

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMON BRLOGAR

# DIPLOMSKA NALOGA

Visokošolski strokovni program  
laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMON BRLOGAR

**ELEKTROFOREZA SERUMSKIH PROTEINOV PRI  
BOLNIKI Z AKUTNIM VNETJEM, CIROZO, NEFROTSKIM  
SINDROMOM IN MONOKLONSKO GAMOPATIJO**

**SERUM PROTEIN ELECTROPHORESIS IN PATIENTS WITH  
ACUTE INFLAMMATION, CIRRHOSIS, NEPHROTIC  
SYNDROME AND MONOCLONAL GAMMOPATHY**

**DIPLOMSKA NALOGA**

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljal v Enoti za laboratorijsko diagnostiko Splošne bolnišnice Jesenice pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom doc. dr. Ivica Avberšek-Lužnik, mag. farm., spec. med. biokem.

**Zahvala:**

Mentorju prof. dr. Borutu Božiču, mag. farm., spec. med. biokem. se iskreno zahvaljujem za nasvete in strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem somentorici doc. dr. Ivici Avberšek-Lužnik, mag. farm., spec. med. biokem., ki mi je s svojim strokovnim znanjem in nasveti usmerjala in mi vsestransko pomagala.

Hvala staršem, bratu in njegovi družini, ki so verjeli vame in mi v času študija stali ob strani.

Zahvaljujem se tudi Splošni bolnišnici Jesenice, ki mi je omogočila izvajanje študije moje diplomske naloge in osebju Enote za laboratorijsko diagnostiko.

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom doc. dr. Ivica Avberšek-Lužnik, mag. farm., spec. med. biokem.

Ljubljana, november, 2008

Predsednik diplomske komisije:izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mag.farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Iztok Grabnar, mag.farm.

# VSEBINA

## POVZETEK

## SEZNAM OKRAJŠAV

## SEZNAM SLIK

## SEZNAM PREGLEDNIC

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. DELITEV PROTEINOV PO BIOLOŠKI AKTIVNOSTI .....	1
1.2. DELITEV PROTEINOV PO VELIKOSTI IN OBLIKI.....	1
1.3. STRUKTURA PROTEINOV .....	2
1.4. SINTEZA PROTEINOV .....	3
1.5. PROTEINI V TELESNIH TEKOČINAH .....	4
1.5.1. Proteini v serumu .....	4
1.5.2. Proteini v urinu .....	6
1.5.3. Proteini v likvorju .....	6
1.5.4. Proteini v amnijski tekočini .....	8
1.5.5. Proteini v drugih telesnih tekočinah .....	8
1.6. LABORATORIJSKE METODE DOLOČANJA PROTEINOV .....	8
1.6.1. Elektroforeza proteinov .....	9
1.6.2. Imunokemijske metode določanja proteinov .....	9
1.7. DIAGNOSTIČNI POMEN DOLOČANJA PROTEINOV .....	9
<b>2. NAMEN DELA .....</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>12</b>
3.1 MATERIALI.....	12
3.1.1. Vzorci .....	12
3.1.2. Oprema .....	13
3.1.3. Materiali in kemikalije.....	13
3.2. METODE.....	14
3.2.1. Priprava vzorcev .....	14
3.2.2. Postopek elektroforeze.....	14
3.2.3. Statistična analiza rezultatov .....	15
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>16</b>
4.1. KONCENTRACIJE CELOKUPNIH BELJAKOVIN PRI ZDRAVIH OSEBAH IN BOLNIKI .....	18
4.2. KONCENTRACIJE ALBUMINOV PRI ZDRAVIH OSEBAH IN BOLNIKI .....	21
4.3. KONCENTRACIJE $\alpha$ -GLOBULINOV PRI ZDRAVIH OSEBAH IN BOLNIKI.....	24
4.4. KONCENTRACIJE $\beta$ -GLOBULINOV PRI ZDRAVIH OSEBAH IN BOLNIKI .....	25
4.5. KONCENTRACIJE $\gamma$ -GLOBULINOV PRI ZDRAVIH OSEBAH IN BOLNIKI .....	25
4.7. INTERPRETACIJA REZULTATOV ELEKTOROREZNE LOČBE SERUMSKIH PROTEINOV .....	28
<b>5. ZAKLJUČEK .....</b>	<b>30</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>31</b>

## POVZETEK

Elektroforeza je metoda, ki temelji na gibanju molekul v električnem polju pod zagotovljenimi pogoji konstantne napetosti. Hitrost potovanja proteinskih molekul je odvisna od njihovega naboja, velikosti in oblike ter jakosti električnega polja in vrste nosilca, na katerem elektroforeza poteka. Rezultati elektroforezne ločbe so uporabni za odkrivanje sprememb v koncentracijah posameznih proteinskih frakcij pri različnih boleznih. Spremembe v elferogramih so izražene v znižanih in/ali zvišanih koncentracijah posameznih frakcij proteinov, ter v prisotnosti ločenih frakcij monoklonskih proteinov. Študijo smo načrtovali z namenom, da bi primerjali koncentracije celokupnih beljakovin in posameznih frakcij proteinov pri zdravih osebah in bolnikih. Naš drugi cilj je bil ugotoviti, katere frakcije so patološke pri bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo, nefrotskim sindromom in monoklonsko gamopatijo in kot tretji cilj je bil opredelitev vsebine komentarja, ki ga lahko podamo ob rezultatih denzitogramov. V študijo smo vključili 30 zdravih oseb gorenjske regije in bolnike z akutnim vnetjem ( $n = 28$ ), s cirozo ( $n = 27$ ), z nefrotskim sindromom ( $n = 30$ ) in monoklonsko gamopatijo ( $n = 18$ ). Na analizatorju Xpand Dimenson smo v vseh serumskih vzorcih izmerili koncentracije celokupnih beljakovin z Biuretno metodo. Elektroforezno ločbo smo izvedli na acetatni celulozi. Obarvane elferograme smo denzitometrirali na denzitometru Cliniscan 2, Helena Laboratories. Dobljene rezultate smo statistično analizirali s programom SPSS, verzija 10. Pri skupini zdravih oseb so bile celokupne beljakovine  $70,6 \pm 3,2$  g/l, pri bolnikih z akutnim vnetjem  $67,8 \pm 9,7$  g/l, pri bolnikih s cirozo  $64,7 \pm 7,6$  g/l, pri bolnikih z nefrotskim sindromom  $58,8 \pm 5,5$  g/l in pri bolnikih z monoklonsko gamopatijo  $100,9 \pm 20,6$  g/l. Koncentracije celokupnih beljakovin so se med skupinami značilno razlikovale kar smo dokazali s testom ANOVA, LSD ( $\alpha < 0,05$ ). Povprečne koncentracije albuminov so bile pri bolnikih z akutnim vnetjem, s cirozo, z nefrotskim sindromom in pri bolnikih z monoklonsko gamopatijo značilno nižje v primerjavi z zdravimi osebami ( $\alpha < 0,001$ ).  $\alpha_1$ -globuline so imeli zvišane samo bolniki z akutnim vnetjem.  $\alpha_2$  serumski globulini so bili zvišani pri bolnikih z akutnim vnetjem in nefrotskim sindromom, medtem ko se  $\beta$ -globulini pri naših skupinah niso razlikovali značilno.  $\gamma$ -globulini so bili značilno višji pri bolnikih s cirozo ( $p < 0,05$ ) in zelo visoki pri bolnikih z monoklonsko gamopatijo ( $p < 0,001$ ) na račun tvorbe imunoglobulinov, ki jih tvorijo plazmatke. Naši rezultati potrjujejo dejstvo, da je postopek elektroforeze na acetatni celulozi diagnostično uporaben za oceno prisotnosti patoloških frakcij serumskih proteinov pri bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo, nefrotskim sindromom in monoklonsko gamopatijo.

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>CA 15-3</b>	tumorski kazalec za raka na dojki
<b>CA 19-9</b>	tumorski kazalec za raka na pankreasu
<b>CA 72-41</b>	tumorski kazalec za raka na želodcu
<b>CEA</b>	karcinoembrionalni antigen
<b>mRNA</b>	ribonukleinska kislina za sporočanje informacije
<b>RNA</b>	ribonukleinska kislina
<b>SD</b>	standardna deviacija
<b>SDS</b>	sodium dodecil sulfat (natrijev dodecil sulfat)
<b>SPSS</b>	program za statistično obdelavo podatkov
<b>RCF</b>	relativna centrifugalna sila (g)
<b>g</b>	gravitacijski pospešek ( $9,81\text{m/s}^2$ )
<b>LSD</b>	test najmanjše pomembne razlike , ki temelji na seštevanju podobnih varianc (Least Significant Difference)

## **SEZNAM SLIK**

Slika 1. Prikaz štirih ravni proteinske strukture (primarna, sekundarna, terciarna in kvartarna).

Slika 2. Shematski prikaz sinteze proteinov na ribosomih.

Slika 3. Elektroforeza serumskih proteinov (elferogram in denztiogram).

Slika 4. Primer denzitograma zdrave osebe in bolnika z monoklonsko gamopatijo.

Slika 5: Primer denzitograma zdrave osebe in bolnika z nefrotskim sindromom.

Slika 6: Primer denzitograma zdrave osebe, bolnika z monoklonsko gamopatijo in bolnika s cirozo.

## **SEZNAM PREGLEDNIC:**

**Preglednica I.** Spremembe v proteinskih frakcijah pri različnih boleznih.

**Preglednica II.** Osnovne karakteristike zdravih oseb in bolnikov

**Preglednica III.** Koncentracija celokupnih beljakovin pri zdravih osebah in bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo, nefrotskim sindromom in monoklonsko gamopatijo.

**Preglednica IV.** Referenčne vrednosti za celokupne beljakovine in posamezne frakcije proteinov.

**Preglednica V.** Koncentracija albuminov pri zdravih osebah in bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo, nefrotskim sindromom in monoklonsko gamopatijo.

**Preglednica VI.** Koncentracije  $\alpha_1$  in  $\alpha_2$ -globulinov pri zdravih osebah in bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo, nefrotskim sindromom in monoklonsko gamopatijo.

**Preglednica VII.** Koncentracije  $\beta$ -globulinov pri zdravih osebah in bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo, nefrotskim sindromom in monoklonsko gamopatijo.

**Preglednica VIII.** Koncentracije  $\gamma$ -globulinov pri zdravih osebah in bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo, nefrotskim sindromom in monoklonsko gamopatijo.



# 1. UVOD

Izraz protein je leta 1838 prvič uporabil nizozemski kemik Gerardus Mulder za poimenovanje skupine molekul, ki so široko zastopane v vseh rastlinah in živalih. Z izbiro imena je Mulder pravilno napovedal pomen proteinov, saj ga je izpeljal iz grške besede *proteios*, kar pomeni »glavni« oziroma »prvi«. Proteini, ki so biološki polimeri aminokislin, imajo veliko različnih struktur in funkcij. Molekule proteinov se v svojem naravnem okolju zvijejo v točno določeno tridimenzionalno strukturo, imenovano »nativna konformacija«. Ta je definirana s sekundarno, terciarno in pri nekaterih proteinih s kvartarno ravno organizacije. Najpomembnejši dejavnik pri organiziranosti proteinske strukture je njeno  $\alpha$ -aminokislinsko zaporedje – primarna struktura. Molekule proteinov imajo zaradi določenega zaporedja aminokislin značilno velikost, obliko in biološko aktivnost (1).

## 1.1. DELITEV PROTEINOV PO BIOLOŠKI AKTIVNOSTI

Encimi so največja skupina proteinskih molekul, nekateri imajo v svoji strukturi še kofaktor, ki je lahko organska molekula ali pa kovinski ion. Uravnavajo presnovne procese v organizmu. Kot katalizatorji delujejo tako, da znižujejo aktivacijsko energijo reakcij in tako predstavljajo eno najpomembnejših skupin biomolekul. Strukturni proteini so: kolageni, elastini in keratini. V celicah predstavljajo mehansko oporo. Obrambni proteini so protitelesa in interferoni, ki preprečujejo škodljiv učinek bakterij in virusov na organizem. Številne majhne biomolekule, kot so kisik, holesterol in maščobne kisline se prenašajo po telesu s pomočjo transportnih proteinov. V seznam proteinov, ki so sposobni uravnati celične in fiziološke aktivnosti spadajo: Lac-represor, inzulin, glukagon, prolaktin, tirotropini in G-proteini. Receptorski proteini, ki so lahko vgrajeni v celične membrane pa sodelujejo pri prenosu živčnih impulzov in hormonskem signaliziranju (1).

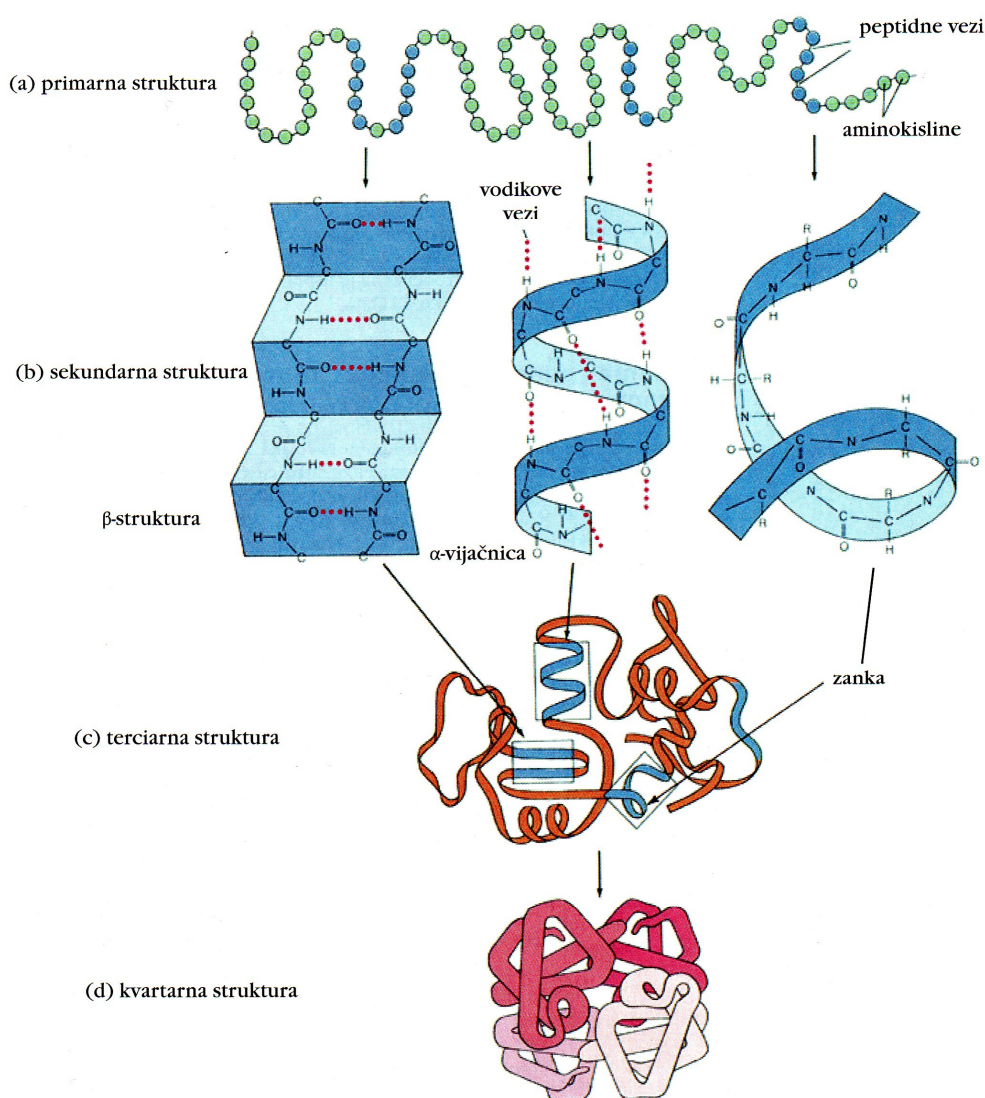
## 1.2. DELITEV PROTEINOV PO VELIKOSTI IN OBLIKI

Po zgradbi ločimo enostavne in konjugirane, po obliki pa fibrilarne in globularne proteine. Med enostavne proteine spadajo tisti, ki so sestavljeni samo iz aminokislinskih ostankov, med konjugirane pa proteini, ki imajo v svoji strukturi dodatno komponento, imenovano prostetična skupina (majhna organska molekula). Fibrilarni proteini utrjujejo čvrstost kosti, kože, kit in hrustanca in mednje spada kolagen. Globularni proteini so topni v citosolu in

drugih bioloških tekočinah, sodelujejo pa pri transportu molekul in imunski zaščiti organizma (1).

### 1.3. STRUKTURA PROTEINOV

Primarna struktura je določena z zaporedjem aminokislinskih ostankov, ki so med seboj povezani s peptidno vezjo. Primarna struktura predstavlja osnovo za nadaljnje tri strukturne ravni (slika 1). Krajši predeli primarnega zaporedja se najprej zvijejo v urejene sekundarne strukture, ki vsebujejo ponavljajoče se elemente kot sta  $\alpha$ -vijačnica in  $\beta$ -plošča. Elementi sekundarnih struktur se povezujejo med seboj in se končno zvijejo v kompaktno globularno enoto, ki predstavlja terciarno strukturo. Za četrto raven, imenovano kvartarna struktura, je značilno povezovanje dveh ali več polipeptidnih verig v protein z več podenotami (1).



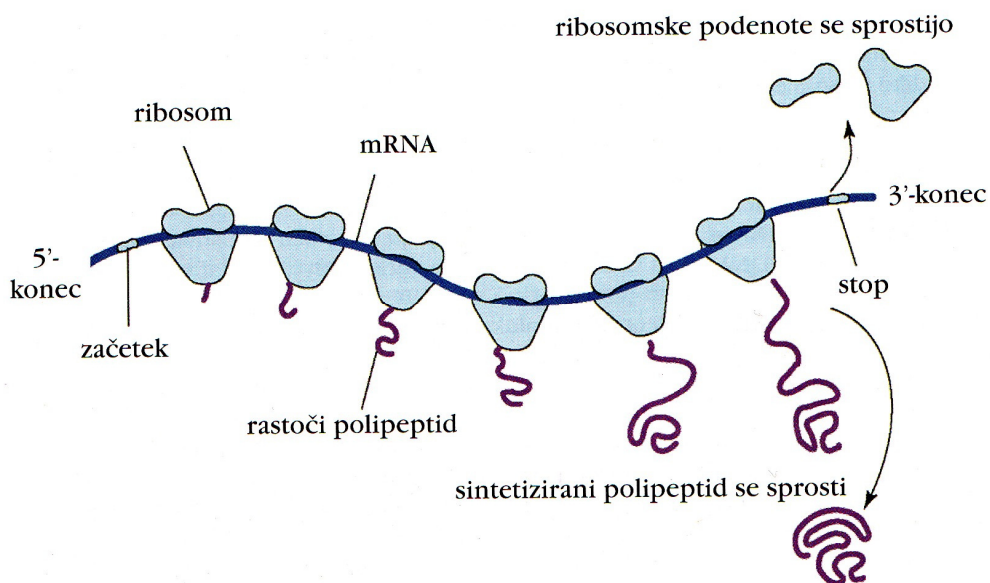
Slika 1. Prikaz štirih ravni proteinske strukture: a) primarna ali kovalentna, b) sekundarna, c) terciarna, d) kvartarna struktura. Povzeto po Rodney Boyerju (1).

## 1.4. SINTEZA PROTEINOV

Proteini so biološki polimeri različnih velikosti, zgrajeni iz nabora 20  $\alpha$ -aminokislin. Vse te aminokislino imajo na centralni ogljikov atom vezan vodik, karboksilno skupino, amsko skupino ter stransko verigo R, ki je drugačna za vsako aminokislino. Aminokislino se povezujejo z amidnimi vezmi v peptide, polipeptide in proteine. Vsaka vrsta proteinov ima točno določeno aminokislinsko sestavo in molekulsko maso. Sinteza proteinov v celici ima naslednje temeljne značilnosti:

- proces poteka na ribosomih,
- aminokislino se aktivirajo s kovalentno vezavo na molekule prenašalne RNA,
- zaporedje nukleinskih baz na informacijski RNA in zaporedje aminokislino določa genetski kod.

Sinteza proteinov je polimerizacijski proces, pri katerem se aminokislino pripenjajo na rastoči karboksilni konec polipeptidne verige med pomikanjem ribosoma po mRNA (slika 2) (1).



Slika 2. Shematski prikaz sinteze proteinov na ribosomih. Povzeto po Rodney Boyerju (1)

## 1.5. PROTEINI V TELESNIH TEKOČINAH

Proteini so velike molekule, če jih primerjamo z molekulami, s katerimi se ukvarjata anorganska in organska kemija. Prisotni so v celicah in v vseh telesnih tekočinah, kjer so njihove funkcije sledeče:

- vzdrževanje onkotskega pritiska, viskoznosti in kislinobaznega ravnovesja v krvi,
- transport ionov in nevodotopnih snovi po krvi,
- vzdrževanje imunske zaščite organizma,
- vzdrževanje sistema hemostaze,
- biokatalitično delovanje v presnovnih procesih,
- vzdrževanje mehanske intergritete celičnih in tkivnih sistemov,
- vloga proteinov kot receptorjev za nevrottransmiterje in hormone.

### 1.5.1. Proteini v serumu

V serumu zdrave osebe se nahaja od 66 do 83 g/l proteinov. Plazma vsebuje tudi fibrinogen, zato so referenčne vrednosti za plazmo približno 3 g/l večje kot v serumu. Do zdaj je bilo v serumu odkritih več kot 300 različnih proteinov. Po elektroforezni ločbi na acetatni celulozi se razvrščajo v 5 frakcij (slika 3).

1. **Albumini** so serumski proteini z molsko maso okrog 7000 in z izoelektrično točko 4,7. Normalne koncentracije albuminov v serumu so 35,2 do 50,4 g/l. V električnem polju se gibljejo najbolj anodno, v primerjavi z drugimi proteini potujejo najhitreje. Poznamo 20 genetskih variant albuminov, ki pa nimajo večjega kliničnega pomena. Pri osebah, ki so heterozigoti, sta na elferogramu prisotni dve jasno ločeni frakciji albuminov. Odsotnost tvorbe albuminov je genetsko povzročena in se imenuje analbuminemija. Je zelo redko stanje, ki je klinično povezano s posebno obravnavo prizadetih oseb. Albumini lahko tvorijo komplekse z drugimi proteini, služijo tudi kot transportni proteini za kalcij, bilirubin, neesterificirane maščobne kisline in zdravilne učinkovine. Njihova glavna vloga je vzdrževanje stalnega volumna telesnih tekočin. So pomemben kazalec prehranjenosti organizma.
2.  **$\alpha$ 1-globulini** so najmanjša skupina serumskih proteinov, prisotni so v koncentracijah od 1,3 do 3,9 g/l.  $\alpha$ 1-antitripsin predstavlja največji delež  $\alpha$ 1-globulinov. Odsotnost gena za sintezo  $\alpha$ 1-antitripsina vodi v nastanek emfizema.  $\alpha$ 1-globulini so še:  $\alpha$ 1-fetoprotein,

$\alpha$ 1-antihimotripsin,  $\alpha$ 1-kisli glikoprotein (orsomukoid) in  $\alpha$ 1-lipoprotein ali holesterol. Tudi Bence Jonesovi proteini se v električnem polju gibljejo v področju  $\alpha$ 1-globulinov.

3.  **$\alpha$ 2-globulini** so prisotni v koncentracijah od 5,5 do 9,3 g/l. Med  $\alpha$ 2-globuline spadajo:  $\alpha$ 2-makroglobulin, haptoglobin in ceruloplazmin. Hepatoglobin veže prosti hemoglobin. Znižan je pri intravaskularni hemolizi.  $\alpha$ 2-makroglobulin je inhibitor trombina. Ima visoko molekulsko maso, zato ne more prehajati v urin niti pri obsežni okvari glomerulov. Pri nefrotskem sindromu so koncentracije  $\alpha$ 2-makroglobulina v serumu zvišane. Ceruloplazmin je prenašalni protein za baker in deluje tudi kot feroooksidaza. Znižan je pri Wilsonovi bolezni, kjer se kopiči v tkivih in povzroča okvare jeter, živčevja in oči.
4.  **$\beta$ -globulini** so pri zdravih osebah zastopani v koncentracijah od 5,9 do 11,4 g/l. Mednje spadajo transferin, hemopeksin,  $\beta$ -lipoprotein, komponenti komplekta C4 in C3, fibrinogen in  $\beta$ 2-mikroglobulin. Transferin je transportni protein za železo v trovalentni obliki. Uporablja se za diferencialno diagnostiko anemij in za spremljanje terapije. Pri hipohromni anemiji je zvišan, vendar je njegova nasičenost z železom majhna. Hemopeksin veže prosti hem. Uporablja se pri diagnostiki hemolitičnih anemij s sočasnim vnetnim procesom, ker ni reaktant akutne faze vnetja. Pri hemolizi je znižan.  $\beta$ -lipoproteini imajo pomembno vlogo pri transportu lipidov, sestavini komplekta C3 in C4 pa pri imunskem odzivu organizma. Fibrinogen sodeluje pri strjevanju krvi. Nahaja se v krvni plazmi. Je globulin, ki se sintetizira v jetrih. Ima majhno molekulsko maso, zato se filtrira skozi glomerulno membrano in tudi popolnoma reabsorbira iz tubulov v kri. Uporablja se za oceno ledvične tubulne funkcije. Pri okvarah tubulov so njegove koncentracije v serumu znižane, v urinu pa zvišane.
5.  **$\gamma$ -globulini** so druga najbolj zastopana frakcija serumskih proteinov, sodelujejo pri imunski zaščiti organizma. V serumu so prisotni v koncentracijah od 5,8 do 15,2 g/l. Molekulo globulinov sestavljata dve težki in dve lahki verigi. V frakciji  $\gamma$ -globulinov se v večini nahajajo imunoglobulini, ki so nosilci imunosti in C-reaktivni protein. Imunoglobuline delimo v pet razredov A, G, E, D in M. Imajo dve osnovni funkciji: prepoznavanje antigenov in aktivacija efektorskih mehanizmov za odstranitev antigenov. Nastajajo v plazmatkah, ki so najbolj zrela oblika limfocitov B. Protitelesa, ki jih izločajo plazmatke, so sposobna vezave na različne antigene. V področju  $\gamma$ -

globulinov se nahajajo še paraproteini ter lizozim pri različnih benignih in malignih procesih. Paraproteini ali monoklonski imunoglobulini so patološke oblike imunoglobulinov, ki so produkt enega kлона plazmatk. Najpogostejši so pri malignih transformacijah limfocitov, ko se maligna limfocitna celica B nenadzorovano razmnoži. Vse potomke maligne celice proizvajajo identične imunoglobuline: monoklonski imunoglobulin, ki v krvi prevlada nad normalnimi imunoglobulini. Monoklonski imunoglobulini so imunoglobulini istega razreda, ki se vežejo na enako antigensko determinanto. Paraproteini pa se lahko pojavljajo v različnih oblikah: kot monomeri, kot polimeri, lahke verige in/ali težke verige imunoglobulinov. Med  $\gamma$ -globuline spadajo tudi krioglobulini. To so proteini, ki se oborijo pri temperaturah, nižjih od telesne temperature. Zelo pomembni med  $\gamma$ -globulini pa so tudi proteini komplekta C<sub>1</sub>-esterazni inhibitor, C<sub>3</sub> in C<sub>4</sub>. Koncentraciji komponent komplekta C<sub>3</sub> in C<sub>4</sub> sta zvišani pri akutnih vnetnih procesih in znižani pri boleznih, kjer nastajajo imunski kompleksi (sistemski lupus eritematosus, revmatoidni artritis). Zvišane koncentracije C<sub>3</sub> in C<sub>4</sub> komponent komplekta so pri akutnih vnetnih procesih, znižane pa pri boleznih, kjer nastajajo imunski kompleksi (2,3,4).

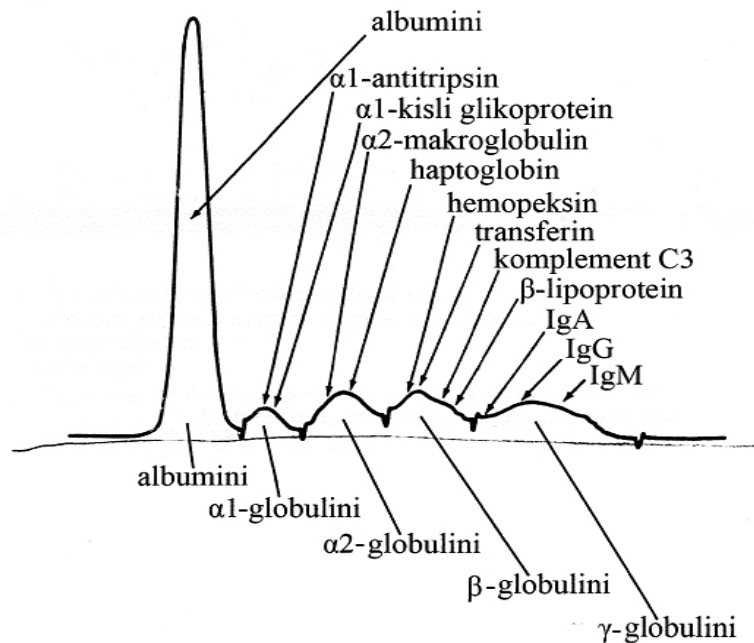
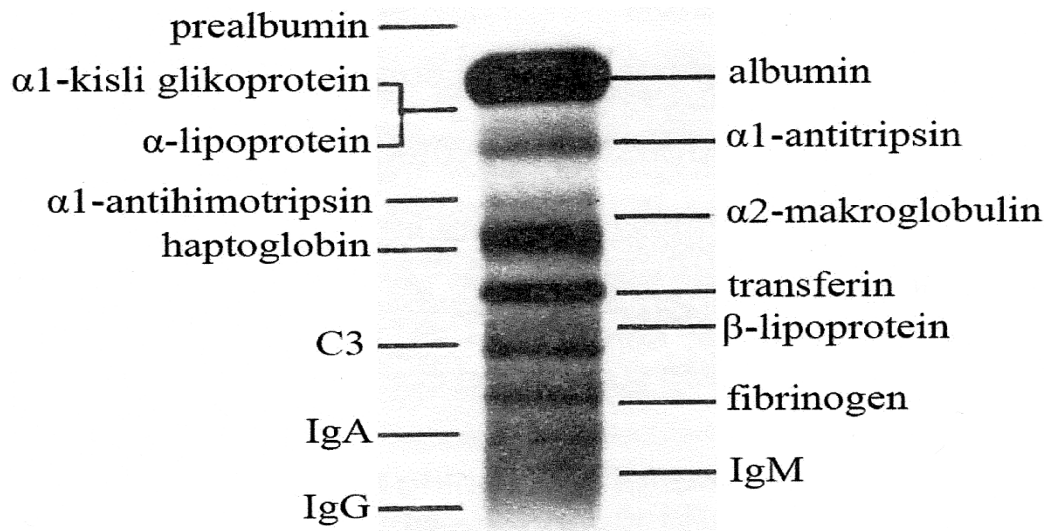
### **1.5.2. Proteini v urinu**

Skozi ledvice se dnevno filtrira 10g proteinov, vendar se jih z urinom izloči le do 0,95g. V glavnem je to albumin, nekaj pa je tudi Tamm-Horsfallovega proteina, ki se verjetno izloča iz distalnih tubulov. Pri elektroforezi normalnega urina lahko opazimo le sled albumina in transferina. Glomeruli v ledvicah delujejo kot ultrafiltri za plazemske proteine. Normalno se skozi filtrirajo le proteini z majhno molekularno maso. Nizkomolekulski proteini se filtrirajo skozi glomerule v odvisnosti od njihove plazemske koncentracije. Iz glomerulnega filtrata se lahko odstranijo s tubulno reabsorpcijo. Količina v urinu izločenih proteinov je lahko večja pri zdravih ljudeh v primeru naporov, dehidracije, stradanja in nosečnosti. Razen albuminov lahko v urinu najdemo tudi globuline, fibrinogen, hemoglobin, redkeje mioglobin, nukleoproteine in paraproteine (3).

### **1.5.3. Proteini v likvorju**

Likvor ali možganska tekočina vsebuje predvsem nizkomolekulske proteine v koncentraciji 0,15 do 0,42 g/l. Približno 80% proteinov likvorja izhaja iz krvne plazme, ki z ultrafiltracijo prehaja skozi stene kapilar in možganske ovojnice. Preostalih 20% proteinov se sintetizira

intratekalno v hrbteničnem kanalu. V likvorju so ponavadi prisotni albumini, prealbumini in transferin. V fetusu in pri novorojenčkih je normalna koncentracija proteinov v likvorju nekoliko višja kot pri odraslih. V patoloških stanjih se najpogosteje zviša koncentracija globulinov. V likvorju so v sledovih tudi komponente komplementa C3 in C4. Pri vnetnih boleznih centralno živčnega sistema se koncentracije komplementa v likvorju zvišajo (3).



Slika 3: Elektroforeza serumskih proteinov. Elferogram (zgoraj) in denzitogram (spodaj).

#### 1.5.4. Proteini v amnijski tekočini

Koncentracija proteinov v amnijski tekočini je 0,13g/l v času od 9. do 13. tedna gestacije. V tem času so v amnijski tekočini prisotni serumski proteini matere. V prvem trimesečju nosečnosti so prisotni proteini, ki izvirajo iz zarodka in rumene vrečke. V amnijski tekočini so prisotni encimi (acetilholinesteraza, alkalna fosfataza,  $\gamma$ -glutamilna transferaza) in specifični proteini ( $\alpha$ -fetoprotein, feritin, transferin) (3).

#### 1.5.5. Proteini v drugih telesnih tekočinah

Patološko kopičenje tekočin v peritonealni, plevralni votlini se razlikuje po vsebnosti proteinov na transudate (manj kot 30g/l) in eksudate (več kot 30g/L). **Proteini v slini** so zastopani v koncentraciji od 0,7 do 1,0 g/l. V slini so  $\alpha$ -amilaza,  $\alpha$ 1-mikroglobulin, kislina fosfataza,  $\beta$ 2- mikroglobulin, IgA, lizozim, laktoferin. **Materino mleko** vsebuje 0,8 - 0,9% proteinov in sicer imunoglobuline A skupaj z imunoglobulini G, ki jih je otrok prejel že preko posteljice kot plod. Glavni proteini so  $\alpha$ -laktoalbumin, laktoferin, lizozim in serumski albumini. **Proteini v solzah** so v koncentracijah od 4,6 do 6,9 g/l. V značilnih koncentracijah so prisotni: IgE, lizozim in transferin. **Proteini v tekočini različnih cist** se razlikujejo glede na velikost, strukturo in lokacijo ciste (jetra, dojke, ovariji, pankreas, ledvice,...). Večinoma so v tekočini cist prisotni proteini, ki so tumorski označevalci: CA 19-9, CEA, CA15-3, CA 72-41. **Proteini v sinovijski tekočini:** V fizioloških pogojih je sinovijska membrana nepropustna za proteine z nizko molekularno maso. Ob vnetnih procesih so v sinovijski tekočini proteini: fibrinogen, albumini in globulini. V normalnih pogojih je koncentracija proteinov od 11 do 22g/l (3,12).

### 1.6. LABORATORIJSKE METODE DOLOČANJA PROTEINOV

Koncentracijo celokupnih proteinov določamo z metodami, ki jih razdelimo v štiri skupine:

- metode, pri katerih se določa proteinski dušik,
- fotometrijske metode,
- spektroskopske metode v območju UV,
- metode z merjenjem refrakcijskega indeksa.

V plazmi so prisotni različni proteini, ki se razlikujejo po molekularni masi, po strukturi in fiziološki vlogi. Pomembne so tudi metode, s katerimi ločimo posamezne skupine proteinov



in/ali samo določene proteine. To so metode elektroforezne ločbe in imunokemijske metode določanja proteinov (3).

### **1.6.1. Elektroforeza proteinov**

Elektroforeza je separacijska metoda. Temelji na gibanju proteinskih molekul v električnem polju. Proteini so v nevtralnem mediju amfoterne molekule. Vrednost pH, pri kateri je molekula proteina brez naboja, je izoelektrična točka. Hitrost potovanja je odvisna od naboja, velikosti in oblike delcev, jakosti električnega polja in vrste nosilca, na katerem se elektroforeza izvaja. Sila, ki deluje na gibljivost delcev, je enaka zmnožku jakosti polja in naboja delca. Na hitrost potovanja proteinov vplivajo tudi ionska jakost pufru in temperatura (2). Elektroforezno ločbo izvajamo na različnih nosilcih (filter papir, acetatna celuloza, agarini gel, agarozni gel, poliakrilamidni gel).

### **1.6.2. Imunokemijske metode določanja proteinov**

Imunokemijske metode določanja proteinov so imunoelektroforeza, radialna imunodifuzija, turbidimetrija in nefelometrija. **Imunoelektroforeza** je kvalitativna metoda, pri kateri se po elektroforezi proteinov na agarju ali agarozni nadaljuje imunoreakcija frakcioniranih proteinov s protitelesi. **Elektroimunodifuzija** je kvantitativna metoda pri kateri elektroforeza in imunoreakcija potekata istočasno. Pri **turbidimetričnih in nefelometričnih** metodah pa merimo koncentracijo nastalih imunskih kompleksov (2).

## **1.7. DIAGNOSTIČNI POMEN DOLOČANJA PROTEINOV**

Proteini so biomolekule, ki sodelujejo pri vseh bioloških procesih v organizmu, vključno z gledanjem, gibanjem, prebavo, delovanjem imunskega sistema in bolezenskimi stanji, ki so posledica patoloških interakcij z drugimi biomolekulami. Pri različnih boleznih so spremembe v elferogramih izražene v znižanih in/ali zvišanih koncentracijah posameznih frakcij proteinov (Preglednica I) (4).

Preglednica I: Spremembe v proteinskih frakcijah pri različnih boleznih.

Patološko stanje	Celokupni proteini	Albumini	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\beta$	$\gamma$
Akutno vnetje	N	↓ N	↑	↑		↓N
Hepatitis	↓N	↓↓	↓	↓	↓	↓
Ciroza	↓N ali ↑	↓↓		↓	↓	↑
Nefrotski sindrom	↓↓	↓↓		↑↑		↓N
Hipergamaglobulinemija	↑N	↓				↑
Plazmocitom, monoklonska gamopatija	↑↑	↓				↑↑

**Legenda:** N- normalna koncentracija, ↓- znižana koncentracija, ↑- povišana koncentracija, ↓↓- močno znižana koncentracija, ↑↑- močno povišana koncentracija, ↓N- znižana ali normalna koncentracija, ↑N- povišana ali normalna koncentracija

## **2. NAMEN DELA**

Raziskavo načrtujemo z namenom, da prikažemo laboratorijsko oceno proteinogramov 30 zdravih oseb in 103 bolnikov z različnimi patološkimi stanji. Frakcije posameznih proteinov bomo po elektroforezi na acetatni celulozi kvalitativno in kvantitativno ovrednotili z denzitometrijo.

Cilj našega dela je odgovoriti na naslednja vprašanja:

1. Kakšne povprečne vrednosti celokupnih beljakovin in posameznih frakcij imajo zdrave osebe gorenjske regije v primerjavi z referenčnimi vrednostmi, ki smo jih povzeli po Thomasu (3)?
2. Katere frakcije proteinov so patološke pri bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo, nefrotskim sindromom, in monoklonsko gamopatijo?
3. V katerih primerih lahko dodani komentar ob denzitogramu pomaga pri nadaljnji diagnostični odločitvi?

## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1. Vzorci

V študijo smo vključili vzorce 30 zdravih oseb in 103 bolnike, ki so se zdravili na internem oddelku Splošne bolnišnice Jesenice od začetka septembra 2007 do konca marca 2008 in sicer z akutnim vnetjem, s cirozo jeter, z nefrotskim sindromom in monoklonsko gamopatijo.

Skupino zdravih oseb so predstavljali zdravstveni delavci, ki so podpisali pristopno izjavo za sodelovanje v študiji. Njihov klinični status je preveril specialist interne medicine. Vključitveni kriteriji so bili sledeči: starost 32-57 let, brez kliničnih znakov podhranjenosti, vnetja, in z normalno ledvično funkcijo.

Za analizo smo uporabili vzorce serumov, ki so že bili analizirani in so bili odvečni material namenjen inaktivaciji. Povprečna starost zdravih oseb je bila 64,2 let, bolnikov pa 61,7 let. Obe skupini se po starosti nista statistično razlikovali. Podatke o diagnozah bolnikov smo po predhodni odobritvi strokovnega direktorja dobili iz baze podatkov v bolnišničnem informacijskem sistemu. Do celovitih kliničnih podatkov o pacientih nismo imeli dostopa. Podatki so zbrani v preglednici II.

Preglednica II. Osnovne karakteristike zdravih oseb in bolnikov.

<b>Bolniki</b>	Število	Spol (m/ž)	Povprečna starost $\pm$ SD
Kontrolna skupina	30	15/15	64,2 $\pm$ 7,79
Skupina bolnikov (skupaj)	103	43/60	61,7 $\pm$ 18,96
Bolniki z akutnim vnetjem	28	11/17	59,3 $\pm$ 21,00
Bolniki s cirozo	27	14/13	61,4 $\pm$ 16,91
Bolniki z nefroskim sindromom	30	14/16	64,6 $\pm$ 20,47
Bolniki z monoklonsko gamopatijo	18	7/11	63,0 $\pm$ 10,75

### 3.1.2. Oprema

- Avtomatski vertikalni elektroforezni sistem AVES 2, Helena Laboratories, Beaumont Texas, 77704 ZDA.
- Elektroforezna komora s štirimi prekati, Helena Laboratories, Beaumont Texas, 77704 ZDA.
- Plošče z acetatno celulozo (TITAN III Cellulose Acetate plates 60x76 mm), Helena Laboratories, Beaumont Texas, 77704 ZDA.
- Večkanalni aplikator, Helena Laboratories, Beaumont Texas, 77704 ZDA.
- Densitometer Cliniscan 2, Helena Laboratories, Beaumont Texas, 77704 ZDA.
- Centrifuga Centric 322A, Tehnica, Železniki, SLO.
- Sušilna komora integralnega dela elektroforeznega sistema AVES 2, Helena Laboratories, Beaumont Texas, 77704 ZDA.
- Biokemični analizator XPAND Dimension, (Newark, DE 19714, ZDA) za določanje koncentracije celokupnih beljakovin v serumu.

### 3.1.3. Materiali in Kemikalije

- Raztopina barbituratnega pufra (natrijev barbituratni pufer s pH=8,6) za elektroforezo (Electra HR Buffer).
- Vodna raztopina Barvila Ponceau S, Helena Laboratories, UK LTD, Anglija. Priprava raztopine: 8,75 g sulfosalicilne kisline, 8,75 g triklorocetne kisline, 125 g barvila Ponceau S smo raztopili v 250 ml demineralizirane vode.
- 5% raztopina očetne kisline (900ml).
- Absolutni metanol (450ml).
- Metanolna raztopina za bistrenje plošče Clear Aid. Priprava: v merilni valj smo dali 30 ml koncentrirane očetne kisline, 70 ml absolutnega metanola in 4 ml Clear dodatka (Helena Biosciences) in pred uporabo premešali.
- Reagenti za določanje celokupnih beljakovin v serumu z Biuretno metodo. Uporabili smo komercialno pripravljene reagent z bakrovim sulfatom in kalij-natrijevim tartratom v raztopini natrijevega hidroksida. Reagent je pripravljen v zaprti plastični posodici (lot DF73, Newark, DE 19714, ZDA), ki smo jo vstavili v analizator pred aplikacijo vzorcev za določitev beljakovin. Priprava reagenta za reakcijo je popolnoma avtomatizirana.

- Becton&Dickenson Vacutainer sistem (Plymouth PL 67 BP, Velika Britanija) za vakuumski odvzem venske krvi.

## **3.2. METODE**

### **3.2.1 Priprava vzorcev**

Vzorci venske krvi so na internem oddelku Splošne bolnišnice Jesenice odvzeli med 7.00 in 9.00 uro zjutraj. Za punkcijo so bile uporabljene epruvete Becton&Dickenson brez dodatkov. V laboratoriju smo vzorce krvi pustili 40 minut na sobni temperaturi, nato smo jih centrifugirali 5 minut z relativno centrifugalno silo (RCF) 1986 g, ločili serum od celic. Po opravljenih laboratorijskih preiskavah smo preostali serum zamrznili na  $-20^{\circ}\text{C}$  in ga uporabili za našo študijo. Elektroforezno ločbo smo izvajali na koncu vsakega tedna. Za študijo so bili uporabljeni serumski vzorci, ki so ostali po opravljenih analizah in so bili namenjeni za uničenje z ostalim odpadnim materialom.

### **3.2.2. Postopek elektroforeze**

1. Na plošči z acetatno celulozo smo označili mesto aplikacije prvega vzorca.
2. Ploščo z acetatno celulozo smo namakali 15 minut v raztopini baribituratnega pufera s  $\text{pH} = 8,6$ .
3. V zunanjo prekato komoro za elektroforezo smo nalili baribituratni pufer (100ml) in s filter papirjem vzpostavili most na pregradah.
4. Vzorce seruma smo odtajali, premešali in z večkanalnim aplikatorjem nanесли na celulozo acetatno folijo, ki smo jo tik pred nanosom vzorcev na hitro popivnali s filtrirnim papirjem.
5. Po aplikaciji smo ploščo z acetatno celulozo položili na pripravljeni most elektroforezne komore. Komoro smo pokrili in jo priklopili na vir stalne napetosti (180V) za 15 minut.
6. Po končani elektroforezi smo elferogram barvali v raztopini Ponceau S (5minut).
7. Sledilo je spiranje v raztopini 5% očetne kisline (10 minut), dehidracija vezi v absolutnem metanolu (4 minute) in bistrenje plošče v raztopini Clear Aid, ter sušenje na  $56^{\circ}\text{C}$  10 minut.
8. Proteinske frakcije smo ovrednotili s skeniranjem elferograma, pri valovni dolžini 525nm, na denzitometru Cliniscan 2, ki nam je dal izpis rezultatov v grafični in numerični obliki.

### **3.2.3. Statistična analiza rezultatov**

Za statistično analizo rezultatov smo uporabili SPSS statistični program za okolje Windows. Koncentracije posameznih frakcij smo izrazili kot aritmetično sredino  $\pm$  SD. Za primerjavo rezultatov med posameznimi skupinami bolnikov smo uporabili statistični test analize variance enega faktorja, ob uporabi odstopov od povprečne vrednosti od vsake meritve-LSD (Least significant difference).

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

V študiji smo izvedli elektroforezno ločbo serumskih proteinov pri 30 zdravih osebah in 103 bolnikih. Vključeni so bili bolniki z akutnim vnetjem ( $n = 28$ ), s cirozo ( $n = 27$ ), z nefrotskim sindromom ( $n = 30$ ) in monoklonsko gamopatijo ( $n = 18$ ).

Na analizatorju Xpand Dimension smo v vseh serumskih vzorcih izmerili koncentracije celokupnih beljakovin in izvedli ločbo serumskih proteinov z navadno elektroforezo na acetatni celulozi. Poleg navadne elektroforeze poznamo še druge tehnike ločevanja serumskih proteinov kot so izoelektrično fokusiranje, kapilarna elektroforeza in SDS poliakrilamidna elektroforeza.

Navadna elektroforeza se izvaja v elektroforezni komori, v kateri so elektrode, ki so povezane z izvorom istosmerne električne napetosti. Elektroforeza poteka v alkalni raztopini pufru (najpogosteje barbituratnega), pri napetosti 180V in električnem toku od 4 do 6 mA. Trajanje elektroforezne ločbe je odvisno od vrste uporabljenega elektroforeznega sistema, nosilca in pH vrednosti puferne raztopine. Po končani elektroforezi se izvede barvanje elferograma in denzitometriiranje posameznih proteinskih frakcij (2,4). V laboratorijih za rutinsko analizo serumskih proteinov se ta metoda najpogosteje uporablja, ker je oprema relativno poceni, vendar je redko popolnoma avtomatizirana in zato za izvajanje dolgotrajna. Rezultati so na voljo v času od dveh do treh ur. Običajno se te metode poslužujemo ob sočasnem zbiranju vzorcev, za analizo posameznih vzorcev pa ni primerna. V Splošni bolnišnici Jesenice se vzorci za elektroforezo serumskih proteinov zbirajo tri do štiri dni in se analizirajo v seriji, ker ta preiskava ne spada med urgentne in se lahko izvaja v podaljšanem postopku.

Zelo natančno določitev posameznih frakcij proteinov lahko dosežemo z izoelektričnim fokusiranjem. To je metoda, s katero se pod vplivom električnega toka razdvajajo proteini od katode proti anodi do pH gradienta, ki odgovarja njihovim izoelektričnim točkam, kjer se koncentrirajo v zelo ostre frakcije. S to tehniko dosežemo kvalitetno ločevanje proteinov, zato se uporablja pri določanju izoencimov in drugih specifičnih proteinov, naprimer apolipoproteinov (13). Zdravniki redkeje potrebujejo tako specifične informacije, zato se isoelektrično fokusiranje pogosteje uporablja v kliničnih študijah kot pri običajni klinični obravnavi bolnikov.

Zelo obetajoče rezultate nudi kapilarna elektroforeza. To je metoda, pri kateri je ločevanje proteinov izvedeno v zaprti, majhni cevki s premerom od 25 - 100 $\mu$ m. Kapilara je



namočena in napolnjena z raztopino pufru s pH vrednostjo 9,9 in priključena na UV detektor. Prednosti metode so avtomatizacija, majhen volumen vzorca, hitrost analize in možnost uporabe širokega spektra detektorjev (2,14,15). S kapilarno elektroforezo lahko nudimo uporabno diagnostično informacijo o prisotnih proteinih v serumu že v 10 do 20 minutah. Kapilarna elektroforeza je metoda izbora za hitro odkrivanje akutnih in kroničnih sprememb v koncentracijah posameznih frakcij serumskih proteinov, zato zamenjuje metodo navadne elektroforeze.

Poleg naštetih metod ločevanja serumskih proteinov poznamo tudi SDS poliakrilamidno elektroforezo. Zaradi vpliva električnega polja, nabiti delci, raztopljeni ali dispergirani v raztopini elektrolita, potujejo v smer, kjer je elektroda z nasprotnim nabojem. V gelu je gibanje delcev odvisno od molekulske mase proteinov. Nekateri proteini potujejo kljub različni molekulski masi enako, ker se SDS veže v masnem razmerju na aminokislino, proteini pa imajo pogosto prisotne tudi sladkorne ali lipidne komponente. Rutinsko se lahko uporablja kot denaturacijska ali pa kot redukcijska elektroforeza. Lahko jo uporabimo tudi za izolacijo posameznih proteinov za raziskovalne študije (2,16), za uporabo v klinično kemijskih laboratorijih pa ni najbolj primerna, ker je na izvedbeni ravni prezahtevna.

Elektroforeznih sistemov za ločevanje serumskih proteinov je več, bistvene razlike so predvsem v nosilcih (filter papir, acetatna celuloza, agarozni gel, poliakrilamidni gel, ...). Potovanje delcev na filter papirju ni enakomerno, pogosta je adsorpcija proteinov na nosilec, nizka hitrost potovanja proteinskih molekul in znatno podaljšan čas elektroforeze (tudi do ene ure). V laboratorijih se pogosto uporabljata agarozni in poliakrilamidni gel. Na agaroznem gelu se frakcije hitro in ostro ločijo, zato je uporaben tudi za imuno elektroforezo. Agarozni gel je primeren za ločevanje lipoproteinov, poliakrilamidni gel pa zaradi izjemnih ločitvenih lastnosti za hitro ločevanje serumskih proteinov.

Mi smo se odločili za elektroforezo na acetatni celulozi zaradi dostopnosti opreme v laboratoriju. Acetatna celuloza je porozen in homogen nosilec, adsorpcija proteinov na nosilcu pa majhna, zato se proteini hitro ločijo na posamezne frakcije. V laboratoriju Splošne bolnišnice Jesenice ima laboratorijsko osebje več izkušenj z elektroforezo na acetatni celulozi kot na agaroznem gelu. Postopek vlivanja in priprave agaroznih plošč je zamuden in zahteven, komercialno pripravljene agarozne plošče so drage, gel se pogosto posuši, takšen pa ni uporaben za elektroforezo. Ker je pogostnost naročanja proteinogramov

relativno nizka, je bolj ekonomičen izbor acetatne celuloze, ki je stabilnejša, njegova uporabnost pa ni povezana z zgoraj navedenimi problemi (18,19,20, 21).

#### 4.1. KONCENTRACIJE CELOKUPNIH BELJAKOVIN PRI ZDRAVIH OSEBAH IN BOLNIKI

Z Biuretno metodo smo določili povprečne koncentracije celokupnih beljakovin v serumskih vzorcih. Te so bile pri zdravih osebah gorenjske regije  $70,6 \pm 3,2$  g/l z razponom od 67,0 do 76,0 g/l in so znotraj referenčnih vrednosti (66-83g/l), ki smo jih povzeli po Thomasu (3). Pri bolnikih z akutnim vnetjem je bila povprečna vrednost celokupnih beljakovin  $67,8 \pm 9,7$  g/l v razponu od 45,0 do 83,0 g/l, pri bolnikih s cirozo  $64,7 \pm 7,6$  g/l v razponu od 52,0 do 83,0 g/l, pri bolnikih z nefrotskim sindromom  $58,8 \pm 5,5$  g/l v razponu od 40,2 do 64,0 g/l in pri bolnikih z monoklonsko gamopatijo  $100,9 \pm 20,6$  g/l v razponu 73,0 do 145,0 g/l. Koncentracije celokupnih beljakovin so se pri bolnikih s značilno razlikovale od zdravih ljudi, razponi pa so bili v precej širokem intervalu (preglednica III). Izvedli smo analizo z ANOVA statističnim testom ob uporabi LSD ocene odstopov od aritmetične sredine med pari posameznih skupin bolnikov. Pri bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo in nefrotskim sindromom so bile celokupne beljakovine nižje ( $p < 0,05$ ) kot pri skupini zdravih ljudi. Pri bolnikih z monoklonsko gamopatijo so bile značilno zvišane ( $p < 0,05$ ).

Preglednica III: Koncentracije celokupnih beljakovin pri zdravih ljudeh in pri bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo, nefrotskim sindromom in monoklonsko gamopatijo

Bolniki	Celokupne beljakovine ( $X \pm SD$ ) g/l	Min koncentracija g/l	Maks koncentracija g/l
Zdravi	$70,6 \pm 3,2$	67,0	76,0
Akutno vnetje	$67,8 \pm 9,7$ *	45,0	83,0
Ciroza	$64,7 \pm 7,6$ *	52,0	83,0
Nefrotski sindrom	$58,8 \pm 5,5$ *	40,2	64,0
Monoklonska gamopatija	$100,9 \pm 20,6$ *	73,0	145

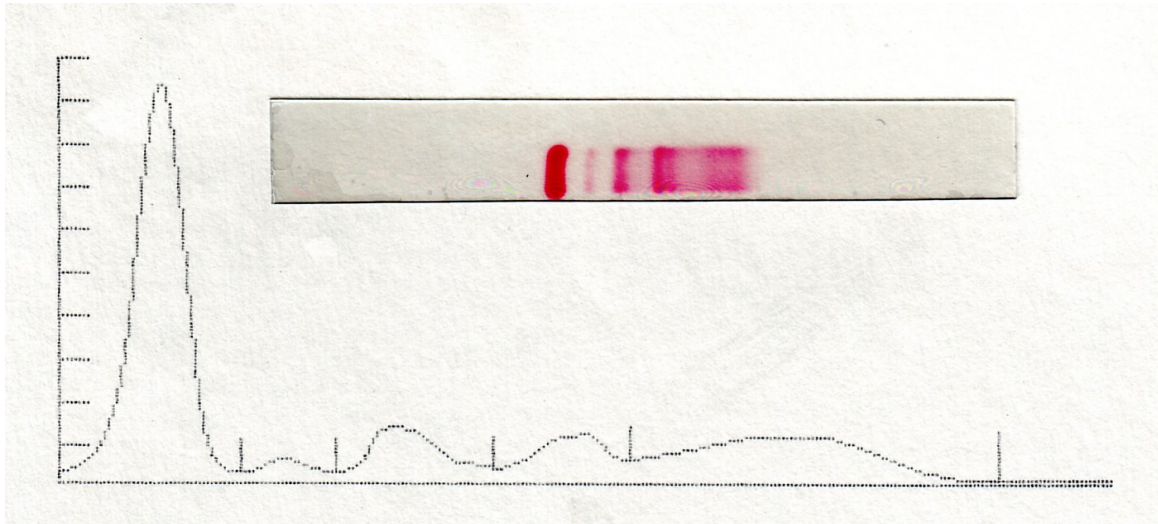
\* ANOVA, LSD;  $\alpha=0,05$

Skupine bolnikov z akutnim vnetjem, s cirozo in z nefrotskim sindromom imajo povprečne vrednosti celokupnih beljakovin značilno nižje od kontrolne skupine, medtem ko je pri bolnikih z monoklonsko gamopatijo koncentracija beljakovin zaradi tvorbe imunoglobulinov značilno višja. Primerjava celokupnih beljakovin in razponov med minimalnimi in maksimalnimi koncentracijami med posameznimi skupinami je pokazala, da se v najvišjem območju gibljejo koncentracije pri bolnikih z monoklonsko gamopatijo, vendar diagnoze monoklonske gamopatije ni mogoče postaviti s samo določitvijo celokupnih beljakovin. Diagnostično uporabnejšo informacijo nudi elektroforeza serumskih proteinov, ker je že iz organoleptične ocene elferograma razvidna prisotnost monoklonske frakcije v področju  $\gamma$ -globulinov. Primerjava je prikazana na sliki 4. Iz slike je razvidno, da se površina pod krivuljama značilno razlikuje med primeroma A in B. Z denzitometrijo lahko ocenimo, koliko g/l znaša vsebnost monoklonskega imunoglobulina. Schild C. (9) in sodelavci so izpostavili realnost določitve monoklonskega imunoglobulina na Capillarys sistemu s posebno vrsto integracijske metode, ki jo priporoča za diagnostično uporabo. Tudi mi smo izmerili koncentracijo monoklonskih globulinov z ločitvijo monoklonske frakcije z metodo, ki jo nudi denzitometer Cliniscan 2. Koncentracije monoklonskih proteinov so bile v območju od 10,0 do 45,0 g/l, z izjemo pri enem bolniku, ki je imel monoklonske proteine v koncentraciji 75,0 g/l. V primerjavi z opisano študijo (9) smo pri naši skupini bolnikov izmerili do dva krat višje koncentracije, ker je bila izbrana skupina bolnikov bolj patološka. Cilj Schildove študije je temeljil na primerjavi rezultatov dveh metod za kvantitativno oceno prisotnih monoklonskih imunoglobulinov iz elferograma, medtem ko smo se mi osredotočili samo na odkrivanje prisotnosti monoklonskih imunoglobulinov in njihovo kvantitativno oceno z denzitometriranjem.

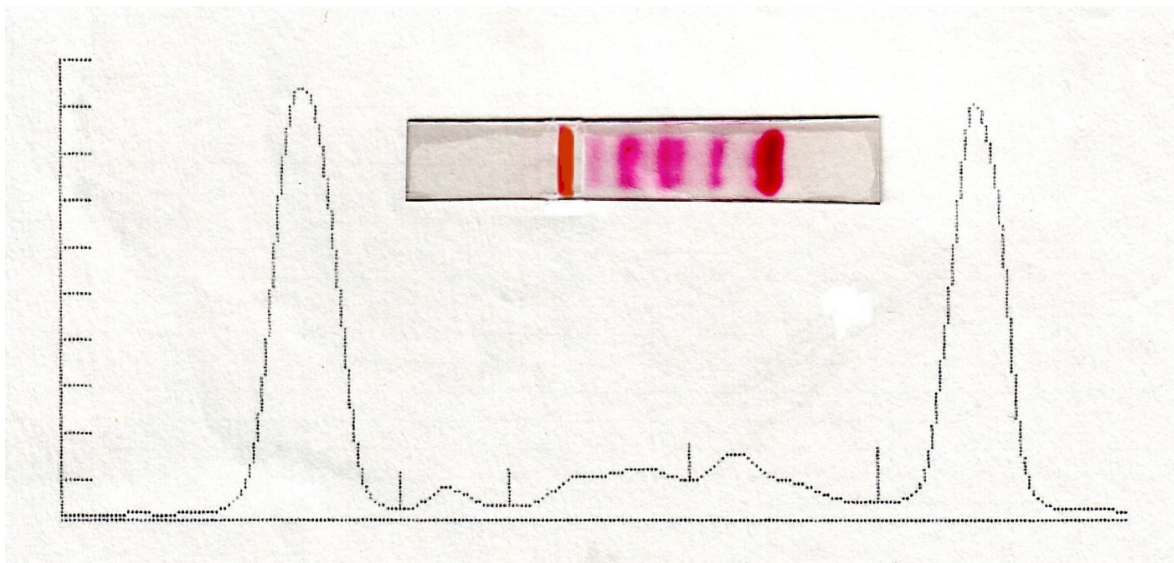
Spremembe proteinskih frakcij pri raznih boleznih korelirajo s klinično sliko bolnika. Spremembe so lahko absolutne ali pa relativne. Koncentracija celokupnih proteinov v serumu je lahko normalna, koncentracija posameznih proteinskih frakcij pa spremenjena. Najpogostejše so spremembe znižanja albuminov. Zmanjšana koncentracija celokupnih proteinov, ki jo imenujemo hipoproteinemija, se pojavlja pri prekomerni hidraciji, zmanjšani sintezi in absorpciji iz prebavnega trakta, povečani razgradnji (hipertireoza, diabetes millitus) in povečani izgubi proteinov pri diarejah, celiaciji, nefritisu in pri opeklinah. Vse proteinske frakcije so znižane pri pomanjkanju proteinov v hrani in pri malabsorpciji, pri tuberkuloznih in malignih boleznih (3,4,5,6). Pri naših skupinah

bolnikov so povprečne koncentracije celokupnih beljakovin nižje od spodnje referenčne meje (66 g/l) pri bolnikih s cirozo (64,7 g/l) in pri bolnikih z nefrotskim sindromom (58,8 g/l), medtem ko so pri bolnikih z monoklonsko gamopatijo (100,9 g/l) značilno višje od zgornje referenčne meje (83 g/l).

A)



B)



Slika 4: Primer denzitograma zdrave osebe (A) in bolnika z monoklonsko gamopatijo (B)

Slika 4 prikazuje primer denzitograma zdrave osebe (starost 51 let, vzorec 12, celokupne beljakovine 70g/l) in bolnika (53 let, vzorec 3, celokupne beljakovine 131g/l). Pri zdravi osebi so frakcije proteinov v normalnem referenčnem območju, pri bolniku so albumini znižani, monoklonska frakcija pa vidno izstopajoča, kar vidimo iz elferograma in denzitograma. Uporabljene referenčne vrednosti so prikazane v preglednici IV.

Preglednica IV: Referenčne vrednosti za celokupne beljakovine in posamezne frakcije proteinov.

	Celuloza acetat Helena Laboratories g/l	Celuloza acetat Thomas g/l	Kapilarna elektroforeza Sebia g/l
<b>Celokupne beljakovine</b>	66 – 83	66 – 83	66 – 83
<b>Albumini</b>	36,3 – 49,1	35,2 – 50,4	36,0 – 54,0
<b><math>\alpha</math>1- globulini</b>	1,1 – 3,5	1,3 – 3,9	2,3 – 4,0
<b><math>\alpha</math>2- globulini</b>	6,5 – 11,7	5,5 – 9,3	5,0 – 9,0
<b><math>\beta</math>- globulini</b>	7,4 – 12,6	5,9 – 11,4	5,0 – 11,0
<b><math>\gamma</math>- globulini</b>	5,8 – 17,4	5,8 – 15,2	7,0 – 14,0

Povečana koncentracija celokupnih proteinov, ki jo imenujemo hiperproteinemija, se pojavlja pri dehidraciji, paraproteinemiji in mielomu, včasih pa tudi pri kroničnih boleznih kot so ciroza jeter, sarkom, kronično vnetje, avtoimunske bolezni (revmatoidne bolezni, eritematozni lupus). Pri dehidraciji zaradi hemokoncentracije prihaja do enakomernega povečanja koncentracije vseh proteinov, pri paraproteinemiji pa do povečanja koncentracije celokupnih proteinov zaradi tvorbe paraproteinov. Pri kroničnih boleznih je povečanje celokupnih proteinov pogosto povezano z zvišano koncentracijo globulinov.

#### **4.2. KONCENTRACIJE ALBUMINOV PRI ZDRAVIH OSEBAH IN BOLNIKI**

Povprečne koncentracije albuminov pri zdravih osebah in pri skupinah bolnikov so podane v preglednici V. Koncentracije albuminov so bile značilno nižje pri bolnikih v primerjavi z zdravimi osebami ( $p < 0,001$ ), minimalna izmerjena koncentracija albuminov je bila odkrita pri bolnikih z nefrotskim sindromom (16,3 g/l) zaradi okvarjene ledvične funkcije

in posledičnega izločanja albuminov s sečem (slika 5). Bolniki s cirozo so imeli zelo znižane koncentracije albuminov ( $25,1 \pm 3,4$  g/l), pri bolnikih z akutnim vnetjem in monoklonsko gamopatijo pa so bile v razponu od 26,0 do 39,0 g/l, kar je tudi značilno nižje od normalne referenčne meje ( $40,0 \pm 3,0$  g/l).

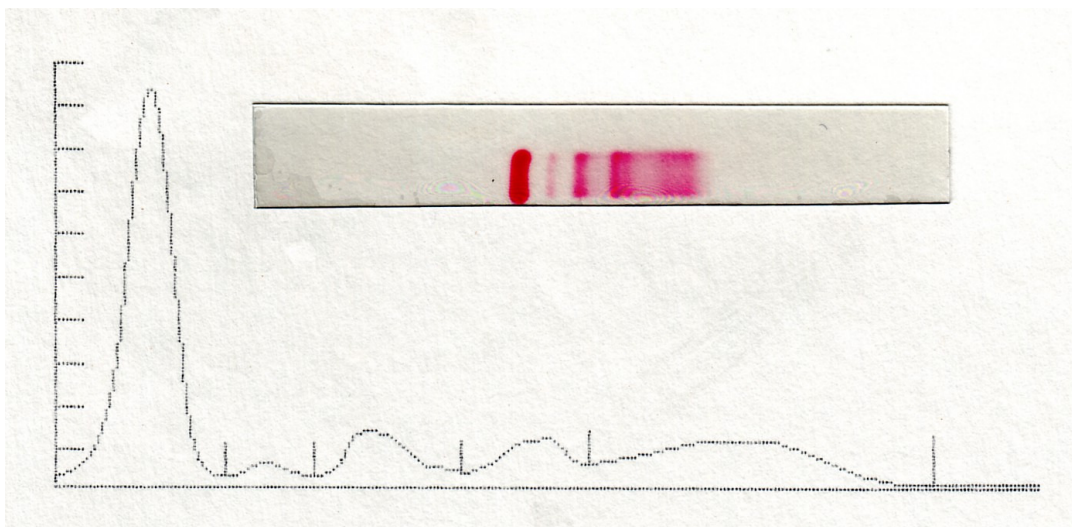
V študiji, ki jo je leta 2006 objavil Candiano G. s sodelavci (22), so v serumih 23 bolnikov z idiopatskim nefrotskim sindromom izmerili koncentracije albuminov od 12 do 22 g/l, v urinu teh bolnikov pa močno zvišane fragmente albuminov ter  $\alpha$ 1-antitripsina. Rezultati naše študije so podobni. Izmerili smo koncentracije albuminov od 16,3 do 33,1 g/l. Neposredna primerjava rezultatov med študijama ni možna, ker smo mi v študijo vključili bolnike z različnimi vrstami nefrotskega sindroma, v objavljeni študiji pa samo bolnike z idiopatskim nefrotskim sindromom.

Preglednica V: Koncentracije albuminov pri zdravih ljudeh in pri bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo, nefrotskim sindromom in monoklonsko gamopatijo

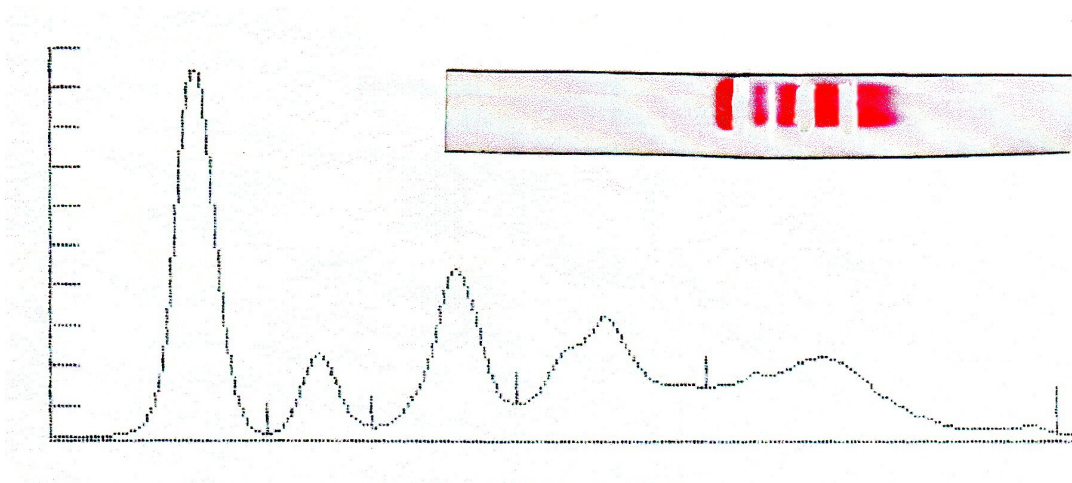
Bolniki	Albumini ( $X \pm SD$ ) g/l	Min. kncentracija g/l	Maks. kncentracija g/l
Zdravi	$40 \pm 3,0$	36,52	46,7
Akutno vnetje	$30,8 \pm 5,8^*$	26,0	34,0
Ciroza	$25,1 \pm 3,4^*$	20,35	31,89
Nefrotski sindrom	$26,4 \pm 4,3^*$	16,3	35,01
Monoklonska gamopatija	$27,7 \pm 3,5^*$	26,0	32,0

\*ANOVA, LSD;  $\alpha=0,05$

A)



B)



Slika 5: Primer denzitograma zdrave osebe (A) in bolnika z nefrotskim sindromom (B).

Slika 5 prikazuje denzitograma in elferograma zdrave osebe (starost 51 let, vzorec 12, albumini 40,0 g/l) in bolnika z nefrotskim sindromom (starost 70 let, vzorec 9, albumini 23,16 g/l). Opazili smo razlike med denzitogramoma. Zdrava oseba ima površino pod krivuljo za albumine večjo v primerjavi z bolnikom, ki ima prizadeto funkcijo ledvic.

### 4.3. KONCENTRACIJE $\alpha$ -GLOBULINOV PRI ZDRAVIH OSEBAH IN BOLNIKI

Med  $\alpha$ -globuline spadata dve frakciji serumskih proteinov,  $\alpha_1$  in  $\alpha_2$ -globulini. Rezultati naših določitev so v preglednici VI. Pri skupini zdravih oseb so povprečne koncentracije  $\alpha_1$  ( $2,31 \pm 0,46$  g/l) in  $\alpha_2$  ( $7,32 \pm 0,85$  g/l) v referenčnem območju. Pri bolnikih z akutnim vnetjem so  $\alpha_1$ -globulini ( $4,81 \pm 0,99$ )g/l značilno višji ( $p < 0,05$ ) kot pri zdravih osebah. Akutne vnetne procese spremlja zvišana tvorba proteinov akutne faze ( $\alpha_1$ -antitripsin,  $\alpha_1$ -kisli glikoprotein, orosomukoid). Ti bolniki imajo zvišano tudi  $\alpha_2$  frakcijo serumskih proteinov ( $11,0 \pm 1,14$  g/l), zaradi zvečanih koncentracij  $\alpha_2$ -makroglobulina in ceruloplazmina.  $\alpha_2$ -globulini so nad zgornjo referenčno mejo tudi pri bolnikih z nefrotskim sindromom ( $11,0 \pm 1,02$  g/l). Pri nefrotskem sindromu je povečana prepustnost glomerulov za albumine in nekatere nizkomolekulske proteine ( $\alpha_1$ -antitripsin, transferin, tiroksin, ceruloplazmin) in tudi imunoglobuline. Izguba transportnih proteinov ima za posledico tudi znižane koncentracije kalcija, železa, bakra, cinka, hormonov ščitnice in vitamina D. Jetra se na to stanje odzovejo tako, da tvorijo več proteinov ( $\alpha_2$ -makroglobulin), vendar tvorba ne pokrije celotne izgube proteinov (3).

Preglednica VI: Koncentraciji  $\alpha_1$  in  $\alpha_2$  globulinov pri zdravih ljudeh in pri bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo, nefrotskim sindromom in monoklonsko gamopatijo.

Bolniki	$\alpha_1$ -globulini ( $X \pm SD$ ) g/l	$\alpha_2$ -globulini ( $X \pm SD$ ) g/l	Min.konc. $\alpha_1$ g/l	Maks.konc. $\alpha_1$ g/l	Min.konc. $\alpha_2$ g/l	Maks.konc. $\alpha_2$ g/l
Zdravi	$2,31 \pm 0,46$	$7,32 \pm 0,85$	1,62	3,52	6,20	9,06
Akutno vnetje	$4,81 \pm 0,99^*$	$11,05 \pm 1,14^*$	4,04	9,13	9,41	13,06
Ciroza	$3,05 \pm 1,71$	$7,59 \pm 2,38$	0,92	9,13	3,85	11,6
Nefrotski sindrom	$3,12 \pm 0,85$	$11,0 \pm 1,02^*$	1,56	4,54	9,43	13,30
Monoklonska gamopatija	$2,91 \pm 0,88$	$6,44 \pm 2,05$	1,02	4,46	2,00	10,30

\* ANOVA, LSD;  $\alpha = 0,05$



#### 4.4. KONCENTRACIJE $\beta$ -GLOBULINOV PRI ZDRAVIH OSEBAH IN BOLNIKI

Rezultati koncentracije  $\beta$ -globulinov so podani v preglednici VII.  $\beta$ -globulini se pri naših skupinah zdravih oseb in bolnikov ne razlikujejo značilno ( $p = 0,093$ ). Pri zdravih osebah znašajo ( $8,82 \pm 1,29$  g/l), pri bolnikih s cirozo so večinoma znižani, pri naši skupini bolnikov s cirozo pa znašajo ( $6,44 \pm 2,07$  g/l), kar je na spodnji referenčni meji.

$\beta$ -globulini so zvišani pri zaprtju žolčnih vodov, nefrotskem sindromu, včasih tudi v nosečnosti. Porast  $\beta$ -globulinov odraža tudi porast  $\beta$ -lipoproteinov, ki predstavljajo glavni del te globulinske frakcije. V  $\beta$ -globulinih se nahaja okoli dvajset proteinov komplementa, ki nastajajo v jetrih. Njihova naloga je pospeševanje fagocitoze. Pri akutnem nefritisu in kroničnih boleznih jeter se znižuje koncentracija C3 komponente, pri ostalih akutnih vnetjih pa se zvišuje. Posamezne komponente komplementa določamo kvantitativno z imunokemijskimi metodami (3). Postopek navadne elektroforeze za odkrivanje abnormalnosti v področju  $\beta$ -globulinov nima večje diagnostične uporabnosti, ker se v tem področju giblje heterogena skupina proteinov.

Preglednica VII: Koncentraciji  $\beta$ -globulinov pri zdravih ljudeh in pri bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo, nefrotskim sindromom in monoklonsko gamopatijo

Bolniki	$\beta$ -globulinov ( $X \pm SD$ ) g/l	Min. koncentracija g/l	Maks. koncentracija g/l
Zdravi	$8,82 \pm 1,29$	6,88	11,80
Akutno vnetje	$9,09 \pm 2,19$	6,19	15,83
Ciroza	$6,44 \pm 2,07$	5,53	15,82
Nefrotski sindrom	$8,86 \pm 1,39$	6,83	13,11
Monoklonska gamopatija	$8,83 \pm 2,31$	5,00	15,82

ANOVA, LSD;  $\alpha=0,05$

#### 4.5. KONCENTRACIJE $\gamma$ -GLOBULINOV PRI ZDRAVIH OSEBAH IN BOLNIKI

Koncentracija  $\gamma$ -globulinov v vzorcih zdravih oseb je znašala  $11,62 \pm 1,78$  g/l (preglednica VIII). Značilno zvišani so pri bolnikih s cirozo  $20,05 \pm 4,67$  g/l in pri bolnikih z monoklonsko gamopatijo  $53,3 \pm 22,8$  g/l. Ciroza je posledica toksične poškodbe jetrnega

tkiva. Ob nekrozi so rahlo zvišane aktivnosti jetrnih encimov in tvorba imunoglobulinov (2,4). Pri monoklonski gamopatiji so globulini zvišani zaradi tvorbe abnormalnih imunoglobulinov, ki nastajajo v klonu plazmatk. Kloni transformiranih plazmatk lahko tvorijo imunoglobuline razredov A, D, E ali G, zato govorimo o plazmacitomu tipa A, D, E ali G. Plazmatka lahko tvori večinoma lahke verige lambda ali kapa, ki se zaradi majhne molekulske mase izločajo z urinom. V teh primerih govorimo o Bence-Jonesovem plazmacitomu. Razred abnormalnih imunoglobulinov, vrsto lahkih verig in njihove točne koncentracije lahko določimo z imunofiksacijsko elektroforezo in/ali nefelometrijo.

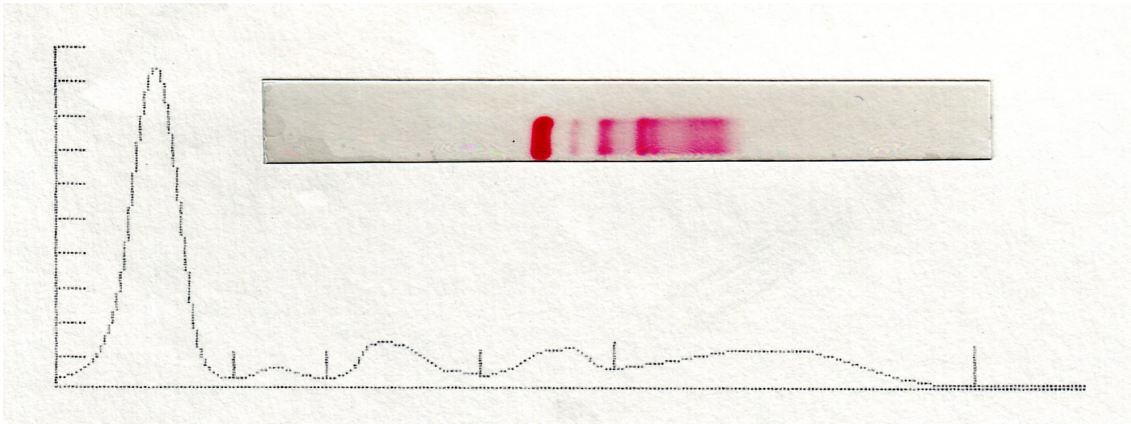
Bergon E. in sodelavci (7) so objavili študijo, v kateri navajajo, da so razlike v določenih koncentracijah med metodo navadne elektroforeze in nefelometrično metodo do 25% za koncentracije monoklonskih proteinov pa do 20 g/l. Rezultati navadne elektroforeze so bili za 23,7% višji od rezultatov dobljenih z imunofiksacijo, razlike pa so bile odkrite tudi znotraj posameznih razredov monoklonskih imunoglobulinov. V laboratoriju se srečujemo tudi s primeri, ko so koncentracije monoklonskih imunoglobulinov nizke (pod 5 g/l) in jih z navadno elektroforezo ne moremo odkriti, z imunofiksacijo in nefelometrijo pa jih lahko določimo. Sklepamo, da so koncentracije monoklonskih imunoglobulinov tudi pri naših bolnikih precenjene. Rezultatov imunofiksacije nimamo, da bi lahko podali razliko v odstopanju, v vsakem primeru pa je pri interpretaciji rezultatov potrebno upoštevati izsledke Bergonove študije. Strokovnjak laboratorijske medicine mora pri detekciji monoklonskega imunoglobulina ob rezultatih dodati komentar, ki zdravniku pomaga pri interpretaciji elferograma in nadaljnjem izboru preiskav.

Preglednica VIII: Koncentracije  $\gamma$ -globulinov pri zdravih ljudeh in pri bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo, nefrotskim sindromom in monoklonsko gamopatijo

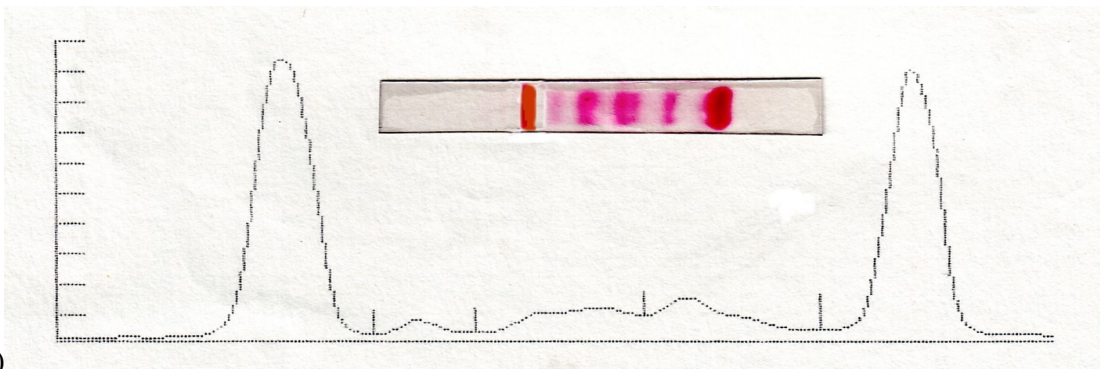
Bolniki	$\gamma$ -globulinov ( $X \pm SD$ ) g/l	Min. koncentracija g/l	Maks. koncentracija g/l
Zdravi	11,62 $\pm$ 1,78	8,55	14,40
Akutno vnetje	13,11 $\pm$ 5,88	4,00	28,66
Ciroza	20,05 $\pm$ 4,67*	15,47	33,24
Nefrotski sindrom	9,53 $\pm$ 2,46	4,00	14,95
Monoklonska gamopatija	53,3 $\pm$ 22,8*	28,66	102,74

\* ANOVA, LSD;  $\alpha=0,05$

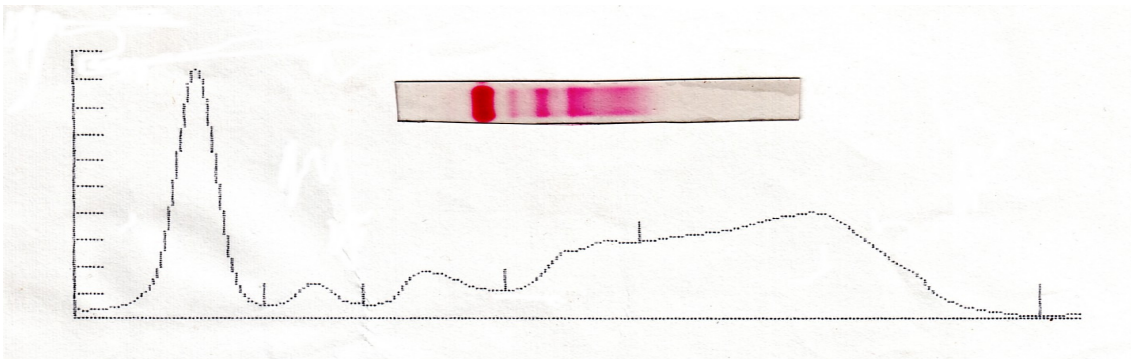
A)



B)



C)



Slika 6: Primer denzitogramov zdrave osebe (A), bolnika z monoklonsko gamopatijo (B) in bolnika s cirozo (C).

Slika 6 prikazuje denzitograme in elferograme zdrave osebe (starost 51 let, vzorec 12,  $\gamma$ -globulini 13,06g/l), bolnika s plazmocitomom (starost 66 let, vzorec 17,  $\gamma$ -globulini 39,0g/l, monoklonski zobec 26,6 g/l) in bolnika s cirozo (starost 53 let, vzorec 16,  $\beta$ -globulini 12,46 in  $\gamma$ -globulini 16,36 g/l). Elferogrami in denzitogrami zdrave osebe in bolnikov se razlikujejo. Pri bolniku z monoklonsko gamopatijo je izrazit monoklonski zobec, pri bolniku s cirozo pa značilni beta ( $\beta$ )-gama ( $\gamma$ ) most.

#### **4.7. INTERPRETACIJA REZULTATOV ELEKTOROREZNE LOČBE SERUMSKIH PROTEINOV**

Elektroforeza serumskih proteinov je polkvalitativna metoda ločevanja le teh na posamezne frakcije. Abnormalnosti pri vzorcih je mogoče dokazovati le, če je postopek elektroforeze izveden po priporočilih proizvajalcev in splošnih standardov. Na izvedbeni ravni je potrebno pri interpretaciji rezultatov elektroforezne ločbe na acetatni celulozi upoštevati sledeča pravila (2,4,17):

1. Pred pripravo pufrne raztopine (pH = 8,6) je potrebno kontrolirati (izmeriti) pH demineralizirane vode. Če pH vode odstopa za več kot 0,2 pH enot od 7,00, voda ni primerna za pripravo pufrne raztopine za elektroforezo serumskih proteinov.
2. Plošče z acetatno celulozo hranimo na temperaturi, ki ni višja od 20°C. Kadar ima gel višjo temperaturo, je potovanje proteinskih molekul krajše, če je gel hladen, pa daljše.
3. Temperatura prostora, v katerem izvajamo elektroforezo, ne sme biti višja od 24°C.
4. Pufrno raztopino za elektroforezo moramo hraniti v hladilniku na 2 - 8°C.
5. Enkrat mesečno izvajamo kontrolo barvila na prisotnost precipitata.
6. Hemoliziranih vzorcev ne analiziramo.
7. Ob možni prisotnosti fibrinogena (plazma, antikoagulantna terapija, neadekvatno centrifugiran vzorec), rezultati serumske elektroforeze niso zanesljivi.
8. Za elektroforezo beljakovin je primeren vzorec samo serum.
9. Spremembo koncentracije ostalih  $\alpha$ 1-globulinov razen  $\alpha$ 2-makroglobulinov detektiramo z elektroforezo, točno pa lahko opredelimo zvišane koncentracije posameznih globulinov samo s specifičnimi imunokemijskimi metodami.

Strokovnjak laboratorijske medicine, ki se ukvarja z elektroforezo serumskih proteinov, lahko k rezultatom proteinograma pripiše komentarje, ki zdravniku pomagajo pri interpretaciji proteinograma. Komentarji morajo vsebovati sporočilo, ki ni diagnostično zavezujoče, temveč predstavlja pravilno usmeritev za izbor nadaljnjega testiranja. Pod vsako frakcijo se namreč lahko prikrito nahaja tudi monoklonski imunoglobulin v nizki koncentraciji, ki ni nič manj patološki od večjih in lažje opaznih monoklonskih zobcev. Iz gradiva za delavnico 5. Sebia dnevi (11) smo povzeli seznam komentarjev najbolj pogostih patoloških slik elektroforeze beljakovin seruma:

1. **Prisoten monoklonski zobec:** priporočamo določitev monoklonskih imunoglobulinov v serumu in urinu.
2. **Možna prisotnost monoklonskega zobca:** priporočamo določitev monoklonskih imunoglobulinov v serumu in urinu.
3. **Nesimetrična porazdelitev podvrst  $\gamma$ -globulinov** lahko ustreza prisotnosti imunskih kompleksov.
4. **Hipogamaglobulinemija ali bolezen lahkih verig:** priporočamo določitev monoklonskih imunoglobulinov v serumu in urinu.
5. **Poliklonska hipergamaglobulinemija:** slika ustreza kroničnemu vnetju ali infekciji.
6. **Beta ( $\beta$ )-gama ( $\gamma$ ) most:** slika ustreza cirozi jeter.
7. **Spremenjene oblike  $\alpha$ -1 frakcije:** priporočamo določitev fenotipizacije  $\alpha$ -1 antitripsina pri preiskovancu in drugih najožjih članih družine.
8. **Dve frakciji albumina:** stanje imenujemo bisalbuminemija.

V naši študiji smo komentarje št.1 in 2 uporabili pri 18 bolnikih s prisotno monoklonsko frakcijo. V naši študiji ni bilo primerov za katere bi lahko uporabili komentarje 3, 5, 7 in 8.

## 5. ZAKLJUČEK

Izvedli smo elektroforezno ločbo proteinov v serumu 30 zdravih oseb in 103 bolnikov. Pri vseh smo določili celokupne beljakovine z Biuretno metodo. Za ločbo proteinov v serumskih vzorcih smo uporabili postopek navadne elektroforeze na acetatni celulozi. Naši rezultati so pokazali, da so imele zdrave osebe gorenjske regije koncentracije celokupnih beljakovin znotraj referenčnih vrednosti (66 – 83 g/l), ki smo jih povzeli po Thomasu. ANOVA test LSD test na stopnji tveganja  $\alpha < 0,05$  je pokazal, da so se koncentracije celokupnih beljakovin pri zdravih osebah značilno razlikovale od tistih, ki smo jih izmerili v serumih bolnikov. Bolniki z akutnim vnetjem, cirozo in nefrotskim sindromom so imeli celokupne beljakovine značilno nižje od zdravih oseb medtem ko so imeli bolniki z monoklonsko gamopatijo značilno višje. Koncentracije albuminov so bile pri bolnikih nižje v primerjavi z zdravimi osebami.  $\alpha 1$ -globuline so imeli zvišane samo bolniki z akutnim vnetjem,  $\alpha 2$ -globuline pa bolniki z nefrotskim sindromom in akutnim vnetjem. V  $\beta$ -globulinski frakciji so proteini hemopeksin, transferin, komponente komplekta in  $\beta$ -lipoproteini, ki niso zastopani v tako visokih koncentracijah, da bi jih z metodo elektroforeze lahko zaznali kot patološke. Tako je bila tudi pri skupinah naših bolnikov koncentracija te frakcije znotraj referenčnega območja.  $\gamma$ -globulini so bili zvišani pri bolnikih s cirozo, najvišje koncentracije pa smo izmerili pri bolnikih z monoklonsko gamopatijo. Rezultati kažejo na to, da je postopek elektroforeze na acetatni celulozi diagnostično zelo uporaben za oceno prisotnosti patoloških frakcij pri bolnikih z akutnim vnetjem, cirozo, nefrotskim sindromom in monoklonsko gamopatijo. Strokovnjak laboratorijske medicine z izkušnjami lahko ob oceni elferogramov in denzitogramov posreduje zdravniku diagnostično uporabne informacije. Te informacije poda v obliki komentarjev k rezultatom proteinogramov. Komentarji so nesporni takrat, ko je na elferogramu viden beta ( $\beta$ )-gama ( $\gamma$ ) most, monoklonski zobec, znižani albumini in/ali opažene abnormalnosti v drugih frakcijah serumskih proteinov.

Naši rezultati kažejo, da smo v sklopu diplomske naloge v celoti dosegli zastavljene cilje študije. Prepričani smo, da je elektroforezna ločba serumskih proteinov na acetatni celulozi metoda izbora za klinično kemijske laboratorije v zdravstvenih ustanovah, ki izvajajo urgentno obravnavo bolnikov. Metoda je poceni, na izvedbeni ravni nezahtevna, rezultati pa so diagnostično uporabni tudi za primere, ko je za nadaljno diagnostiko potreben izbor ustrezne imunspecifične metode.

## 6. LITERATURA

1. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 70-91
2. Burtis CA, Ashwood E: Tietz text book of clinical chemistry, second edition, WB Saunders company, United States of America, 1994: 191-204, 671-730.
3. Thomas L : Clinical Laboratory Diagnostic, first Edition, TH -Books Verlagsgesellschaft mbH/Frankfurt/Main, Germany,1998:662-685
4. Štraus B: Medicinska biokemija, druga obnovljena i dopunjeno izdanje, medicinska naklada Biblioteka udžbenici i priručnici sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1992: 250-294, 904-907.
5. Andoljšek D, Bolezni krvi in krvotvornih organov. V: Kocjančič A, Mrevlje F, Interna medicina. DZS Ljubljana, 1998: 999-1003.
6. Rasouli M, Okhovatian A, Enderami A: Serum proteins profile as an incidator of malignancy: multivariate logistic regression and ROC analyses. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43(9):913-918.
7. Bergon E, Miravalles E: Estimation of serum M-protein concentration from polyclonal immunoglobulins: an alternative to serum protein electrophoresis and standard immunochemical procedures. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(8).
8. Larsson A, Hansson L-O: Analysis of inflammatory response in human plasma samples by an automated multicapillary electrophoresis system. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(12):1396-1400.
9. Schild C, Wermuth B, Trapp-Chiappni D, Egger F, Nuoffer J-M: Reliability of M protein quantification: comparison of two peak integration methods on Capillarys. *Clin Chem Lab Med* 2008;46(6):876-877.
10. Kaplan B, Ramirez-Alvarado M, Dispenzieri A, Zeldenrust S, Leung N, Livneh A, Gallo G: Isolation and biochemical characterization of plasma monoclonal free light chains in amyloidosis and multiple myeloma: a pilot study. *Clin Chem Lab Med*; 2008;46(3):335-341.
11. Flisar Ž, Melkič E: Gradivo za delavnico, 5. Sebia dnevi, Maribor, 29.06.2007.
12. Terčič D, Božič B: The basis of the synovial fluid analysis. *Clin Chem Lab Med*; 2001; 20:39(12): 1221-1226.

13. Noll B, Halckler R, Pelzer M, Pelzer S, Nusser P, Maisch, Schaefer JR, Steinmetz A: Semi-Avtomated Rapid Isoelectric Focusing of Apopoliproteins C from Human Plasma Using PhastSystem and Immunofixation, *Clin Chem Lab Med*; Volume 37, Issue 6,1999: 643-648.
14. Bossuyt X, Lissoir B, Mariën G, Maisin D, Vunckx J, Blanckaert N, et al: Avtomated serum protein elektrophoresis by Capillarys. *Clin Chem Lab Med*;2003; 41: 704-710.
15. Gay-Bellie C, Bengoufa D, Houze P, Le Carrer D, Benlakehal M, Bousquet B, Gourmel B, Le Bricon T: Automated Multicapillary Electrophoresis for Analysis of human Serum proteins, *Clinical Chemistry*, 2003;49:1909-1915.
16. Le Bricon T, Erlich D, Bengoufa D, Dussaucy M, Garnier JP, Bousquet B: Sodium dodecyl sulfate-agarose gel electroforesis of urinary proteins:application tom multiple immunosubstraction. *Am J Clin Pathol* 1998;110:503-509
17. Jay DW, Provasek D: Characterization and mathematical correction of hemolysis interference in selected Hitachi 717Assay.*Clin Chem* 1993;39:1804-1810.
18. Liang FT, Granstrom DE, Timoney JF, Shi YF: Micropreparative high resolution puriffcation by a combination of sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectrofocusing and membrane blotting. *Anal Biochem* 1997;250:61-5.
19. Rosenfeld L: Origins of protein electrophoresis in paper (Letter). *Clin Chem* 1981;27:1948-9.
20. Harrison HH, Miller KL, Abu-Alfa A, Podlasek SJ: Immunoglobulin clonality analysis.Resolution of ambiguities in immunofixation electrophoresis. Results by high resolution, two-dimensional electrophoretic analysis of paraprotein bands eluted from agarose gels: *Am J Clin Pathol* 1993;100:550-60.
21. Riches PG, Kohn J: Improved resolution of cellulose acetate membrane electrophoresis. *Ann Clin Biochem* 1987; 24:77-9.
22. Candiano G, Musante L, Bruschi M, Ptreto A, Santucci L: Repetitive fragmentation produvts of albumine in glomerular diseases associated with nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3139-48.