

Masarykova univerzita v Brně
Lékařská fakulta

VÝZNAM ELEKTROFORÉZY BÍLKOVIN SÉRA V LABORATORNÍ DIAGNOSTICE

Bakalářská práce
v oboru zdravotní laborant

Vedoucí bakalářské práce:
MUDr. Ingrid Wilhelmová

Autor:
Anna PAVLÍČKOVÁ

Brno, duben 2017

Jméno a přímení autora: Anna Pavlíčková

Název bakalářské práce: Význam elektroforézy bílkovin séra v laboratorní diagnostice

Pracoviště: Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Ingrid Wilhelmová

Rok obhajoby bakalářské práce: 2017

Souhrn: Tato bakalářská práce pojednává o významu využití elektroforézy sérových bílkovin v laboratorní praxi. Teoretická část zahrnuje základní principy elektroforézy, následné zpracování a vyhodnocení elektroforeogramu, dále rozdělení proteinů při elektroforéze, jednotlivé elektroforetické typy a provázání s diagnostikou monoklonální gamapatie. Praktická část se zabývá posouzením využití elektroforézy bílkovin v laboratorní diagnostice. Zpracovává výsledky vyšetření elektroforézy bílkovin v séru retrospektivně sesbírané na Oddělení klinické biochemie ve FN USA v Brně. Řeší především její význam v diagnostice a v monitorování onemocnění spojených s monoklonální gamapatií.

Klíčová slova: elektroforéza, elektroforéza bílkovin v séru, monoklonální gamapatie

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením MUDr. Ingrid
Wilhelmové, a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.

V Brně dne

.....

(vlastnoruční podpis autora)

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce paní MUDr. Ingrid Wilhelmové za odborné vedení, cenné rady, připomínky, ochotu a věnovaný čas.

Dále bych také poděkovala pracovníkům Oddělení klinické biochemie za pomoc v oblasti přístrojové techniky.

Použité symboly a zkratky

I. IKAK	První interní kardioangiologická klinika
I. NK	První neurologická klinika
II. IK	Druhá interní klinika
AK	Aminokyselina
AKI, s.r.o.	Alergologie, klinická imunologie a interna
AL-amyloidóza	Amyloidóza z lehkých řetězců
API	α_1 inhibitor proteináz
ARK	Anesteziologicko resuscitační klinika
CKTCH	Centrum kardiovaskulární a transplantační chirurgie
CRP	C reaktivní protein
Cu	Měď
Fab fragment	Antigen binding fragment (fragment vázající antigen)
Fc fragment	Fragment crystallizable (fragment vázající se na příslušné receptory)
FN USA	Fakultní nemocnice u svaté Anny
HIV	Human Immunodeficiency Virus (virus lidského imunodeficitu)
Ig	Imunoglobulin
Ig A	Imunoglobulin třídy A
Ig D	Imunoglobulin třídy D
Ig E	Imunoglobulin třídy E
Ig G	Imunoglobulin třídy G
Ig M	Imunoglobulin třídy M
Kys.	Kyselina
MGUS	Monoklonální gamapatie nejasného významu
M-Ig	Monoklonální imunoglobulin
MK	Mastné kyseliny
Mr	Molekulová hmotnost
NS	Nespecifikovaný
OKB	Oddělení klinické biochemie
OKH	Oddělení klinické hematologie
ORZL	Oddělení rodinných a závodních lékařů
p	Hladina významnosti statistického testu

POEMS syndrom	Polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal immunoglobulin, skin changes (syndrom spojený s polyneuropatií, organomegálií, edokrinopatií, monoklonální gamapatií a kožním postižením)
RES	Retikuloendotelový systém
RNA	Ribonukleová kyselina
RTG	Rentgenový
S	Sérum
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminometan
ÚKIA	Ústav klinické imunologie a alergologie
WHO	World Health Organisation (Světová zdravotnická organizace)
Zn	Zinek

Obsah

Úvod.....	- 9 -
Teoretická část	- 10 -
1 Bílkoviny v séru	- 10 -
1.1 Chemická struktura bílkovin	- 10 -
1.2 Funkce sérových bílkovin	- 11 -
1.3 Celková koncentrace bílkovin v krevním séru.....	- 11 -
2 Elektroforéza	- 12 -
2.1 Zónová elektroforéza	- 12 -
2.1.1 Princip.....	- 12 -
2.1.2 Instrumentální technika.....	- 13 -
2.1.3 Vizualizace a detekce.....	- 14 -
2.2 Kapilární elektroforéza.....	- 16 -
3 Rozdělení proteinů při elektroforéze	- 17 -
3.1 Jednotlivé elektroforetické frakce a jejich bílkovinné zastoupení	- 18 -
3.1.1 Albumin	- 18 -
3.1.2 α_1 globuliny.....	- 18 -
3.1.3 α_2 globuliny.....	- 19 -
3.1.4 β globuliny	- 19 -
3.1.5 γ globuliny	- 21 -
4 Elektroforetické typy	- 23 -
4.1 Typ akutního zánětu.....	- 24 -
4.2 Typ chronického zánětu	- 25 -
4.3 Typ chronické hepatitidy nebo jaterní cirhózy.....	- 25 -
4.4 Typ nefrotického syndromu (obraz ztrát bílkovin)	- 26 -
4.5 Typ polyklonální hyperimmunoglobulinémie.....	- 27 -
4.6 Typ hypogamaglobulinémie.....	- 27 -

4.7	Typ monoklonální gamapatie.....	- 28 -
4.8	Malnutriční typ.....	- 28 -
4.9	Bisalbuminémie.....	- 29 -
4.10	Analbuminémie	- 29 -
4.11	Oligoklonální pásy	- 30 -
4.12	Přítomnost fibrinogenu.....	- 30 -
4.13	Hemolýza	- 31 -
5	Monoklonální gamapatie	- 32 -
5.1	Vyšetřovací metody a význam stanovení pomocí elektroforézy bílkovin v séru .-	32 -
5.2	Onemocnění spojená s monoklonální gamapatií.....	- 33 -
5.2.1	Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)	- 33 -
5.2.2	Mnohočetný myelom	- 34 -
5.2.3	Primární amyloidóza.....	- 34 -
5.2.4	Waldenströmova makroglobulinémie.....	- 34 -
	Praktická část	- 35 -
6	Cíl práce.....	- 35 -
7	Popis metodiky	- 36 -
8	Stanovení frakcí sérových bílkovin elektroforézou.....	- 37 -
8.1	Interlab G26 Easy Fix	- 37 -
8.2	Princip měření	- 38 -
8.3	Použité reagensie	- 38 -
8.4	Biologický materiál	- 38 -
8.4.1	Interference	- 38 -
8.4.2	Analytická proveditelnost.....	- 39 -
8.5	Citlivost metody.....	- 39 -
8.6	Řízení kvality	- 39 -
8.7	Provedení.....	- 39 -
8.8	Výsledky	- 40 -

8.8.1	Referenční rozmezí	- 40 -
8.8.2	Přehled typů elektroforetických obrazů	- 41 -
9	Statistické zpracování dat	- 42 -
9.1	Popis datového souboru	- 42 -
9.2	Přehled diagnóz	- 43 -
9.3	Přehled oddělení	- 44 -
9.4	Zastoupení jednotlivých typů elektroforetických obrazů v souboru	- 46 -
9.5	Zastoupení pozitivních a negativních výsledků	- 47 -
9.5.1	Zastoupení mezi muži a ženami	- 48 -
9.5.2	Zastoupení v jednotlivých věkových kategoriích	- 49 -
9.6	Frekvence opakovaných vyšetření elektroforetických obrazů	- 51 -
10	Vyhodnocení	- 53 -
11	Kazuistiky	- 56 -
11.1	Kazuistika 1	- 56 -
11.2	Kazuistika 2	- 57 -
	Závěr	- 59 -
	Literatura	- 60 -
	Seznamy	- 64 -
	Přílohy	

Úvod

Elektroforéza bílkovin v séru slouží k separaci proteinů do 5 — 6 skupin (bílkovinných frakcí) v závislosti na celkovém náboji. Podle relativního zastoupení těchto frakcí a vizuálního vyhodnocení elektroforeogramu lze identifikovat různá onemocnění, projevující se změnou složení bílkovin séra (Racek 2006).

Nejčastěji se využívá k identifikaci přítomnosti monoklonálního imunoglobulinu. Jedná se o screeningové vyšetření pro diagnostiku onemocnění, spojeného s monoklonální gamapatií (Špička et al. 2005). Pomocí této metody se i často stanovuje koncentrace monoklonálního imunoglobulinu. (Adam et al. 2008).

Kromě této aplikace lze identifikovat i další stavy, např. akutní a chronické onemocnění, ztráty bílkovin, onemocnění jater, přítomnost oligoklonálních páسů u roztroušené sklerózy mozkomíšní, a další (Kopáč 2004; Racek 2006).

Elektroforéza, jako technika k separaci nabitých částic, byla vyvíjena v minulém století. První vědeckou elektroforetickou aparaturu sestavil Arne Tiselius v roce 1937, kterou použil k separaci proteinů. Za tento objev získal v roce 1948 Nobelovu cenu za chemii. (Pazourek 2003). V praxi elektroforéza bílkovin v séru byla hojně využívána 50. letech, postupně ji však nahrazovaly jiné metody pro detekci proteinů (Bilyk et al. 2008). Protože se jedná o levnou a dostupnou metodu, je využívána dodnes (Maisnar et al. 2012).

Bakalářská práce pojednává o elektroforéze bílkovin v séru jako o metodě a o jejím využití v laboratorní diagnostice. Cílem je zhodnocení jejího využití při identifikaci a monitorování onemocnění spojených s nálezem monoklonální gamapatie i posouzení jejího významu při hodnocení jiných onemocnění. Kromě toho také řeší závislost elektroforetického typu monoklonální gamapatie na pohlaví a věku.

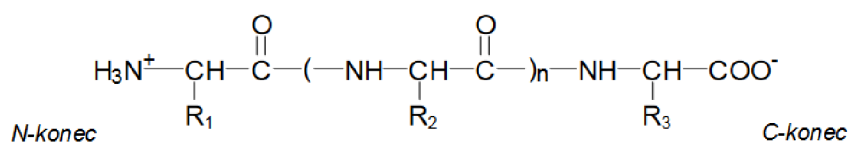
Teoretická část

1 Bílkoviny v séru

V krevní plazmě se nachází pravděpodobně stovky různých bílkovin. Mnoho z nich je v nevýznamných koncentracích, ale mohou se vyskytovat i řádově v desítkách miligramů až v jednotkách gramů (Gurau et al. 2016). Kromě množství se liší i velikostí molekuly, chemickou stavbou, nebo svou funkcí. Většina je tvořena v játrech, avšak např. imunoglobuliny produkují lymfocyty B nebo některé lipoproteiny enterocyty (Basile 2014).

1.1 Chemická struktura bílkovin

Jedná se o polymery složené z 20 typů proteinogenních aminokyselin, spojených peptidovou vazbou (obr. 1). Pořadí AK v řetězci je dáno geneticky, proteiny vznikají v ribozomech translací RNA řetězce. Každý řetězec má svůj N-konec s $-NH_3^+$ skupinou a C-konec s $-COO^-$ skupinou. Od peptidů se liší jejich určeným prostorovým uspořádáním — nativní konformací. Ta se vytváří už při vlastní syntéze (Tomandl et al. 2014). Při biologické aktivitě proteinu se jeho konformace někdy částečně mění (Beránek et al. 2013).



Obrázek 1 Peptidová vazba (Tomandl et al. 2014)

Rozeznáváme různé strukturní úrovně bílkovin:

1. Primární struktura — určuje pořadí AK v řetězci
2. Sekundární struktura — je dána prostorovým uspořádáním peptidového řetězce, stabilizovaného vodíkovými vazbami.
3. Terciální struktura — je prostorové uspořádání sekundárních struktur v důsledku interakcí zbytků AK.
4. Kvarterní struktura — se skládá z několika jednotlivých peptidových řetězců, monomerů. Ty jsou spojeny nekovalentními interakcemi (Beránek et al. 2013; Tomandl et al. 2014).

Často dochází i k posttranslačním úpravám. Většinou polární zbytky AK jsou upraveny působením specifických enzymů (Koolman et al. 2012). U bílkovin krevní plazmy je podstatná

jejich glykosylace. Bílkoviny krevní plazmy, kromě albuminu, jsou glykoproteiny. Všechny obsahují oligosacharidové řetězce, připojené přes N-glykosidovou vazbu. Hlavní význam spočívá ve zvýšení rozpustnosti. Glykosylace rozhoduje o funkci proteinu, a při poškození umožňuje vazbu na receptory hepatocytů a jeho degradaci (Tomandl et al. 2014).

Celkový náboj proteinů určují ionizovatelné molekuly v postranních řetězcích AK. Chovají se jako amfolyty, v závislosti na pH mění počet kladných a záporných nábojů (Beránek et al. 2013). Hodnota pH, při kterém se molekula jeví jako elektroneutrální (počet kladných i záporných nábojů je stejný), se označuje jako isoelektrický bod (Tomandl et al. 2014). To má své uplatnění v elektroforéze bílkovin a v izoelektrické fokusaci (Beránek et al. 2013).

1.2 Funkce sérových bílkovin

V krvi bílkoviny plní různé funkce. Především udržují onkotický tlak v krevním řečišti. Na této funkci se nejvíce podílí albumin. Mnoho bílkovin transportuje látky, jako jsou minerály, hormony, lipidy, léky a mnoho dalších sloučenin, většinou nerozpustných ve vodě. Nejen v krvi mají proteiny funkci pufrů, podílí se na udržení acidobazické rovnováhy organismu. Imunoglobuliny i další proteiny (tzv. proteiny akutní fáze) se podílejí na obraných reakcích organismu. Některé jsou enzymy a inhibitory enzymů a svou enzymovou funkci uplatňují přímo v plazmě. Mnoho z nich se účastní hemokoagulace a brání tak velkým ztrátám krve při poranění. Mají samozřejmě mnoho dalších funkcí, někdy ještě neobjasněných (Racek 2006).

1.3 Celková koncentrace bílkovin v krevním séru

Za fyziologických podmínek odpovídá rozmezí 64 – 83 g/l (Dastyh et al. 2015). Hodnoty v plazmě jsou z důvodu přítomnosti fibrinogenu o 3 – 5 % vyšší (Basile 2014).

Koncentrace může být ovlivněna různými patologickými stavy. K hypoproteinémii dochází při nedostatečném příjmu plnohodnotných bílkovin v potravě, u maldigesce, malabsorpce, při nedostatečné tvorbě u hepatopatií, nebo v důsledku nadměrných ztrát. Často doprovází závažné stavy, spojené s negativní dusíkovou bilancí. K ztrátám dochází u masivní proteinurie (nefrotický syndrom) nebo při zánětech trávicího traktu, jako je Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, u popáleninových traumat. Někdy se s ní můžeme setkat i u zmnožení vody v organismu (Dastyh et al. 2015). Hyperproteinémie je většinou způsobena monoklonální, či polyklonální hyperimmunoglobulémií (Racek 2006). Kromě toho zvýšenou koncentrací proteinů v séru pozorujeme také při dehydrataci organismu (Dastyh et al. 2015).

2 Elektroforéza

Elektroforéza nejčastěji slouží k separaci nabitých částic o velké velikosti, následně k jejich identifikaci, případně kvantifikaci. Je využívána k rozdělení bílkovin v séru a v moči, lipoproteinů, hemoglobinů, izoenzymů, nebo genetické diagnostice (Burtis et al. 2012).

Rozlišujeme několik typů elektroforézy, lišícími se principem i způsobem provedení:

1. Zónová elektroforéza
2. Kapilární elektroforéza (Burtis et al. 2012)

Pro elektroforézu bílkovin se nejvíce používá zónová elektroforéza, kapilární elektroforéza je zde proto jen zmíněna.

2.1 Zónová elektroforéza

Separace molekul probíhá na nosičích, většinou gelových. Nosiče vytvářejí prostředí pro elektroforézu (Burtis et al. 2012; Gottwaldová 2015).

2.1.1 Princip

Nabité částice mají schopnost ve stejnosměrném elektrickém poli se pohybovat podle velikosti a charakteru svého náboje buď ke katodě, nebo k anodě. V důsledku různé pohyblivosti dojde k jejich separaci (Gottwaldová 2015).

Pohyb molekul při elektroforéze závisí na jejím náboji, velikosti a tvaru, dále pak na síle elektrického pole, vlastnostech dělicího média, iontové síle pufru i teplotě (Burtis et al. 2012). Na nabitou částici účinkují dvě protichůdné síly. Elektrostatická síla působí ve směru proudu nabitých částic, odpor viskózního prostředí brání v jejím pohybu. Elektrostatická síla je přímo úměrná velikosti elektrického náboje molekuly a intenzitě elektrického pole. Odpor viskózního prostředí závisí na rychlosti pohybu částice, dále na velikosti a tvaru částice i na viskozitě prostředí (Gottwaldová 2015). Odpor viskózního prostředí působí proti zrychlení částice, což vede k postupné stabilizaci rychlosti pohybu a ustanovení stacionárního stavu (Burtis et al. 2012; Gottwaldová 2015).

Dalším faktorem, ovlivňujícím proces elektroforézy, je endosmóza. Elektroforetické nosiče vyvazují hydroxylové skupiny z dělicího pufru na svůj povrch. Zbylé kladné ionty pak, spolu s vodou, putují ke katodě a strhávají s sebou i vodu. Vytváří tak protiproud bránící pohybu záporně nabitých separovaných molekul. Méně nabité částice tak mohou zůstat na startu, či jsou dokonce unášeny opačným směrem, než probíhá separace (Burtis et al. 2012; Dastych 2014).

2.1.2 Instrumentální technika

Zdroj elektrického pole

Zajišťuje potenciálový rozdíl mezi katodou a anodou. Zařízení umožňují nastavení konstantního proudu, napětí, či výkonu (Dastych 2014).

Při elektroforéze vzniká tzv. Joulovo teplo, které celý systém ohřívá (Gottwaldová 2015). Vznik tepla působí odpor (R) procházejícímu proudu (I) (Burtis et al. 2012). Z tohoto důvodu se používá nastavení konstantního napětí (U), podle Ohmova zákona ($R = U/I$) při nárůstu odporu dojde k snížení elektrického proudu (Dastych 2014).

Pufř

Jeho funkcí je přenos elektrického proudu, udržení stálého pH a ovlivnění typu, i velikosti náboje separovaných částic. Většina separovaných molekul má charakter amfiontu s kyselými a bazickými skupinami (Burtis et al. 2012). Pufř, respektive jeho pH, ovlivňuje jejich disociaci, tím i celkový náboj molekuly. Při elektroforéze sérových bílkovin je pH prostředí voleno tak, aby všechny molekuly měly negativní náboj a putovaly k anodě (Gottwaldová 2015).

Iontová síla pufřu určuje celkový počet iontů v roztoku (Dastych 2014). Ovlivňuje velikost iontové atmosféry kolem náboje, rychlost putování a ostrost elektroforetických zón (Burtis et al. 2012).

Nosné médium

Nosné médium vytváří prostředí pro elektroforetické dělení (Burtis et al. 2012). Musí být chemicky inertní, hydrofilní a porézní. V dnešní době se nejvíce používají gelové nosiče, agarózový, nebo polyakrylamidový gel (Gottwaldová 2015). Gelová elektroforéza může být provedena ve vertikálním i horizontálním uspořádání. Pro optimální separaci je vhodné vzorek nanášet na velmi úzkou startovní zónu (Burtis et al. 2012).

Agaróza je polymer, skládající se z opakujících se jednotek D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy. Vzniká z agaru odstraněním agaropektinu (obsahuje více nabitých skupin, způsobujících endosmózu). Obsahuje velké póry, kterými proteiny procházejí bez zadržení. Dělení tak probíhá pouze na základě jejich elektrického náboje. Její výhodou je nízká afinita k proteinům a po vysušení dobrá průhlednost, což je vhodné pro densitometrii (Burtis et al. 2012).

Polyakrylamid tvoří lineární řetězec z akrylamidu, který je zesíťován přes N, N'-metylenbisakrylamid. Mírou zesíťování a podílem polyakrylamidu můžeme ovlivňovat velikost pórů (Gottwaldová 2015). Díky této vlastnosti dělení může probíhat na základě velikosti a tvaru molekuly. Je vhodný pro SDS gelovou elektroforézu (gelová elektroforéza s použitím dodecylsírany sodného). Nejběžněji je používán 7,5% gel s póry 5 nm, které jsou pro rozdělení bílkovin dostatečné, ale některé velké proteiny krevní plazmy (β -lipoprotein, fibrinogen, α_2 -makroglobulin) mohou mít problém s průchodem a vytvářet tak abnormální frakce (Burtis et al. 2012).

V dnešní době se běžně používají gely ve formě fólií (Zima et al. 2013).

2.1.3 Vizualizace a detekce

Vizualizace

Nejdříve je nutné bílkoviny, rozdělené při elektroforéze, denaturovat a zafixovat v gelu. Mohlo by dojít k difuzi proteinů a k rozostření jednotlivých zón. K tomu se používá kyselina octová, či methanol (Burtis et al. 2012).

Rozdělené frakce se následně zviditelní barvou, Ponceau S, Amidočern, Coomasie brilliant blue (nejčastěji používaná). Specifičtější je použití sloučenin stříbra (soli nitrátu, či diamidu), ale v rutinní praxi se nepoužívá (Burtis et al. 2012; Dastych 2014). Množství navázaného barviva závisí na typu proteinu, či stupni denaturace (Gottwaldová 2015).

Následně se gel odbarvuje v roztoku methanolu, kys. octové, nebo ve vodě. Odstraní se tak přebytečné barvivo a zvýší transparentnost pozadí. Následuje sušení (Dastych 2014).

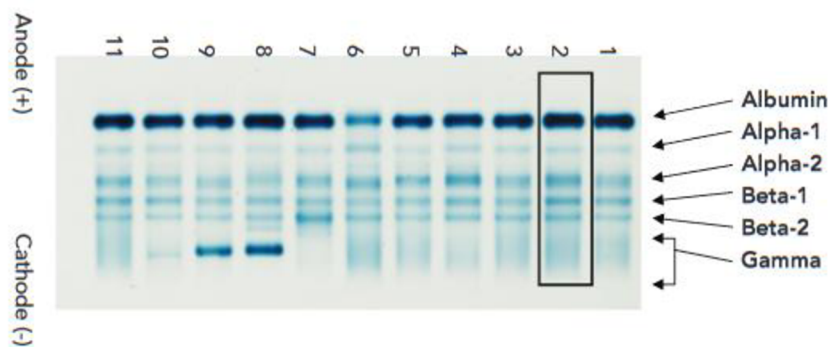
K vizualizaci enzymů se využívá jejich katalytické aktivity při přeměně substrátu na produkt. V místě enzymu dochází k vytvoření barevného produktu. U imunofixací lze aplikovat různě značené protilátky. Molekuly DNA se často vizualizují za pomoci fluorescenčních barev (Burtis et al. 2012).

Detekce

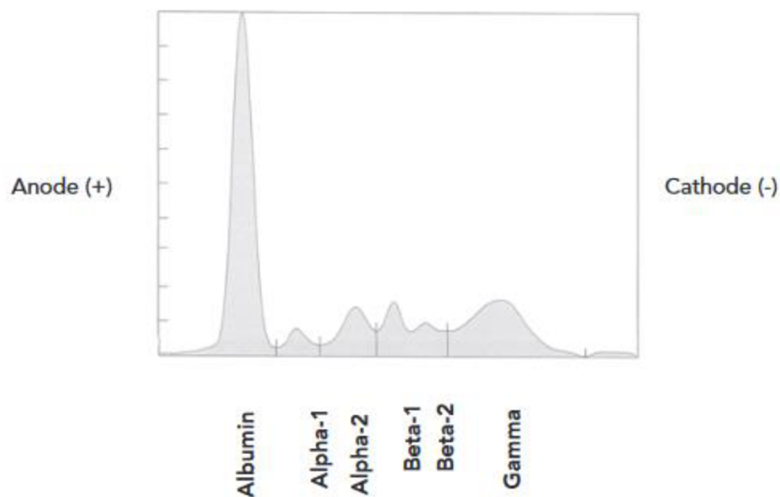
Detekci provádíme okometricky a za pomoci denzitometru.

Při okometrickém hodnocení pozorujeme přítomnost elektroforetických zón a jejich šířku, intenzitu, či přítomnost monoklonálních pásů, což jsou ostře ohraničené atypické zóny (obr. 2). Výsledek srovnáváme s rozdělením standardu.

Denzitometr slouží ke kvantifikaci výsledných zón (Burtis et al. 2012). Jedná se o měření absorbance nebo reflexe vzorku v pevném stavu. U opticky transparentního vzorku paprsek prochází horizontálně a nosič se posouvá vertikálně. U netransparentního případu se měří odraz světelného paprsku reflexní spektrofotometrií. Výsledkem je elektroforeogram, zobrazující intenzitu absorbance ve formě píků (Dastych 2014). Zařízení automaticky detekuje výšku a plochu pod píkem a vypočítá relativní podíl frakcí z celkového množství dělené směsí, např. bílkoviny, nebo aktivity enzymu (obr. 3). Při známé koncentraci celkového množství zobrazí i koncentraci jednotlivých frakcí (Burtis et al. 2012). Těto schopnosti se využívá pro výpočet koncentrace monoklonálních imunoglobulinů.



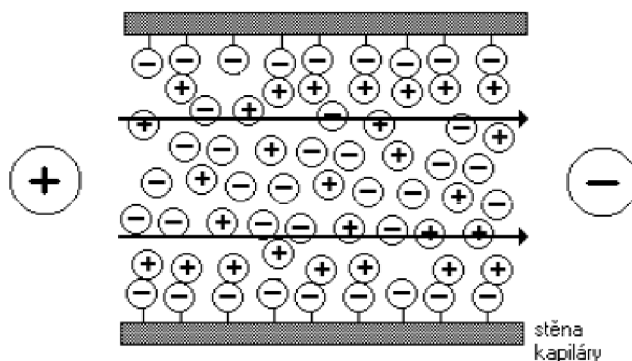
Obrázek 2 Příklad elektroforeogramu elektroforézy bílkovin v séru (Harris a Winter 2012)



Obrázek 3 Denzitometrické zpracování elektroforeogramu na předchozím obrázku (obr. 2) (Harris a Winter 2012)

2.2 Kapilární elektroforéza

K rozdělení molekul dochází v tekutém prostředí uvnitř skleněných kapilár. Využívá se zde elektrokinetických principů i účinku endosmózy. Povrch kapiláry nese záporný náboj. Pozitivní ionty unášejí rozpouštědlo ke katodě a spolu s ním i separované molekuly. Kladně nabité ionty jsou urychlovány, zatímco záporné ionty endosmóza unáší proti směru působení elektrického proudu (obr. 4) (Gottwaldová 2015).



Obrázek 4 Schéma endosmózy při kapilární elektroforéze (Gottwaldová 2015)

Používají se tenké skleněné kapiláry o průměru 0,02 — 0,2 mm a délce 0,1 — 1 m (Zima et al. 2013). Díky velkému povrchu kapiláry ku jejímu objemu, dochází k snadnému odvodu tepla. Můžeme tak aplikovat o mnoho vyšší proud než u zónové elektroforézy. To velmi urychluje separaci (Dastych 2014). Dalšími výhodami jsou vysoká rozlišovací schopnost a nízká spotřeba vzorku (Zima et al. 2013).

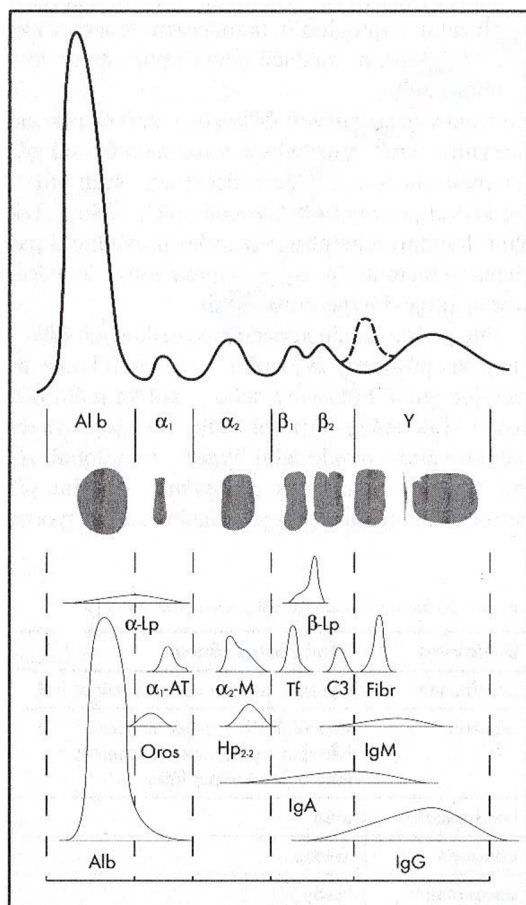
Detektory se nacházejí za dělicí kapilárou. Používáme ultrafialové, fluorescenční, či elektrochemické (Dastych 2014).

3 Rozdělení proteinů při elektroforéze

Dělení probíhá ve stejnosměrném elektrickém poli na agarózovém gelu. Rychlost migrace každé molekuly bílkoviny závisí především na náboji (Racek 2006). Biochemické vlastnosti bílkovin a podmínky při elektroforéze (pH použitého pufru) určují, že proteiny putují od katody k anodě.

Rozdělené frakce barvíme, následně hodnotíme intenzitu a polohu jednotlivých frakcí jednak kvalitativně okometricky, ale také měříme intenzitu zbarvení pomocí denzitometru. Výsledkem je elektroforeogram s píky, odpovídajícími relativnímu množství bílkovin v jednotlivých frakcích (Dastych 2014).

Podle jejich pohyblivosti v elektroforetickém gelu tedy rozlišujeme frakci albuminu (v čele rozdělení), α_1 globulinů, α_2 globulinů, β globulinů, (někdy rozdělena na 2 části: β_1 globuliny a β_2 globuliny) a γ globulinů. Před albuminem se může ještě vyskytnout frakce prealbuminu. Při vyšetřování plazmy se mezi β a γ frakcí objevuje zóna fibrinogenu (obr. 5) (Basile 2014).



Obrázek 5 Zastoupení bílkovin v elektroforetických frakcích (Racek 2006). Mezi β a γ frakcí je naznačena zóna fibrinogenu.

Každá frakce, kromě první (tvořena pouze albuminem), je zastoupena celou škálou bílkovin. Jejich zastoupení v jednotlivých frakcích však není striktně dáno, často částečně přesahují i do sousedních zón (Racek 2006).

3.1 Jednotlivé elektroforetické frakce a jejich bílkovinné zastoupení

3.1.1 Albumin

Albumin je nejvíce zastoupenou bílkovinou v séru. Jeho frakce tvoří 54—66 % koncentrace celkové bílkoviny (Hložková 2016). Ze všech proteinů má největší mobilitu na elektroforetickém gelu. Skládá se z jednoho polypeptidového řetězce elipsoidního tvaru o Mr 66 000 kD (Ledvina et al. 2009).

Pro své velké množství se výrazně podílí na udržování onkotického tlaku krve. Při poklesu koncentrace pod 25 g/l dochází k výraznému přesunu vody do intersticia a vzniku otoků (Ledvina et al. 2009). Kromě toho transportuje řadu látek, jako jsou bilirubin, volné MK, hormony, stopové prvky (např. Zn, Cu) a léky (Dastyh et al. 2015).

Ke snížení albuminové frakce dochází v důsledku nedostatečné syntézy např. u jaterního onemocnění, při velkých ztrátách u popálenin, nefrotického syndromu nebo u enteropatií. Malé snížení může způsobit akutní zánět nebo těhotenství (Basile 2014). Další možností je přesun do 3. prostoru (intersticia nebo transceluárního prostoru) u ischemických nebo šokových stavů (Dastyh et al. 2015). Vzácně genetický defekt, nebo vazba nějaké látky způsobuje rozdělení albuminové frakce, tzv. bisalbuminémii (Racek 2006).

3.1.2 α_1 globuliny

Hlavní podíl této frakce tvoří α_1 -antitrypsin. Kromě něj zde najdeme α_1 -fetoprotein, α_1 -lipoprotein, α_1 -mikroglobulin, transkortin, thyroxin vázající protein a další (Racek 2006; Ledvina et al. 2009).

α_1 -antitrypsin (α_1 -inhibitor proteináz — API)

Jedná se o inhibitor proteináz, především elastázy a kolagenázy, uvolňovaných z makrofágů. Jeho úkolem je ochrana vlastních tkání před proteolýzou (Racek 2006). Řadí se mezi tzv. proteiny akutní fáze (Dastyh et al. 2015).

Zvýšení koncentrace (i zvýšení podílu α_1 frakce) je způsobeno akutními záněty nebo při těhotenství. Snížení se naopak vyskytuje u dědičného onemocnění zvaného hereditární defekt tvorby API (Racek 2006).

3.1.3 α_2 globuliny

Tuto frakci můžeme rozdělit na dvě části — katodickou a anodickou. V anodické převažuje α_2 -makroglobulin, v katodické haptoglobin. Kromě těchto dvou bílkovin se zde nalézají také ceruloplazmin, feritin a další (Basile 2014; Dastych et al. 2015).

α_2 -makroglobulin

Je největším proteinem v séru (Mr 725 000 kD) (Ledvina et al. 2009). Jedná se o inhibitor endogenních proteináz trypsinu a chymotrypsinu. Účastní se také hemokoagulačních procesů jako inhibitor plazminu. Pro svou velikost špatně proniká glomerulem ledvin, díky tomu pozorujeme jeho zvýšení při nefrotickém syndromu (Dastych et al. 2015; Basile 2014).

Snížení doprovází akutní pankreatitidy, dále také primární deficit v důsledku genetického onemocnění. K zvýšení dochází v akutní fázi zánětlivého onemocnění, u nefrotického syndromu, v dětství a v těhotenství (Racek 2006; Basile 2014; Zima 2013).

Haptoglobin

Skládá se ze dvou řetězců α a dvou řetězců β . V krvi pevně váže molekulu hemoglobinu, uvolněnou při intravazální hemolýze. Tento komplex je pak rychle vychytáván buňkami RES. Kromě toho má i antiproteinázový účinek a je reaktantem akutní fáze (Zima 2013).

Zvýšení koncentrace haptoglobinu způsobují zánětlivé procesy, trauma a operace. Ke snížení dochází při nadměrné intravazální hemolýze, u jaterních onemocnění, při proteinurii a při některých poruchách erythropoézy (Zima 2013).

3.1.4 β globuliny

Tato oblast se někdy dělí na podzóny β_1 a β_2 . V β_1 převládá transferin, kromě něj zde najdeme např. hemopexin. V β_2 zóně se vyskytuje C3 (nejpočetnější) a C4 složka komplementu, β -lipoprotein, β_2 -mikroglobulin, či C-reaktivní protein (Nechvátalová 2016).

Transferin

Jeho hlavní funkcí je vazba železitých iontů (Fe^{3+}) a jejich transport z enterocytů do efektorových tkání. Jedna molekula je schopna vázat dva atomy železa (Penka et al. 2011). Zajišťuje tak jeho detoxikaci, jelikož volné železo podporuje tvorbu hydroxylového radikálu a oxidaci různých struktur (Ledvina et al. 2009). Normálně je jeho kapacita využita z 1/3. Při nedostatku železa dochází k nárůstu koncentrace transferinu a zároveň k poklesu jeho saturace (Penka et al. 2011). To je důležité k posouzení celkových zásob železa v organismu a k hodnocení anemických stavů.

Zvýšené hodnoty se vyskytují u anémií z nedostatku železa a při těhotenství (Nechvátalová 2016). K snížení koncentrace dochází u proteinové malnutrice, u jaterních chorob, u enteroragie nebo nefrotického syndromu (Dastyh et al. 2015). Jedná se o negativní reaktant akutní fáze, jeho snížení doprovází chronické stavy (Basile 2014).

C3 a C4 složka komplementu

Komplementový systém je komplex 11 bílkovin v krevní plazmě (Racek 2006). Mají imunitní funkci, řadí se k nespecifické humorální imunitě. Po setkání s určitou strukturou na povrchu buňky, či bakterie dochází k aktivaci kaskády, která vede k opsonizaci, nebo až k lýze. Takovou strukturou může být Fc fragment navázané protilátky, či lektin připojený na manózu sacharidových struktur patogenů. Některé proteiny, vytvořené během reakce, mají chemotaktický účinek (Hořejší a Bartůňková 2009).

C reaktivní protein (CRP)

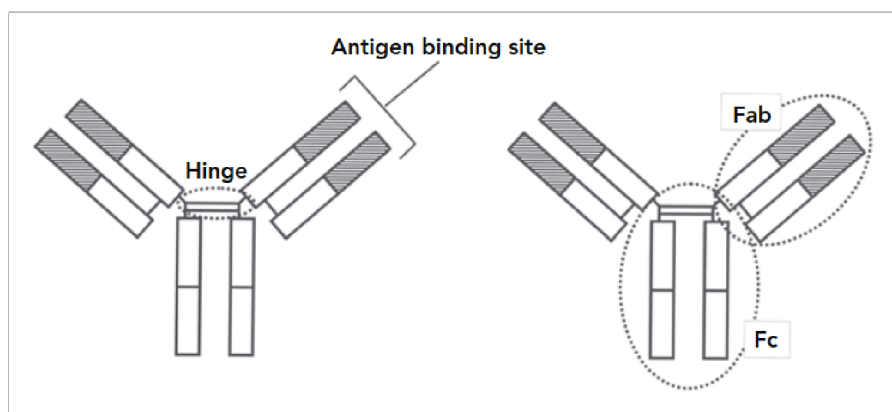
Jedná se o bílkovinu akutní fáze. V imunitní reakci je schopen aktivovat komplementový systém a vázat se na C-polysacharid pneumokoků (Zima et al. 2013).

K mnohonásobnému zvýšení dochází u bakteriálních zánětů. Na virové infekce nereaguje. Kromě toho se nadprodukce vyskytuje i u jiných zátěží, např. poranění, chirurgický zákrok, infarkt myokardu, porod a jiné. V praxi se využívá jako marker zánětlivého procesu. Pro jeho rychlou odezvu slouží i pro monitorování stavu, nebo účinnosti léčby (Dastyh et al. 2015).

3.1.5 γ globuliny

Největší zastoupení zde mají imunoglobuliny. Ty se však nachází i v β a částečně v α_2 globulinové oblasti (obr. 5) (Racek 2006). Tento fakt musí být zohledněn při hodnocení monoklonální gamapatie.

Všechny imunoglobuliny mají v zásadě jednotnou základní strukturu. Skládají se z 2 lehkých a 2 těžkých řetězců, spojených disulfidickými můstky. Lehké řetězce řadíme do dvou typů κ a λ , těžké řetězce do 5 typů (α , γ , δ , ϵ , μ). Podle typu těžkého řetězce rozlišujeme imunoglobuliny Ig A, Ig G, Ig D, Ig E a Ig M. Na celé struktuře pak rozeznáváme jeden Fc a 2 Fab fragmenty. Fab fragmenty nesou variabilní místa, která jsou zodpovědná za vazbu k antigenu. Variabilní místo je složeno z lehkého i těžkého řetězce (obr. 6) (Hořejší a Bartůňková 2009).



Obrázek 6 Struktura molekuly imunoglobulinu (Harris a Winter 2012)

Imunoglobuliny jsou tvořeny aktivovanými lymfocyty B — plazmocyty. Jeden klon plazmocyťů produkuje protilátky o stejné specifitě. Označují se jako monoklonální protilátky. V organismu jsou v nadměrné míře tvořeny u monoklonálních gamapatií, v laboratorní praxi se běžně používají v různých imunochemických reakcích protilátky připravené in vitro. Plazmocyty, produkující takovéto protilátky, vycházejí z jednoho mateřského B lymfocytu (Bartůňková a Paulík 2011).

Imunoglobuliny Ig M

Tvoří se při infekci jako první, svědčí pro aktivní infekci. Postupně jsou nahrazovány imunoglobuliny G. Jejich řetězce vytvářejí pentamery o vysoké M_r (Ledvina et al. 2009).

Imunoglobuliny Ig G

Při infekci jsou tvořeny až v pozdější fázi. Mají obvykle vyšší afinitu k antigenu než Ig M. V organismu přetrvávají po dlouhou dobu, jsou produkovány paměťovými buňkami (Bartůňková a Paulík 2011). Pro jejich malou molekulu snadno procházejí placentou, zajišťují imunitní ochranu plodu a dočasně i novorozence (Hořejší a Bartůňková 2009). Mohou však způsobit hemolytické onemocnění novorozence.

Imunoglobuliny Ig A

Zajišťují slizniční imunitu. Jejich funkcí je hlavně opsonizace a tím usnadnění fagocytózy cizorodých částic. Vyskytují se i ve formě dimerů (Ledvina et al. 2009).

Imunoglobuliny Ig E

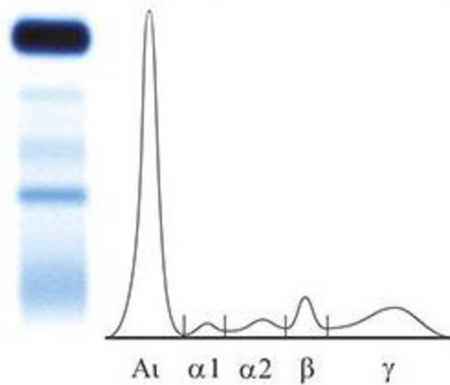
Jsou produkovány při alergických reakcích a parazitárních infekcích.

Imunoglobuliny Ig D

Vyskytují se v tělních tekutinách ve velmi nízkých koncentracích. Bývají jako receptory vázány na plazmatickou membránu B lymfocytů (Ledvina et al. 2009).

4 Elektroforetické typy

Fyziologické složení bílkovin v krvi a jejich poměrové zastoupení je konstantní. Tomuto stavu odpovídá normální profil elektroforeogramu (obr. 7).

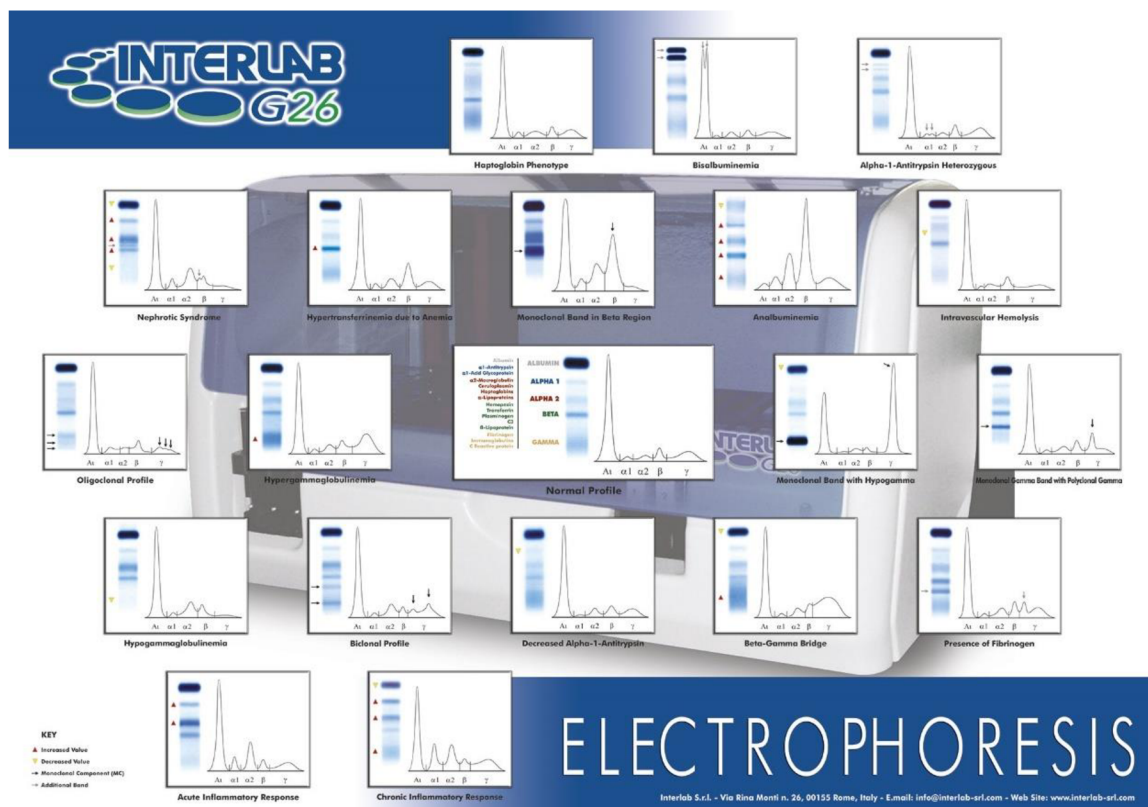


Obrázek 7 Normální elektroforeogram (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8)

Pro denzitometrické vyhodnocení jsou referenční meze relativního zastoupení jednotlivých frakcí následující:

- Albumin 52 — 65 %
- α_1 globuliny 2 — 5 %
- α_2 globuliny 7 — 11 %
- β globuliny 9 — 13 %
- γ globuliny 14 — 20 % (Basile 2014)

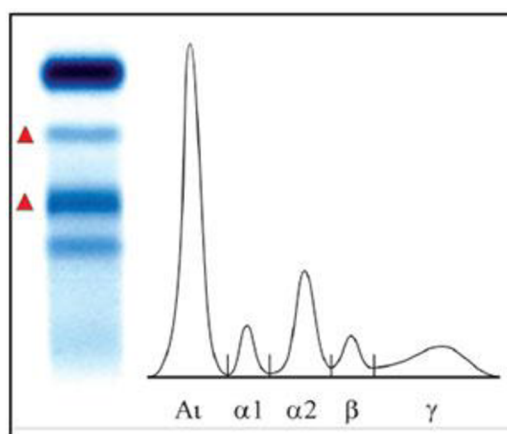
Při různých patologických stavech se charakter jednotlivých frakcí může měnit. Dochází k jejich zmnožení, úbytku, vytvoření nových frakcí, k tvorbě monoklonálních pásů (Racek 2006). Některé změny jsou charakteristické pro určité skupiny chorob, podle toho byly určeny tzv. elektroforetické typy (obr. 8) (Racek 2006).



Obrázek 8 Elektroforetické typy — rozdělení od firmy Interlab (Interlab S.r.l. 2013)

4.1 Typ akutního zánětu

U akutního zánětu dochází k nárůstu α_1 a α_2 globulinů a zároveň k mírnému poklesu albuminové frakce (obr. 9). Nárůst způsobuje zmnožení proteinů akutní fáze. Pokles albuminu je relativní nebo v důsledku zrychleného katabolismu (Racek 2006).

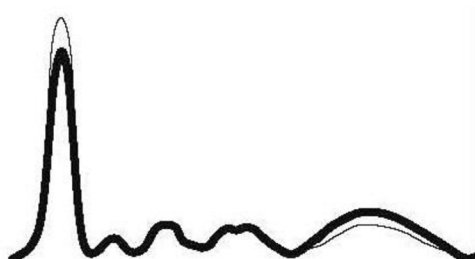


Obrázek 9 Akutní zánět (Basile 2014)

Předpokladem je zánět rozsáhlého charakteru, většinou u bakteriálních infekcí. Kromě toho jej nalezneme u popálenin, traumat, po chirurgických zákrocích a v jiných akutních stavech (Racek 2006; Basile 2014).

4.2 Typ chronického zánětu

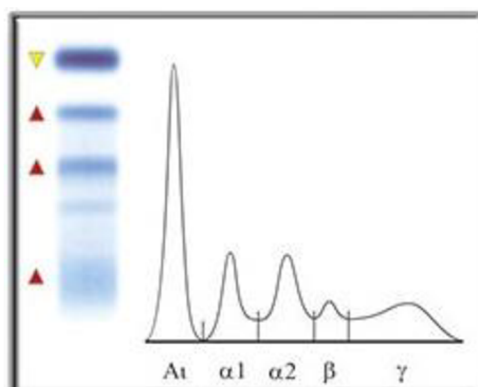
α_1 a α_2 globuliny nejsou zvýšené (Vejražka 2011). Dochází však k nárůstu v celé oblasti γ frakce, který má charakter širokého pruhu. Albumin je mírně snížen (obr. 10) (Racek 2006; Vejražka 2011).



Obrázek 10 Chronický zánět (Vejražka 2011)

Vyskytuje se u chronických infekcí (tuberkulóza), u autoimunitních onemocnění (systémový lupus erythematodes, skleróza multiplex a další), nebo u chronických zánětlivých procesů (sarkoidóza) (Harris a Winter 2012).

Zvýšení α_1 a α_2 globulinů svědčí pro opětovnou aktivaci zánětu — **chronický aktivní zánět** (obr. 11). Může se vyskytovat u chronické aktivní revmatoidní artritidy, u aktivního systémového lupusu erythematodes, chronické aktivní hepatitidy a dalších (Masopust 1998; Vejražka 2011).

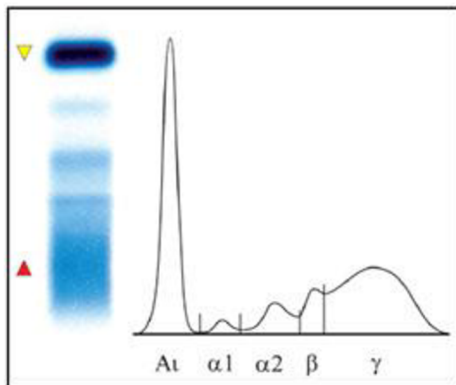


Obrázek 11 Chronický zánět (Interlab S.r.l. 2013), jeho aktivní forma (upravený obr. 8)

4.3 Typ chronické hepatitidy nebo jaterní cirhózy

V důsledku snížené funkce jater nacházíme snížené hodnoty albuminu. Kromě toho dochází k zmnožení imunoglobulinů, které přesahují z γ frakce až do β frakce. Vytváří se tak charakteristický β - γ můstek (obr. 12). Je tvořen Ig A, který se nachází mezi těmito dvěma frakcemi (Basile 2014). U jaterního onemocnění se může vyskytnout i snížení α_1 , α_2

a β globulinů (Racek 2006). Zmnožení imunoglobulinů kompenzuje pokles onkotického tlaku v důsledku nedostatku ostatních krevních bílkovin.

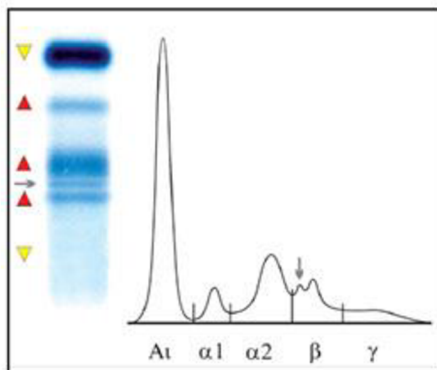


Ponte beta-gamma

Obrázek 12 β - γ můstek (Basile 2014)

4.4 Typ nefrotického syndromu (obraz ztrát bílkovin)

Tento typ je charakterizován hypoalbuminémií a podle závažnosti i hypogamaglobulinémií. Zmnoženy jsou α_2 a β globuliny, které obsahují bílkoviny o velké molekulové velikosti, které tak snadno neprocházejí membránou glomerulu (obr. 13) (Basile 2014).



Síndrome nefrotica

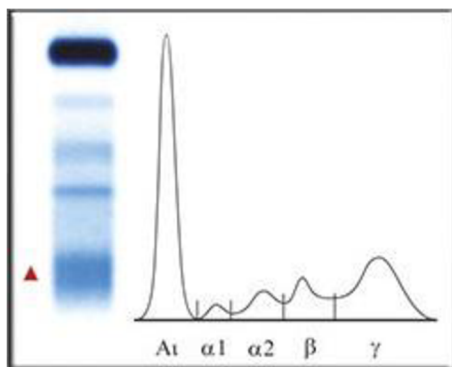
Obrázek 13 Typ ztrát bílkovin (Basile 2014)

Nacházíme jej u velkých ztrát bílkovin, především u nefrotického syndromu. Při poškození membrány glomerulu dochází ke ztrátě selektivity, do moči pronikají bílkoviny, jako je albumin, či imunoglobuliny. V důsledku velkých ztrát těchto bílkovin za účelem udržení onkotického tlaku narůstá množství bílkovin o velké M_r , které tak snadno neprocházejí (Dastyh et al. 2015). Je to např. α_2 -makroglobulin, či lipoproteinové částice (Harris a Winter 2012). Tento stav nacházíme u proteinurie nad 3 g/24h (Giot 2010)

Podobný obraz může nastat i u enteropatií. Od nefrotického syndromu se může lišit menšími ztrátami γ globulinů, naopak frakce α_2 a β globulinů jsou méně zvýšeny. K ztrátám proteinů dochází v důsledku poškození sliznice trávicího traktu (Gurau et al. 2016). Příčinou mohou být různé infekce, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, celiakie atd. (Dastyh et al. 2015)

4.5 Typ polyklonální hyperimmunoglobulinémie

Jedná se o zvýšení γ globulinů v celé oblasti této frakce bez změn v ostatních oblastech (obr. 14) (Gurau et al. 2016). Je to způsobeno vysokou aktivitou B lymfocytů. Někdy bývá snížena koncentrace albuminu (Gurau et al. 2016).

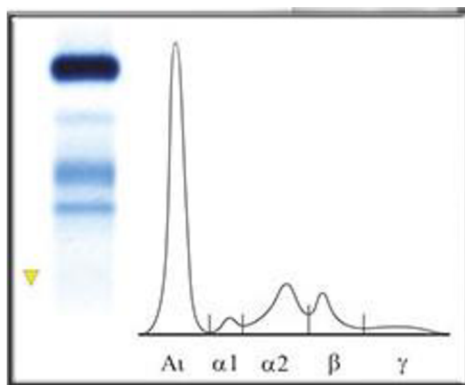


Obrázek 14 Polyklonální hyperimmunoglobulinémie (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8)

Tento obraz nacházíme u stavů způsobených chronickým jaterním onemocněním, autoimunitními poruchami, rakovinou, leukémií, chronickou myelomonocytární leukémií (Gurau et al. 2016). Může se objevit i u závažných virových infekcí (hepatitida, HIV infekce, rubeola, mononukleóza) (Giot 2010; O'Connell et al. 2005).

4.6 Typ hypogamaglobulinémie

Tento stav představuje nedostatek γ globulinů. Ostatní frakce jsou v normě (obr. 15).



Obrázek 15 Hypogamaglobulinémie (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8)

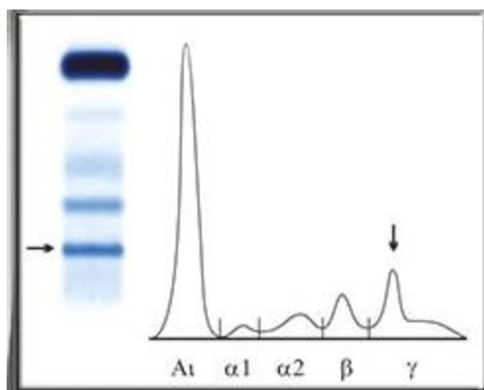
Fyziologicky ji najdeme u novorozenců, kteří ještě nejsou schopni produkovat protilátky v dostatečné míře. V prvních měsících života jsou chráněni protilátkami od matky (Hořejší a Bartůňková 2009).

Další příčinou mohou být vrozené imunodeficience a to především deficit Ig G a Ig A. Další nedostatek protilátek se při elektroforéze pro nízkou koncentraci v séru neprojeví (Gurau et al. 2016). Vzácně se vyskytuje agamaglobulinémie, vázaná na chromozom X. Pacienti nemají žádné B lymfocyty a tudíž netvoří ani protilátky. Imunodeficience způsobují potíže s infekcemi, vyvolanými především opouzdřenými mikroby (Hořejší a Bartůňková 2009).

Sekundárně hypogamaglobulinémii mohou způsobit nádory lymfatické tkáně (Racek 2006).

4.7 Typ monoklonální gamapatie

Je pro ni charakteristický ostře ohraničený atypický pík v oblasti γ globulinů (obr. 16). Tento tzv. monoklonální pás se však může vyskytovat i v α_2 nebo β frakci (Racek 2006).



Obrázek 16 Monoklonální pás v γ frakci (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8)

Najdeme jej nejčastěji u mnohočetného myelomu, dále také u monoklonální gamapatie nejasného významu, Waldenströmovy makroglobulinémie, amyloidózy a dalších (O'Connell et al. 2005). Podrobněji o těchto stavech bude pojednáno v kapitole 5 (str. 32).

Vzácně se vyskytují také biklonální a triklonální gamapatie se dvěma a třemi monoklonálními pásy na elektroforeogramu (Maisnar et al. 2012).

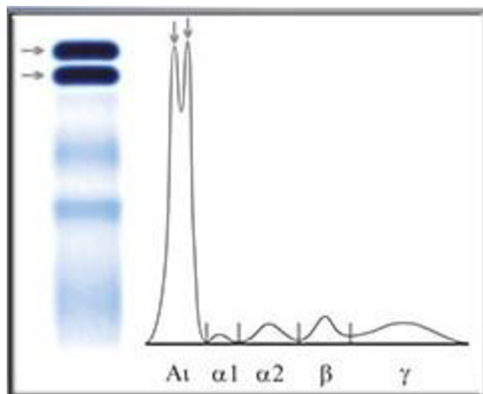
4.8 Malnutriční typ

U tohoto stavu nacházíme nízkou frakci albuminu a β globulinů (především transferin). Při nedostatku železa se snížení transferinu neprojeví. Někdy dochází k mírnému zvýšení α_1 a α_2 globulinů, čímž se kompenzuje pokles onkotického tlaku. Od akutního zánětu jej odlišíme díky anamnéze a nízké koncentraci celkové bílkoviny (Racek 2006).

Malnutriční typ je spojen s nedostatečným příjmem bílkovin v potravě u malnutrice, maldigesce, malabsorpce, u chorob zažívacího traktu (Dastyh et al. 2015). Dále může doprovázet endokrinní onemocnění (hypertyreóza, Cushingův syndrom) nebo těžké zánětlivé stavy (Giot 2010).

4.9 Bisalbuminémie

V elektroforeogramu vidíme dva píky albuminu (obr. 17).

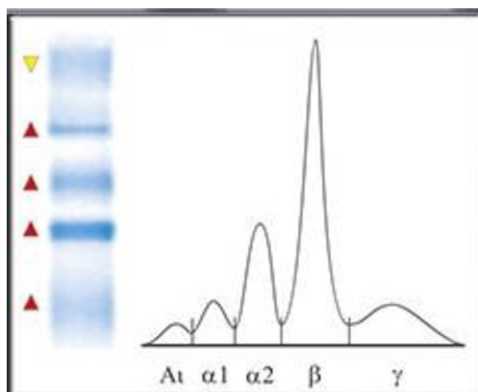


Obrázek 17 Bisalbuminémie (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8)

Bisalbuminémie vzniká v důsledku buď genetické variace, nebo u enteropatií, či vazbou některých léků (β -laktamy) (Giot 2010; Racek 2006).

4.10 Analbuminémie

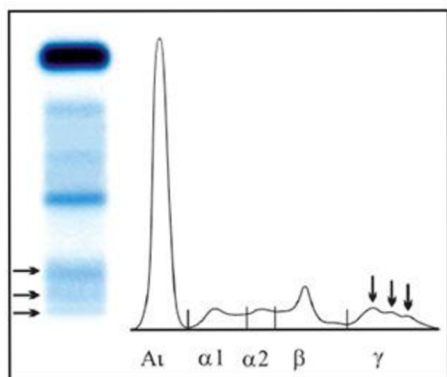
Koncentrace albuminu je velmi nízká, kompenzačně, pro zachování osmotického tlaku jsou zvýšeny ostatní frakce (obr. 18). I přesto pacienti trpí otoky (Giot 2010). Jedná se o vzácné dědičné onemocnění (Racek 2006).



Obrázek 18 Analbuminémie (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8)

4.11 Oligoklonální pásy

V γ zóně vidíme několik úzkých pásů (obr. 19). Při některých stavech dochází k zvýšení některých podtříd imunoglobulinů, což se projeví vznikem oligoklonálních pásů (Giot 2010).



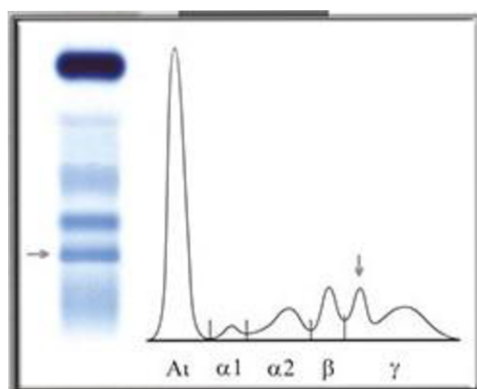
Profilo oligoclonale

Obrázek 19 Oligoklonální pásy (Basile 2014)

Tento stav se vyskytuje u virových infekcí, autoimunitních chorob, či u imunosupresivní léčby (Basile 2014). Oligoklonální pásy ve svém obrazu má téměř polovina pacientů s mozkomíšní sklerózou. U takového nálezu se doporučuje provést vyšetření mozkomíšního moku (Kopáč 2004).

4.12 Přítomnost fibrinogenu

Mezi β a γ frakcí se objeví nová frakce fibrinogenu (obr. 20). To může ztížit identifikaci monoklonální gamapatie.



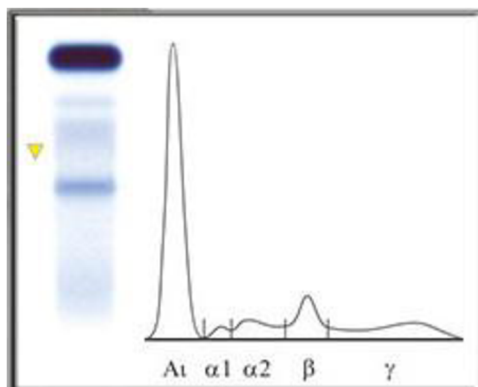
Obrázek 20 Přítomnost fibrinogenu (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8)

Tento obraz nalezneme při odběru plazmy, nebo u pacientů s poruchou hemokoagulace (Racek 2006).

4.13 Hemolýza

U hemolytického séra vazba hemoglobinu na haptoglobin způsobí posun α_2 globulinové frakce ke katodě. Volný hemoglobin zvyšuje množství β globulinů (Racek 2006).

Intravaskulární hemolýza se projeví poklesem v oblasti α_2 globulinů. Haptoglobin s navázaným hemoglobinem je rychle eliminován buňkami RES (Zima 2013).



Obrázek 21 Intravaskulární hemolýza (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8)

5 Monoklonální gamapatie

Jedná se o stav, v němž dochází k tvorbě monoklonálního imunoglobulinu (M-Ig) prokazatelného v krvi či v moči. Je produkován jedním klonem plazmatických buněk, které mají buď benigní charakter, ten však může přecházet v maligní formu (Adam et al. 2008; Maisnar et al. 2012).

5.1 Vyšetřovací metody a význam stanovení pomocí elektroforézy bílkovin v séru

Pro diagnostiku tohoto stavu se používají různé metody nejen laboratorní.

Elektroforéza bílkovin slouží především jako screeningová metoda pro snadnou diagnostiku přítomnosti monoklonálního imunoglobulinu. Je poměrně jednoduchá, levná a dostatečně specifická. Prostřednictvím této metody se provádí i stanovení koncentrace M-Ig (Maisnar et al. 2012). Relativní podíl M-Ig se za pomoci změřené koncentrace celkové bílkoviny přepočítá na absolutní hodnotu v g/l. Toho se využívá k posouzení závažnosti onemocnění a také k sledování jeho vývoje (Adam et al. 2008).

Kromě ní provádíme i elektroforézu bílkovin v moči, sloužící k určení přítomnosti M-Ig v moči a k případné kvantifikaci, imunofixaci v séru i v moči k potvrzení diagnózy monoklonální gamapatie i k identifikaci typu M-Ig. Dále vyšetřujeme koncentraci polyklonálních Ig, množství volných lehkých řetězců v séru, či v moči, koncentraci albuminu a β_2 mikroglobulinu, případně zjišťujeme viskozitu séra (Maisnar et al. 2012).

Z dalších vyšetření se provádí cytologie, či histologie kostní dřeně pro identifikaci typu a počtu nádorových buněk, ze zobrazovacích metod např. RTG vyšetření, výpočetní tomografie (CT), nebo magnetická rezonance (MR) pro zjištění ložisek v kostech, případně histologické vyšetření postižené tkáně u amyloidózy a mnohé další (Adam et al. 2008; Bureš et al. 2014).

5.2 Onemocnění spojená s monoklonální gamapatií

Podle WHO klasifikace krevních chorob rozlišujeme tyto nosologické jednotky tvořené klonálními plazmocytami:

1. Maligní jednotky
 - a. Solitární (jednoloziskový) medulární plazmocytom,
 - b. Solitární primárně měkkotkáňový (extramedulární) plazmocytom
 - c. Mnohočetný myelom
 - d. Osteosklerotický myelom
 - e. POEMS syndrom
 - f. Castlemanova nemoc
2. Benigní jednotky
 - a. Monoklonální gamapatie nejasného významu
 - b. Nemoci z ukládání monoklonálního imunoglobulinu (AL-amyloidóza z lehkých řetězců a nemoci způsobené depozity imunoglobulinů v neamyloidové podobě) (Adam et al. 2008)

Kromě těchto stavů monoklonální imunoglobuliny mohou být tvořeny i u B-lymfoproliferativního onemocnění (chronická lymfatická leukémie, lymfoplasmocytární lymfom (Waldenströmova makroglobulinémie), splenický lymfom, nemoc z těžkých řetězců, Schnitzlerův syndrom atd.) (Adam et al. 2008; Špička et al. 2005). Dále v nízké koncentraci jej nalézáme u autoimunitních nemocí, revmatoidní artritidy, sklerodermie, Hashimotovy tyroiditidy, u některých kožních chorob a dalších stavů (Adam et al. 2008).

Dále zmíním některé nejčastěji se vyskytující onemocnění a základní informace o nich.

5.2.1 Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)

Tímto termínem se označuje stav, kdy detekujeme přítomnost M-Ig, produkujícího plazmocytů v kostní dřeni, ale zároveň není přítomna jejich maligní proliferace a ani známky orgánového poškození v důsledku tohoto onemocnění (Adam et al. 2011).

U části nemocných může dojít k přechodu do některé z maligních forem (Bureš et al. 2014), nejčastěji do mnohočetného myelomu. Považujeme ji tedy za prekancerózní stav. Přechod je postupný, proto se pacienti v pravidelných intervalech monitorují (Adam et al. 2011).

5.2.2 Mnohočetný myelom

Pro mnohočetný myelom je typická, kromě přítomnosti monoklonálního imunoglobulinu, i infiltrace kostní dřeně s postupným útlumem krvetvorby a výskyt osteolytických ložisek, projevujících se bolestmi kostí (Adam et al. 2008). V některých případech (asi 1 % nemocných s mnohočetným myelomem) se můžeme setkat s takzvaným nesekretorickým myelomem, kdy v krvi ani v moči nedetekujeme M-Ig (Bureš et al. 2014).

Pacienti nejčastěji trpí únavou, bolestmi kostí, a opakovanými infekcemi (projevy imunodeficitu) (Adam et al. 2008). Mezi další symptomy patří anémie, projevy renální insuficience a proteinurie, poruchy homeostázy, hyperkalcémie, tvorba amyloidu, či příznaky hyperviskózního syndromu (Špička et al. 2005). Vzácně může docházet i k neuropatiím, pokud je imunoglobulin schopný se vázat na struktury těla a poškozovat je (Adam et al. 2008).

5.2.3 Primární amyloidóza

Jedná se o ukládání původně solubilních proteinů do fibrilární podoby ve stěnách malých cév nebo v extracelulárním prostoru. Ukládání často způsobuje poškození tkáně. Takovou schopnost může mít i M-Ig. (Adam et al. 2008; Špička et al. 2005).

Amyloidózu často najdeme u mnohočetného myelomu nebo u Waldenströmovy makroglobulinémie. Pokud ji však způsobí M-Ig produkovaný nemaligním klonem plazmocytů (jako u MGUS), označujeme ji jako primární amyloidózu (Adam et al. 2008).

Dochází u ní k rozvoji nefrotického syndromu, městnavého srdečního selhání, syndromu karpálního tunelu, periferní neuropatie, dále také k poškození jater, myopatii a dalším poruchám (Adam et al. 2008; Špička et al. 2005).

5.2.4 Waldenströmová makroglobulinémie

Je formou lymfoplazmocytárního lymfomu, který produkuje M-Ig (Penka et al. 2011). Způsobuje ji maligní proliferace plazmocytoidních lymfocytů, produkujících M-Ig třídy M (Bureš et al. 2014).

Projevuje se únavou, slabostí, úbytkem hmotnosti, difúzním zvětšením uzlin, hepatosplenomegálií (Bureš et al. 2014; Špička et al. 2005). Pro svou velkou molekulu není schopen procházet do intersticia, a tak se více hromadí ve vaskulárním systému, kde často způsobí hyperviskózní syndrom (Bureš et al. 2014).

Praktická část

6 Cíl práce

Úkolem této bakalářské práce je statistické zhodnocení dat vyšetření elektroforézy bílkovin v séru na Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice u svaté Anny v Brně, která byla retrospektivně sesbírána v rozmezí 3 měsíců.

Cílem tedy je:

1. Posouzení četnosti konkrétní diagnózy, uvedené na žádance a počtu odeslaných vzorků z konkrétního zdravotnického zařízení, či oddělení
2. Vyhodnocení četnosti jednotlivých elektroforetických obrazů
3. Porovnání množství pozitivních výsledků (typ monoklonální gamapatie) mezi muži a ženami a v závislosti na věku pacienta
4. Posouzení frekvence předchozích vyšetření pacienta a závislosti na pozitivitě výsledku.

Na závěr jsou uvedené 2 kazuistiky některých elektroforetických nálezů.

7 Popis metodiky

Data byla získána retrospektivně z laboratorního informačního systému laboratoře Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice u svaté Anny v Brně. Pro účely této bakalářské práce byli vybráni pacienti, u kterých se vyšetřila elektroforéza bílkovin v séru a to v období od 1. října do 31. prosince roku 2016. Takto vznikl soubor o 541 stanovení.

U každého pacienta bylo zaznamenáno pohlaví, věk, elektroforetický typ, zjištěný na základě vyšetření elektroforézy bílkovin v séru, a počet předchozích vyšetření elektroforézy bílkovin v laboratoři OKB FN USA Brno. Kromě těchto parametrů byla poznačena i hlavní diagnóza, uvedená na žádance, oddělení a zařízení, z kterého byl vzorek odeslán.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno za pomoci kancelářského programu Excel 2016 a statistického programu STATICA 12.

Kromě popisné statistiky byl použit k hodnocení i Pearsonův chí-kvadrát test (χ^2).

Slouží k testování nezávislosti v kontingenčních tabulkách. Hodnotí existenci vztahu dvou a více nezávislých nominálních či ordinálních znaků (Pavlík a Dušek 2012). Nulovou hypotézou je, že neexistuje vztah mezi řádky a sloupci kontingenční tabulky, tedy mezi četnostmi náhodných veličin X a Y. Principem testu je porovnání zjištěných četností výskytu veličiny X a Y a jejich očekávaných četností s platností nulové hypotézy (mezi četnostmi veličiny X a Y není žádný vztah) (Jarkovský 2016; Pavlík a Dušek 2012). Test lze použít v případě, že hodnoty, uvedené v kontingenční tabulce, jsou nezávislé, tedy každý prvek je uveden pouze v jedné buňce. Další podmínkou je, že alespoň 80 % buněk musí mít hodnotu četností nad 5 a ve všech buňkách musí tato hodnota být alespoň 2 (Pavlík a Dušek 2012).

8 Stanovení frakcí sérových bílkovin elektroforézou

Stanovení jednotlivých bílkovinných frakcí bylo provedeno v laboratoři Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice u svaté Anny za pomoci automatického analyzátoru Interlab G26 Easy Fix.

Při vyšetření se postupuje podle pokynů ve standardních operačních postupech: Stanovení frakcí sérových bílkovin elektroforézou [Albumin_S, Alfa-1-globuliny_S, Alfa-2-globuliny_S, Beta-globuliny_S, Gama-globuliny_S] (Hložková 2016).

8.1 Interlab G26 Easy Fix

Jedná se o analyzátor pro automatické provedení elektroforézy bílkovin v séru, či moči, i pro imunofixaci a další elektroforetické metody. Je schopen sám aplikovat vzorky na gel, provést elektroforetickou separaci, gel následně přemístit do lázni s jednotlivými roztoky, vysušit jej a nakonec denzitometricky vyhodnotit. Denzitometrické zpracování je prováděno za pomoci softwaru Elfolab (Interlab S.r.l. nedatováno).

Za hodinu je možné analyzovat až 150 vzorků. Obsahuje 4 držáky na gely a do každého lze umístit 1 — 2 gely. Na gel se ve dvou řadách vejde 26 vzorků (včetně kontrolního vzorku). Dělení probíhá mezi 3 elektrodami zrcadlově ve dvou řadách (Gottwaldová 2015).



Obrázek 22 Analyzátor Interlab G26 Easy Fix (Interlab S.r.l. nedatováno)

8.2 Princip měření

Principem je elektroforetické rozdělení bílkovin v séru do pěti bílkovinných frakcí (albumin, α_1 globuliny, α_2 globuliny, β globuliny a γ globuliny). Separace probíhá na agarózových gelech v alkalickém prostředí (pH 8,9). Bílkoviny putují od katody k anodě ve stejnosměrném elektrickém poli, rychlost jejich pohybu je závislá na jejich celkovém náboji.

Po ukončení separace jsou rozdělené proteiny denaturovány a obarveny pomocí barviva Acid Blue, potom se deska s gelem odbarvuje a vysušuje.

Následuje denzitometrické měření. Výstupem je elektroforeogram s jednotlivými příky, odpovídajícími intenzitě zbarvení rozdělených zón s vyjádřeným relativním zastoupením. Za pomoci známé koncentrace celkové bílkoviny systém přepočítá absolutní hodnotu koncentrace jednotlivých bílkovinných frakcí v g/l, případně množství monoklonálního imunoglobulinu. Kromě denzitometrického stanovení se výsledek hodnotí i okometricky, především přítomnost abnormálních elektroforetických pásů.

8.3 Použité reagensie

Pro tuto metodu je používána diagnostická souprava Elektroforéza sérových proteinů a koncentované moči od firmy Interlab S.r.l. (kat. č. SRE601K). Obsahuje agarózové gely, houbičky nasycené pufrům (TRIS-barbital pufr), barvivo Acid Blue, roztok k promývání aplikátorů, zásobník na vzorky a blotovací papír A. Mimo soupravu je ještě využíván odbarvovací roztok — koncentrovaný roztok kyseliny citrónové (kat. č. SRE201M) a fluidil (od firmy SEBIA, kat. č. 4587).

8.4 Biologický materiál

Nejlepší je analyzovat čerstvá séra. Možné je i skladování po dobu 1 týdne v lednici (2 — 8 °C), či zmrazení (-20 °C) po dobu jednoho měsíce. Při skladování však dochází k posunu β lipoproteinů z β zóny do α_2 až α_1 zóny. Posun závisí na délce skladování.

8.4.1 Interference

Není možné analyzovat hemolytické vzorky. Hemoglobin může vytvářet nadbytečný proužek v oblasti α_2 globulinů, anebo (či zároveň) katodický posun této zóny.

Vzorek plazmy obsahuje fibrinogen, který vytváří nadbytečnou zónu mezi β a γ oblastí. Může být zaměněn za monoklonální imunoglobulin.

8.4.2 Analytická proveditelnost

Celková koncentrace bílkoviny nesmí překročit 100 g/l. Po překročení této hodnoty je nutno sérum ředit fyziologickým roztokem na koncentraci 60 — 80 g/l. Nejnižší možnou koncentrací bílkovin vhodnou k analýze je 20 g/l (pro měření bílkovin v moči).

8.5 Citlivost metody

Pro vizuální detekci koncentrace monoklonálního imunoglobulinu byla zjištěna koncentrace 0,25 g/l této bílkoviny.

8.6 Řízení kvality

Pro zajištění správnosti měření na každý gel do jedné elektroforetické dráhy aplikujeme roztok Normal Control Serum Microcal SCE123AA nebo Abnormal Control Serum Microcal SCE127AA. Po proběhlé analýze následně srovnáme výsledky s rozmezími pro určení správnosti stanovení.

8.7 Provedení

1. Nedříve jsme naplnili nádobky odpovídajícími roztoky (odbarvovací roztok, roztok Acid Blue a destilované voda). Následně jsme zapnuli přístroj INTERLAB G26 a spustili software Elfolab. Do držáku jsme umístili jednorázový zásobník, na něj usadili kovový rámeček a vložili do přístroje.
2. Do migrační komory, kterou jsme vyndali z přístroje, jsme pomocí pinzety umístili tři houbičky nasáklé pufrům. Následně jsme migrační komoru zasunuli zpět do přístroje.
3. Do držáku zkumavek č. 1 jsme vložili zkumavky se vzorky. Vkládání se započalo v pozici 1 způsobem, aby zkumavky byly zasunuty až na dno stojánku a čárový kód byl viditelný ve výřezu držáku na zkumavky. Držák, po naplnění všemi zkumavkami, jsme vložili do přístroje. Stejný postup se opakoval i u dalších držáků, do vložení 25 vzorků pacientů. Do 26. pozice se vložil kontrolní roztok.
4. Před vyjmutím gelu jsme krabičku jedenkrát otočili (tak, aby byl vidět nápis Interlab). Pak jsme gel opatrně vyndali (hrozí porušení povrchu agarózy) a na povrch jsme položili blotovací papír A pro odsátí přebytečného pufru. Přitom bylo nutné papír rychle odstranit kvůli jeho možnému vysušení. Následně jsme umístili gel do držáku tak, aby byl v levém

horním rohu čitelný nápis INTERLAB. Potom jsme zaklopili uzávěrku a držák vložili do přístroje. Analýzu je nutné spustit do 5 minut.

5. Pro zpuštění analýzy jsme stiskli tlačítko START v programu Elfolab. Otevřelo se okno pro transport identifikace pacientů, kde jsou data z laboratorního informačního systému automaticky přenesena do databáze pacientů. Identifikace je označena zeleně nebo červeně. Červená značí špatné načtení čárového kódu. V tomto případě jsme příslušný stojánek se zkumavkami zasunuli do přístroje znovu, nebo identifikaci zadali ručně.
6. Při nedostatečném objemu vzorku se zobrazí varovné okno a následně obrazovka s označením chybějícího vzorku. V takovém případě jsme vzorek napipetovali do jamky plastového zásobníku (30 μ l) a spustili analýzu pouze s nanášením vzorků.
7. Nanesení vzorku na gel, rozdělení při elektroforéze a následnou fixaci, barvení a vysušení přístroj provádí automaticky. Připravený gel pak sám přenese a změří denzitometricky.
8. Po ukončení analýzy jsme provedli údržbu po analýze. Postupovali jsme podle pokynů uvedených v standartních operačních postupech.

8.8 Výsledky

Po automatickém vyhodnocení elektroforeogramů jsme provedli vizuální kontrolu. V případě potřeby lze elektroforeogram i manuálně korigovat. Výsledky jsou uváděny v relativních hodnotách. Při přítomnosti M-Ig jsme prováděli jeho kvantifikaci. Jedná se o vyznačení oblasti s M-Ig, o následný automatický výpočet jeho relativního zastoupení a přepočítání na absolutní koncentraci (v g/l). Kromě denzitometrického hodnocení jsme prohlíželi rozdělení proteinů i vizuálně. Pátrali jsme především po přítomnosti atypického gradientu.

8.8.1 Referenční rozmezí

Na OKB ve FN USA se výsledky vydávají v jednotkách SI (zkratka z Le Système International d'Unités — systém mezinárodních jednotek). Jedná se o vyjádření hmotnostním zlomkem — součet všech podílů se rovná 1.

- Albumin 0,54 — 0,66
- α_1 globuliny 0,014 — 0,028
- α_2 globuliny 0,091 — 0,138
- β globuliny 0,085 — 0,144
- γ globuliny 0,106 — 0,192 (Hložková 2016)

8.8.2 Přehled typů elektroforetických obrazů

Na Oddělení klinické biochemie ve Fakultní nemocnici u svaté Anny v Brně vysokoškolský pracovník přikládá komentáře k výsledkům, lišícím se od normálního rozdělení. V laboratorním informačním systému má na výběr z předdefinovaných komentářů, které si však může dále upravovat, nebo napsat svůj vlastní. Předdefinované komentáře víceméně kopírují jednotlivé elektroforetické typy. Následující tabulka (tab. 1) ukazuje přehled jednotlivých komentářů (elektroforetických typů) a jejich zkratk. Vzhled jednotlivých elektroforetických typů, jejich popis i hodnocení je přehledně uvedeno v kapitole 4 — Elektroforetické typy (str. 24S). Rozdělení a vyhodnocení na OKB FN USA víceméně odpovídá posteru v této kapitole (obr. 8).

Tabulka 1 Elektroforetické obrazy a jejich zkratky

E1	Obraz akutního zánětu/stavu
E2	Obraz chronického zánětu/stavu
E3	Obraz chronického aktivního zánětu/stavu
E4	Typ jaterní cirhózy nebo chronické hepatopatie
E5	Obraz ztrát bílkovin
E6	Hypogamaglobulinémie
E7	Polyklonální zmnožení gamaglobulinů
E8	Obraz nefrotického syndromu
E9	Typ monoklonální gamapatie
E10	Atypický gradient v oblasti gamaglobulinů, nelze vyloučit přítomnost paraproteinu, doporučení provést imunofixaci v séru i v moči

9 Statistické zpracování dat

9.1 Popis datového souboru

Celkem bylo sesbíráno 541 stanovení od pacientů ve věku od 10 do 93 let. Rozdělení dle pohlaví a věku a procentuální podíl sumarizuje tabulka 2 a graf na obr. 23.

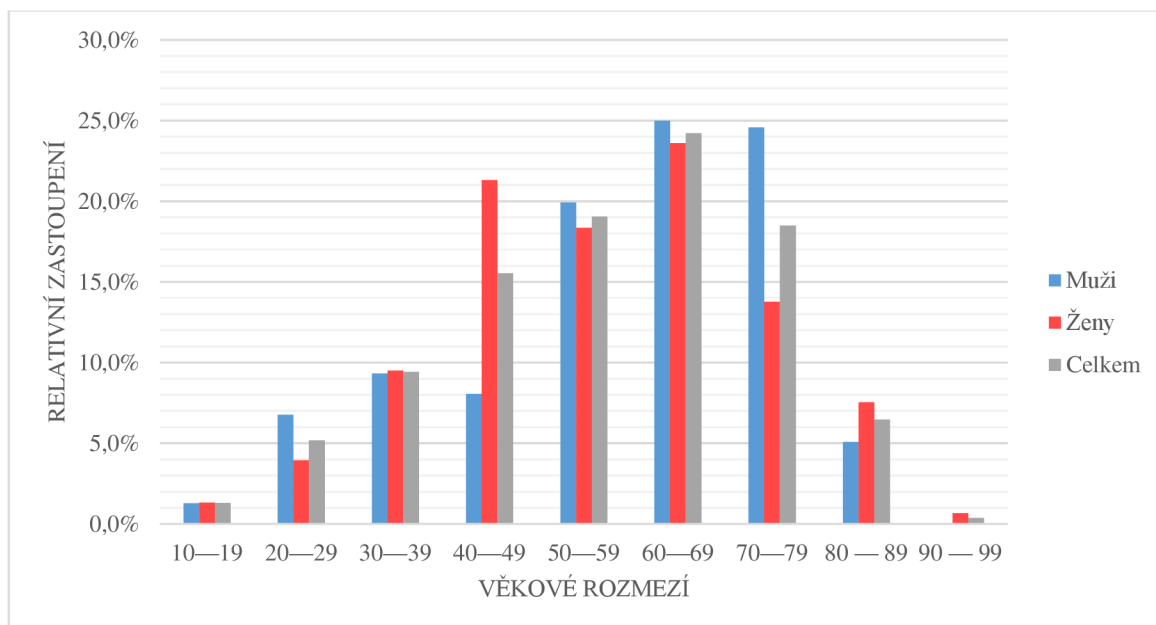
Mužů bylo 236 (43,6 %), žen 305 (56,4 %), což je o 69 žen (12,8 % celého souboru) více než mužů.

Nejvíce vyšetřených bylo ve věkové skupině 60 — 69 let a to 131 pacientů (59 mužů a 69 žen) naopak nejméně ve skupině 90 — 99 let, pouze 2 ženy ve věku 91 a 93 let. Ve skupině do 9 let nebyl žádný pacient, ve skupině 10 — 19 let pouze 7. Medián věku v celém souboru je 59 let, u mužů je 61 let a u žen 57 let.

Ve skupině 10 — 19 jsou zahrnuty i děti, elektroforetické obrazy v dětství se téměř neliší (Gurau et al. 2016).

Tabulka 2 Rozdělení souboru dle pohlaví a věku

Věkové rozmezí	Muži		Ženy		Celkem	
	Absolutní počet	Relativní zastoupení	Absolutní počet	Relativní zastoupení	Absolutní počet	Relativní zastoupení
10 — 19	3	1,3 %	4	1,3 %	7	1,3 %
20 — 29	16	6,8 %	12	3,9 %	28	5,2 %
30 — 39	22	9,3 %	29	9,5 %	51	9,4 %
40 — 49	19	8,1 %	65	21,3 %	84	15,5 %
50 — 59	47	19,9 %	56	18,4 %	103	19,0 %
60 — 69	59	25,0 %	72	23,6 %	131	24,2 %
70 — 79	58	24,6 %	42	13,8 %	100	18,5 %
80 — 89	12	5,1 %	23	7,5 %	35	6,5 %
90 — 99	0	0,0 %	2	0,7 %	2	0,4 %
Celkem	236	43,6 %	305	56,4 %	541	100,0 %



Obrázek 23 Rozdělení dle pohlaví a věku

9.2 Přehled diagnóz

Jedná se o diagnózy pacientů, které byly uvedeny na žádance s požadavkem vyšetření elektroforézy bílkovin v séru. Následující tabulka (tab. 3) shrnuje nejčastější z nich.

Celkem byli vyšetřováni pacienti s 163 různými diagnózami. Nejvíce byly posílány vzorky od pacientů s diagnózou monoklonální gamapatie nejasného původu (37 pacientů), potom s poruchou mozku NS (32 pacientů), nebo s funkční dyspepsií (27 pacientů).

Tabulka 3 Přehled diagnóz a počtu pacientů s konkrétní diagnózou

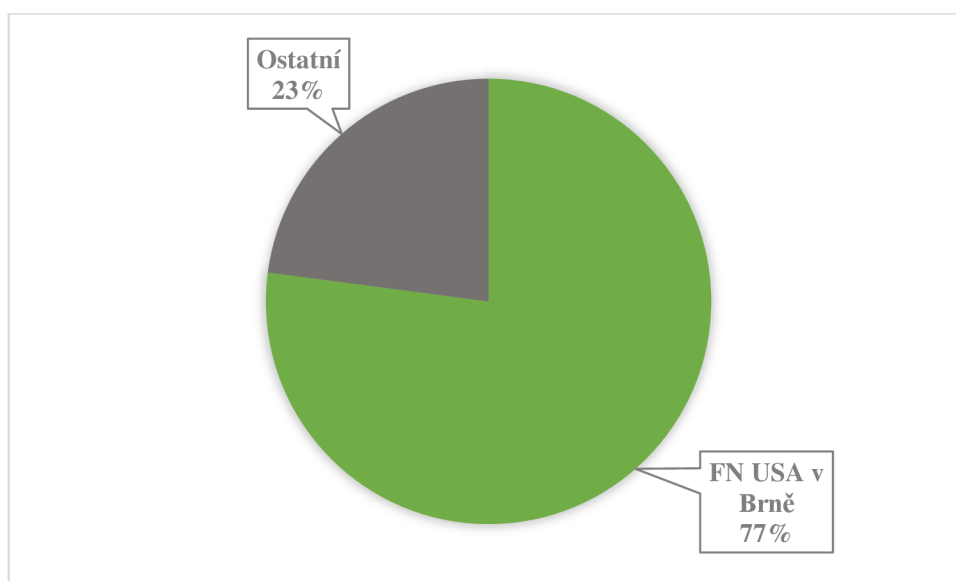
Kód diagnózy	Název	Počet pacientů
D472	Monoklonální gamapatie nejasného významu	37
G939	Porucha mozku NS	32
K30	Funkční dyspepsie	27
D508	Jiné anémie z nedostatku železa	24
D849	Imunodeficience NS	23
M2550	Bolest kloubů, mnohočetná lokalizace	21
G402	Symptomatická epilepsie a epileptické syndromy (fokální, parciální) příbuzné lokalizace s komplexem parciálních záchvatů	17
I10	Esenciální (primární) hypertenze	15
I259	Chronická ischemická choroba srdeční NS	14
K738	Jiná chronická hepatitida NJ	12
K746	Jiná neurčená cirhóza jater	12
D500	Sekundární chronické anémie a po ztrátě krve z nedostatku železa	11

9.3 Přehled oddělení

Pacienti pocházeli z 13 různých zařízení. Z Fakultní nemocnice u svaté Anny je 417 vzorků (77,1 %), z Centra kardiovaskulární a transplantační chirurgie (CKTCH) 59 vzorků (10,9 %) a z Nemocnice Boskovice s.r.o. 21 vzorků (3,9 %).

Tabulka 4 Přehled zařízení

Zařízení	Počet pacientů	Relativní zastoupení
FN USA v Brně	417	77,1 %
CKTCH	59	10,9 %
Nemocnice Boskovice s.r.o.	21	3,9 %
Nemocnice Milosrdných bratří	17	3,1 %
Nemocnice Břeclav	10	1,9 %
Vojenská nemocnice Brno	8	1,5 %
Kroměřížská nemocnice a.s.	2	0,4 %
MUDr. Stanislav Šurel	2	0,4 %
Psychiatrická nemocnice	2	0,4 %
AKI, s.r.o.	1	0,2 %
HEDICA s.r.o.	1	0,2 %
Soukromá klinika LOGO, s.r.o.	1	0,2 %

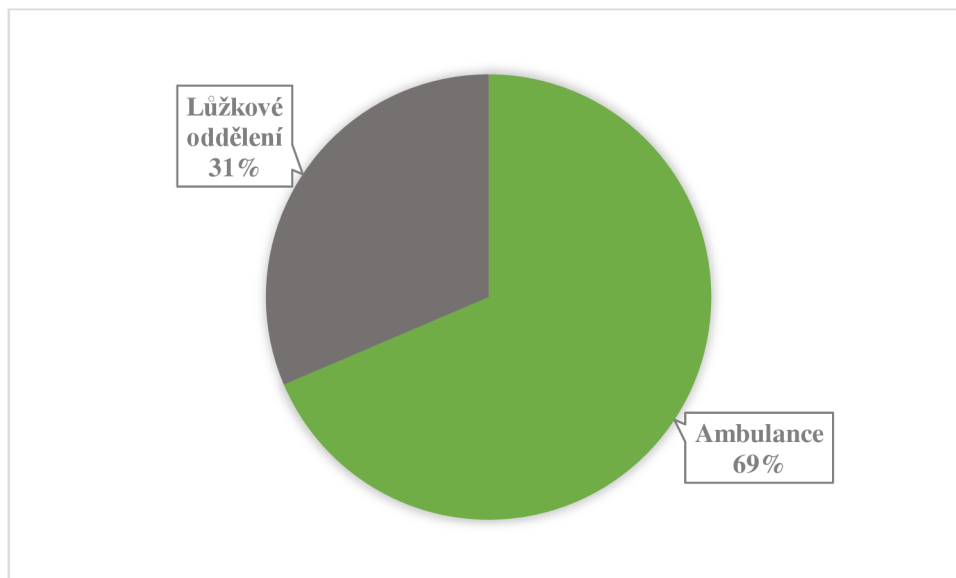


Obrázek 24 Relativní podíl pacientů z FN USA v Brně a z externích zařízení

Další tabulka 5 a obrázek 25 shrnují podíl pacientů z ambulancí a lůžkového oddělení. Z ambulancí pocházelo celkem 371 vzorků (68,6 %) z lůžkových oddělení 170 (31,4 %).

Tabulka 5 Počet pacientů vyšetřovaných v ambulancích a na lůžkovém oddělení

Typ oddělení	Počet pacientů	Relativní zastoupení
Ambulance	371	68,6 %
Lůžkové oddělení	170	31,4 %



Obrázek 25 Relativní zastoupení pacientů z lůžkového oddělení a ambulance

Tabulka 6 ukazuje přehled 21 nejčastějších oddělení v rámci FN USA v Brně, z kterých byl vzorek odeslán a počet vyšetřovaných pacientů z těchto oddělení. Lůžková oddělení ze stejných klinik jsem pro zjednodušení sloučila dohromady.

Nejvíce bylo posíláno žádostí o vyšetření z Oddělení klinické hematologie-ambulance, celkem 89 pacientů (21,3 % z FN USA). Další v pořadí je I. interní kardioangiologická klinika-lůžková část s 54 pacienty (12,9 %) I. neurologická klinika-ambulance s 43 pacienty (10,3 %) a I. interní klinika-ambulance revmatologie také s 43 pacienty (10,3 %).

Oddělení, která za uvedené období odeslala vzorek pouze od 1 pacienta, bylo 11.

Tabulka 6 Přehled oddělení v rámci FN USA v Brně

Název oddělení	Počet pacientů	Relativní zastoupení
OKH-ambulance	89	21,3 %
I.IKAK-lůžková část	54	12,9 %
I. neurologická klinika- ambulance	43	10,3 %
II.IK-ambulance revmatologie	43	10,3 %
ÚKIA-oddělení klinické imunologie	31	7,4 %
I.NK-lůžková část	25	6,0 %
II.IK-lůžková část	20	4,8 %
II.IK-ambulantní oddělení-všeobecné	18	4,3 %
I.IKAK- nízkoprahový příjem	16	3,8 %
I. dermatovenerologická klinika-lůžkové oddělení	13	3,1 %
II.IK-gastroenterologické oddělení	12	2,9 %
II.IK-ambulance nefrologie	10	2,4 %
ORZL-ambulantní oddělení	7	1,7 %
I. dermatovenerologická klinika-ambulance	6	1,4 %
I.IKAK-ambulance interní	6	1,4 %
OKB-ambulantní oddělení	3	0,7 %
ARK-ambulance bolesti 1	2	0,5 %
II.IK- ambulace endokrinologie	2	0,5 %
II.IK- ambulance plicní	2	0,5 %
II.IK-hemodialýza základní	2	0,5 %
II.IK-stacionární dialýzy	2	0,5 %
Ostatní (s 1 pacientem)	11	2,6 %

9.4 Zastoupení jednotlivých typů elektroforetických obrazů v souboru

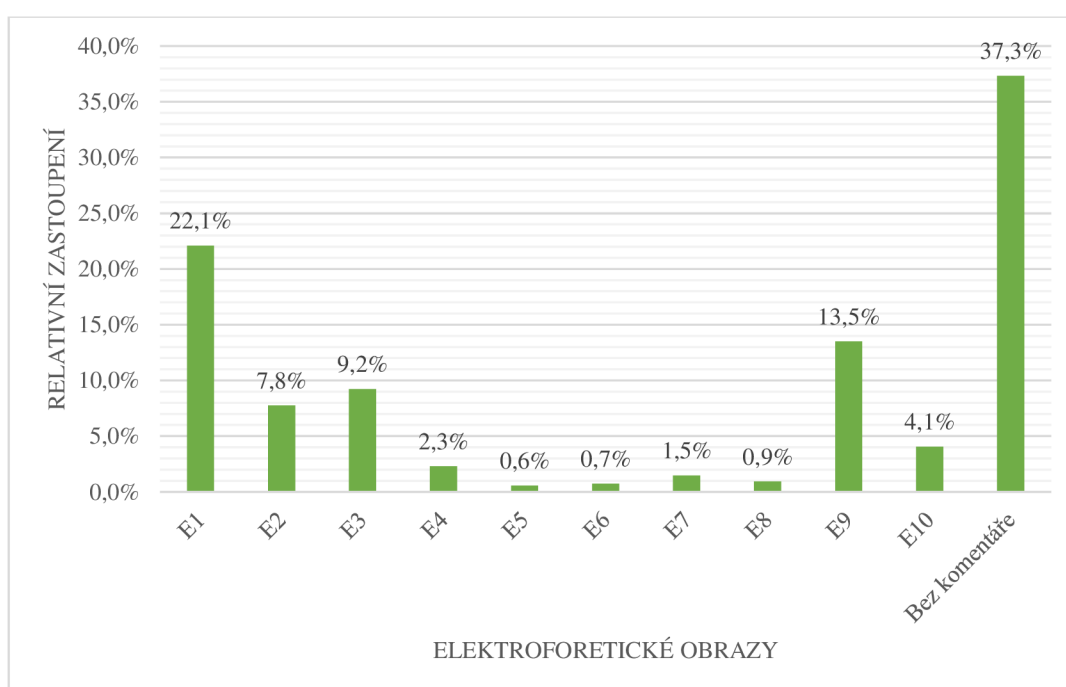
Zastoupení typů elektroforetických obrazů a jejich relativní podíl shrnuje tabulka 7 a obrázek 26. Označení bez komentáře znamená, že nález byl buď fyziologický, nebo se nedal zařadit ani do jedné elektroforetické skupiny. U jedné pacientky byla zjištěna kombinace elektroforetického obrazu akutního zánětu — E1 a typu jaterní cirhózy nebo chronické hepatopatie — E4, proto jsem ji rozdělila mezi tyto dvě kategorie jako ½.

Výsledky bez komentáře (37,3 %) převažují nad jednotlivými elektroforetickými obrazy. Celkově však bylo více výsledků s komentářem (62,7 %) než bez komentáře.

Nejčastěji se vyskytoval typ akutního zánětu — E1 (22,1 %) a dále pak typ monoklonální gamapatie — E9 (13,5 %). Naopak nejméně zastoupenými jsou obraz ztrát bílkovin — E5 (0,6 %), hypogamaglobulinémie — E6 (0,7 %) nebo obraz nefrotického syndromu — E8 (0,9 %).

Tabulka 7 Relativní zastoupení elektroforetických typů

Elektroforetický typ	Absolutní počet	Relativní zastoupení
E1	119,5	22,1 %
E2	42	7,8 %
E3	50	9,2 %
E4	12,5	2,3 %
E5	3	0,6 %
E6	4	0,7 %
E7	8	1,5 %
E8	5	0,9 %
E9	73	13,5 %
E10	22	4,1 %
Bez komentáře	202	37,3 %



Obrázek 26 Relativní zastoupení elektroforetických typů

9.5 Zastoupení pozitivních a negativních výsledků

V této kapitole jsem jako pozitivní výsledek označila elektroforetický typ E9 (obraz monoklonální gamapatie s prokázáním imunofixací). Hraniční výsledek je typ E10 (atypický gradient byl nalezen pouze elektroforézou, ale imunofixace nebyla ještě provedena). Za negativní výsledky jsou považovány všechny ostatní elektroforetické typy a vyšetření, které neměly komentáře.

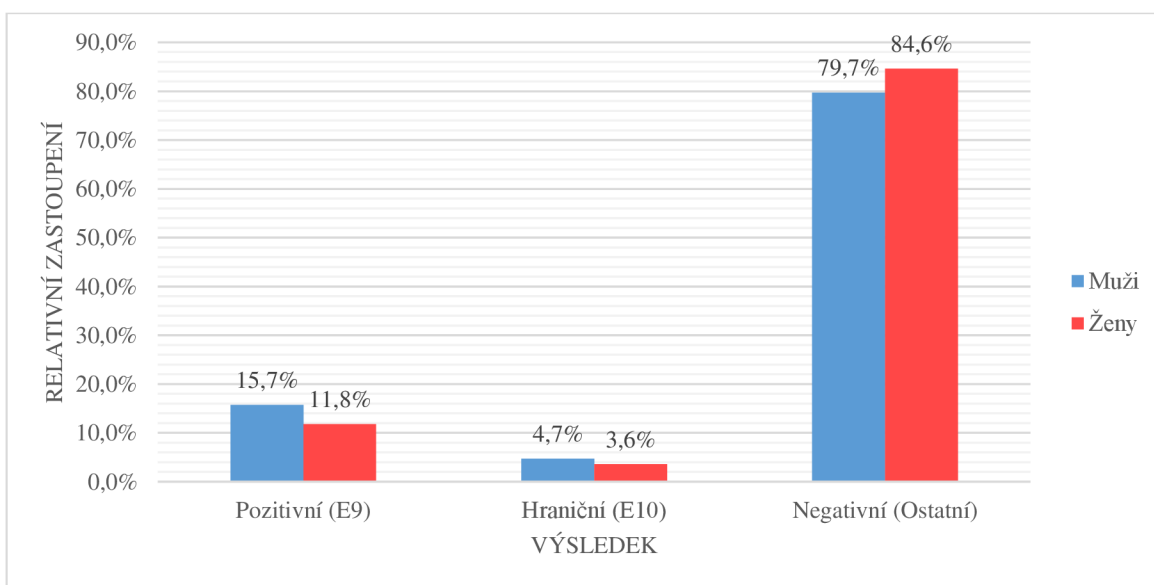
9.5.1 Zastoupení mezi muži a ženami

Následující tabulka 8 a obrázek 27 shrnují rozložení pozitivních, hraničních a negativních nálezů mezi muži a ženami. Obraz monoklonální gamapatie se vyskytoval častěji u mužů (15,7 %) než u žen (11,8 %). U hraničního nálezu je to podobné (u mužů 4,7 % a u žen 3,6 %).

Při výpočtu Pearsonova chí-kvadrát testu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi muži a ženami při hladině významnosti 5 % ($p = 0,327$, $p > \alpha$, $\alpha = 0,05$, viz tab. 9).

Tabulka 8 Rozdělení pozitivních a negativních nálezů

	Muži		Ženy	
	Absolutní počet	Relativní zastoupení	Absolutní počet	Relativní zastoupení
Pozitivní (E9)	37	15,7 %	36	11,8 %
Hraniční (E10)	11	4,7 %	11	3,6 %
Negativní (Ostatní)	188	79,7 %	258	84,6 %



Obrázek 27 Zastoupení pozitivních (E9), hraničních (E10) a negativních výsledků

Tabulka 9 Přehled četností a výsledek Pearsonova chí-kvadrát testu

	Pozitivní	Hraniční	Negativní	Celkem
Reálné četnosti				
Muž	37	11	188	236
Žena	36	11	258	305
Celkem	73	22	446	541
Očekávané četnosti				
Muž	31,84	9,60	194,56	236
Žena	41,16	12,40	251,44	305
Celkem	73	22	446	541
Personův Chí-kvadrát	2,23625			
Stupně volnosti	2			
p	0,327			

9.5.2 Zastoupení v jednotlivých věkových kategoriích

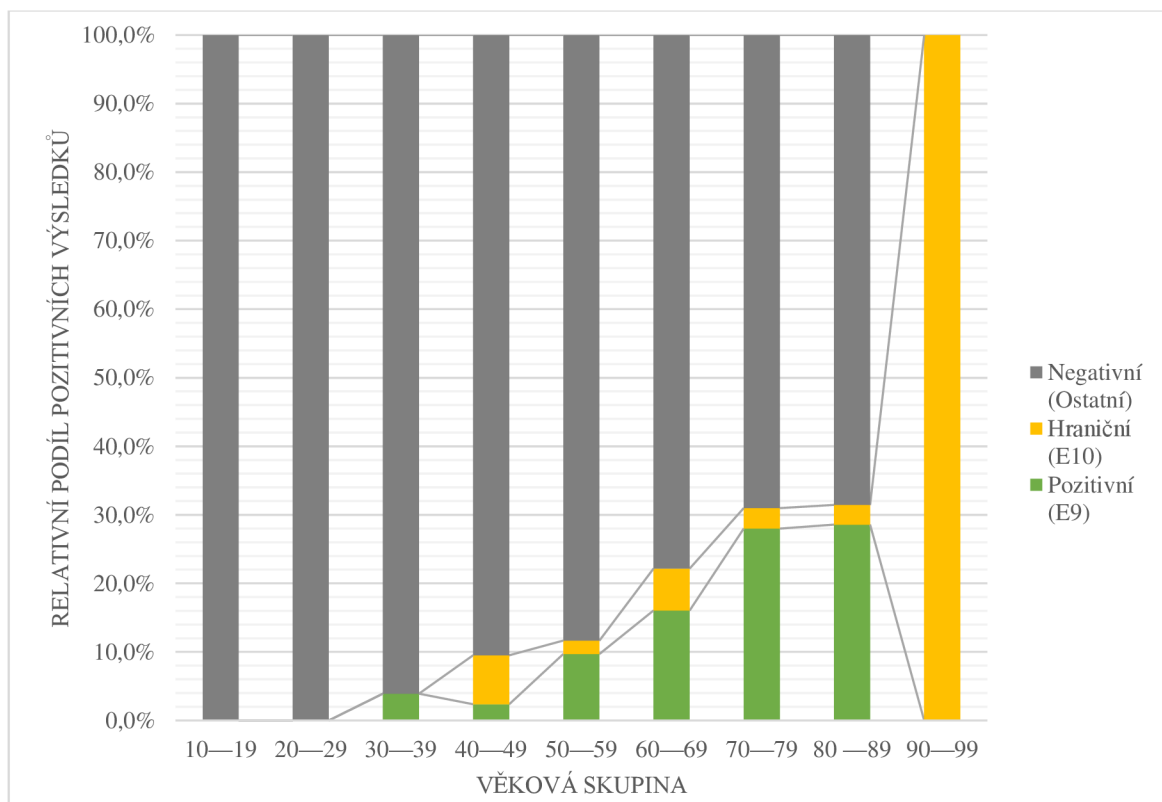
Tabulka 10 a obrázek 28 ukazují rozdělení pozitivních, hraničních a negativních nálezů v závislosti na věku pacienta.

Typ monoklonální gamapatie byl prokázán od věkové skupiny 30 — 39. Hraniční výsledek se vyskytoval dokonce až ve skupině 40 — 49 let. U nejstarších pacientů (90 — 99 let) se vyskytoval pouze typ E10.

Při výpočtu Pearsonova chí-kvadrát testu jsem zjistila statisticky významný rozdíl mezi elektroforetickým typem E9 a věkovými skupinami při hladině významnosti 5 % ($p < 0,001$, $p < \alpha$, $\alpha = 0,05$, viz tab. 11). Kvůli provedení výpočtu byly sloučením příslušných věkových rozmezí vytvořeny skupiny do 49 let a nad 80 let.

Tabulka 10 Rozložení pozitivních a negativních výsledků v jednotlivých věkových skupinách

Věkové rozmezí	Pozitivní (E9)		Hraniční (E10)		Negativní (Ostatní)	
	Absolutní počet	Relativní zastoupení	Absolutní počet	Relativní zastoupení	Absolutní počet	Relativní zastoupení
10 — 19	0	0,0 %	0	0,0 %	7	100,0 %
20 — 29	0	0,0 %	0	0,0 %	28	100,0 %
30 — 39	2	3,9 %	0	0,0 %	49	96,1 %
40 — 49	2	2,4 %	6	7,1 %	76	90,5 %
50 — 59	10	9,7 %	2	1,9 %	91	88,3 %
60 — 69	21	16,0 %	8	6,1 %	102	77,9 %
70 — 79	28	28,0 %	3	3,0 %	69	69,0 %
80 — 89	10	28,6 %	1	2,9 %	24	68,6 %
90 — 99	0	0,0 %	2	100,0 %	0	0,0 %



Obrázek 28 Relativní zastoupení pozitivních a negativních výsledků v jednotlivých věkových skupinách

Tabulka 11 Přehled četností a výsledek Pearsonova chí-kvadrát testu

	Pozitivní	Hraniční + Negativní	Celkem
Reálné četnosti			
> 49	166	4	170
50—59	93	10	103
60—69	110	21	131
70—79	72	28	100
> 80	27	10	37
Celkem	468	73	541
Očekávané četnosti			
> 49	147,06	22,94	170
50—59	89,10	13,90	103
60—69	113,32	17,68	131
70—79	86,51	13,49	100
> 80	32,01	4,99	37,00
Celkem	468,00	73,00	541,00
Personův Chí-kvadrát	43,8955		
Stupně volnosti	4		
p	<0,000001		

9.6 Frekvence opakovaných vyšetření elektroforetických obrazů

Jedná se o vyhodnocení opakování vyšetření elektroforézy bílkovin pacientů, zaznamenaných v Laboratorním informačním systému OKB FN USA v Brně, a to ze všech jeho záznamů. U čísel 20, 22, 24, 26, 27 chybějí data pro srovnání, proto jsou pole pro hodnoty relativního zastoupení prázdné.

Tabulka 12 a obrázek 29 shrnují počet pacientů v závislosti na celkovém počtu vyšetření. Pouze jednou byla elektroforéza vyšetřena celkem u 316 pacientů (58,4 %) dvakrát 83 (15,3 %).

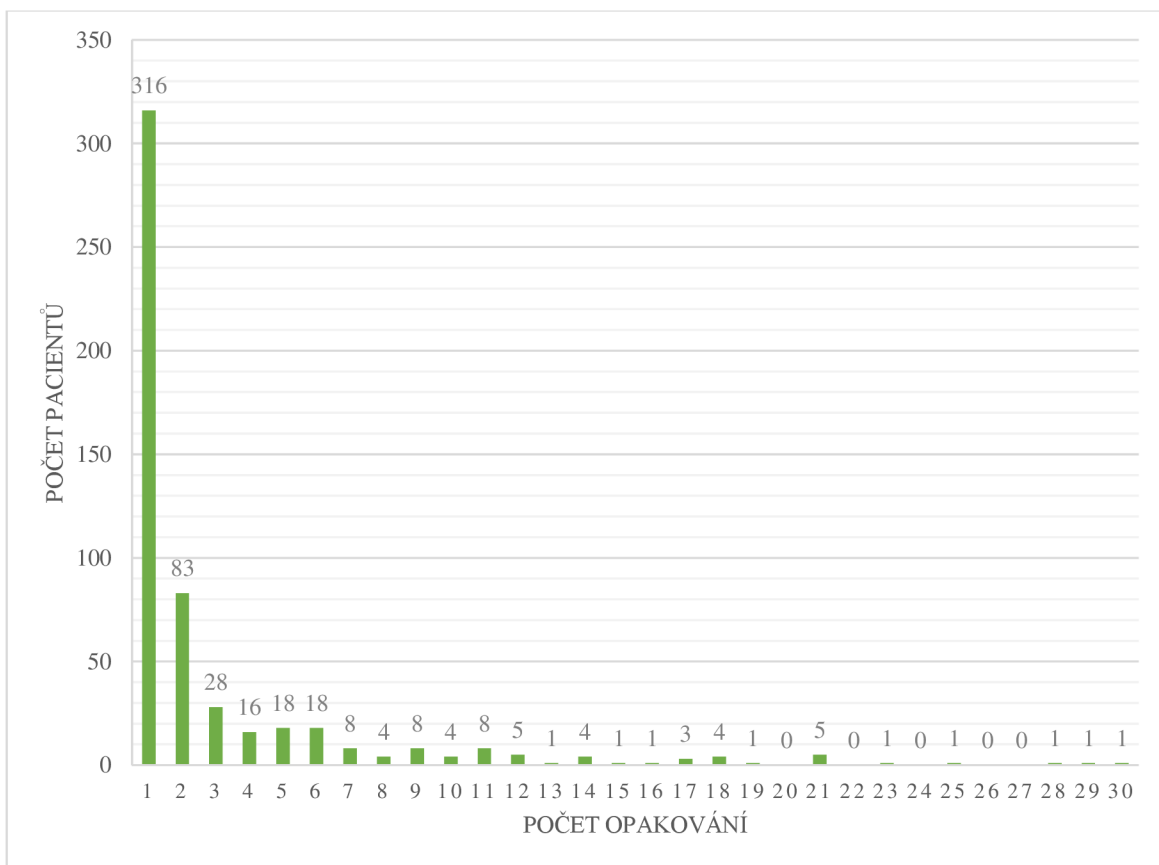
Obrázek 30 ukazuje relativní podíl typu monoklonální gamapatie v závislosti na frekvenci opakování vyšetření. U pacientů, kteří byli vyšetřováni poprvé, se typ monoklonální gamapatie — E9 podílí pouze 4,4 %, u vyšetřovaných podruhé je podíl 9,3 %.

Tabulka 12 Rozložení počtu opakování vyšetření v celém souboru a u typu monoklonální gamapatie

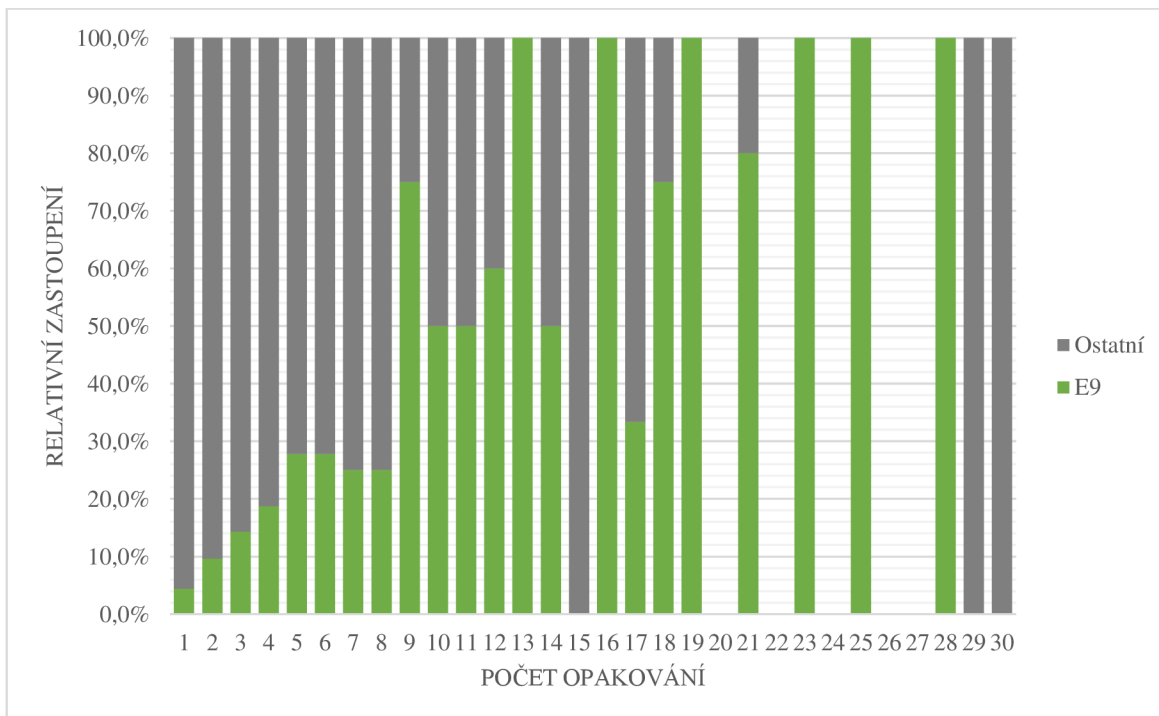
Počet vyšetření	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Celkem	316	83	28	16	18	18	8	4	8	4
E9	14	8	4	3	5	5	2	1	6	2
E9 (%)	4,4	9,6	14,3	18,8	27,8	27,8	25,0	25,0	75,0	50,0

Počet vyšetření	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Celkem	8	5	1	4	1	1	3	4	1	0
E9	4	3	1	2	0	1	1	3	1	0
E9 (%)	50,0	60,0	100	50,0	0,0	100,0	33,3	75,0	100,0	

Počet vyšetření	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Celkem	5	0	1	0	1	0	0	1	1	1
E9	4	0	1	0	1	0	0	1	0	0
E9 (%)	80,0		100,0		100,0			100,0	0,0	0,0



Obrázek 29 Frekvence opakovaných vyšetření



Obrázek 30 Relativní podíl typu monoklonální gamapatie v závislosti na počtu opakování

10 Vyhodnocení

Na OKB FN USA v Brně byl retrospektivně sesbírán soubor dat 541 stanovení elektroforézy bílkovin v séru od pacientů ve věku 10 — 93 let s mediánem 59 let. Žen (56,4 %) bylo více než mužů (43,6 %). Malé množství pacientů se nacházelo ve skupině do 19 let. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že FN USA nemá dětská oddělení, je zaměřená výhradně na dospělé pacienty. Výjimku tvoří pouze Oddělení klinické imunologie, kam přichází i děti. Proto hodnocení v této věkové skupině je zkresleno touto skutečností.

Nejdříve jsem posuzovala, jaké diagnózy měli pacienti uvedeny na žádance. Některé z nejčastějších diagnóz korelují s příznaky onemocnění, spjatého s monoklonální gamapatií. Byly to např. anémie, imunodeficience, bolest kloubů, kvalitativní poruchy trombocytů, jiné určené poruchy leukocytů, uváděné v literatuře (Adam et al. 2008; Špička et al. 2005) jako příznaky např. mnohočetného myelomu. Řada diagnóz na žádankách přímo svědčila pro výskyt monoklonální gamapatie, jako např. MGUS nebo mnohočetný myelom. Při těchto onemocněních se elektroforéza provádí pro monitorování stavu pacienta, sledování vývoje jeho onemocnění (Adam et al. 2008, 2011).

Dále jsem hodnotila, z jakých zařízení a oddělení vzorky přicházely. Nejčastěji pocházely z oddělení ve Fakultní nemocnici u svaté Anny v Brně (77,1 %), z externích zařízení bylo zasláno pouze 22,9 % vzorků. Velký počet vzorků také pochází z Centra kardiiovaskulární a transplantační chirurgie (10,9 %). Elektroforézu vyšetřují jednak jako screening přítomnosti monoklonální gamapatie před transplantací a také u pacientů s indikovanou imunosupresí. U transplantovaných pacientů je vyšší pravděpodobnost výskytu nádorových onemocnění z důvodu oslabené imunity (Hořejší a Bartůňková 2009).

V našem souboru více pacientů pocházelo z ambulantní péče (68,6 %). To ukazuje, že většina pacientů není hospitalizována, přicházejí k lékaři s rozličnými potížemi, které by teoreticky mohly znamenat výskyt onemocnění s monoklonální gamapatií, a jako screeningové vyšetření je provedena elektroforéza bílkovin v séru.

Počet vzorků z jednotlivých oddělení jsem hodnotila pouze v rámci FN USA. Různorodost oddělení ukazuje, že toto vyšetření ordinují lékaři z celé nemocnice. Velký počet požadavků přicházel např. z Oddělení klinické hematologie, Ambulance revmatologie (I. interní klinika), Oddělení klinické imunologie (Ústav klinické imunologie a alergologie). Na těchto odděleních mají největší výskyt pacientů se symptomy spjatými s onemocněním monoklonální gamapatie.

Vyhodnocení zastoupení jednotlivých elektroforetických obrazů v souboru reflektuje, jaká onemocnění jsou elektroforézou bílkovin v séru identifikována. Více bylo těch výsledků, které

byly charakterizované některým z konkrétních elektroforetických typů. Převládající typ akutního zánětu (22,1 %) ukazuje, že pacienti přicházejí k lékaři s akutními problémy a nespecifickými příznaky onemocnění. Vysoké zastoupení typu monoklonální gamapatie (13,5 %) potvrzuje skutečnost, že elektroforéza bílkovin v séru slouží jako screeningová metoda pro snadné odhalení pacientů s onemocněním spjatým s monoklonální gamapatií a také pro monitorování stavu již diagnostikovaných nemocných (zjišťování koncentrace monoklonálního imunoglobulinu) (Maisnar et al. 2012).

Ostatní elektroforetické typy např. obraz ztrát bílkovin (0,6 %), hypogamaglobulinémie (0,7 %), obraz nefrotického syndromu (0,9 %), polyklonální zmnožení gamaglobulinů (1,5 %), nebo jaterní onemocnění (2,3 %), měly v našem souboru malou četnost. Tyto stavy již umíme diagnostikovat jinými a přesnějšími metodami, elektroforéza poskytne jen orientační posouzení patologických změn sérových bílkovin.

Také jsem hodnotila rozložení výsledků pozitivních (typ obrazu monoklonální gamapatie s prokázáním imunofixací — E9), hraničních (atypický gradient byl nalezen pouze elektroforézou, ale imunofixace nebyla ještě provedena — E10) a negativních (ostatní elektroforetické typy a výsledky neokomentované) mezi muži, ženami a v závislosti na věku. U hraničních nálezů by bylo zajímavé zjištění, u jakého množství pacientů se skutečně prokázal M-Ig imunofixací. Takovou možnost jsem však neměla, protože řada pacientů byla přeložena jinam, kde proběhlo následné dovyšetření a případně specializované léčení.

U mužů se typ E9 vyskytoval častěji (15,7 % mužů) než u žen (11,8 %). Neprokázala jsem však významný rozdíl mezi pohlavím při statistické významnosti 5 %. V dostupné literatuře (Špička et al. 2005) se běžně uvádí větší výskyt monoklonální gamapatie u mužů než u žen, např. u mnohočetného myelomu u mužů je výskyt 5,3 a u žen 3,3/100 000 obyvatel, u Waldenströmovy makroglobulinémie 0,34 u mužů a 0,17 u žen na 100 000 obyvatel. Malý rozdíl v našem souboru je způsoben nejspíše malým vzorkem a složením vyšetřovaných pacientů.

Dále jsem posuzovala výskyt pozitivních, hraničních a ostatních elektroforetických typů v závislosti na věku pacientů. Počet pozitivních nálezů v našem souboru roste s věkem, což bylo ověřeno i statistickým testem (hladina významnosti 5 %). Do 50 let se pozitivní výsledky vyskytovaly jen minimálně. Ve věku 50 — 59 let byl identifikován typ monoklonální gamapatie celkem v 9,7 % případech a ve věku 80 — 89 let dokonce ve 28,6 % případech. Moje výsledky jsou v souladu s literaturou (Adam et al. 2011), např. u MGUS se prevalence u osob ve věku 50 — 59 uvádí 1,7 % a nad 70 let je více než 5 %.

Dále jsem hodnotila frekvenci opakovaných vyšetření. U většiny pacientů byla elektroforéza bílkovin v séru provedena pouze jedenkrát (58,4 %). S počtem opakování vyšetření klesá i počet pacientů. U typu monoklonální gamapatie narůstá frekvence provedených elektroforéz v procentech, protože slouží k sledování stavu a vývoje onemocnění spjatého s monoklonální gamapatií i monitorování účinnosti léčby.

11 Kazuistiky

Na závěr uvádím 2 různé kazuistiky. Jedná se o 2 pacienty, vyšetřované na oddělení Klinické biochemie USA v Brně. Všechny informace o nich byly získány z jejich záznamů.

11.1 Kazuistika 1

Muž, ve věku 68 let měl na žádance uvedenou diagnózu akutní selhání ledvin. Laboratoř OKB FN USA u něj vyšetřovala elektroforézu bílkovin v séru poprvé.

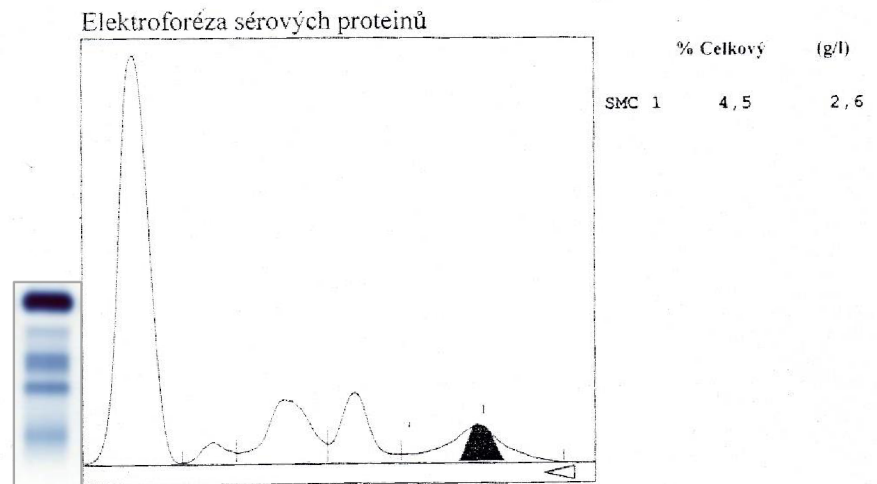
Koncentrace celkové bílkoviny byla naměřena 57,6 g/l, což je pod normou. Při elektroforéze bílkovin v séru byl zjištěn atypický gradient uprostřed oblasti gamaglobulinů. Zároveň byla provedena i imunofixace sérových bílkovin s prokázáním přítomnosti monoklonálního imunoglobulinu Ig G kappa. Při kvantifikaci M-Ig za použití elektroforézy byla zjištěna koncentrace 3 g/l. Při imunofixaci bílkovin v moči nebyla identifikována přítomnost M-Ig.

Na elektroforeogramu vidíme přítomnost píku monoklonálního imunoglobulinu. Relativní podíl γ globulinů je v normě, ale α_1 a α_2 globuliny jsou zvýšeny.

Datum testu 20.10.2016

Běh 1 Stopa 24

Frakce 5 Scan(mm) 16 Gel Id: 249866



Frakce	%	% Normálu.	(g/l)	(g/l) Normálu.
Albumin	60,8	54,0-66,0	35,0	32,4-52,8
Alpha 1	3,1 ↑	1,4- 2,8	1,8	0,8- 2,2
Alpha 2	14,3 ↑	9,1-13,8	8,3	5,5-11,0
Beta	10,7	8,7-14,4	6,2	5,2-11,5
Gamma	11,1	10,6-19,2	6,4 ↓	6,4-15,4

A/G poměr 1,55

Celk. prot. (g/l) 57,7 ↓ 60,0-80,0

Obrázek 31 Elektroforéza bílkovin v séru

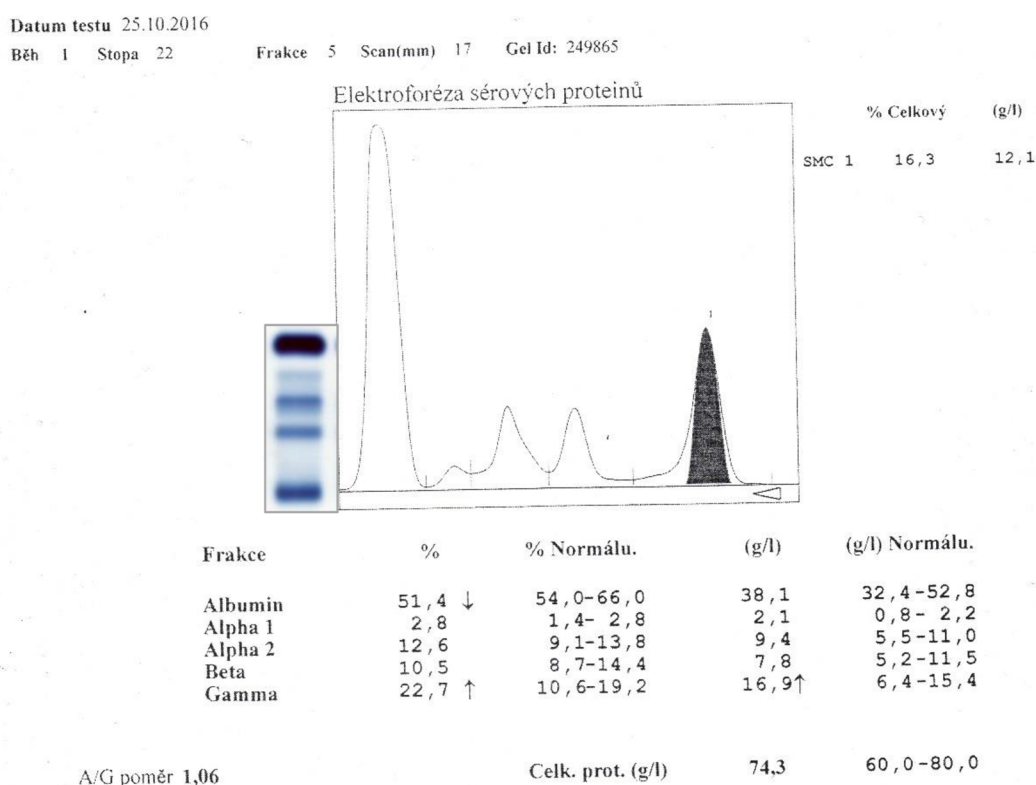
11.2 Kazuistika 2

Jedná se o ženu ve věku 66 let. Hlavní diagnóza na žádance byla uvedena imunodeficiencie NS.

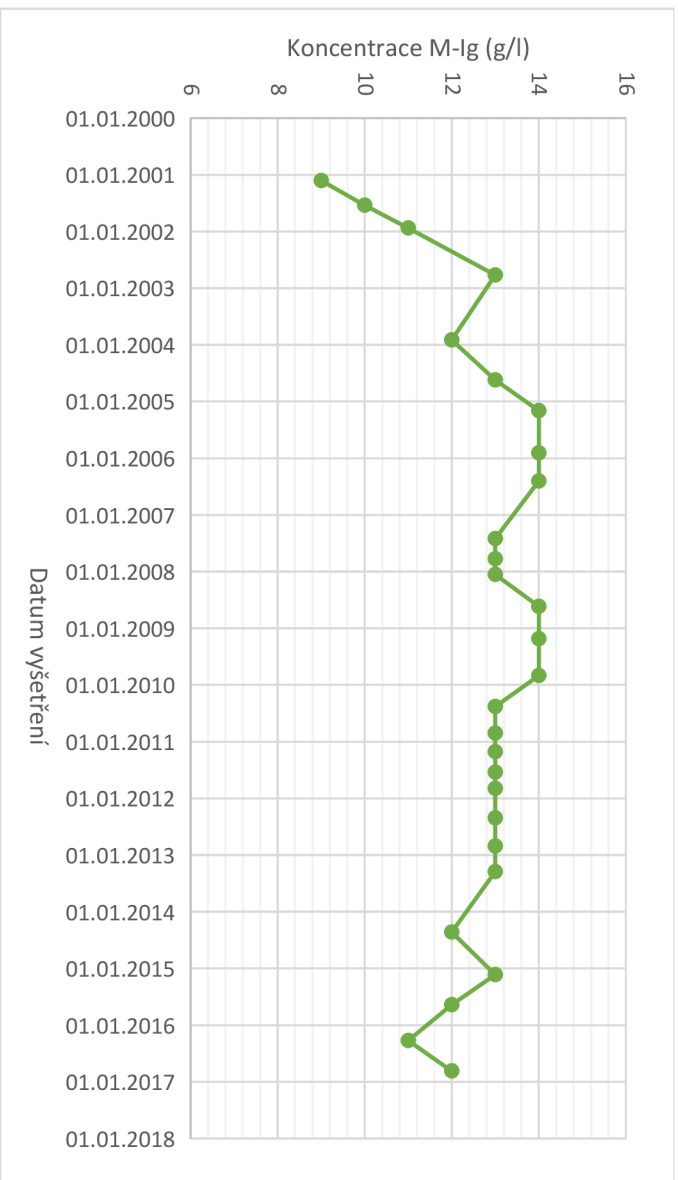
Poprvé byla elektroforéza vyšetřena v únoru 2001, kde byl nalezen atypický gradient na katodickém zakončení zóny gamaglobulinů. Pomocí imunofixace byl identifikován typ monoklonálního imunoglobulinu jako Ig G lambda s koncentrací 9 g/l. Pacientce je od té doby vyšetřována elektroforéza jednou až třikrát ročně, za 15 let sledování bylo provedeno vyšetření 28 krát. Při elektroforetické migraci se atypický gradient vždy nacházel ve stejné oblasti jako na počátku. Pokaždé byla změřena koncentrace M-Ig, která se pohybovala v rozmezí 9 g/l — 14 g/l. Obrázek 33 ukazuje vývoj koncentrace M-Ig v čase.

Při posledním vyšetření byla zjištěna koncentrace celkové bílkoviny 74,3 g/l a koncentrace monoklonálního imunoglobulinu 12 g/l.

Na elektroforeogramu se nachází ostře ohraničený pík monoklonálního imunoglobulinu (obr. 32).



Obrázek 32 Elektroforéza bílkovin v séru



Obrázek 33 Vývoj koncentrace M-Ig v čase

Závěr

Cílem práce bylo zpracování dat retrospektivně sesbíraných na Oddělení klinické biochemie ve Fakultní nemocnici u svaté Anny v Brně a jejich následné vyhodnocení, posouzení významu elektroforézy bílkovin v séru pro laboratorní praxi a zhodnocení množství pozitivních výsledků (typ monoklonální gamapatie) v závislosti na pohlaví a věku.

Elektroforéza bílkovin v séru se v dnešní době provádí především za účelem screeningu onemocnění doprovázených monoklonální gamapatií (viz kazuistika 1). To potvrzuje i rozmanitost diagnóz, uvedených na žádance, a také různá oddělení, která požadovala vyšetření.

Při prokázané monoklonální gamapatií se elektroforéza využívá k monitorování stavu nemocných. Proto frekvence opakovaných vyšetření převažuje u typů monoklonální gamapatie. Tato metoda slouží ke sledování koncentrace monoklonálního imunoglobulinu, posouzení stavu onemocnění a monitorování jejich léčby (viz kazuistika 2).

Počet pacientů s elektroforetickým typem monoklonální gamapatie v našem souboru rostl s věkem. Vztah ve výskytu mezi pohlavím nebyl prokázán, nejspíše pro malý datový soubor.

Má bakalářská práce prokázala, že elektroforéza bílkovin v séru má stále velký význam laboratorní diagnostice, jedná se o metodu levnou, běžně dostupnou a dostatečně specifickou pro odhalení atypického gradientu.

Literatura

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ, Jiří VORLÍČEK et al., 2008. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2., doplněné a zcela přepracované vydání. Praha: Grada, 390 s. ISBN 978-80-247-2502-4.

ADAM, Zdeněk, Luděk POUR a Zdeňka ČERMÁKOVÁ, 2011. Monoklonální gamapatie obecně a monoklonální gamapatie nejistého významu, dřívějším termínem benigní gamapatie. *Postgraduální medicína* [online]. Praha: Mladá fronta, **13**(2), 136-139 [cit. 2017-02-28]. ISSN 12124184. Dostupné také z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/monoklonalni-gamapatie-obecne-a-monoklonalni-gamapatie-nejisteho-vyznamu-drivejsim-terminem-benigni-gamapatie-457917>

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, Milan PAULÍK et al., 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing a.s, 171 s. ISBN 978-80-247-3533-7.

BASILE, Umberto, [2014]. Protidology: Concepts of pathophysiology and analytical techniques. *Interlab official website* [online]. Řím: Interlab Srl. [cit. 2017-01-10]. Dostupné z: http://www.interlab-srl.com/media/web-guide/i_presentazione_html_EN/index.html

BERÁNEK, Martin, Miloš TICHÝ et al., 2013. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie: pro studijní program Zdravotnická bioanalytika*. Praha: Karolinum, 197 s. ISBN 978-80-246-2186-9.

BILYK, Ivan, Petr BREINEK a Marek BUDINA, 2008. *50 let České společnosti klinické biochemie* [online]. Praha: ČSKB ČLSJEP [cit. 2017-04-11]. ISBN 978-80-254-2771-2. Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/50let/Brozura_CSKB.pdf

BUREŠ, Jan, Jiří HORÁČEK, Jaroslav MALÝ et al., 2014. *Vnitřní lékařství. Díl 2. 2.*, přepracované a rozšířené vydání. Praha: Galén, 545 s. ISBN 978-80-7492-145-2.

BURTIS, Carl A., Edward R. ASHWOOD a David E. BRUNS, 2012. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* [online]. Fifth edition. Missouri: Elsevier Health Sciences [cit. 2016-12-05]. ISBN 978-1-4557-5942-2. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=BBLRUI4aHhkC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

DASTYCH, Milan et al., 2014. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant. 2. doplněné vydání*. Brno: Masarykova univerzita, 201 s. ISBN 978-80-210-7103-2.

DASTYCH, Milan, Petr BREINEK et al., 2015. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant. 3. vydání*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-7788-1.

GIOT, Jean-Francois, 2010. Agarose Gel Electrophoresis -- Applications in Clinical Chemistry. *Jurnal of Medical Biochemistry* [online]. [Varšava]: Versita, **29**(1), 9-14 [cit. 2017-01-24]. ISSN 14528258. Dostupné také z: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/search/basic?sid=4c22ddd9-b968-42c9-9f91-a63942339ec8%40sessionmgr101&vid=0&hid=115>

GOTTWALDOVÁ, Jana, 2015. Elektroforetické techniky. In: *Instrumentální technika př. Univerzitní kampus, LF, MU. 23. 3.*

GURAU, Gabriela, Malina COMAN, Ciprian Adrian DINU, Camelia BUSILA, Dragos Cristian VOICU, Luana Andreea MACOVEI a Alina Mihaela CALIN, 2016. The Electrophoretic Patterns of Serum Proteins in Children. *REVISTA DE CHIMIE* [online]. Budapešť: Institute for Scientific Information, **67**(1), 190-194 [cit. 2016-11-10]. ISSN 00347752. Dostupné také z: <http://www.revistadechimie.ro/pdf/GURAU%201%2016.pdf>

HARRIS, Neil S. a William E. WINTER, ©2012. *Multiple Myeloma and Related Serum Protein Disorders: An Electrophoretic Guide* [online]. New York, NY: Demos Medical, **1st ed** [cit. 2017-01-23]. ISBN 978-1-61705-015-2. Dostupné z: http://eds.b.ebscohost.com/eds/ebookviewer/ebook?sid=4737ab8d-23db-493b-8b91-5fb051168836%40sessionmgr102&ppid=pp_Cover&hid=112&vid=0&format=EB

HLOŽKOVÁ, Pavla, 2016. *SOP, Stanovení frakcí sérových bílkovin elektroforézou [Albumin_S, Alfa-1-globuliny_S, Alfa-2-globuliny_S, Beta-globuliny_S, Gama-globuliny_S]*. Brno, 2016.

HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ, 2009. *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: Triton, 316 s. ISBN 978-80-7387-280-9.

INTERLAB S.R.L., EasyFix Interlab G26. *Interlab official website* [online]. Řím: Interlab S.r.l. [cit. 2017-03-02]. Dostupné z: <http://www.interlab-srl.com/en/instruments/easyfix-interlab-g26>

INTERLAB S.R.L., 2013. Interlab G26 Electrophoresis. In: *Interlab official website* [online]. Řím: Interlab S.r.l. [cit. 2017-1-23]. Dostupné z: http://www.interlab-srl.com/en/media/educational/poster_electrophoresis_g26.jpg

JARKOVSKÝ, Jiří, 2016. Analýza dat. In: *Biostatistika-přednáška* [online]. Univerzitní kampus, LF, MU. 15. 11. Dostupné z: https://is.muni.cz/auth/el/1411/podzim2016/BLBS051p/um/Analyza_dat.pdf

KOOLMAN, Jan, Klaus-Heinrich RÖHM, Vladimír BENDA, Martin VEJRAŽKA a Jiří JONÁK, 2012. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 498 s. ISBN 978-80-247-2977-0.

KOPÁČ, Josef, 2004. *Lékařská laboratorní diagnostika*. Turnov: Lékařská laboratoř, 815 s.

LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN, 2009. *Biochemie pro studující medicíny. II. díl, (Kapitola 14-23)*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 275 s. ISBN 978-80-246-1415-1.

MAISNAR, Vladimír, Petr DULÍČEK et al., 2012. *Monoklonální imunoglobuliny - výskyt, význam a možnosti jejich průkazu*. Praha: Nucleus HK, 125 s. ISBN 978-80-87009-87-1.

MASOPUST, Jaroslav, 1998. *Klinická biochemie: požadování a hodnocení biochemických vyšetření. II. část*. Praha: Karolinum, 437 s. ISBN 978-80-210-7788-1.

NECHVÁTALOVÁ, Jana, 2016. Imunoblot, imunoelektroforéza. In: [online]. *Klinická imunologie*, FN USA. 9. 5. Dostupné z: <https://is.muni.cz/auth/el/1411/jaro2016/BLIM0411c/um/>

O'CONNELL, Tx., Tj. HORITA a B. KASRAVI, 2005. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *AMERICAN FAMILY PHYSICIAN*. AMERICAN ACADEMY FAMILY PHYSICIANS, **71**(1), 105-112 [cit. 2017-01-23]. ISSN 0002838x. Dostupné také z: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/search/basic?sid=4c22ddd9-b968-42c9-9f91-a63942339ec8%40sessionmgr101&vid=0&hid=115>

PAVLÍK, Tomáš a Ladislav DUŠEK, 2012. Biostatistika [online]. Brno: Akademické nakladatelství CERM [cit. 2017-04-20]. ISBN 978-80-7204-782-6. Dostupné z: <https://www.iba.muni.cz/res/file/ucebnice/pavlik-biostatistika-v2.pdf>

PAZOUREK, Jiří, 2003. *Moderní elektroforetické analytické metody: (přednášky pro magisterské studium)* [online]. [Brno] [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: <https://faf.vfu.cz/pub-files/ustavy/ustav-chemickych-leciv/vyuka-predmetu/analyticka-chemie-i-ii/separacni-metody---elektroforeza.pdf>

PENKA, Miroslav, Eva TESÁŘOVÁ et al., 2011. *Hematologie a transfúzní lékařství I: Hematologie: Hematologie*. Praha: Grada Publishing a.s, 487 s. ISBN 978-80-247-3459-0.

RACEK, Jaroslav et al., 2006. *Klinická biochemie*. Druhé, přepracované vydání. Praha: Galén, 329 s. ISBN 978-80-7262-324-2.

ŠPIČKA, Ivan et al., ©2005. *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. Praha: Galén, 128 s. ISBN 80-7262-330-3.

TOMANDL, Josef, Jiří DOSTÁL, Hana PAULOVÁ a Eva TÁBORSKÁ, 2014. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Brno: Masarykova univerzita, 212 s. ISBN 978-80-210-6973-2.

VEJRAŽKA, Martin, 2011. Elektroforéza bílkovin v séru. *WikiSkripta* [online]. [Praha]: MEFANET [cit. 2017-02-01]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Elektrofor%C3%A9za_b%C3%ADlkovin_v_s%C3%A9ru&oldid=90972

ZIMA, Tomáš et al., 2013. *Laboratorní diagnostika*. Třetí, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 1146 s. ISBN 978-80-7492-062-2.

Seznamy

Seznam obrázků

Obrázek 1 Peptidová vazba (Tomandl et al. 2014).....	10 -
Obrázek 2 Příklad elektroforeogramu elektroforézy bílkovin v séru (Harris a Winter 2012)	15 -
Obrázek 3 Denzitometrické zpracování elektroforeogramu na předchozím obrázku (obr. 2) (Harris a Winter 2012).....	15 -
Obrázek 4 Schéma endosmózy při kapilární elektroforéze (Gottwaldová 2015).....	16 -
Obrázek 5 Zastoupení bílkovin v elektroforetických frakcích (Racek 2006). Mezi β a γ frakcí je naznačena zóna fibrinogenu.....	17 -
Obrázek 6 Struktura molekuly imunoglobulinu (Harris a Winter 2012).....	21 -
Obrázek 7 Normální elektroforeogram (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8).....	23 -
Obrázek 8 Elektroforetické typy — rozdělení od firmy Interlab (Interlab S.r.l. 2013).....	24 -
Obrázek 9 Akutní zánět (Basile 2014).....	24 -
Obrázek 10 Chronický zánět (Vejražka 2011).....	25 -
Obrázek 11 Chronický zánět (Interlab S.r.l. 2013), jeho aktivní forma (upravený obr. 8) .-	25 -
Obrázek 12 β - γ můstek (Basile 2014).....	26 -
Obrázek 13 Typ ztrát bílkovin (Basile 2014).....	26 -
Obrázek 14 Polyklonální hyperimmunoglobulinémie (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8)	27 -
Obrázek 15 Hypogamaglobulinémie (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8).....	27 -
Obrázek 16 Monoklonální pás v γ frakci (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8).....	28 -
Obrázek 17 Bisalbuminémie (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8).....	29 -
Obrázek 18 Analbuminémie (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8).....	29 -
Obrázek 19 Oligoklonální pásy (Basile 2014).....	30 -
Obrázek 20 Přítomnost fibrinogenu (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8).....	30 -
Obrázek 21 Intravaskulární hemolýza (Interlab S.r.l. 2013) (upravený obr. 8).....	31 -
Obrázek 22 Analyzátor Interlab G26 Easy Fix (Interlab S.r.l. nedatováno).....	37 -
Obrázek 23 Rozdělení dle pohlaví a věku.....	43 -
Obrázek 24 Relativní podíl pacientů z FN USA v Brně a z externích zařízení.....	44 -
Obrázek 25 Relativní zastoupení pacientů z lůžkového oddělení a ambulance.....	45 -
Obrázek 26 Relativní zastoupení elektroforetických typů.....	47 -

Obrázek 27 Zastoupení pozitivních (E9), hraničních (E10) a negativních výsledků	- 48 -
Obrázek 28 Relativní zastoupení pozitivních a negativních výsledků v jednotlivých věkových skupinách	- 50 -
Obrázek 29 Frekvence opakovaných vyšetření	- 52 -
Obrázek 30 Relativní podíl typu monoklonální gamapatie v závislosti na počtu opakování	- 52 -
Obrázek 31 Elektroforéza bílkovin v séru	- 56 -
Obrázek 32 Elektroforéza bílkovin v séru	- 57 -
Obrázek 33 Vývoj koncentrace M-Ig v čase	- 58 -

Seznam tabulek

Tabulka 1 Elektroforetické obrazy a jejich zkratky	- 41 -
Tabulka 2 Rozdělení souboru dle pohlaví a věku	- 42 -
Tabulka 3 Přehled diagnóz a počtu pacientů s konkrétní diagnózou.....	- 43 -
Tabulka 4 Přehled zařízení	- 44 -
Tabulka 5 Počet pacientů vyšetřovaných v ambulancích a na lůžkovém oddělení	- 45 -
Tabulka 6 Přehled oddělení v rámci FN USA v Brně	- 46 -
Tabulka 7 Relativní zastoupení elektroforetických typů	- 47 -
Tabulka 8 Rozdělení pozitivních a negativních nálezů	- 48 -
Tabulka 9 Přehled četností a výsledek Pearsonova chí-kvadrát testu	- 49 -
Tabulka 10 Rozložení pozitivních a negativních výsledků v jednotlivých věkových skupinách	- 49 -
Tabulka 11 Přehled četností a výsledek Pearsonova chí-kvadrát testu	- 50 -
Tabulka 12 Rozložení počtu opakování vyšetření v celém souboru a u typu monoklonální gamapatie	- 51 -

Přílohy

Příloha 1 Přehled diagnóz

Kód	Název diagnózy	Počet
D472	Monoklonální gamapatie nejasného významu	37
G939	Porucha mozku NS	32
K30	Funkční dyspepsie	27
D508	Jiné anémie z nedostatku železa	24
D849	Imunodeficiencie NS	23
M2550	Bolest kloubů, mnohočetná lokalizace	21
G402	Symptomatická epilepsie a epileptické syndromy (fokální, parciální) příbuzné lokalizace s komplexem parciálních záchvatů	17
I10	Esenciální (primární) hypertenze	15
I259	Chronická ischemická choroba srdeční NS	14
K738	Jiná chronická hepatitida NJ	12
K746	Jiná neurčená cirhóza jater	12
D691	Sekundární chronické anémie a po ztrátě krve z nedostatku železa	11
D500	Kvalitativní poruchy trombocytů	11
N185	Jiné určené poruchy leukocytů	9
D728	Chronické onemocnění ledvin, stádium 5	9
D684	Získaný nedostatek koagulačních faktorů	8
Z136	Dilatovaná kardiomyopatie	6
I420	Chronické onemocnění ledvin	6
N189	Screeningové vyšetření specializované na kardiovaskulární onemocnění	6
I209	Angina pectoris NS	5
M0590	Alkoholická cirhóza jater	5
M2559	Séropozitivní revmatická artritida NS - Mnohočetné lokalizace	5
K703	Bolest kloubů, lokalizace NS	5
Z940	Transplantovaná ledvina	5
M159	Monoklonální gamapatie nejasného významu	4
D899	Porucha mozku NS	4
E118	Funkční dyspepsie	4
C911	Jiné anémie z nedostatku železa	4
M5490	Imunodeficiencie NS	4
B170	Bolest kloubů, mnohočetná lokalizace	4
I500	Symptomatická epilepsie a epileptické syndromy (fokální, parciální) příbuzné lokalizace s komplexem parciálních záchvatů	4
N184	Esenciální (primární) hypertenze	4
M5455	Bolesti dolní části zad - Torakolumbální (hrudně-bederní) krajina	3
K769	Nemoc jater NS	3
D649	Anémie NS	3
Z017	Laboratorní vyšetření	3
D841	Defekt v systému komplementu	3
L959	Vaskulitida omezen na kosti NS	3
Z000	Celkové lékařské vyšetření (prohlídka)	3
N179	Akutní selhání ledvin NS	3

Kód	Název diagnózy	Počet
R509	Horečka NS	3
K743	Primární biliární cirhóza	3
E040	Difúzní netoxická struma	2
D689	Vada koagulace NS	2
N309	Cystitida NS	2
Z005	Vyšetření potenciálního dárce orgánů a tkáně	2
I421	Obstruktivní hypertrofická kardiomyopatie	2
I408	Jiná akutní myokarditida	2
D860	Sarkoidóza plic	2
I350	Stenóza aortální (chlopeň)	2
I633	Mozkový infarkt způsobený trombózou mozkových tepen	2
R53	Nevolnost a únava	2
L88	Pyoderma gangrenosum	2
I214	Akutní subendokardiální infarkt myokardu	2
E116	Diabetes mellitus 2. typu s jinými určenými komplikacemi	2
K508	Jiný Crohnova nemoc	2
L405	Psoriáza artropatická (M07.0 – M07.3*, M09.0*)	2
N178	Jiné akutní selhání ledvin	2
L989	Onemocnění kůže a podkožního vaziva NS	2
D480	Novotvar NNCH - kost a kloubní chrupavka	2
D729	Porucha bílých krvinek	2
G609	Idiopatické progresivní neuropatie	2
M350	[Sjögrenův] „suchý“ syndrom	2
N049	Nefrotický syndrom NS	2
I509	Selhání srdce	2
G20	Parkinsonova nemoc	2
R55	Mdloba synkopa a zhroucení — kolaps	2
E785	Hyperlipidemie NS	2
L500	Alergická kopřivka	2
G628	Jiné určené polyneuropatie	2
A499	Bakteriální infekce NS	2
C900	Mnohočetný myelom	2
J111	Chřipka s jinými projevy na dýchacím ústrojí, virus neidentifikován	2
J069	Akutní infekce horních dýchacích cest NS	2
Z944	Transplantovaná ledvina	2
D682	Dědičný nedostatek jiných koagulačních faktorů	1
L400	Běžná lupénka – psoriasis vulgaris	1
C679	Měchýř močový NS	1
K730	Chronická perzistující hepatitida NS	1
D720	Genetické anomálie leukocytů	1
K709	Alkoholické onemocnění jater NS	1
M7909	Revmatismus NS, lokalizace NS	1
M5497	Dorzalgie NS, bederně-křížová krajina	1
L52	Erythema nodosum	1
R104	Jiná a neurčená břišní bolest	1
D759	Nemoc krve a krvetvorných orgánů NS	1
R701	Abnormální viskozita krve	1
L120	Bulózní pemfigoid	1

Kód	Název diagnózy	Počet
A692	Lymeská nemoc	1
D509	Anémie z nedostatku železa NS	1
Z524	Dárce ledviny	1
M7685	Jiné entézopatie dolní končetiny, mimo nohu (pod kotníkem) - Pánevní krajina a stehno	1
M5429	Cervikalgie; lokalizace NS	1
B181	Chronická virová hepatitida B bez Delta agens	1
M519	Onemocnění meziobratlové ploténky NS	1
E039	Hypothyreóza NS	1
I802	Flebitida a tromboflebitida jiných hlubokých cév dolních končetin	1
L299	Pruritus NS	1
I801	Flebitida a tromboflebitida femorální žíly	1
L282	Jiné prurigo	1
I676	Nehnisavá trombóza nitrolebního žilního systému	1
D695	Jiné autoimunitní hemolytické anémie	1
I639	Mozkový infarkt NS	1
D688	Jiné určené vady koagulace	1
M511	Onemocnění lumbálních a jiných meziobratlových plotének s radikulopatií (G55.1*)	1
D591	Jiné autoimunitní hemolytické anémie	1
M459	Ankylozující spondylitida, lokalizace NS	1
K830	Zánět žlučových cest – cholangitida	1
M353	Revmatická polymyalgie	1
D383	Novotvar NNCH - mezihrudí - mediastinum	1
I422	Jiné hypertrofické kardiomyopatie	1
C880	Waldenströmova makroglobulinémie	1
N308	Jiná cistitida	1
C220	Karcinom jaterních buněk	1
M329	Systémový lupus erythematodes NS	1
K739	Chronická hepatitida NS	1
N289	Onemocnění ledviny a močovodu NS	1
R227	Lokalizované zduření, útvar a bulka, mnohočetných lokalizací	1
R599	Zvětšení mízní uzliny	1
R198	Jinak neurčené příznaky a znaky týkající se trávicí soustavy a břicha	1
I330	Akutní a subakutní infekční endokarditida	1
L308	Jiná neurčená dermatitida	1
I301	Infekční perikarditida	1
D839	Běžná variabilní imunodeficiencie NS	1
I260	Plicní embolie s akutním cor pulmonale	1
D750	Rodinná erytróza	1
T814	Infekce po výkonu	1
L208	Jiná atopická dermatitida	1
I251	Aterosklerotická nemoc (choroba) srdeční	1
D696	Trombocytopenie NS	1
I250	Aterosklerotická kardiovaskulární nemoc, takto určená	1
D693	Idiopatická trombocytopenická purpura	1
M150	Primární generalizovaná (osteo)artróza	1
K900	Celiakie	1

Kód	Název diagnózy	Počet
I213	Akutní transmurální infarkt myokardu neurčené	1
K869	Nemoc slinivky břišní	1
S7200	Zlomenina krčku kosti stehenní — zavření	1
K861	Jiná chronická pankreatitida	1
M0000	Stafylokoková artritida a polyartritida, mnohočetný lokalizace	1
D519	Anemie z nedostatku vitamínu B12 NS	1
Z941	Transplantované srdce — srdeční transplantát	1
K859	Akutní pankreatitida	1
G822	Paraplegie NS	1
M8630	Chronická multifaktoriální osteomyelitida mnohočetná lokalizace	1
N183	Chronické onemocnění ledvin, stádium 3	1
D470	Novotvary NNCH z histiocyťů a krvetvorných buněk	1
L988	Jiná určená onemocnění kůže a podkožního vaziva	1
D143	Nezhoubný novotvar — průduška a plíce	1
N181	Chronické onemocnění ledvin, stádium 1	1
K740	Jaterní fibróza	1
S202	Zhmoždění — kontuze — hrudníku	1
C840	Mycosis fungoides	1
E875	Hyperkalemie	1
C61	Zhoubný novotvar předstojné žlázy — prostaty	1
E788	Jiné poruchy metabolismu lipoproteinů	1
B182	Chronická virová hepatitida C	1
L700	Acne vulgaris	1
B180	Chronická virová hepatitida B s Delta agens	1
E780	Čistá hypercholesterolemie	1
M5499	Dorzalgie NS, lokalizace NS	1
L660	Pseudopelade	1
J301	Alergická rýma způsobená pylem	1
J90	Pohrudniční výpotek, NS	1

Příloha 2 Přehled oddělení a zařízení

Zařízení	Oddělení	Počet
FN USA	OKH-Ambulance	89
FN USA	I. neurologická klinika-ambulance	43
FN USA	II. IK-Ambulance revmatologie	43
FN USA	ÚKIA-Oddělení klinické imunologie	31
FN USA	I. IKAK-lůžková část-33	27
FN USA	II. IK-ambulantní oddělení-všeobecné	18
FN USA	I. IKAK-lůžková část-32	17
FN USA	I. NK- Lůžková část standard-0412	17
FN USA	I. IKAK-nízkoprahový příjem	16
FN USA	II. IK-Gastroenterologické oddělení	12
FN USA	II. IK-Ambulance nefrologie	10
FN USA	I. dermatovenerologická klinika – oddělení 25	9
FN USA	II. IK-lůžková část-71 muži	8
FN USA	II. IK – lůžková část, oddělení 67	8
FN USA	I. IKAK-lůžková část-49	7
FN USA	I. dermatovenerologická klinika-ambulance	6
FN USA	I. IKAK-Ambulance interní	6
FN USA	ORZL-ambulantní oddělení-ordinace B	5
FN USA	I. NK-Lůžková část-0413	4
FN USA	I. dermatovenerologická klinika-oddělení 28	4
FN USA	II. IK-lůžková část-70 ženy	3
FN USA	OKB-ambulantní oddělení	3
FN USA	I. NK- Lůžková část standard-0411	3
FN USA	II. IK-Ambulance endokrinologie	2
FN USA	ARK-ambulance bolesti 1	2
FN USA	II. IK-Ambulance plicní	2
FN USA	II. IK-Stationář dialýzy	2
FN USA	I. IKAK-lůžková část-30 JIP	2
FN USA	II. IK-Hemodialýza	2
FN USA	ORZL-ordinace C	2
FN USA	I. ORTK-lůžková část-57	1
FN USA	NK-lůžková část-80 JIP	1
FN USA	NCHK-ambulantní oddělení	1
FN USA	URO-lůžková část-68	1
FN USA	OCHO-ambulance	1
CKTCH	Oddělení 14	26
CKTCH	Transplantační ambulance	20
CKTCH	Ambulance	11
CKTCH	Oddělení 12 JIP	1
CKTCH	Oddělení 14 JIP	1
Nemocnice Boskovice	Hematologická ambulance	20
Nemocnice Boskovice	Interna B	1
Nemocnice Milosrdných bratří	Interní oddělení	10
Nemocnice Milosrdných bratří	Hematologická ambulance	7

Zařízení	Oddělení	Počet
Nemocnice Břeclav	Hematologická ambulance	7
Nemocnice Břeclav	JIP Interního oddělení	2
Nemocnice Břeclav	Hemodialýza při interním oddělení	1
Vojenská nemocnice Brno	Interna-ambulance	7
Vojenská nemocnice Brno	Interna – lůžkové standard	1
Kroměřížská nemocnice a. s.	Hemodialýza	2
MUDr. Stanislav Šurel	Nefrologická ambulance	2
Psychiatrická nemocnice	Stanice 11 (oddělení psychiatricko-neurologické)	2
AKI, s.r.o.	Alergologie a klinická imunologie	1
HEDICA s.r.o.	Chronická a akutní hemodialýza	1
Soukromá klinika LOGO s.r.o.	Interna	1

Pozn.: JIP

Jednotka intenzivní péče

OCHO

Onkologicko-chirurgické oddělení

URO

Urologické oddělení

Příloha 3 Kazuistika 2 — vývoj koncentrace M-Ig v závislosti na čase

Pořadí vyšetření	Datum vyšetření	Koncentrace M-Ig (g/l)
1	07. 02. 2001	9
2	16. 07. 2001	10
3	10. 12. 2001	11
4	08. 10. 2002	13
5	01. 12. 2003	12
6	16. 08. 2004	13
7	28. 02. 2005	14
8	28. 11. 2005	14
9	29. 05. 2006	14
10	04. 06. 2007	13
11	12. 10. 2007	13
12	21. 01. 2008	13
13	14. 08. 2008	14
14	09. 03. 2009	14
15	02. 11. 2009	14
16	20. 05. 2010	13
17	08. 11. 2010	13
18	07. 03. 2011	13
19	18. 07. 2011	13
20	30. 10. 2011	13
21	07. 05. 2012	13
22	05. 11. 2012	13
23	18. 04. 2013	13
24	12. 05. 2014	12
25	12. 02. 2015	13
26	24. 08. 2015	12
27	11. 04. 2016	11
28	24. 10. 2016	12