraction proteins were found in 43% of the samples. As shown in Table 1, the study included patient samples with a wide range of total protein, total immunoglobulins, and MP concentrations. The concentration of total immunoglobulin isotype involved in monoclonal synthesis was higher than that determined by densitometrical approaches, with a mean difference of 31.14 (26.25-36.02, $P < 0.001$) % for PD and 86.85 (78.89-94.81, $P < 0.001$) % for the TS method. Positive bias for PD results was found in a comparison of two densitometrical methods (Figure 2b), as well as systematic and proportional differences when they were categorized based on background presence (polyclonal background or beta migrating MP) (with background, intercept: -1.46 (95%CI - 1.88 to - 1.09), slope: 0.57 (95%CI 0.52 to 0.63), $P = 0.740$; without background, intercept -2.84 (95%CI - 3.52 to - 2.43), slope 0.85 (95%CI 0.83 to 0.89), $P = 0.350$).

Table 1. Descriptive data of patient samples

	N	Median	IQR	Min	Max	P
Total protein (g/L)	133	76	71-83	53	172	< 0.001
MP IgG (g/L)	93	19.05	14.07-30.98	7.99	103.00	< 0.001
MP IgA (g/L)	19	13.00	7.30-16.72	3.44	59.20	0.002
MP IgM (g/L)	21	13.15*	8.01*	3.79	34.75	> 0.100
PD (g/L)	133	12.15	7.25-20.95	1.90	100.60	< 0.001
TS (g/L)	133	6.60	2.58-14.13	0.20	78.90	< 0.001
MP with background (g/L)†	57	7.00	5.10-10.15	1.90	20.60	0.040
MP without background (g/L)†	76	19.00	13.10-29.85	5.20	100.60	< 0.001

*IgM data presented with arithmetic mean and standard deviation. †concentrations obtained by PD approach. MP - M-protein. IgG - immunoglobulin G. IgA - immunoglobulin A. IgM - immunoglobulin M. PD - Perpendicular drop approach. TS - tangent skimming approach. IQR - interquartile range. Min - lowest value. Max - highest value.

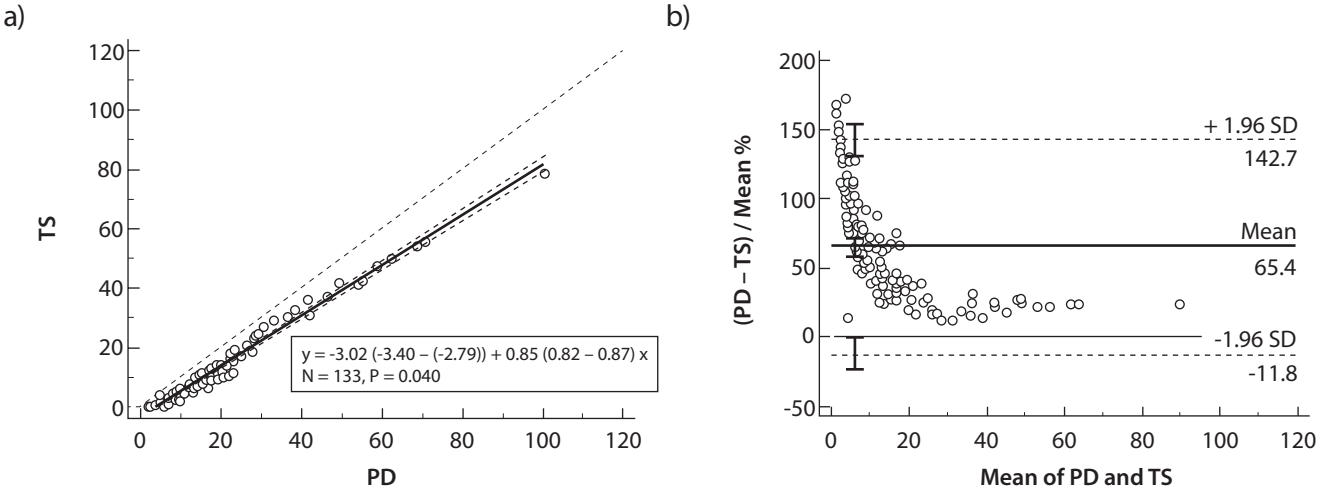


Figure 2. Passing-Bablok regression (a) and a difference plot (b) of results obtained by two densitometric approaches. A positive bias indicates higher values for the PD approach. The 95% confidence intervals for intercept and slope are shown within parentheses. PD - perpendicular drop approach. TS - tangent skimming method.

Derived variables with included concentration of total immunoglobulin isotype involved in monoclonal synthesis - AD1nIg, AD2nIg, D1Ig, and D1nIg – achieved comparable results with both densitometrical approaches. The variables with applied normalization, AD1nIg, AD2nIg and D1nIg, revealed a clear tendency of increasing difference with increase of MP concentration, especially above 20 g/L assessed by PD method (Figure 3). Variables D1Ig and D1nIg achieved the most comparable results (Figure 4). The AD1nIg results showed a significant deviation from linearity ($P < 0.010$), while the AD2nIg results (intercept - 33.18 (95%CI - 40.59 to - 26.61), slope 7.03 (95%CI 6.50 to 7.53); $P = 0.210$) indicated systematic and proportional differences.

When data were classified into two groups based on the presence of background (polyclonal background or beta migrating MP) and compared to densitometrical results, the most comparable results were also noted in D1Ig and D1nIg variables. Only samples with MP concentrations less than 20g/L, determined by PD, were included in the regression analysis of normalized data (Table 2). No systematic or proportional differences were observed in D1Ig results comparing to PD approach in group with background, while there were moderate systematic differences in group without background. The implementation of a 15 g/L MP concentration cut-off had no effect on the outcome, while groups with concentrations less than 10 mg/L were too small to conduct regression analysis.

Comparing to TS approach, none of the derived variables achieved regression without systematic or proportional differences, regardless of background presence.

The highest CVs were noted in TS results. Regardless of MP concentration, polyclonal background, or migration pattern, CVs of derived variables were lower (maximum 3.1%) than those obtained by densitometric measurements (highest 37.7%) (Table 3). Among all evaluated approaches the lowest CVs were observed in the patient sample with MP located in gamma fraction (MP 16.6 g/L by PD; 12.5 g/L by TS), in absence of polyclonal background. In contrast to densitometric approaches, there was no loss of precision in patient samples with low MP concentrations and a pronounced polyclonal background.

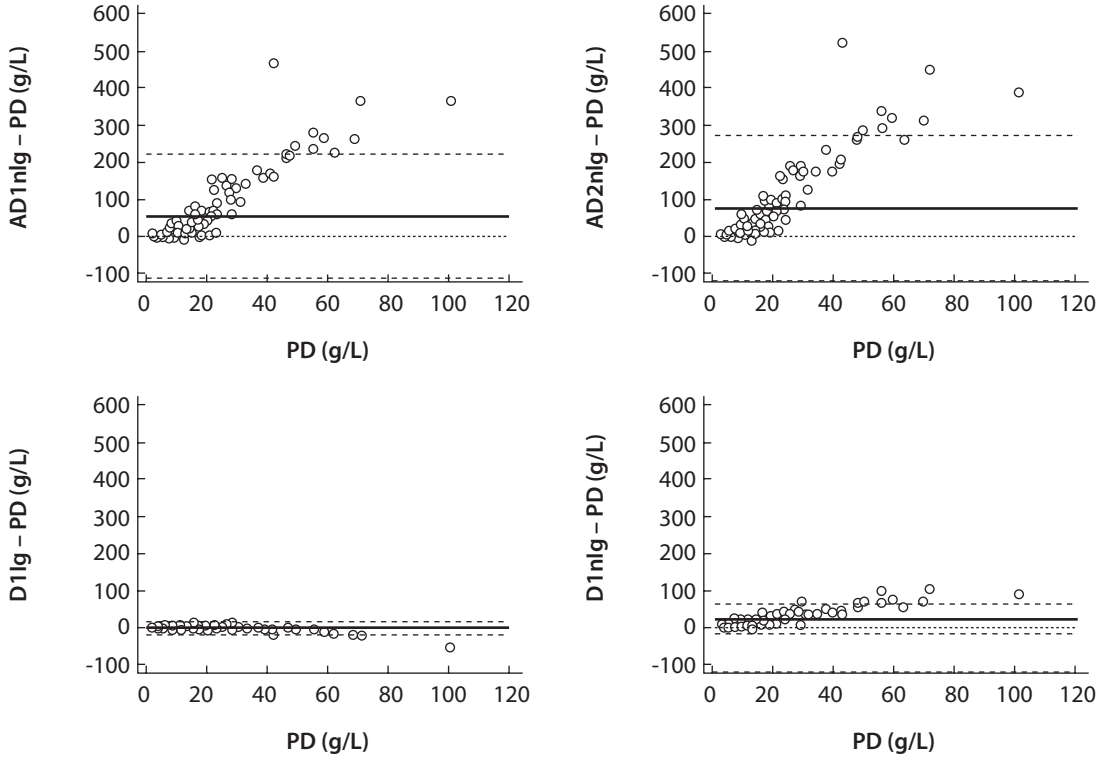


Figure 3. Bland-Altman data comparison graphs show differences for AD1nlg, AD2nlg, D1lg, and D1nlg variables in regard to the PD densitometric approach. D1lg, and D1nlg data showed the lowest difference in comparison to PD approach results. In normalized results is evident increasing tendency in difference with increase of MP concentration. Solid line (mean) – mean difference; dashed lines (SD) – standard deviation. AD1nlg – normalized, includes MP amplitude data, total protein and concentration of total immunoglobulin isotype involved in monoclonal synthesis (Ig_{invl}). AD2nlg – AD1nlg with contribution of albumin data. D1lg – includes proportion change in MP amplitude data before and after immunoprecipitation, as well as concentration of total immunoglobulin isotype involved in monoclonal synthesis (Ig_{invl}). D1nlg – normalized D1lg. PD - perpendicular drop approach. MP – M-protein.

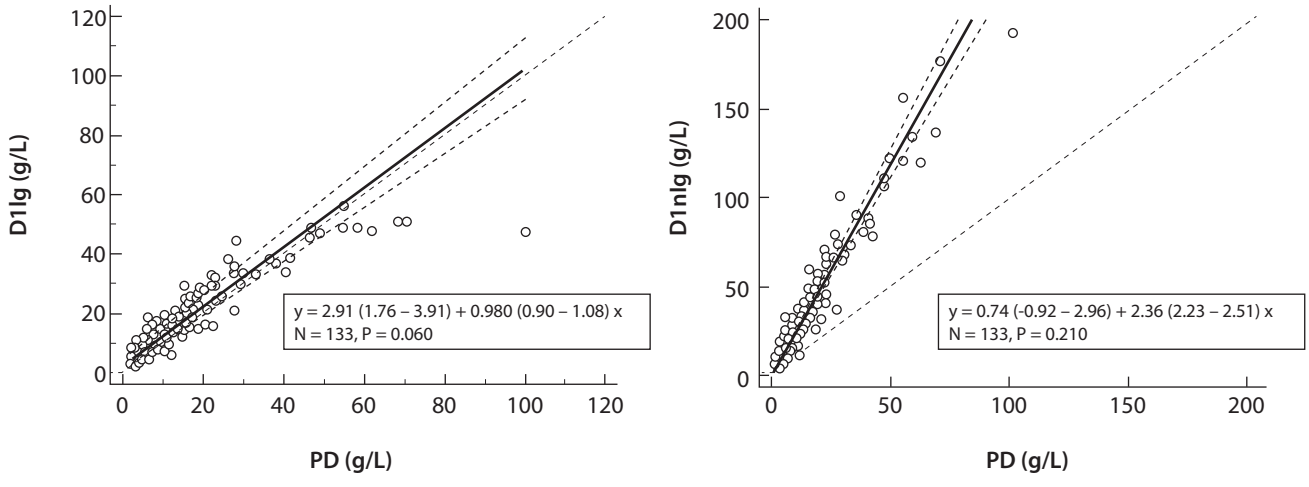


Figure 4. Passing-Bablok regression analysis of D1lg and D1nlg values in comparison to PD results; proportional differences were observed in D1nlg results and systematic differences in D1lg results. The 95% confidence intervals for intercept and slope are shown within parentheses. D1lg – includes proportion change in MP amplitude data before and after immunoprecipitation, as well as concentration of total immunoglobulin isotype involved in monoclonal synthesis (Ig_{invl}). D1nlg – normalized D1lg variable. PD - perpendicular drop approach. MP – M-protein.

Table 2. Regression analysis of derived variables data in relation to current densitometric methods and the presence of background

	Samples with MP and polyclonal background in gamma fraction or with beta migrating MP (N = 57)			Samples with MP in gamma fraction without polyclonal background (N = 76)*		
	Intercept	Slope	P	Intercept	Slope	P
	95%CI	95%CI		95%CI	95%CI	
Perpendicular drop approach						
AD1nlg	3.73	0.23	P = 0.100	- 45.42	5.84	P = 0.530
	2.88 to 4.24	0.17 to 0.33		- 72.46 to - 27.09	4.59 to 7.58	
AD2nlg	- 18.01	5.47	P = 0.520	- 8.07	0.12	P = 0.530
	- 30.12 to - 10.80	4.70 to 7.37		6.11 to 10.00	0.09 to 0.16	
D1lg	2.24	1.19	P = 0.190	3.48	0.94	P = 0.350
	- 2.12 to 4.38	0.89 to 1.65		1.00 to 5.11	0.84 to 1.06	
D1nlg	0.03	2.81	P = 0.100	- 11.17	3.19	P = 0.150
	- 5.46 to 4.18	2.35 to 3.44		- 23.04 to - 5.66	2.68 to 4.03	
Tangent skimming approach						
AD1nlg	- 5.06	7.78	P = 0.320	- 24.14	6.73	P = 0.970
	- 12.05 to - 0.89	5.50 to 11.65		- 42.45 to - 12.49	5.33 to 8.99	
AD2nlg	- 8.24	11.39	P = 0.930	- 40.21	10.01	P = 0.530
	- 15.78 to - 0.04	8.49 to 15.20		- 75.54 to - 22.66	7.79 to 14.06	
D1lg	3.88	2.40	P = 0.190	6.73	1.09	P = 0.080
	0.71 to 5.49	1.67 to 3.58		4.74 to 7.78	0.96 to 1.25	
D1nlg	4.97	5.50	P = 0.520	- 1.16	4.02	P = 0.530
	- 0.90 to 7.70	4.17 to 7.88		- 10.61 to 3.55	3.18 to 5.24	

In all 57 samples with MP and polyclonal background in gamma fraction or with beta migrating MP, as well as in 40/76 samples with MP in the gamma fraction without polyclonal background, MP concentrations were less than 20g/L. The slope and intercept are listed with 95% confidence interval (CI). *In comparison of normalized variables are included only samples with MP concentration < 20g/L obtained by PD approach (N = 40). MP - M-protein. PD - Perpendicular drop approach. AD1nlg – normalized, includes MP amplitude data, total protein and concentration of total immunoglobulin isotype involved in monoclonal synthesis (Ig_{invl}). AD2nlg – AD1nlg with contribution of albumin data. D1lg – includes proportion change in MP amplitude data before and after immunoprecipitation, as well as concentration of total immunoglobulin isotype involved in monoclonal synthesis (Ig_{invl}). D1nlg – normalized D1lg.

Table 3. Testing of analytical precision by taking into account four known variable factors in MP quantification: migration pattern, polyclonal gamma globulin background, MP concentration and gating method

CV (%)	PD	TS	AD1nlg	AD2nlg	D1lg	D1nlg
MP in beta fraction in concentration of 10.9 g/L by PD approach (4.5 g/L by TS approach)	8.3	27.8	2.7	2.4	1.3	1.1
MP in gamma fraction in concentration of 16.6 g/L by PD approach (12.5 g/L by TS approach) without polyclonal background	2.3	8.5	1.0	1.1	0.5	0.6
MP in gamma fraction in concentration of 18.4 g/L by PD approach (11.8 g/L by TS approach) with polyclonal background	6.6	16.8	2.5	2.8	3.1	2.6
MP in gamma fraction in low concentration of 4.1 g/L by PD approach (0.8 g/L by TS approach) with a pronounced polyclonal background	14.4	37.7	2.2	2.3	2.0	2.2

To inspect variation in gating strategy two observers were included. Precision testing results of currently utilized PD and TS approaches and the studied model revealed lower coefficients of variations (CVs) in the studied approach. MP - M-protein. PD – perpendicular approach. TS – tangent skimming approach. AD1nlg – normalized, includes MP amplitude data, total protein and concentration of total immunoglobulin isotype involved in monoclonal synthesis (Ig_{invl}). AD2nlg – AD1nlg with contribution of albumin data. D1lg – includes proportion change in MP amplitude data before and after immunoprecipitation, as well as concentration of total immunoglobulin isotype involved in monoclonal synthesis (Ig_{invl}). D1nlg – normalized D1lg.

Discussion

Our findings confirm that total immunoglobulin isotype concentration, frequently used as a measure of MP concentration, overestimates the concentration of MP (9). In studied group of patients it has been demonstrated that densitometric methods for MP quantification cannot be used interchangeably, regardless of the presence of a background. Similar discrepancies were observed by Schild who proposed TS approach, while Keren and Schroeder described corrected perpendicular drop in order to improve PD approach (6,10). Possible irregularities in EPG that are not related to MP, as well as the findings of an international survey on laboratory practice regarding monoclonal gammopathies which show that many laboratories still assume the identified spike in EPG is MP without typing the protein, are further reasons why densitometrical approaches for quantification of MP are not most appropriate (11-13).

In our group of patients the strongest correlation results were achieved using derived variables which included total immunoglobulin isotype involved in monoclonal synthesis. The impact of possible overestimation of total immunoglobulin concentration due to immune reagents reacting differently to specific monoclonal protein amino acid sequences is not eliminated in the proposed models, but it is minimized by visualization of MP in IS-EPG and taking total protein concentration into account (9). The D1Ig results, which were not normalized, showed that the D1Ig variable and the PD approach can be used interchangeably in a group with the detected background. The assumption that employed and only accessible material containing three isotypes of MPs with no polyclonal background will improve the quantification model, was not supported with conducted comparisons. We hypothesized that the low concentration of MPs in the used material was the main limitation of normalized variables. Despite the fact that immunoprecitated complexes migrate in the albumin and prealbumin fractions, the albumin fraction data had no influence on the explored quantification strategy.

Previously, the quantitative immunosubtraction approach was described by Schroeder *et al.* (14). They employed additional software to export IS-EPG results, and samples from only three patients were analyzed. Bergon and Miravalles developed a different strategy, estimating MP indirectly using polyclonal immunoglobulin heavy chain/light chain equivalency factors measured experimentally (15).

Immunosubtraction electrophoresis provides quantitative data which improve MP quantification with increase in precision, especially in samples with detected background and low MP concentration.

The fact that laboratory scientists have been occupied with MP quantification in the previous decade is substantiated by a conducted international multicenter study whose results point to four variable factors in MP quantification: gamma globulin background, migration pattern, MP concentration and gating method (16).

According to previously published papers, PD is the preferred approach for quantifying MP in gamma region, and total immunoglobulin concentration involved in monoclonal synthesis or the TS method are preferred methods when MP is in non-gamma regions (17). Substantial imprecision in TS results was noted in the sample with beta globulin migrating MP (27.8%), which was attributed to subjectivity in gating across observers. Our results also show that background which was detected in 43% of our results, is not an uncommon occurrence and alters the relevance of using a universal approach for MP quantification, has no or moderate impact on D1Ig and D1nIg variables. The precision of total protein and immunoglobulins is unlikely to have an impact on the precision of computed variables, as both were verified and found to be acceptable during analytical evaluation mandatory by ISO 15189.

The well defined points in IS-EPG, baseline and spike amplitude, are used in this study to avoid lack of objectivity which is a known weakness of densitometrical approaches due to the possibility

of subjective MP spike demarcation. Therefore the possibility of a biased densitometrical approach being used interchangeably was eliminated, minimizing inconsistency in findings and the risk of inadequate therapy monitoring. Nowadays, commercially available immunosubtraction systems are limited on detection of IgG, IgA and IgM isotypes. The assessed strategy would be unable to quantify IgD MP, which is extremely rare, accounting for just 1.8 to 1.2% of all multiple myeloma cases, and IgE gammopathy (18). In addition, similar as in currently available approaches, the polimerization of immunoglobulin molecules which is presented as two spikes in EPG, could limit the effectiveness of the proposed model.

In conclusion, we described and studied a novel approach for objective quantification of MP by deriving parameters obtained from IS-EPG in combination with relevant biochemistry analytes. For the first time, an approach is presented that encompasses the idea of normalizing/calibrating IS-EPG data. The amplitude of the MP spike in IS-EPG before and after immunosubtraction has been identified and verified as a useful measurand for estimating MP concentration. The D1Ig variable produced the most comparable results in relation to PD approach.

According to our results, most commonly used PD approach can be used interchangeably with the D1Ig variable in group of patients with the present background, where employment of D1Ig increases MP quantification precision. Studied strategy can improve the harmonization of MP findings and follow-up in monoclonal gammopathy patients.

Potential conflict of interest

None declared.

References

1. *Turesson I, Bjorkholm M, Blimark CH, Kristinsson S, Velez R, Landgren O. Rapidly changing myeloma epidemiology in the general population: Increased incidence, older patients, and longer survival. Eur J Haematol. 2018;101:237–44. https://doi.org/10.1111/ejh.13083*
2. *Rajkumar SV. Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. Am Soc Clin Oncol Educ B. 2016;e418-e423. https://doi.org/10.1200/EDBK_159009*
3. *Bradwell AR, Harding SJ, Fourrier NJ, Wallis GLF, Drayson MT, Carr-Smith HD, et al. Assessment of monoclonal gammopathies by nephelometric measurement of individual immunoglobulin κ/λ ratios. Clin Chem. 2009;55:1646–55. https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.123828*
4. *Paolini L, Di Noto G, Maffina F, Martellosio G, Radeghieri A, Luigi C, et al. Comparison of HevyliteTM IgA and IgG assay with conventional techniques for the diagnosis and follow-up of plasma cell dyscrasia. Ann Clin Biochem. 2015;52:337–45. https://doi.org/10.1177/0004563214564225*
5. *Batinić J, Perić Z, Segulja D, Last J, Prijić S, Dubravčić K, et al. Immunoglobulin heavy/light chain analysis enhances the detection of residual disease and monitoring of multiple myeloma patients. Croat Med J. 2015;56:263-71. https://doi.org/10.3325/cmj.2015.56.263*
6. *Keren DF, Schroeder L. Challenges of measuring monoclonal proteins in serum. Clin Chem Lab Med. 2016;54:947-61. https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0862*
7. *de Kat Angelino CM, Jacobs JFM. External quality assessment of M-protein diagnostics: A realistic impression of the accuracy and precision of M-protein quantification. Clin Chem Lab Med. 2021;59:1063–8. https://doi.org/10.1515/cclm-2020-1810*
8. *Yang Z, Harrison K, Park YA, Chaffin CH, Thigpen B, Easley PL, et al. Performance of the Sebia CAPILLARYS 2 for Detection and Immunotyping of Serum Monoclonal Paraproteins. Am J Clin Pathol. 2007;128:293–9. https://doi.org/10.1309/1L3CG8GK6F8VYNYH*
9. *Murray DL, Ryu E, Snyder MR, Katzmann JA. Quantitation of serum monoclonal proteins: Relationship between agarose gel electrophoresis and immunonephelometry. Clin Chem. 2009;55:1523–9. https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.124461*
10. *Schild C, Wermuth B, Trapp-Chiappini D, Egger F, Nuoffer JM. Reliability of M protein quantification: Comparison of two peak integration methods on Capillarys 2. Clin Chem Lab Med. 2008;46:876–7. https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.146*
11. *Regeniter A, Siede WH. Peaks and tails: Evaluation of irregularities in capillary serum protein electrophoresis. Clin Biochem. 2018;51:48–55. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.09.017*
12. *Genzen JR, Murray DL, Abel G, Meng QH, Baltaro RJ, Rhoads DD, et al. Screening and Diagnosis of Monoclonal Gammopathies: An International Survey of Laboratory Practice. Arch Pathol Lab Med. 2018;142:507–15. https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0128-CP*

13. Šegulja D, Šparakl T, Rogić D. Applied capillary electrophoresis system affects screening for monoclonal gammopathy in serum: verification study of two eight-capillary systems. Scand J Clin Lab Invest. 2022;82:85–9. https://doi.org/10.1080/00365513.2022.2034035
14. Schroeder LF, Huls F, Williams CL, Li SH, Keren DF. A Novel Approach to Estimating M-Protein Concentration: Capillary Electrophoresis Quantitative Immunosubtraction. J Appl Lab Med. 2018;2:914–9. https://doi.org/10.1373/jalm.2017.024950
15. Bergón E, Miravalles E. Estimation of serum M-protein concentration from polyclonal immunoglobulins: An alternative to serum protein electrophoresis and standard immunochemical procedures. Clin Chem Lab Med. 2008;46:1156–62. https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.232
16. Turner KA, Frinack JL, Ettore MW, Tate JR, Graziani MS, Jacobs JFM, et al. An international multi-center serum protein electrophoresis accuracy and M-protein isotyping study. Part I: Factors impacting limit of quantitation of serum protein electrophoresis. Clin Chem Lab Med. 2020;58:533–46. https://doi.org/10.1515/cclm-2019-1104
17. Sthaneshwar P, Thambiah SC, Mat Salleh MJ, Nasuruddin DN, Ahmad Zabidi NF, Jelani AM, et al. Survey on serum protein electrophoresis and recommendations for standardised reporting. Malays J Pathol. 2021;43:281–90.
18. Vladutiu AO. Immunoglobulin D: Properties, measurement, and clinical relevance. Clin Diagn Lab Immunol. 2000;7:131–40. https://doi.org/10.1128/CDLI.7.2.131-140.2000

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Doktorski rad

KVANTIFIKACIJA SERUMSKOGA M-PROTEINA METODOM IMUNOSUPTRAKCIJE

DRAGANA ŠEGULJA

Prisutnost M-proteina u serumu karakterizira stanje monoklonske gamapatije. Koncentracija M-proteina izravno korelira s veličinom tumorske mase, osim u vrlo rijetkim slučajevima nesekrecijske bolesti. Detekcija, tipizacija i kvantifikacija M-proteina nužne su za postavljanje dijagnoze, procjenu rizika progresije i praćenje uspješnosti terapije. Ograničenja postojećih metoda kvantifikacije serumskoga M-proteina (denzitometrijska i imunokemijska) razlog su kontinuiranih istraživačkih napora u osmišljavanju novih postupaka koji bi unaprijedili dijagnostiku i praćenje kliničkoga stanja bolesnika s monoklonskom gamapatijom. Cilj je ovoga istraživanja bio razviti i evaluirati osmišljeni računski postupak za kvantifikaciju serumskoga M-proteina primjenom laboratorijskih rezultata kvalitativne metode imunosuptrakcije. Istraživanje je obuhvatilo 133 uzorka bolesnika s monoklonskom gamapatijom klinički praćenih u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. U svim je uzorcima provedena elektroforeza serumskih proteina, imunofiksacija i imunosuptrakcija te određena koncentracija ukupnih proteina i pojedinih razreda imunoglobulina G, A i M. Amplituda vrška M-proteina nativnoga uzorka i globulinske krivulje nakon imunoprecipitacije prepoznate su kao ključni parametri u laboratorijskim rezultatima imunosuptrakcije. Podatci o amplitudi krivulja su, uz koncentraciju ukupnih proteina, razreda imunoglobulina uključenoga u sintezu M-proteina i globulina, poslužili kao temelj osmišljenih računskih modela. Utvrđena je vrlo dobra povezanost deriviranih varijabli AD1nIg, D1Ig, D2Ig i D1nIg temeljenih na podacima iz imunosuptrakcijskog elferograma s rezultatima uspoređivanih metoda. Podatci iz imunosuptrakcijskog elferograma o albuminskoj frakciji nisu pridonijeli jačini povezanosti rezultata deriviranih varijabli s rezultatima postojećih metoda. Dokazana je veća preciznost određivanja koncentracije M-proteina primjenom deriviranih varijabli u odnosu na denzitometrijsku metodu i nije ovisila o koncentraciji, prisutnosti poliklonske pozadine niti migracijskom položaju M-proteina.

U ovom je radu istražena i opisana mogućnost umjeravanja rezultata imunosuptrakcije. Najusporediviji rezultati s postojećim metodama dobiveni su s rezultatima derivirane varijable D1Ig uz najbolje rezultate procjene preciznosti i točnosti. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da su u računskim modelima za kvantifikaciju M-proteina amplitude krivulja na mjestu vrška M-proteina u imunosuptrakcijskom elferogramu objektivan i vrijedan mjerljivi parametar neovisan o prisutnosti pozadine. Evaluacijom deriviranih varijabli pokazano je da je njihovom primjenom moguće unaprijediti dijagnostiku i praćenje kliničkoga stanja bolesnika s monoklonskom gamapatijom.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži 119 stranica, 29 slika, 22 tablice i 90 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kapilarna elektroforeza; M-protein; imunosuptrakcija; gamapatija; multipli mijelom; elektroforeza serumskih proteina, imunokemijski test.

Mentori: dr. sc. Danica Matišić
prof. dr. sc. Karmela Barišić

Povjerenstvo: prof. dr. sc. Jerka Dumić
prof. dr. sc. Dunja Rogić
prof. dr. sc. Drago Batinić

Rad je prihvaćen: 15. veljače 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry Doctoral thesis

QUANTIFICATION OF SERUM M-PROTEIN BY IMMUNOSUBTRACTION METHOD

DRAGANA ŠEGULJA

The presence of M-protein in serum characterizes the state of monoclonal gammopathy. M-protein concentration directly correlates with tumor mass size, except in very rare cases of the nonsecretory disease. Detection, typing, and quantification of M-protein are necessary for diagnosis, assessment of the risk of progression, and monitoring the therapy efficiency. The shortcomings of existing methods for M-protein quantification (densitometric and immunochemical) encourage ongoing research efforts to develop novel procedures that would improve the management of patients with monoclonal gammopathy. This study aimed to develop and evaluate a computational procedure for quantifying serum M-protein using laboratory results of a qualitative immunosubtraction method. The study included 133 samples of patients with monoclonal gammopathy treated at the University Hospital Center Zagreb. Serum protein electrophoresis, immunofixation, and immunosubtraction were performed in all samples, and the concentrations of total protein and of individual immunoglobulin classes G, A, and M were determined. The amplitude of the M-protein spike of the native serum and the globulin curve after immunoprecipitation were recognized as key parameters in the laboratory results of immunosubtraction. Amplitude data, along with the concentrations of total protein, immunoglobulin class involved in M-protein synthesis and globulins represent the basis of explored derived models. A very strong correlation was found between the derived variables AD1nIg, D1Ig, D2Ig, and D1nIg based on data from the immunosubtraction elpherogram with the results of the compared methods. Data on the albumin fraction, generated from immunosubtraction elpherogram, did not improve the correlation. Higher precision of derived variables was demonstrated than in the densitometric method and it was unaffected by concentration, background presence, or migration pattern of M-protein.

In this research, the concept of immunosubtraction result normalisation has been described and studied. The most comparable results to both examined methods were obtained with the results of the derived variable D1Ig, with the best precision and accuracy testing results. The findings of this study imply that the change in amplitude of the curves at the M-protein spike position in immunosubtraction elpherogram is an objective, background-independent, measurable, and relevant parameter in M-protein quantification by derived variables. The evaluation of the derived variables showed that their implementation could improve diagnostics and follow-up of patients with monoclonal gammopathy.

The thesis is deposited at the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis includes 119 pages, 29 figures, 22 tables and 90 references. The original is in Croatian language.

Keywords: capillary electrophoresis; M-protein; immunosubtraction electrophoresis; multiple myeloma; serum protein electrophoresis; immunoassay.

Supervisors: Danica Matišić, PhD
Professor Karmela Barišić, PhD

Reviewers: Professor Jerka Dumić, PhD
Professor Dunja Rogić, PhD
Professor Drago Batinić, PhD

Accepted: 15th February 2023