Клинический электрофорез белков - современные аспекты клинической диагностики

С.Л. Арсенин
Генеральный директор
ООО «Хелена РУС»

Санкт-Петербург 16 марта 2017 г.

Применение в клинической практике

ЭФ белков сыворотки (5/6 фракций, 15 фракций)	Изменение сдвигов метаболизма (печень, почки, костный мозг, нутритивный статус)
Иммунофиксация сыворотки и/или мочи	Выявление парапротеина в сыворотке и моче, оценка клональности иммуноглобулинов
ЭФ фракций ЛДГ, КФК, ЩФ	Биомаркеры органного поражения
ИЭФ цереброспинальной жидкости	Диагностика рассеянного склероза
ЭФ липопротеинов и фракций холестерина	Типирование гиперлипидемий
ЭФ и ИЭФ гемоглобина	Талассемии и гемоглобинопатии
ИЭФ трансферрина	Оценка злоупотребления алкоголем

Клинический электрофорез

Анализ белковых фракций сыворотки крови – наиболее распространенное и востребованное исследование в клинической диагностике.

Какие показания для проведения электрофореза белков сыворотки в крови?

- Скрининговый тест до назначения биохимического анализа (в ряде западноевропейских стран – Италия, Франция и др.)
- Выполняется после биохимического анализа общеклинического анализа крови. Основные критерии для назначения:

  - Снижение концентрации общего белка в сыворотке крови < 60 г/л

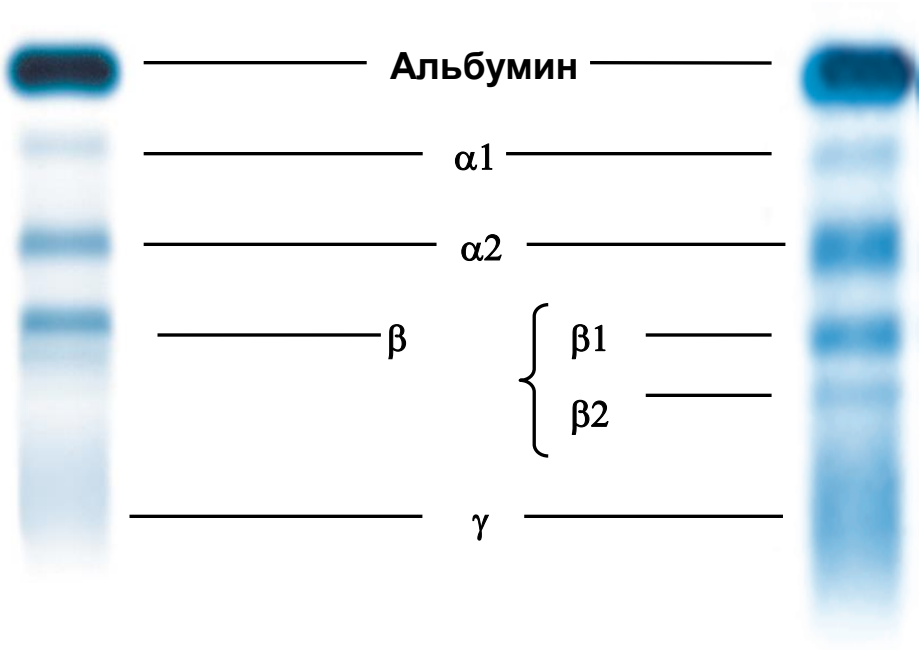
  - Увеличение концентрации общего белка в сыворотке крови > 85 г/л

  - Снижение концентрации альбумина в сыворотке крови < 35 г/л

  - Увеличение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) неясного генеза > 25 мм/ч

Исследование белковых фракций

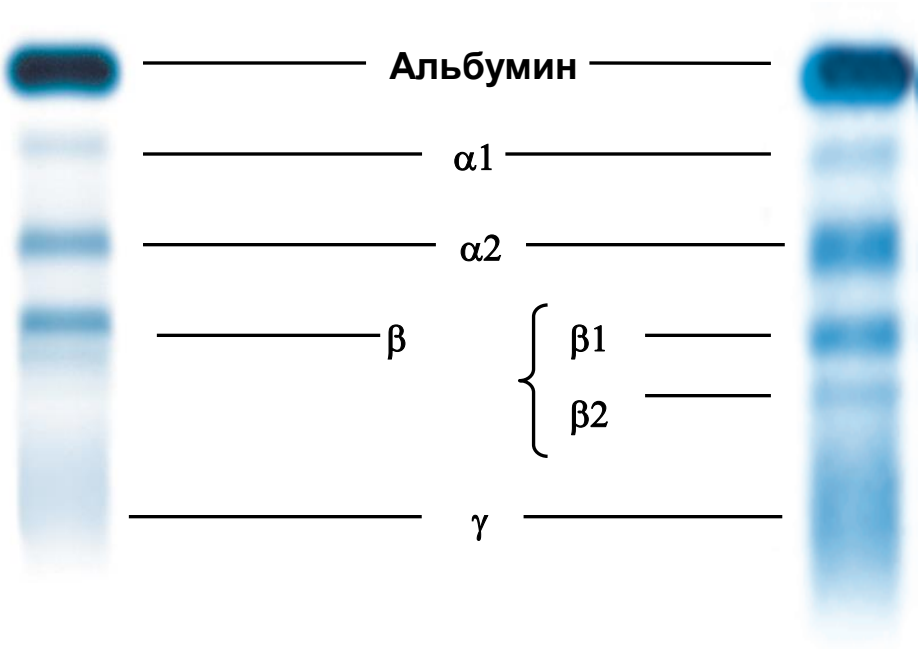
- Белки сыворотки разделяются на 5 или 6 фракций.



Исследование белковых фракций

• Разделение на 6 фракций
(с выделением зоны С3 компонента комплемента во фракцию β2):

улучшает разрешение бета-зоны => выше шанс увидеть М-градиент



Исследование белковых фракций

Фракция	Доминантные белки	Минорные белки
Альбуминовая	альбумин	преальбумин
Альфа-1-глобулины	α1-липопротеин(ЛПВП) α1-антитрипсин	α1-антихимотрипсин орозомукоид
Альфа-2-глобулины	α2-макроглобулин гаптоглобин церулоплазмин Gc-глобулин	гемопексин антитромбин III ингибитор С1-эстеразы СРБ
Бета-глобулины	трансферрин С3-комплемент β-липопротеин (ЛПНП)	С4-комплемент β2-микроглобулин
Гамма-глобулины	IgG IgA IgM	IgD IgE легкие цепи Ig лизоцим

Транспортные белки, ферменты, иммунный ответ, острофазный ответ…

Исследование белковых фракций

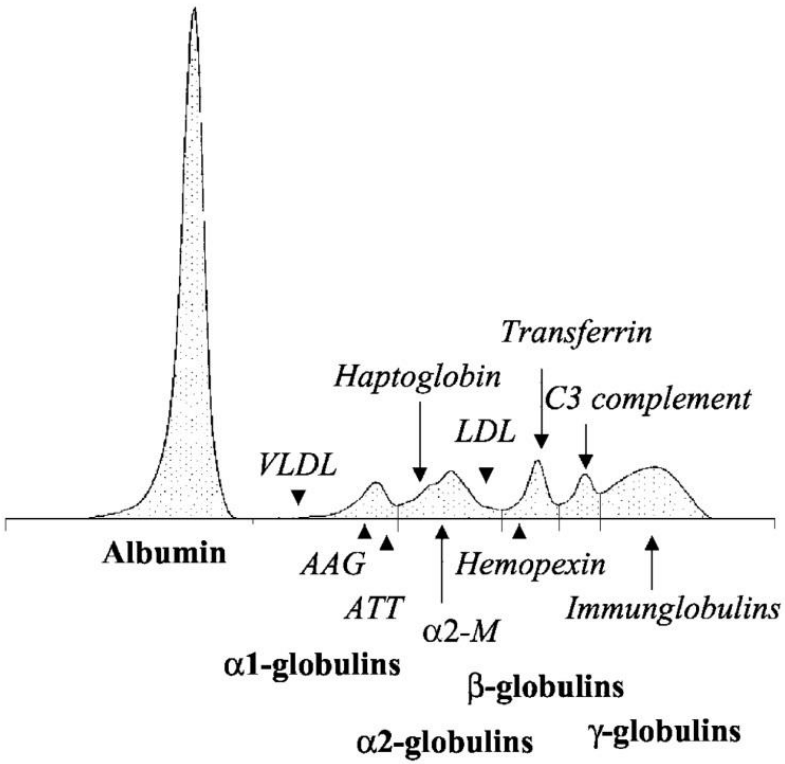
Нормальные значения фракций

Albumin	64.3%	± 5.0
Alpha 1 glob.	2.5%	± 0.8
Alpha 2 glob.	9.8%	± 2.0
Beta glob.	11.3%	± 2.8
Beta 1 glob.	7.7%	± 1.5
Beta 2 glob.	3.6%	± 2..0
Gamma glob.	12.1 %	± 2.5

• На характер электрофореграмм сыворотки крови может влиять целый ряд процессов:

недоедание, потеря белка,
нарушение синтеза белков печенью,
воспалительные процессы, иммунный ответ

Электрофорез белков сыворотки



Острое воспаление:

Повышение: альфа 1 антитрипсин, альфа 1 гликопротеин, гаптоглобин (альфа 2), СРБ (гамма), фибриноген

Снижение: альбумин, трансферрин (бета1)

Подострое воспаление:

Повышение: С3 (бета 2), гаптоглобин (альфа 2), IgM, фибриноген

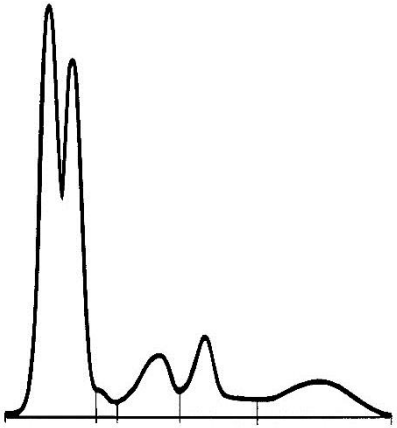
Снижение: альбумин

Хроническое воспаление:

Повышение: С3, гаптоглобин (альфа 2), IgG, IgM, IgA, фибриноген

Исследование белковых фракций

Изменения фракции альбумина



• Бисальбуминемия

проявляется дополнительной полосой ближе к катоду или переходная полоса или мутное пятно, опережающее нормальный альбумин

Наследственная мутация (врожденная)

- *Клинически не проявляется*

•Приобретенная (транзиторная)

- при приеме *беталактамных антибиотиков – причина высокие дозы у больных с почечной недостаточностью – дополнительная полоса – комплекс ЛП-Альбумин*

- при наличии панкреатической фистулы с гиперферментемией - *внутрисосудистый лизис альбумина. Это указывает на возможное наличие фистулированной ложной панкреатической кисты, что является показанием для хирургического вмешательства.*

Изменения фракции альбумина

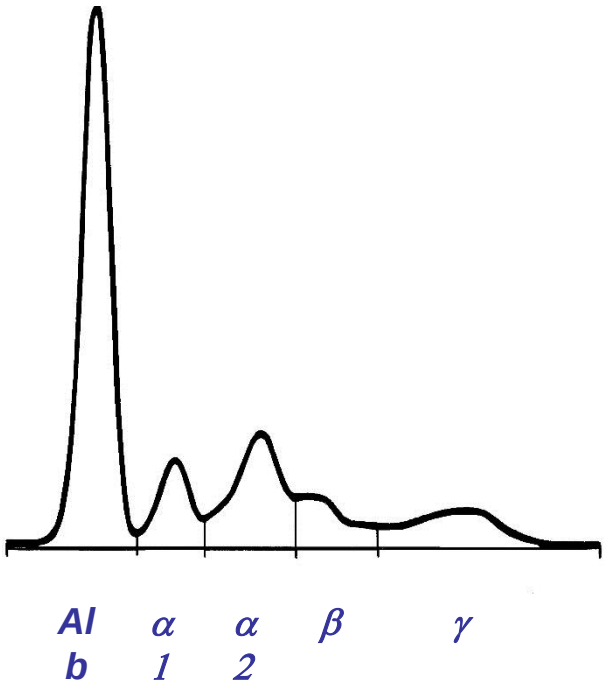
- Гипоальбуминемия:

Дефицит питания, снижение функции печени, органные нарушения (почек, желудка, кожи), повышенный катаболизм, воспаление

- Гиперальбуминемия:

Как правило вследствие гемоконцентрации или при в/в введении альбумина

Изменение фракции Альфа-1



Уменьшение

- Врожденный дефицит альфа-1-антитрипсина (ассоциируется с печеночной патологией у детей и заболеванием легких у взрослых)
-При массивных потерях белка, также снижается альбумин, альфа-2 и бета зона

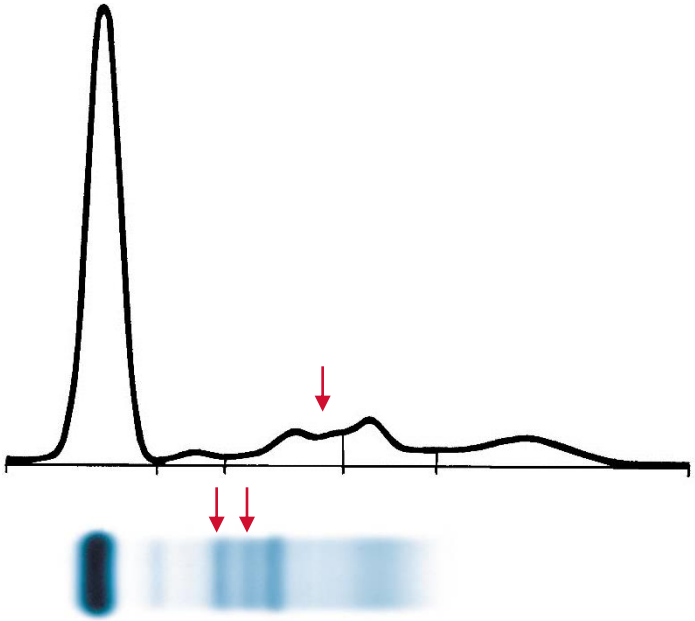
Увеличение

При острых воспалительных заболеваниях, сопровождается увеличением альфа-2 (зона «острофазных белков»)

Увеличение. Острое воспаление

Изменение фракции Альфа-2

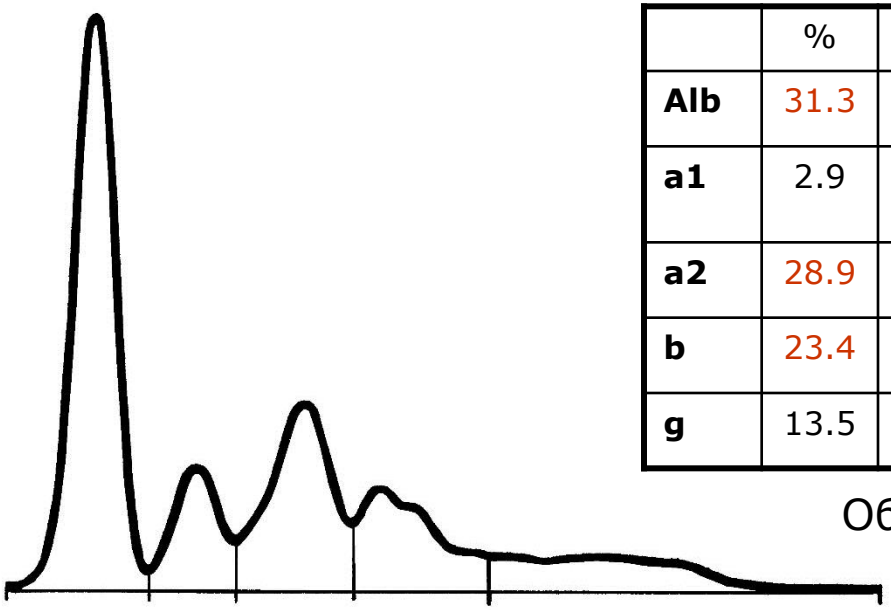
Двойная полоса
-вероятность гемолиза
-Наличие фенотипического варианта гаптоглобина
-Наличие моноклонального компонента
-Наличие бета-липопротеина с аномальной э/ф подвижностью



Двойная полоса

Уменьшение
Гепатоцеллюлярная недостаточность, потеря белка
Увеличение
- При воспалительном синдроме вследствии увеличения содержания гаптоглобина
- Нефротический синдром

Увеличение фракции Альфа-2: Нефротический синдром



	%	g/L	NV %	NV g/L
Alb	31.3	13.1	60-71	42-50
a1	2.9	1.2	1.4-2.9	1-2
a2	28.9	12.1	7-11	5-8
b	23.4	9.8	8-13	6-9
g	13.5	5.6	9-16	6-11

Общий Белок = 42 g/l

Изменение фракции Бета

Уменьшение

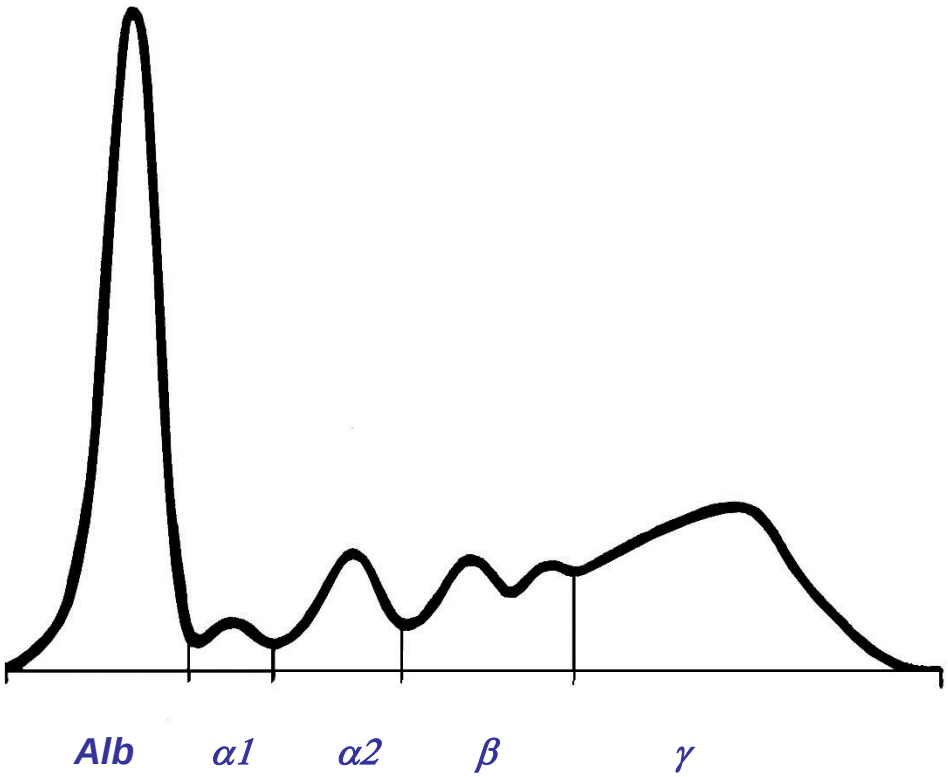
-потеря белка вследствие снижения трансферрина (локализован в бета-1 зоне)
-потребление С-3 (локализован в бета-2 зоне), ошибка вследствие использования не свежей сыворотки

Увеличение

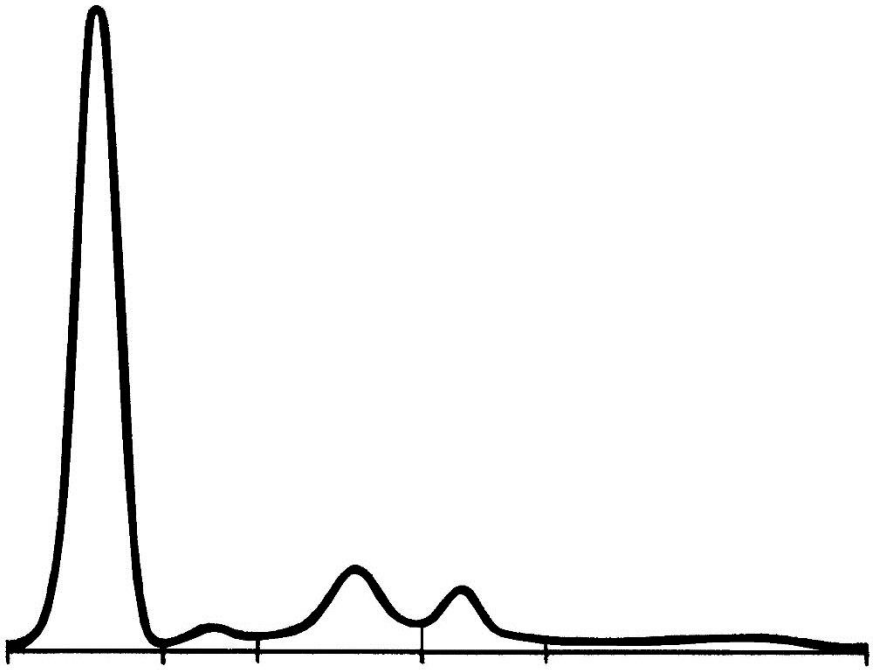
-Обусловлено наличием моноклональных белков (чаще IgA, свободные легкие цепи)

Не связано с моноклональным компонентом:
-Гипертрансферринемия – при железодефицитной анемии (увеличивается бета-1)
-Обструкция желчно выводящих путей – снижение катаболизма С-3 (увеличивается бета-2 зона)
-Тотальное усиление интенсивности бета-зоны, слияние бета и гамма зоны – алкогольный цирроз

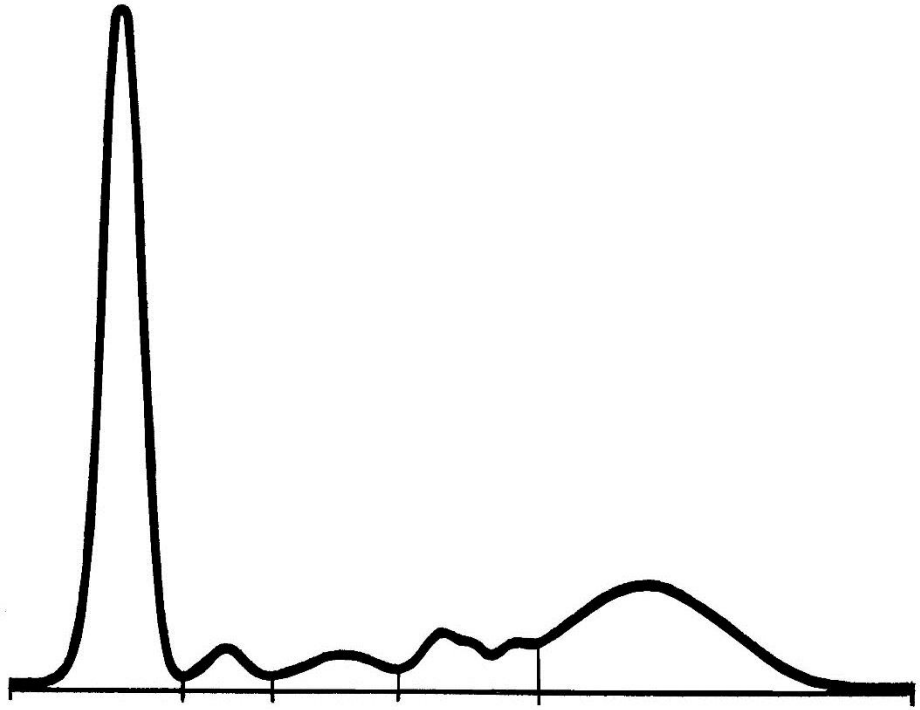
Увеличение фракции Бета:
Бета-гамма блок при алкогольном циррозе



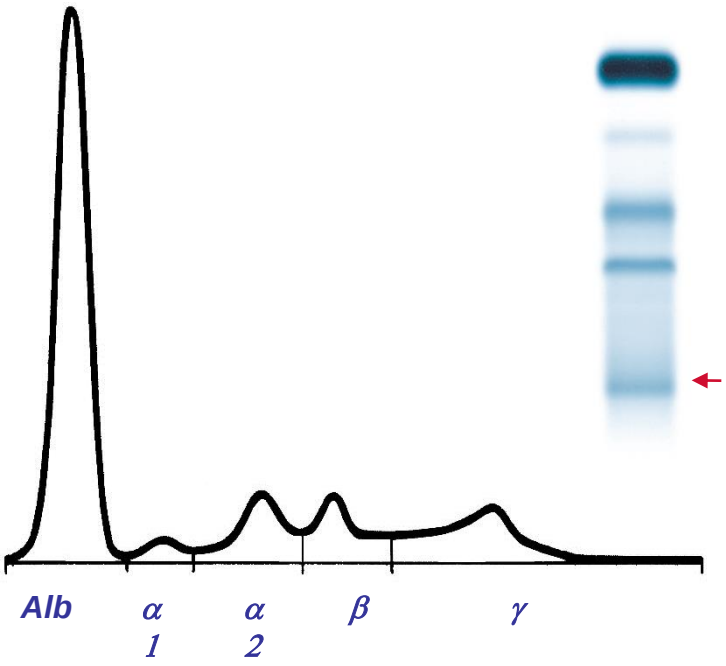
Изменения фракции Гамма: Гипогаммаглобулинемия



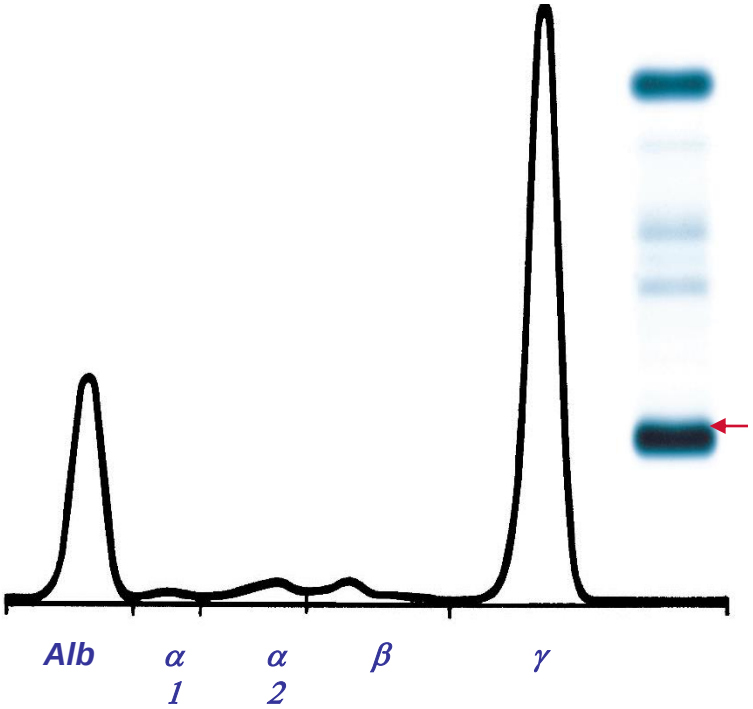
Изменения фракции Гамма: Гипергаммаглобулинемия



Изменения фракции Гамма: Моноклональная гаммапатия

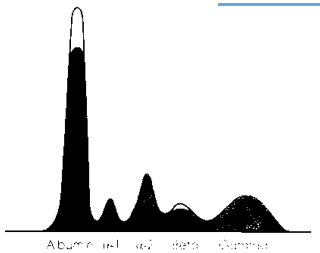


Слабо выраженный М-градиент

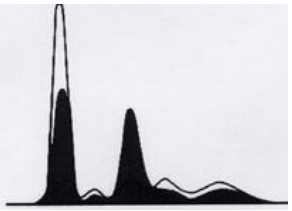


Выраженный М-градиент

Характерные паттерны при ЭФ белков сыворотки



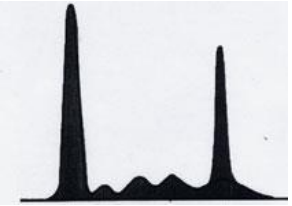
Системный воспалительный острофазовый ответ приводит увеличению альфа 1 и альфа 2-фракции, при одновременном снижении уровня альбумина
Характерен для острых инфекционных заболеваний и используется в дифференциальной диагностике воспалительных состояний.



Снижение содержания фракции альбумина. Возможно при:
-Снижении белковосинтетической функции печени и голодании
-потере белка с мочой при нефропатиях
-повышенном катаболизме при эндокринных заболеваниях

Возрастание фракции γ-глобулинов является признаком поликлональной гаммопатии и возникает при ряде заболеваний: хроническая патология печени, системные заболевания соединительной ткани, хронические инфекции, метастатистическая карцинома, ожоговая болезнь.

Снижение содержания фракции γ-глобулинов (гипогаммаглобулинемия и агаммаглобулинемия) может говорить о первичном или вторичном иммунодеффиците, а также возможно при амилоидозе и болезни легких цепей.



Резкое возрастание отдельной составляющей фракции γ-глобулинов происходит при моноклональной гаммапатии и является поводом для углубленного обследования пациентов в отношении гематоонкологических заболеваний. Мониторинг содержания парапротеина позволяет оценить эффективность терапии.

Изоэлектрофокусирование

- Разновидность ЭФ, при котором вещества разделяются в зависимости ее изоэлектрической точки
- Разделение происходит благодаря присутствию в геле веществ – амфолитов, имеющих в своем составе разное количество отрицательно и положительно заряженных групп
- Под действием электрического тока амфолиты распределяются в геле, образуя «градиент pH» - т.е. непрерывную буферную среду с различными значениями кислотности (например от 3 до 10,5 единиц pH)
- Белки мигрируют в ней до своей изоэлектрической точки, в которой общий заряд молекулы становится нейтральным
- Белки накапливаются в этих зонах, образуя тонкие полосы - «фокусируются»

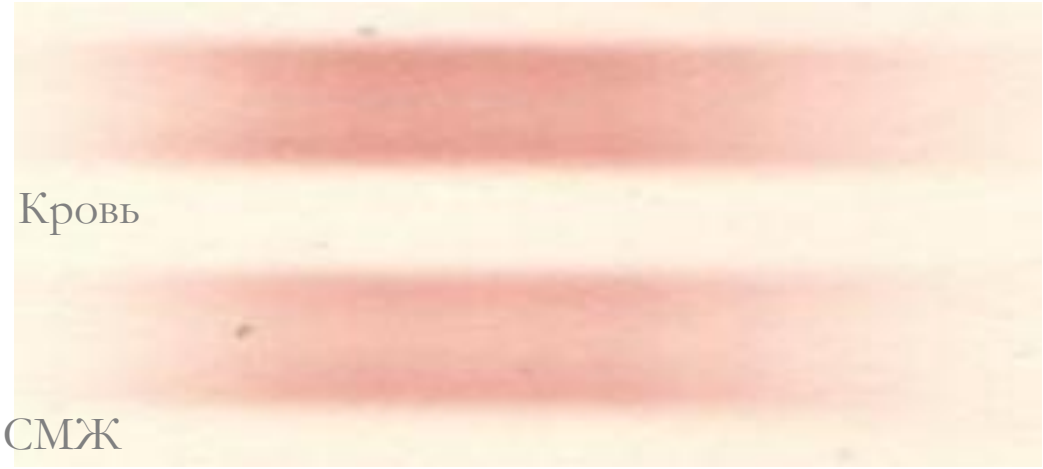
Варианты иммунного ответа в СМЖ (изоэлектрофокусирование IgG)

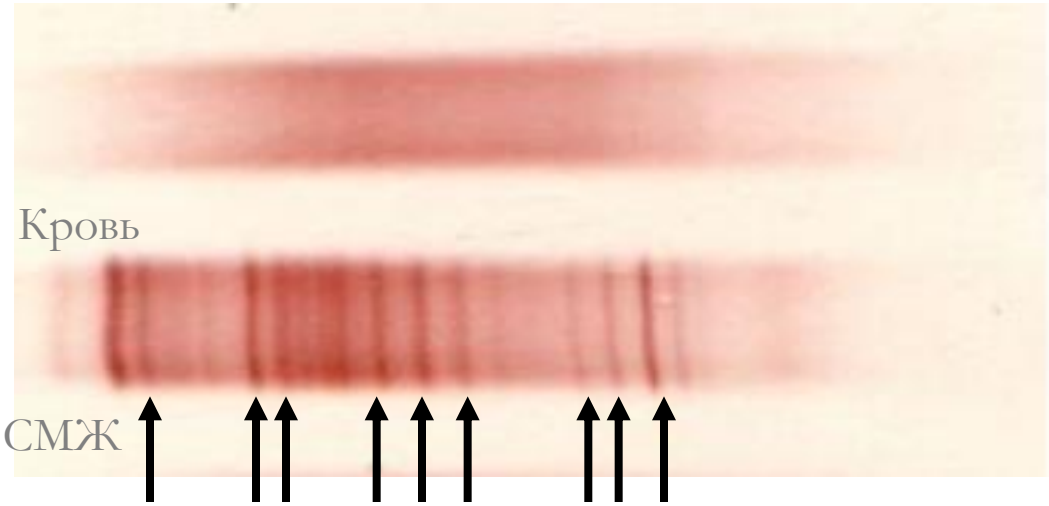
- Норма

(поликлональный ответ в крови и в ликворе)

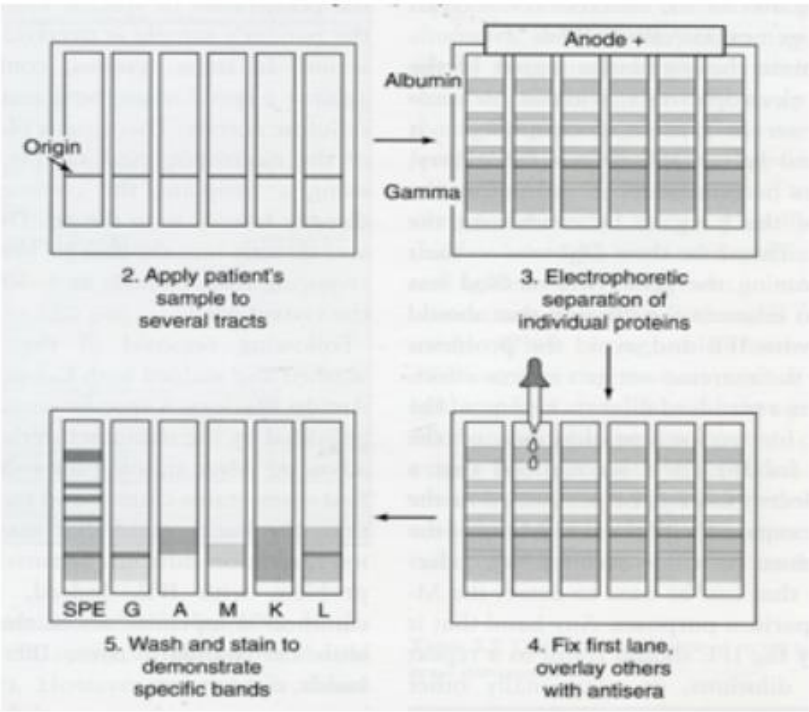
- Рассеянный склероз

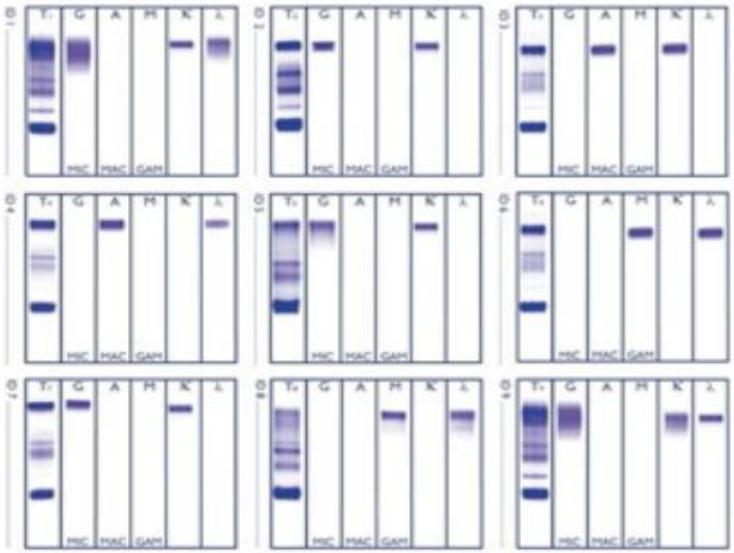
(олигоклональный ответ только в ликворе)





Иммунофиксация



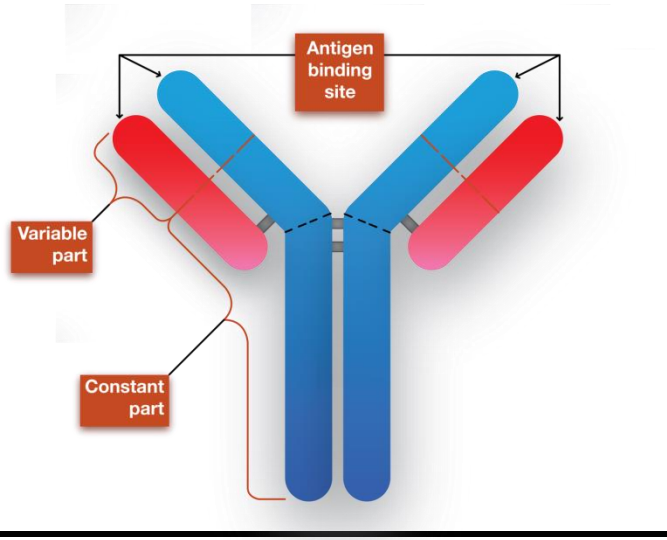


Основной спектр антисывороток включает пять основных:
анти- IgG, IgA, IgM, anti-kappa, anti-lambda,
а также ряд вспомогательных:
анти- IgD, IgE, free-K, free-L, pentavalent, trivalent

Выявление моноклонального иммуноглобулина - парапротеина

- Парапротеин (ПП) является первым среди описанных **онкомаркеров** (MacIntyre1846, Apitz 1940)
- При электрофорезе белков сыворотки крови представляет новую «фракцию» белков сыворотки, синонимы **М-пик или М-градиент, моноклональный компонент**
- Состоит из моноклонального иммуноглобулина или фрагментов молекул иммуноглобулина, в моче ПП представлен **белком Бенс-Джонса**
- **Синтез нормальных иммуноглобулинов подавлен**
- Концентрация ПП отражает общую опухолевую массу

Иммуноглобулин и его строение



Тяжелая цепь молекулы Ig

Тяжелая цепь определяет класс иммуноглобулина **– IgG, IgM, IgA, IgE, IgD.**

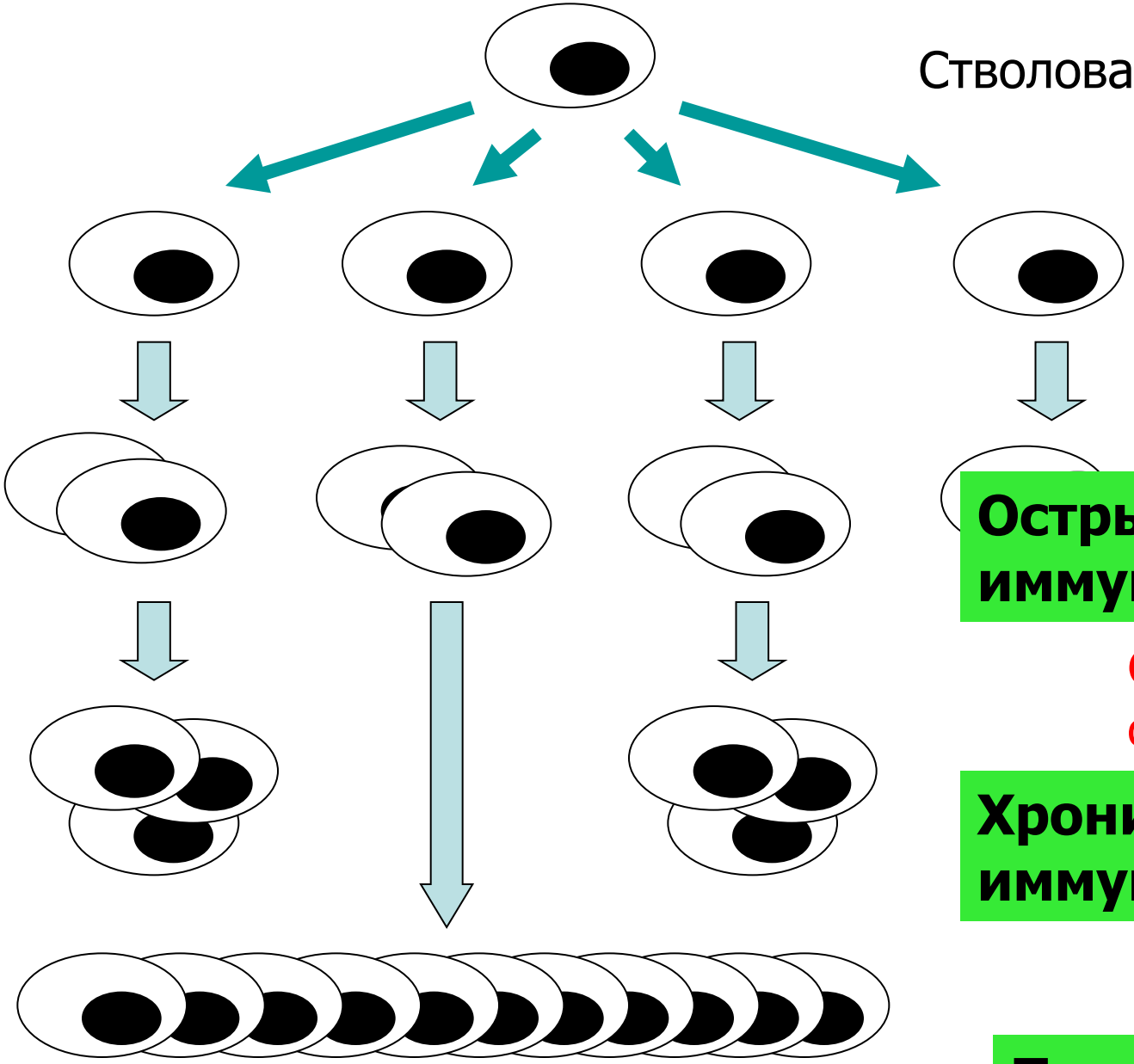
Крайне редко синтезируется без соответствующих легких цепей. Несет полисахаридные остатки, что определяет растворимость Ig.

Легкая цепь молекулы Ig

Во всех молекулах синтезируется либо **каппа-цепь или лямбда-цепь**, их соотношение в составе иммуноглобулинов сыворотки составляет 2:1

При увеличении продукции Ig наблюдается аномальный синтез свободных легких цепей каппа либо лямбда, которые в почке фильтруются и накапливаются в моче – **белок Бенс-Джонса**. Их обычно можно обнаружить в альфа2 или бета фракции.

Варианты клональности и синтеза Ig’s



Поликлональный синтез Ig

Острый иммунный ответ

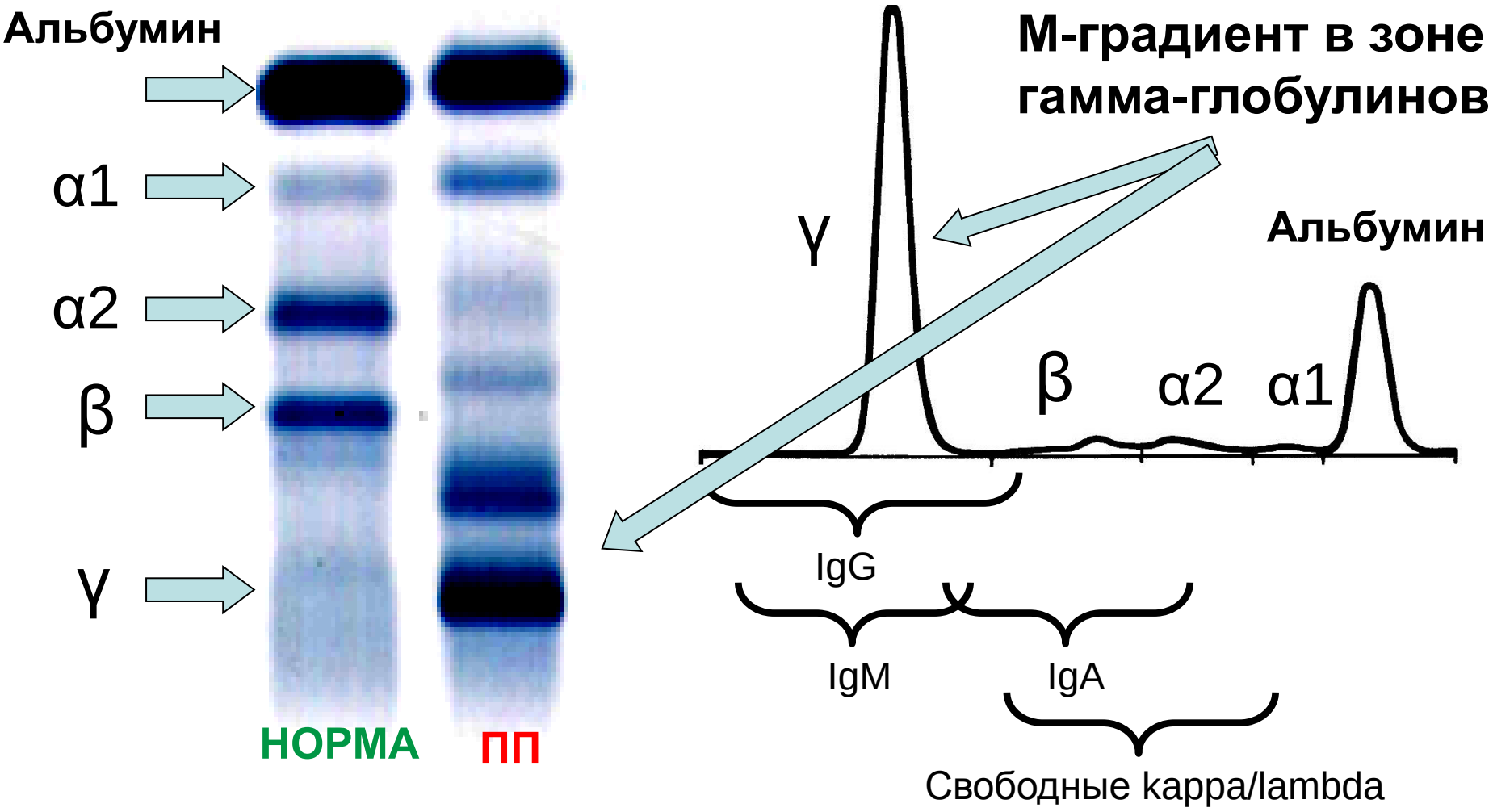
Олигоклональный синтез Ig

Хронический иммунный ответ

Моноклональный синтез Ig

Парапротеинемия

Парапротеин (М-градиент) при электрофорезе белков сыворотки



Миелома и ее основные формы (International Myeloma Working Group, 2003)

- **Моноклональная гаммапатия невыясненного значения (МГНЗ):** парапротеин <30 г/л, <10% плазматических клеток в трепанобиопсии костного мозга, нет поражения органов
- Отмечается за **5-30 лет до клинического дебюта миеломы**
- **Тлеющая (индолентная) миелома:**

  парапротеин >30г/л или >10% плазматических клеток в трепанобиопсии костного мозга, нет поражения органов
- **Множественная миелома:**

  Парапротеин >30г/л;

  В пункции/трепанобиопсии костного мозга >10% плазматических клеток;

  Выявлено поражение органов (related organ and tissue injury - ROTI)

Клиническая картина миеломы

1. Боли в костях, усиливающиеся при движении (70%), спонтанные переломы. Обусловлены пролиферацией опухолевых клеток, приводящей к активации остеокластов и остеолизису. Остеолизис ведет к поступлению в кровь значительного количества кальция.
2. Миеломная нефропатия (50%). Обусловлена гиперкальцийемией, повреждением канальцев легкими цепями имуноглобулинов.
3. Анемия, повышение СОЭ. (увеличение белка, гиперкальцемия, ЛДГ, высокие Igs сыворотки крови, белок в моче)
4. Бактериальные инфекции (25-30%). Связаны пониженной продукцией антител и ускоренным их разрушением.
5. Амилоидоз накопление в ткани изменённых легких цепей с утратой функции почек, печени, сердца и др. органов
6. Синдром гипервязкости крови. Обусловлен гиперпродукцией моноклонального белка
7. Неврологическая симптоматика. Компрессия спинного мозга, корешковые боли, периферическая нейропатия.

Частота парапротеинемии резко возрастает после 50 лет

- У всех пациентов с миеломой парапротеинемия началась задолго до развития заболевания (Landgren et al, 2009; Kyle 2006), нередко опережая диагноз на 20-30 лет
- Парапротеинемия в разных возрастных группах
  - 25-34 лет 0.03%
  - 35-44 лет 0.08%
  - 45-54 лет 0.2%
  - 55-64 лет 1.6%
  - 65-74 лет 7.8%
  - 75 и более 10%
- Парапротеинемия без наличия развернутого заболевания носит название **моноклональная гаммапатия невыясненного значения** и относится к группе незлокачественных парапротеинемий
- Более 80% случаев первичного выявления парапротеина это МГНЗ

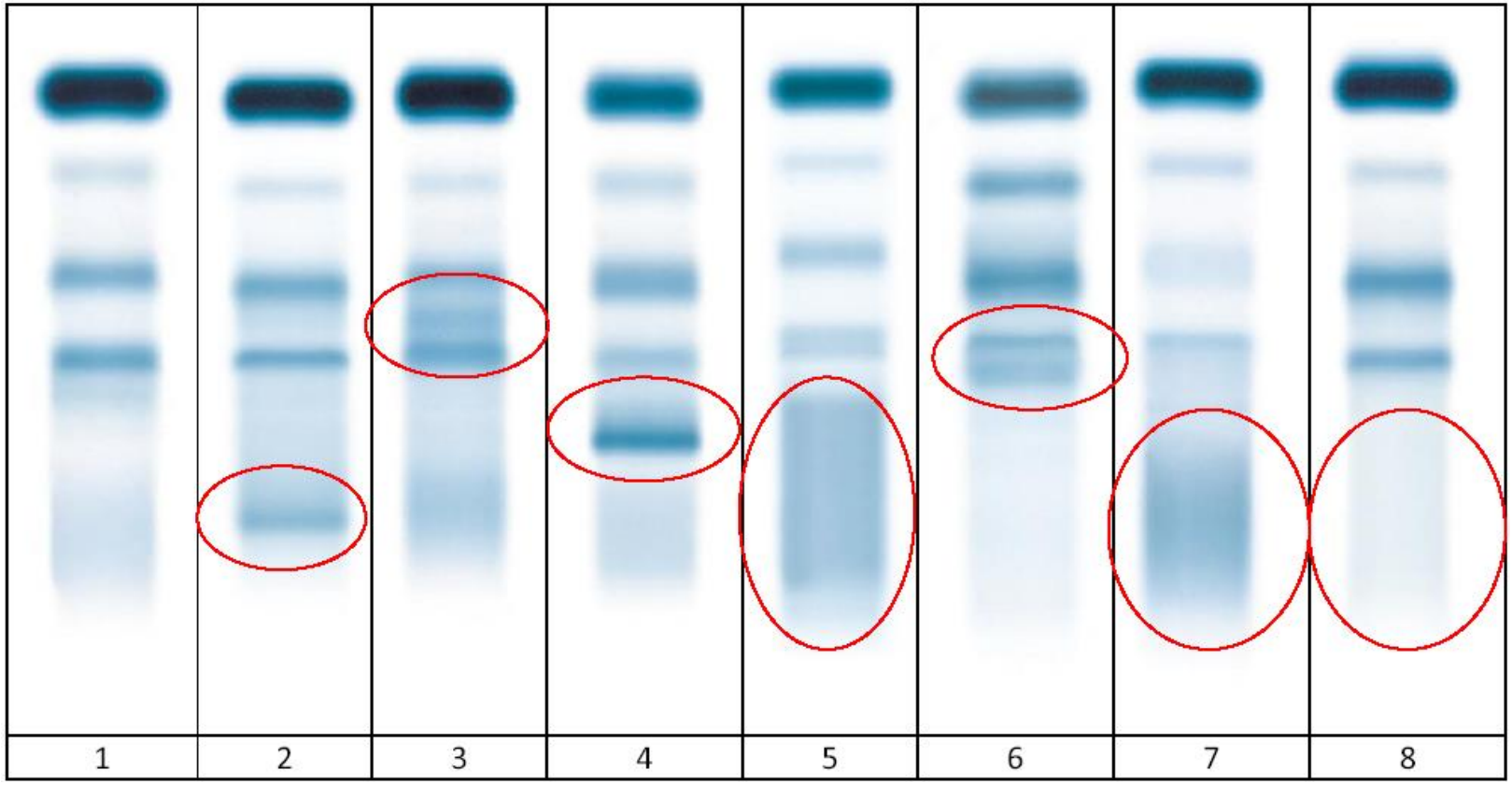
Прогноз и наблюдени при МГНЗ
(BCSH and UKMF MGUS guidelines 2009)

Низкий риск трансформации	Высокий риск трансформации
Парапротеин <15 g/L IgG or <10g/L IgA/IgM	Парапротеин >15 g/L IgG or >10g/L IgA/IgM
Асимптомно (нет CRAB)	Парапротеин класса IgD/IgE
Нет белка Бенс-Джонса	Есть клинические жалобы
Ig'ы других классов в норме или незначительно повышены	Выявлены ББД, свободные легкие цепи, гипогаммаглобулинемия
Вероятна МГНЗ, амбулаторное наблюдение желательно	Высокий риск развития тлеющей миеломы
Повторить ЭФ/ИФ и ЭФМ/ББД через 3-6 месяцев и далее ежегодно как минимум 5 лет	Направление к онкогематологу с углубленным обследованием

Незлокачественные парапротеинемии

- Группа заболеваний и состояний, характеризующаяся появлением в крови и моче парапротеина
- **Предзаболевания и асимптоматические состояния**
- Моноклональная гаммапатия невыясненого значения
- **Незлокачественные заболевания**
- Амилоидоз
- Криоглобулинемия
- Холодовая гемолитическая анемия
- Паранеопластические полиневриты
- Микседематозный лишай/POEMS синдром

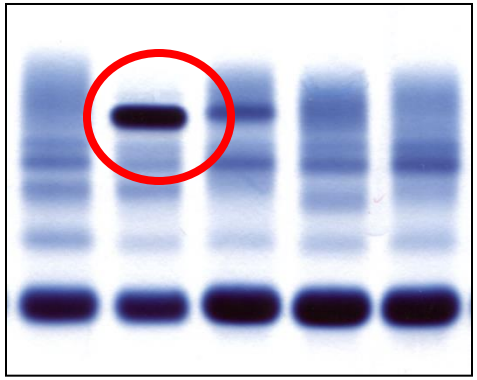
Сложности детекции парапротеина при клиническом ЭФ



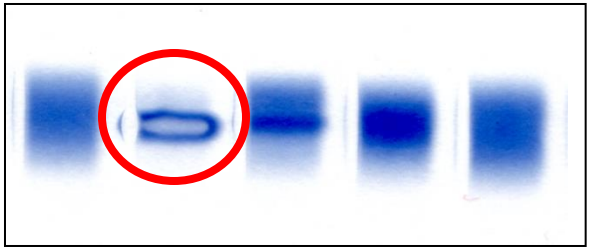
1. Норма; 2 Минимоноклон; 3. Гемолиз; 4 Фибриноген; 5 Бета-гамма блок - цирроз печени; 6 Пре-бета при ГН; 7 Гипергамма; 8 Гипогамма

Последовательное выявление и анализ состава М-компонента в диагностике парапротеинемии

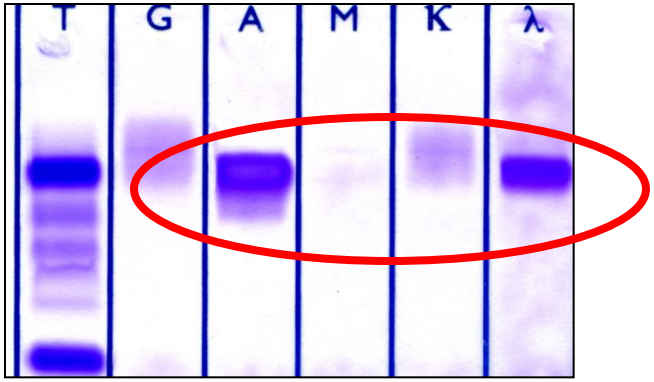
Электрофорез белков сыворотки крови



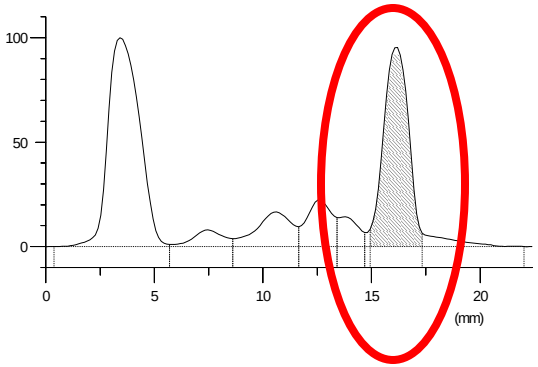
Скрининг ПП (иммунофиксация с поли-антисывороткой (IgGAMkl)



Развернутая иммунофиксация и типирование парапротеина



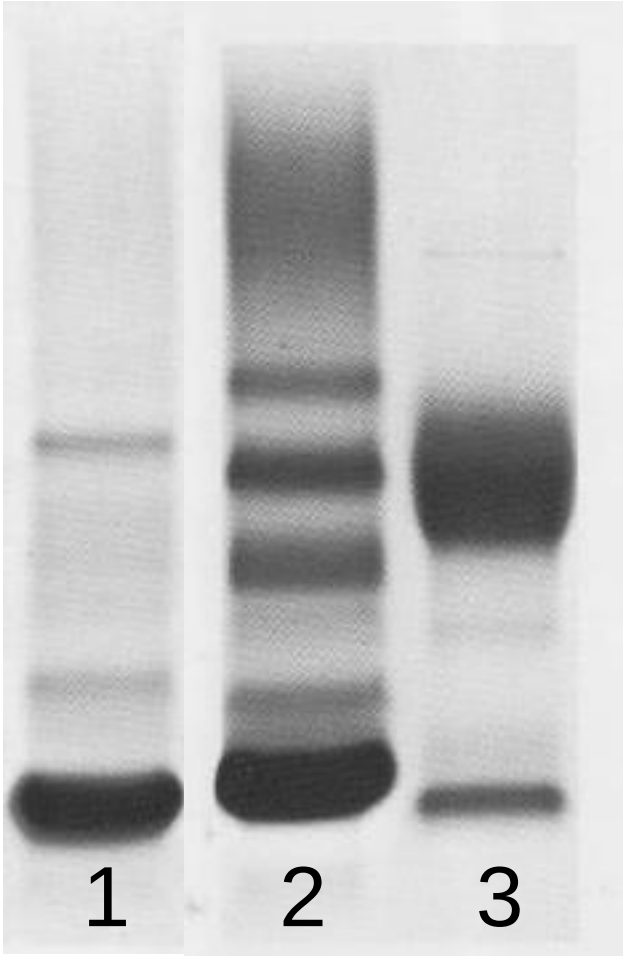
Денситометрия белковых фракций и измерение ПП



Анализ белкового состава мочи

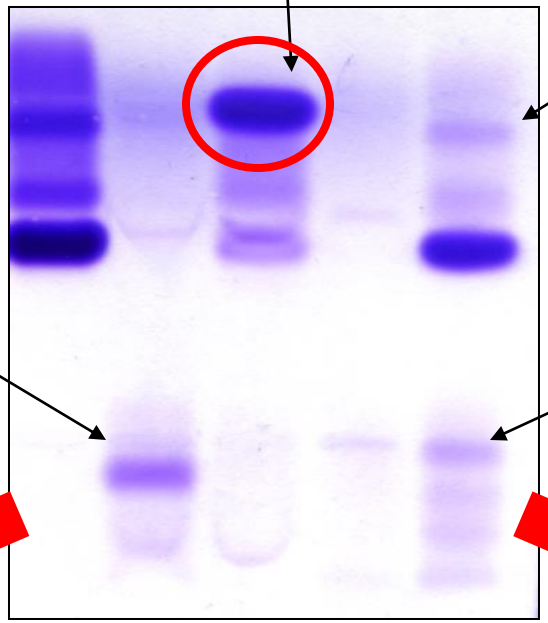
- Моча содержит в среднем 10 мг белка/л, суточная протеинурия до 100 мг/сутки.
- В норме альбумин (50%) и белок Тамм-Хорсфала (40%) и низкомолекулярные белки
  1) α-1 кислый гликопротеин (40kDa).
  2) α-1 микроглобулин (27kDa).
  3) β-2 микроглобулин (12kDa).
  4) Следы белков гамма-зоны (12kDa).
  5) Ретинол связывающий белок (20kDa).
- В норме чувствительность электрофореза белков сыворотки должна быть достаточной для выявление следовых количеств альбумина – требуется концентрация мочи

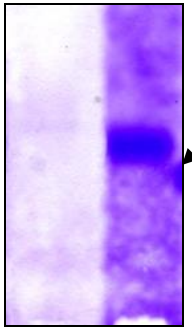
Варианты протеинурии при гломерулопатиях



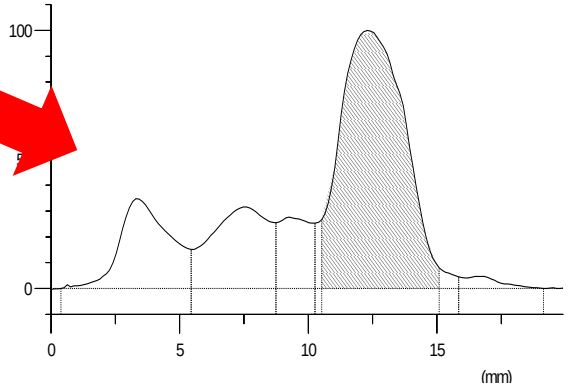
1. Селективная протеинурия (преимущественно альбумин)
2. Неселективная протеинурия (все белки сыворотки)
3. Протеинурия переполнения (секреция белка Бенс-Джонса, представляющего полимер свободных легких цепей иммуноглобулинов)

Электрофорез мочи для оценки протеинурии и определение белка Бенс-Джонса





Иммунофиксация мочи



Денситометрическое измерение

Тесты для обследования на моноклональные гаммапатии

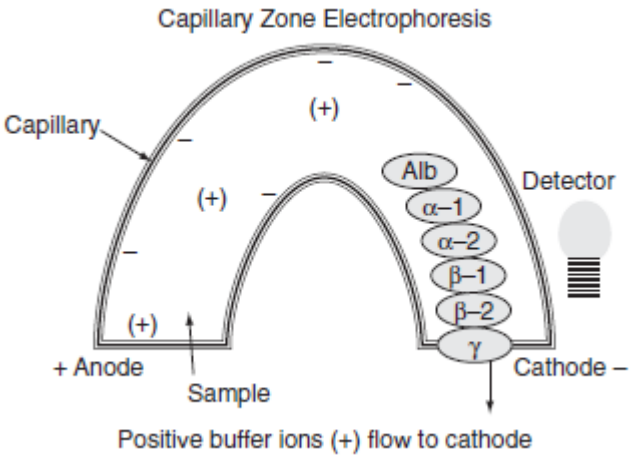
Название теста	Определяемые показатели	Использование в диагностике
Скрининг сыворотки с поливалентной сывороткой	Наличие парапротеина, его содержание, наличие диспротеинеимии	Первичный тест для обследования пациентов
Скрининг мочи на белок Бенс-Джонса с поливалентной сывороткой	Наличие парапротеина, его содержание, тип протеинурии	Первичный тест для обследования пациентов с протеинурией
Скрининг мочи и сыворотки с помощью иммунофиксации с поливаленной сывороткой	Выявление парапротеинов в двух материалов	Основной скрининговый тест для диагностики миеломы
Иммунофиксация сыворотки крови и иммунофиксация мочи (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, kappa, lambda)	Наличие парапротеина, его содержание, тип и определение легкой цепи,	Обследование при миеломе, б.Вальденстрема, болезни легких цепей, амилоидозе Наиболее чувствительный тест
Определение содержания свободных легких цепей	Концентрации каппа и лямба цепи в сыворотке и моче, индекс синтеза каппа/лямбда	Оценка динамики синтеза парапротеина, определение клональности

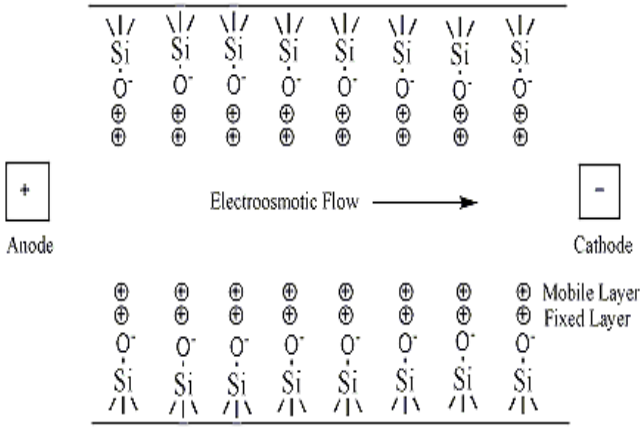
Капиллярный электрофорез

- Капиллярный ЭФ (Jenkins, 1994) – наиболее технически совершенная методология разделения белков

- Самая совершенная технология, позволяющая обеспечить высокую скорость анализа и четкость данных

- Высокий ток, хороший теплоотвод, четкое разделение особенно на анодном конце, прямая детекция (200-215 нм)





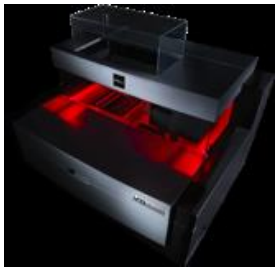
Небольшие отличия

Агарозный ЭФ

- Прозрачный агарозный гель
- Внесение в слоты аппликатора или использование гребенки
- Возможность концентрации образца путем повторных нанесений
- Лучшее разрешение у катодного конца геля *(там где мигруруют Ig)*
- Возможно химическое или иммунохимическое окрашивание белков в геле

- Связывание белков с краской нелинейно
- Чувствительность к температуре и влажности
- Требуется дополнительные шаги окрашивания и денситометрии
- Требуются ручные манипуляции

Капиллярный ЭФ



- Тонкие капилляры
- Жидкая теплопроводная среда
- Высокой вольтаж
- Нет артефактов за счет охлаждения
- Малый объем образца
- Чувствительность выявления фракций
- Полная автоматизация
- Прямая УВ детекция белков, но иногда лекарства и рентген контрасты мешают качеству разделения белков

- Лучшее разрешение на анодном конце геля *(Там где мигрирует альбумин)*
- Иммунофиксация не возможна, также нельзя использовать дополнительные красители

Helena Biosciences Europe

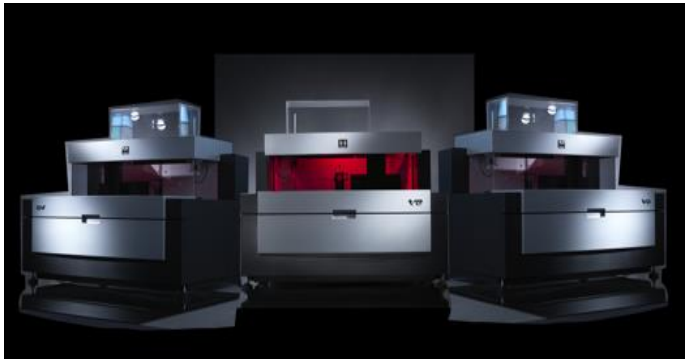
SAS-1 Plus

SAS-2

- **Автоматизированный комплекс SAS-1plus и SAS-2**
- Компактная настольная система предназначена для лабораторий выполняющих порядка 1200 – 6000 тестов в год. Позволяет проводить электрофорез до 24-х образцов одновременно.
- ЭФ сыворотки/мочи, ИФ, ЭФ гемоглобина, ферментов, холестерина

helena V8
Biosciences Europe

- Система капиллярного электрофореза на 8 капиллярах с автоматическим забором образца (первичная пробирка)
- До 90 результатов электрофореза белка сыворотки в час
- Возможность дозагрузки образов
- Мультианализ – до 3 методов электрофореза параллельно
- Возможность интеграции с гелевым электрофорезом
- Возможность автоматического рефлекс тестирования – иммунофиксация при высокой гамма фракции
- ЭФ сыворотки, ЭФ мочи, иммунозамещение, ЭФ/ИЭФ гемоглобина, CDT



Спасибо за внимание!

Сергей Леонидович Арсенин

(499) 947-02-67

(926) 233-82-97

arseninsl@helenabio.ru

www.helenabio.ru