

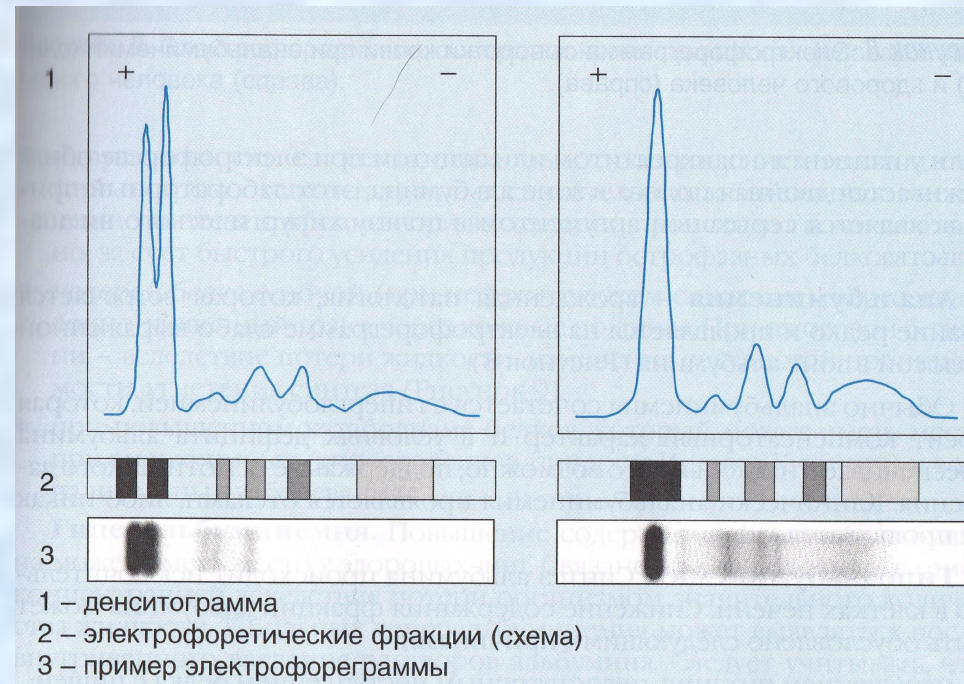
Электрофорез белков сыворотки крови

Роль электрофоретического анализа

- Определение типа электрофореграммы может подтвердить предполагаемый диагноз, выявить скрытую патологию, следить за ходом лечения
- **Абсолютным показанием** для исследования электрофореграммы является подозрение на миеломную болезнь, иммунодефицит.
- **Может быть полезным**
 - для диагностики заболеваний печени, нефротического синдрома, злокачественных новообразований, коллагенозов
 - при контроле течения заболеваний, при которых нарушается белковый состав сыворотки крови
 - при скрининге врожденного или приобретенного дефицита или аномалии белков
 - при снижении содержания общего белка < 60 г/л или повышении > 85 г/л, при снижении концентрации альбумина < 35 г/л и при увеличении СОЭ > 25 мм/час

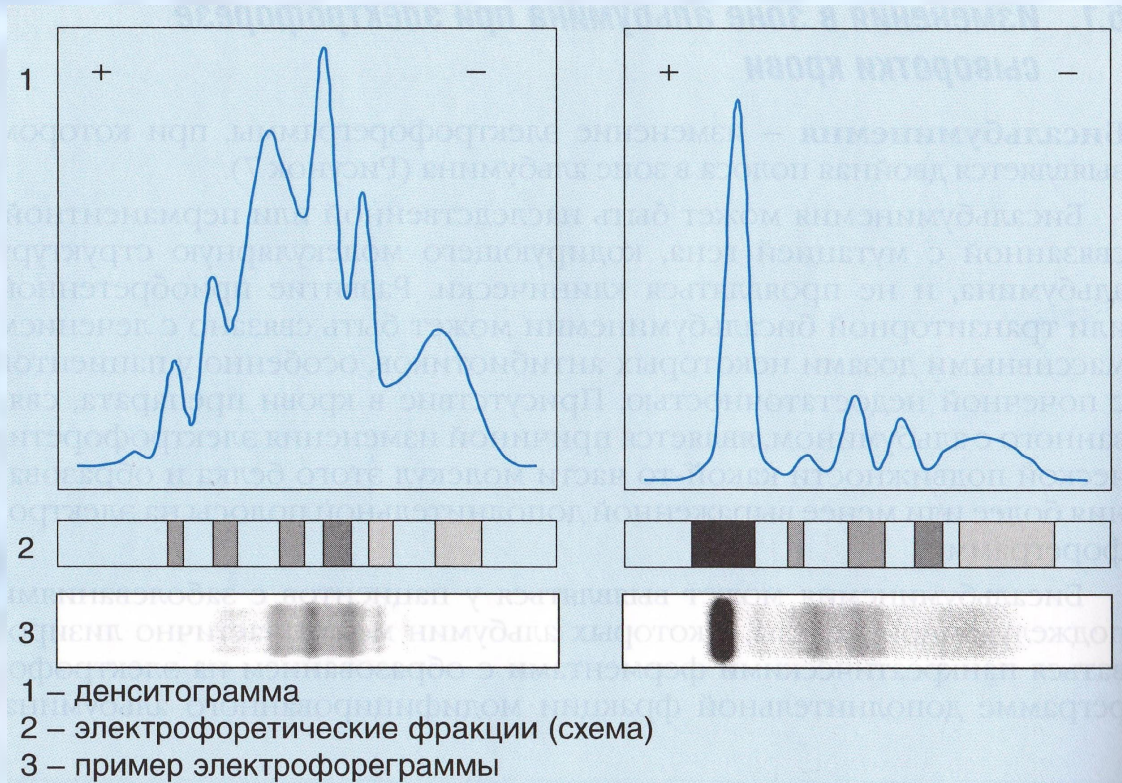
Электрофореграмма при бисальбуминемии

- Выявляется двойная полоса в зоне альбумина
- Может быть генетически обусловленной или транзиторной
- Причины: присутствие препарата, связанного с альбумином, заболевания поджелудочной железы (лизис ферментами)



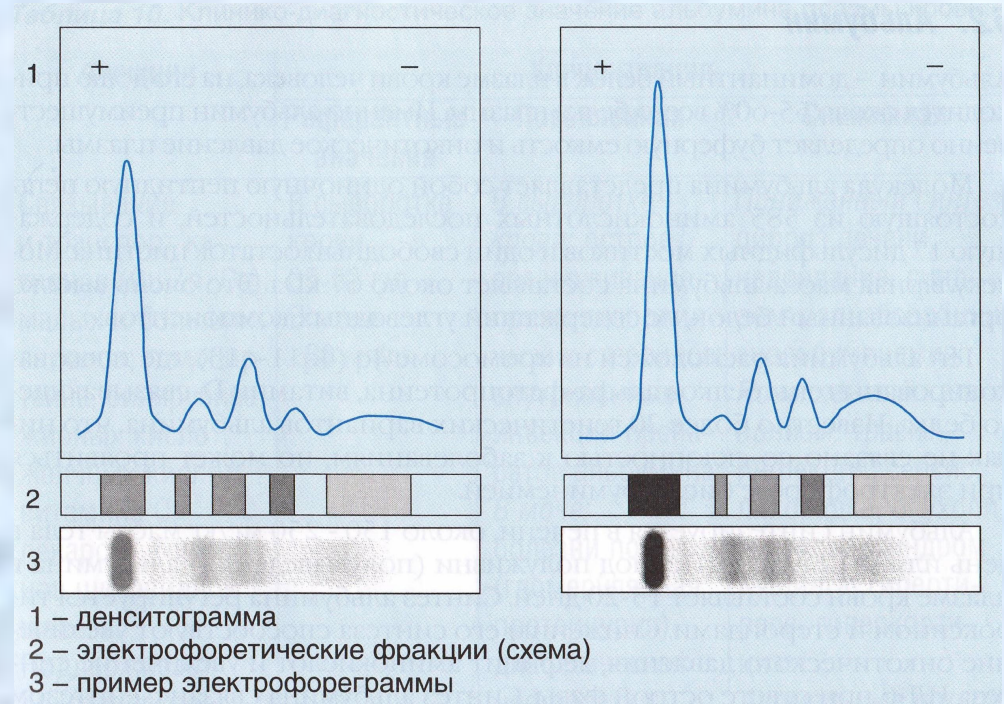
Электрофореграмма при анальбуминемии

Врожденная
патология
(встречается редко)
Сочетается с
гиперглобулинемией



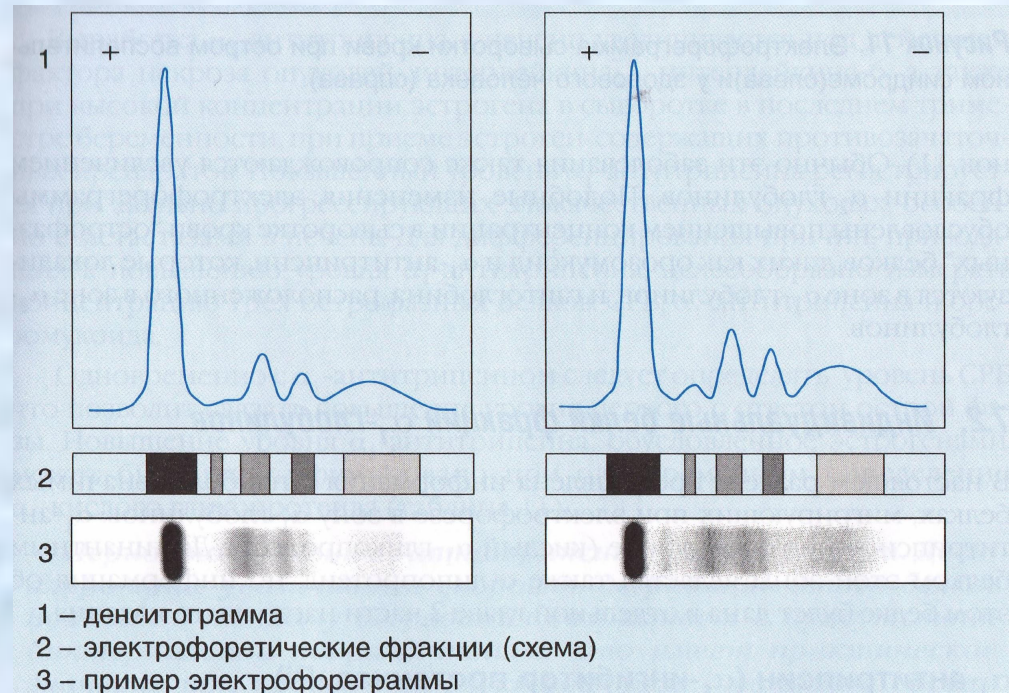
Электрофореграмма при ожогах

- Гипоальбуминемия
- Белковое голодание
- Нарушение всасывания в ЖКТ
- Нарушение синтеза белка
- Потери белка с мочой
- Повышение катаболизма белков



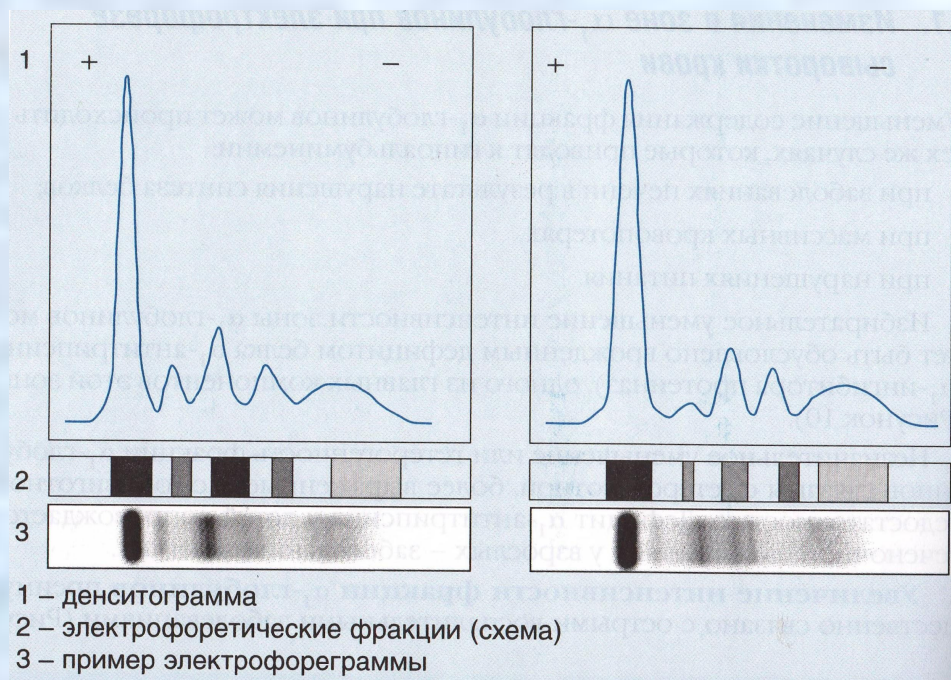
Электрофореграмма при дефиците α_1 -антитрипсина

Снижение α_1 –
глобулинов
-заболевания печени
-массивные кровопотери
-нарушение питания
-дефиците α_1 –
антитрипсина



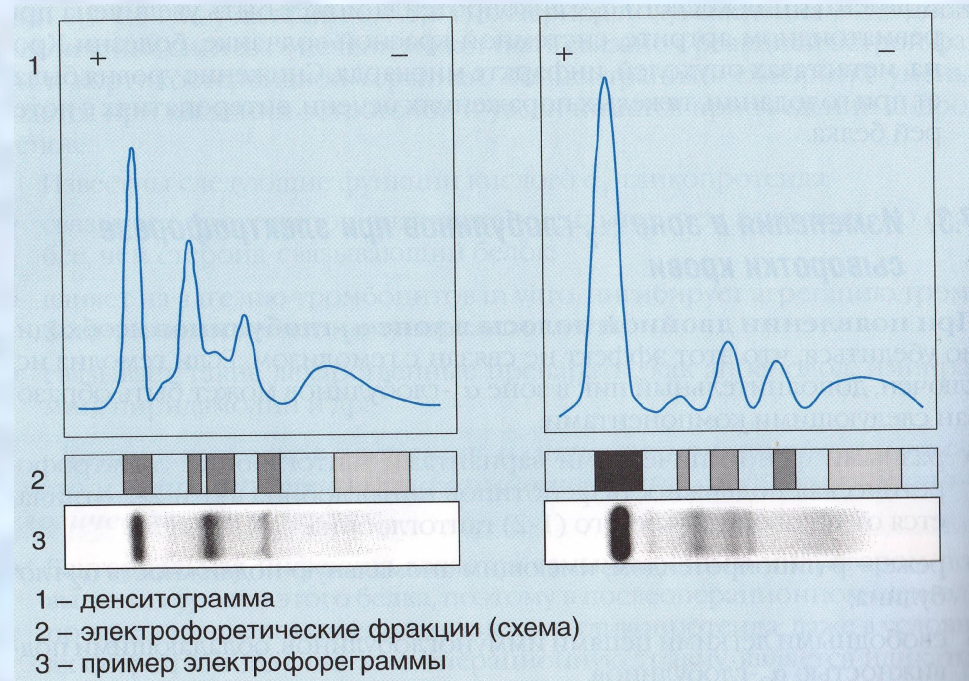
Электрофореграмма при остром воспалительном синдроме

Увеличение α_1 –
глобулинов
-острые
воспалительные
заболевания
(увеличение
концентрации α_1 –
антитрипсина,
орозомукоида)



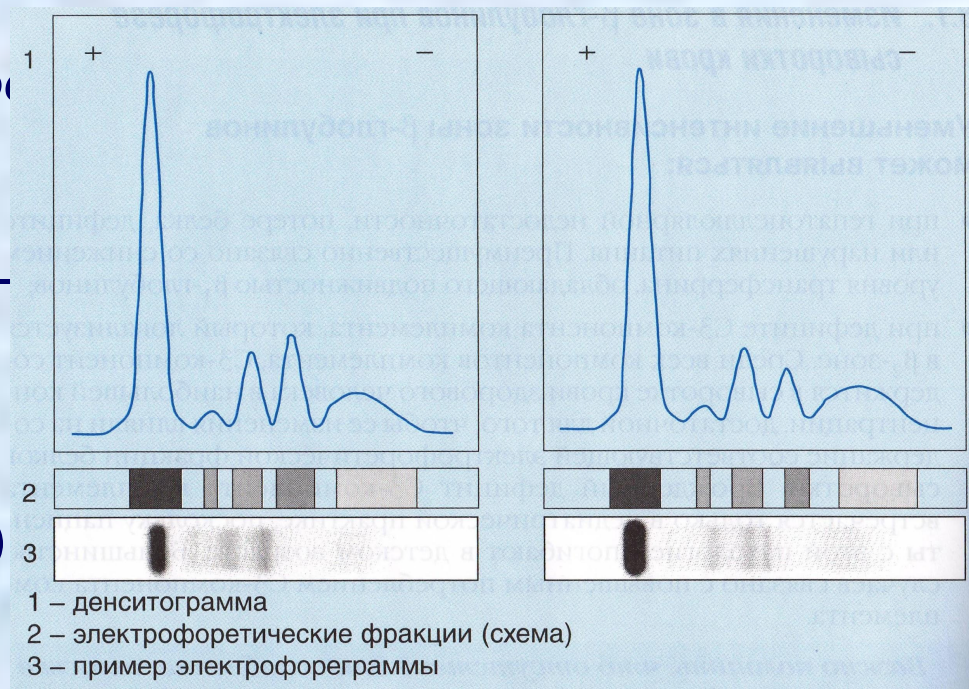
Электрофореграмма сыворотки крови при нефротическом синдроме

- **Снижение α_2 –глобулинов**
 - Нарушение питания
 - Патология печени
 - Внутрисосудистый гемолиз
- **Увеличение α_2 –глобулинов**
(преимущественно за счет гаптоглобина и α_2 -макроглобулина)
 - Воспаление (сочетается с увеличением α_1 -глобулинов)
 - Нефротический синдром



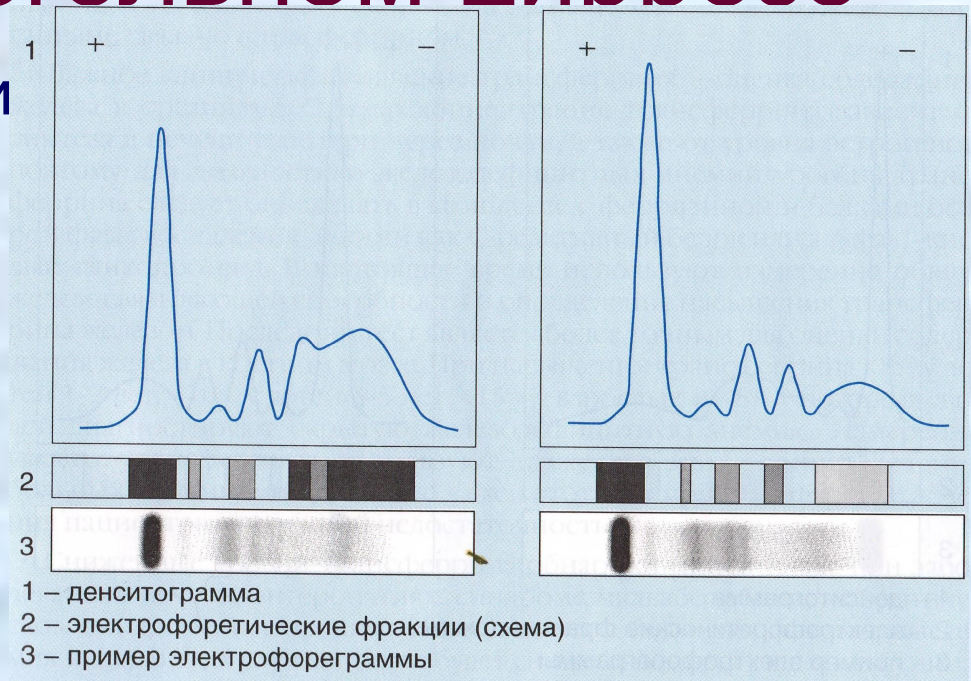
Электрофореграмма сыворотки крови и гипертрансферинемией при анемии

- **Уменьшение β -глобулинов**
 - патология печени
 - дефицит С3-компонента
- **Увеличение β -глобулинов**
 - Гемолизированная сыворотка
 - ЖДА (за счет трансферрина)
 - повышение С3-компонента



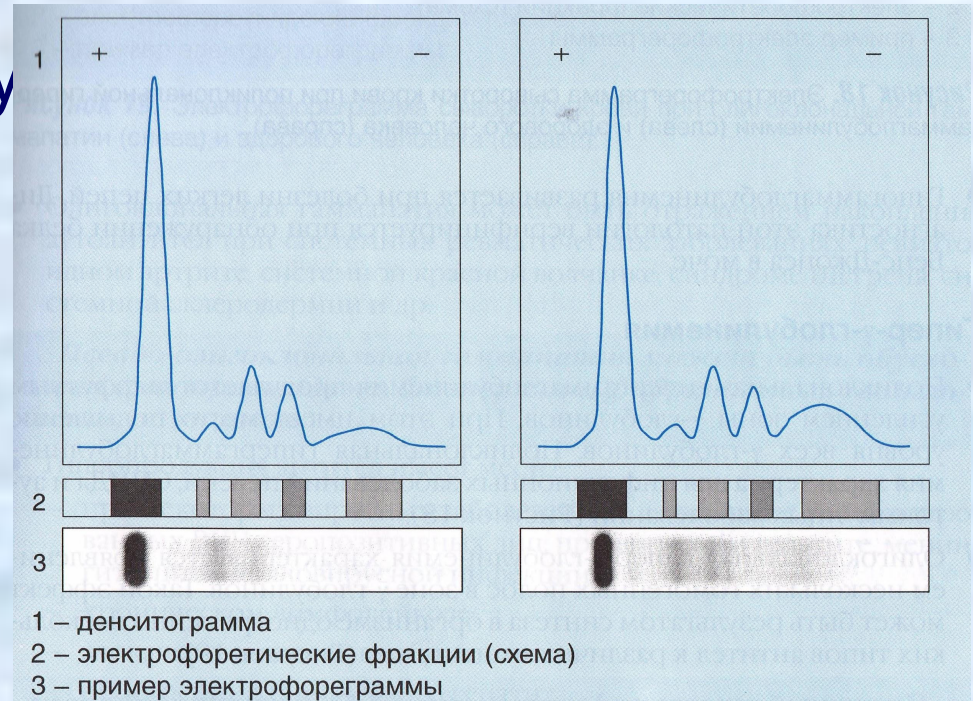
Электрофореграмма сыворотки крови при алкогольном циррозе

- Слияние β - и γ -фракции (за счет увеличения поликлонального Ig A)



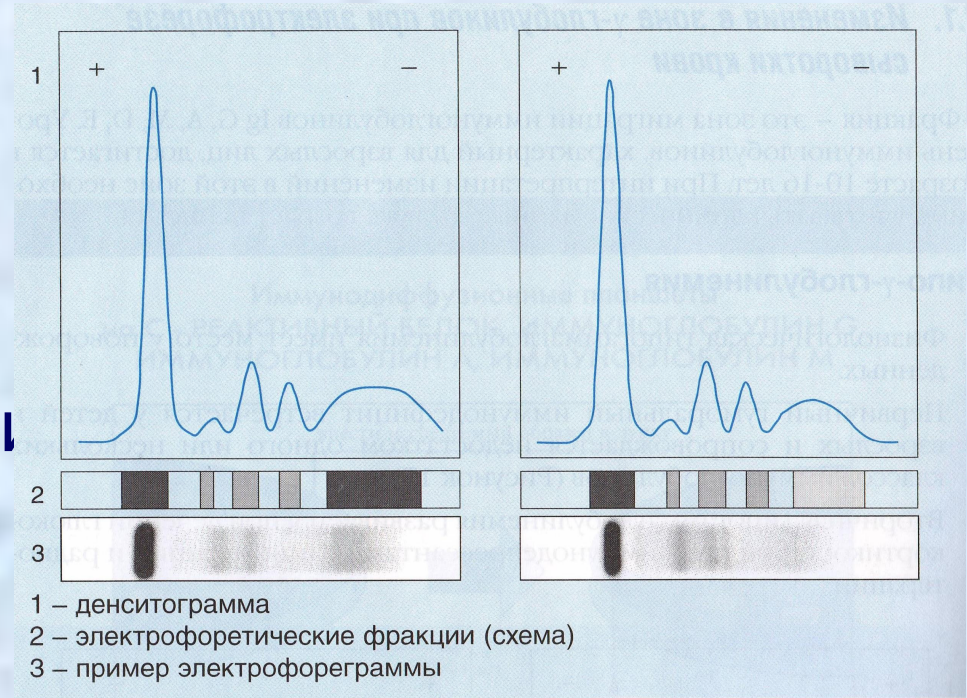
Электрофореграмма сыворотки крови при гипогаммаглобулинемии

- Физиологическая – у новорожденных
- Первичный гуморальный иммунодефицит
- Вторичный – при лечении глюкокортикоидами, иммунодепрессантами, химиотерапии, радиотерапии



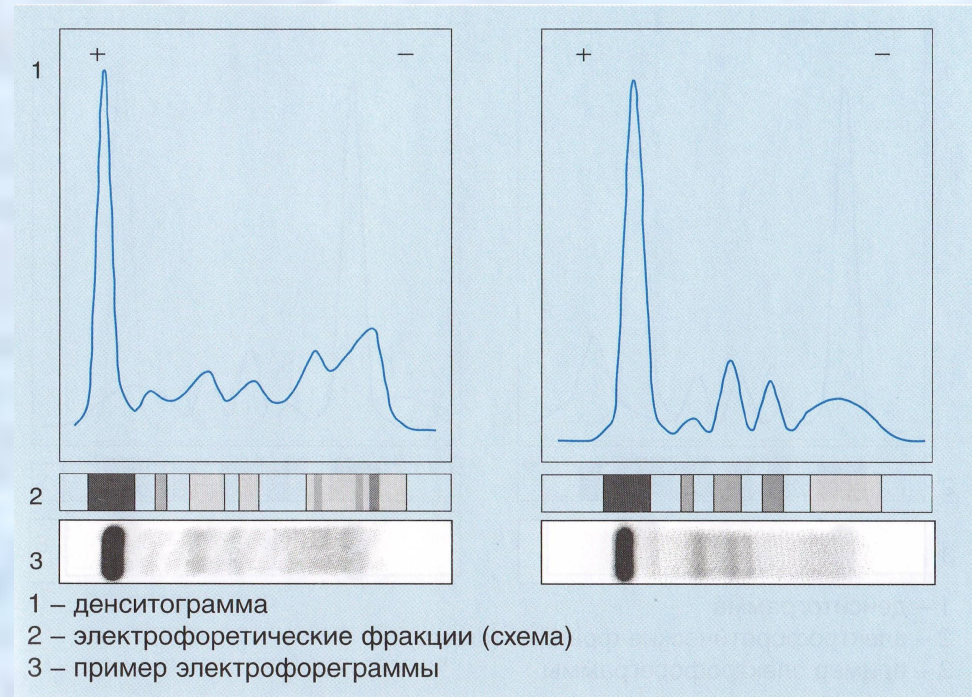
Электрофореграмма сыворотки крови при поликлональной гипергаммаглобулинемии

- Диффузное усиление зоны γ -глобулинов (инфекционные заболевания печени СПИД, аутоиммунные заболевания)



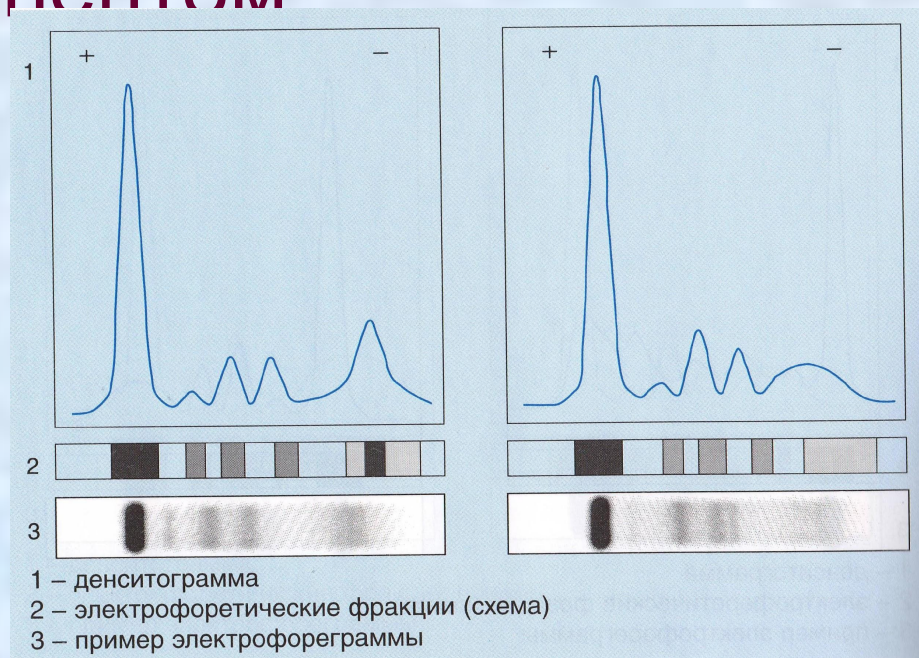
Электрофореграмма сыворотки крови при олигоклональной гипергаммаглобулинемии

- Появление нескольких полос (синтез в организме одновременно нескольких типов антител к различным антигенам)
- Накопление антител при системных ревматических заболеваниях



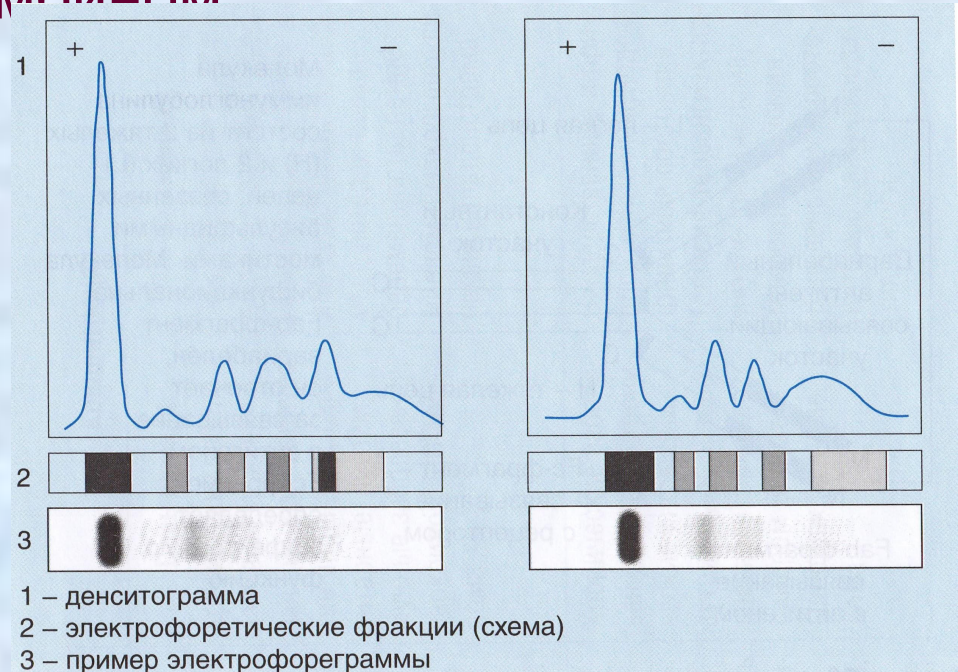
Электрофореграмма сыворотки крови пожилого пациента с моноклональным компонентом

- Появление узкой гомогенной полосы
- У пожилых лиц обнаруживается бессимптомная гаммапатия
- Встречается миеломе, лимфоме, хроническом лимфолейкозе, болезни Вальденстрема



Электрофореграмма сыворотки крови с дополнительной полосой , обусловленной присутствием фибриногена, и того же образца после обработки тромбином

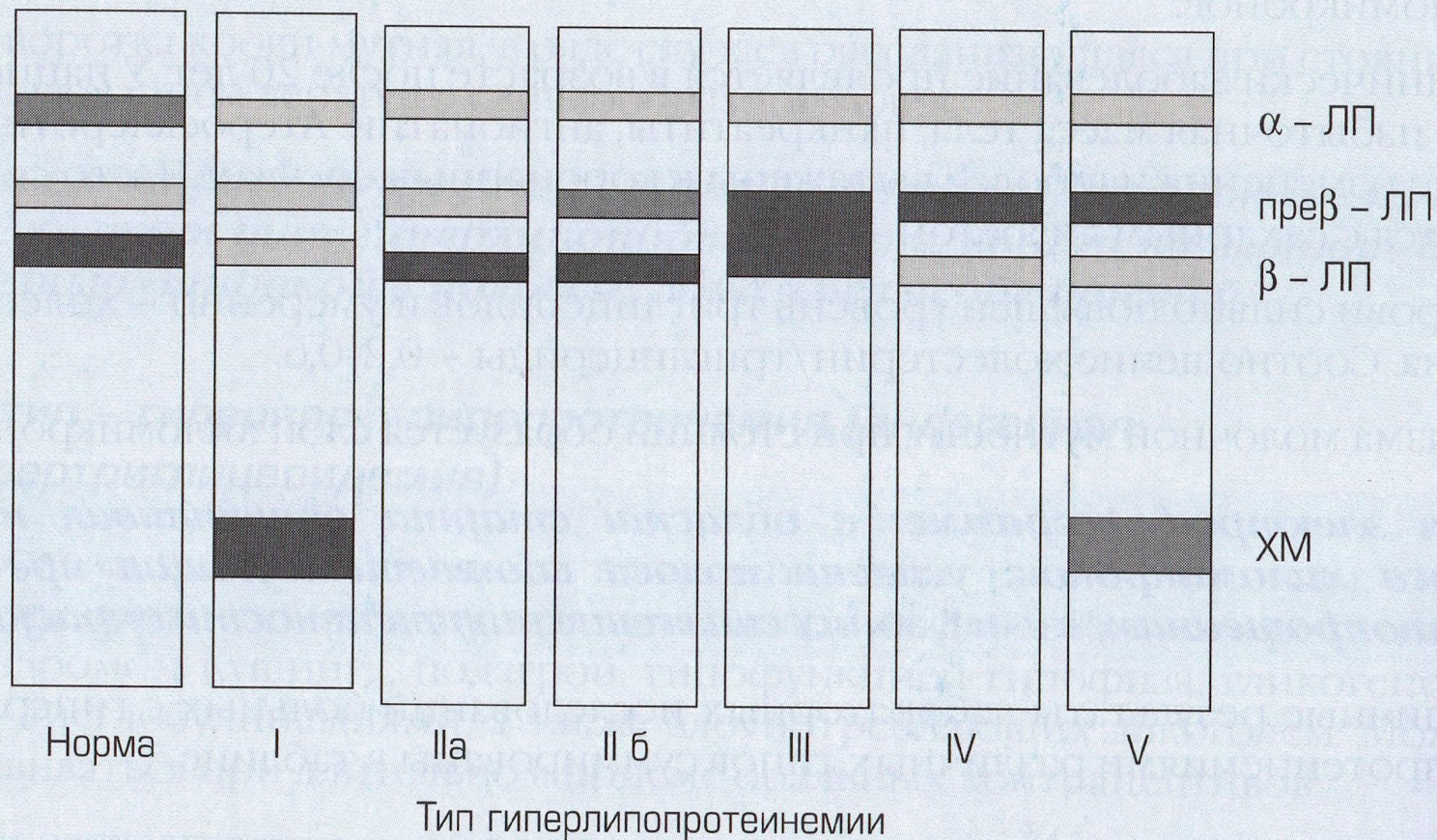
- Появление дополнительной полосы может в присутствии фибриногена (необходимо повторное проведение электрофореза после обработки тромбином)



Лабораторные исследования у больных с гиперлиппротеинемиями

Тип гиперлипотеинемии	I	IIa	IIb	III	IV	V
Общий холестерин	2-4 г/л	3-10 г/л	2,8-3,5 г/л	3-5 г/л	<2,7г/л	до 5 г/л
Триглицериды	30-70 г/л	< 1,6 г/л	2-5 г/л	2-9 г/л	2-10 г/л	до 30 г/л
Визуальная оценка сыворотки	Молочно-белая, при стоянии сливкообразный слой	Прозрачная	Прозрачная или слегка мутная	Прозрачная или слегка мутная	Мутная	Молочно-белая
Хиломикроны	++++	0	0	0	0	++++
ЛПНП	↓↓↓	↑↑↑	↑↑	↑↑	↓	↓↓
ЛПОНП	N / ↓↓↓	N	↑	↑↑	↑↑	↑↑
ЛПВП	↓↓↓	N / ↓	N / ↓	↓	↓	↓
Атерогенность	-	+++	+++	+	-	++

Схема изменений на электрофореграмме при различных типах гиперлиппротеинемий

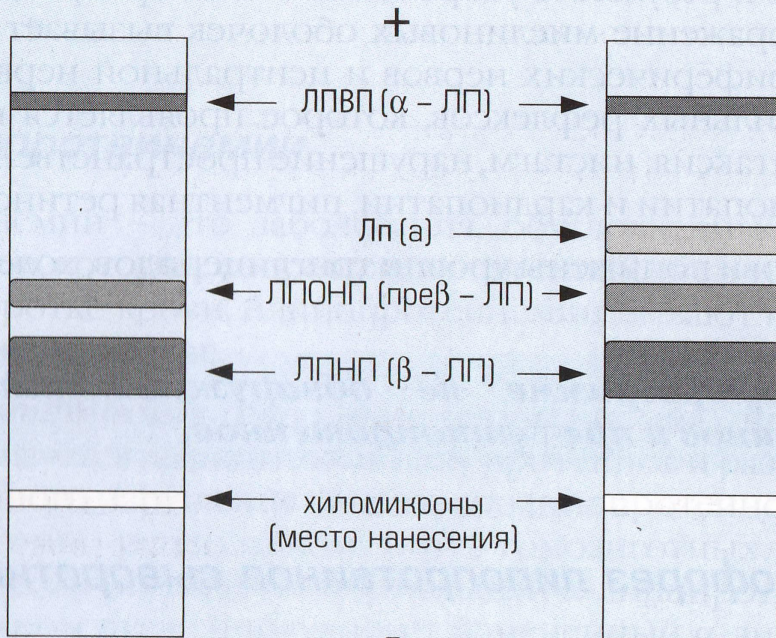


Аполипопротеинемии

- Заболевания, сопровождающиеся снижением уровня ЛП в сыворотке крови:
- **Ан- α -липопротеинемия** (гипо- α -липопротеинемия) – врожденное нарушение синтеза апо ЛП AI и AII (у гомозиготов – вместо α -липопротеина – измененный – Тэнжи-ЛП, у гетерозиготов – нормальный и измененный). При электрофорезе – вместо фракции пре- β -ЛП – широкая полоса β -ЛП
- **А- β -липопротеинемия** (гипо- β -липопротеинемия) – наследственное нарушение образования β -липопротеинов, пре- β -липопротеинов и ХМ, связанное с нарушением синтеза апо-ЛП В. В сыворотке снижены уровни ХС, ФЛ, ТГ. При электрофорезе не обнаруживаются фракции β -липопротеинов и пре- β -липопротеинов

Электрофорез ЛП сыворотки крови

Электрофорез ЛП сыворотки крови

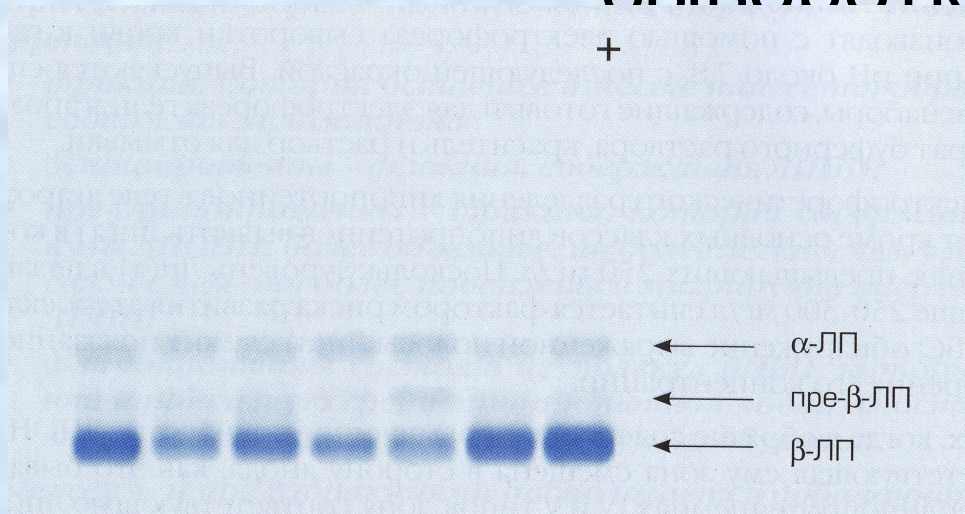


- В норме
- β -ЛП – 38,6-69,4%
- Пре- β -ЛП – 4,4-23,1%
- α - ЛП – 22,3-53,1%
- добавочная фракция, соответствующая Лп (а)

Электрофоретическое исследование холестерина липидных фракций

сыворотки крови

+



- Для анализа использовать свежую сыворотку, сразу поместить в холодильник, хранить не более 3 суток при 4°
- Нельзя использовать замороженные образцы и применять гепарин
- При хранении снижается уровень ЛПОНП и повышается ЛПНП

Выявление холестерина

Липопротейн (а)

- Липопротейн (а) – липопротейнассоциированный антиген – обогащенная холестерином и белком частица, сходная с ЛПНП.
- Белковая часть содержит кроме Апо-100 Апо(а) – апапротейн, соединенный с ЛПНП дисульфидным мостиком

Молекула ЛП(а) крупнее и имеет большую плотность, чем ЛПНП, имеет подвижность, близкую к пре-β-ЛП.

Липопротеин (а)

- Липопротеин (а) подавляет фибринолиз, способствует тромбозу
- N – до 140 мг/дл у мужчин, до 150 – у женщин

Не зависит от возраста, пола, факторов риска (курение, гипертензия, образ жизни)

- При повышении > 300 мг/дл - двукратное повышение риска ИБС
- **Измерять следует :**
 - при подозрении на атеросклероз, особенно при повышении хСЛПНП
 - при оценке риска ИБС у лиц среднего возраста
 - при назначении гиполипидемической терапии
 - при отсутствии эффекта от статинов
 - для оценки риска рестенозов при ангиопластике
 - для оценки риска развития сердечно-сосудистых осложнений при СД

- **Повышение уровня**

- при нефротическом синдроме
- у больных на гемодиализе
- при плохо контролируемом СД
- при гипотиреозе
- в острой стадии ИМ

- **Понижение уровня**

- при гипертиреозе
- у пациентов, принимающих эстрогены
- при лечении неомицином

Электрофоретическое исследование гемоглобинов

- **Основная форма** – HbA (две α -цепи и две $-\beta$ -цепи)
 - В незначительном количестве – HbA₂ (две α -цепи и две $-\delta$ -цепи) и HbF (две α -цепи и две $-\gamma$ -цепи)
- (У новорожденного 80% HbF, заменяется в течение 1 года жизни)

Аномальные Hb

- HbS – остаток глутаминовой кислоты в β -цепи заменен на вал
- HbM – гистидин, связывающий Fe, заменен другими аминокислотами
- HbC - остаток глутаминовой кислоты в β -цепи заменен на лизин
- Другие формы

Значение исследования Hb

- Для диагностики некоторых форм анемий у взрослых
- Для скрининга наследственных анемий у новорожденных
- Для дифференциальной диагностики анемий с другими заболеваниями (печени и др.)

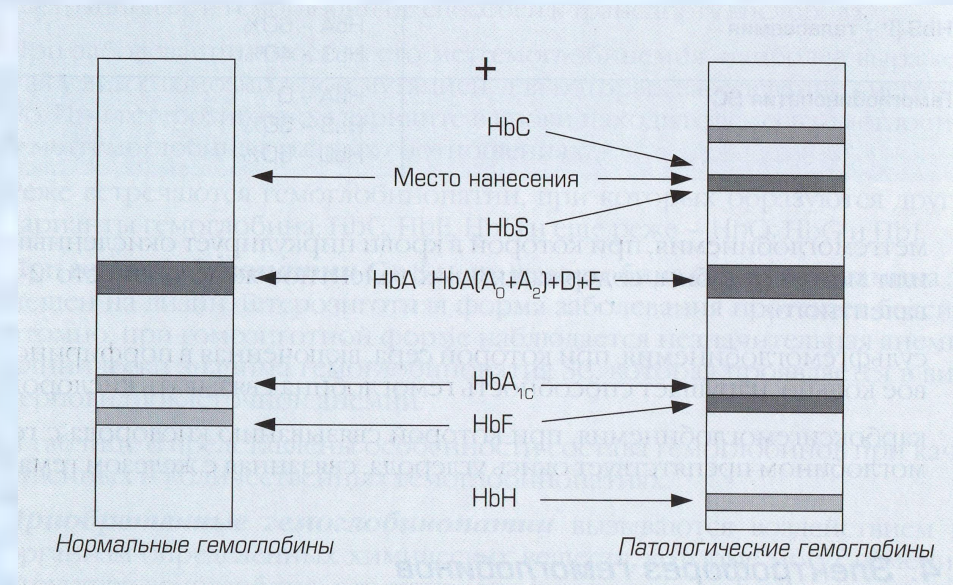
Наследственные гемоглобинопатии

- **Количественные**, или талассемии, связанные с уменьшением или полным отсутствием синтеза α - и β -цепей (α -талассемия и β -талассемия)
- **Структурные** или качественные, обусловлены синтезом других разновидностей Hb (S, C, E и др.)
- **Смешанные** (HbE- β -талассемия, HbS- β -талассемия, HbS- β -талассемия)

Содержание различных форм Hb при гемоглобинопатиях

Схема расположения фракций Нв при электрофорезе гемолизата

- Кровь берут с антикоагулянтом
- Гемолизат готовят из отмытых физ р-ром эритроцитов добавлением гемолизирующего реактива
- Наибольшая подвижность – НвН, затем НвА и НвС
- НвS – остается в области нанесения
- Если НвF выше 7%, он может сливаться с гликированным Нв



В кислой среде НвС смещается к аноду.

Электрофореграммы гемолизата при гемоглобинопатиях

- Электрофорез гемолизата нормального и содержащего HbS
- Электрофорез гемолизата нормального и содержащего HbC

Электрофореграммы гемолизата

- Электрофорез гемолизата нормального содержащего около 1% HbF
- Электрофорез гемолизата нормального содержащего около 6% HbF

Электрофореграммы гемолизата

Гликированный гемоглобин

- Гликированный Hb имеет большую катодную подвижность

Гликированный гемоглобин

- ***Ложно высокий уровень :***
 - присутствие патологических форм Hb
 - при кровопотере в связи с большим содержанием молодых эритроцитов
 - при увеличении продолжительности жизни эритроцитов
(гемолитическая анемия, полицитемии, спленэктомия)

Изоферменты сыворотки крови

- ЛДГ
 - ЛДГ₁ – 16-30%
 - ЛДГ₂ – 30-40%
 - ЛДГ₃ – 20-26%
 - ЛДГ₄ – 6-12%
 - ЛДГ₅ – 3-6%

Изоферменты ЛДГ

Изофермент	Органы/ткани
ЛДГ ₁ , ЛДГ ₂	Миокард, эритроциты, почки
ЛДГ ₃	Селезенка, легкие, лимфоузлы, тромбоциты
ЛДГ ₄ , ЛДГ ₅	Печень, скелетные мышцы

- Изоферменты ЛДГ сыворотки крови

Изоферменты ЛДГ

- ОИМ
 - Соотношение $\text{ЛДГ}_1 / \text{ЛДГ}_2 > 1$ (в норме - < 1)
 - Активность ЛДГ_1 возрастает не ранее суток, в 2 и более раз
 - На долю ЛДГ_1 при обширном инфаркте приходится $> 45\%$ общей активности

Изоферменты ЛДГ

- Миопатия
- Повышается активность ЛДГ₄ и ЛДГ₅

Изоферменты ЛДГ

- Заболевания печени
- Выраженное повышение активности ЛДГ (до 10 раз)
- Увеличение за счет фракций ЛДГ₄ и ЛДГ₅

Изоферменты ЛДГ

- Использовать свежесобранные образцы сыворотки или плазмы крови.
- Можно использовать сыворотку, хранившуюся при t 15-30° не более недели
- Нельзя замораживать
- Нельзя использовать гемолизированную сыворотку

Изменение активности ЛДГ и ее фракций

Изменение активности ЛДГ и ее фракций

Щелочная фосфатаза

- **Печеночная** – 2 изоформы (L_1 и L_2),
- L_1 содержится в большом количестве повышается при холестазах, циррозе, вирусном гепатите, метастазах опухолей легких, ЖКТ, лимфомы в печень, большая анодная подвижность
- L_2 (макропеченочная, быстрая), присутствует в меньшем количестве. Повышается при холестазах, при заболеваниях, сопровождающихся желтухой (цирроз, вирусный гепатит, опухолях молочной железы, простаты, легких с метастазами в печень)

Щелочная фосфатаза

- **Костная** (В) – секретируется остеобластами, участвует в образовании костного матрикса. Повышается при опухолях молочной железы с метастазами в кости и печень, остеосаркоме, лимфоме, ревматических заболеваниях, гиперфункции паращитовидных желез, рахите
- Активность выше у детей и подростков

Щелочная фосфатаза

- Кишечная (I) около 40% общей активности. Повышается при циррозе, диабете, ХПН
- Плацентарная (P) появляется при беременности, максимум – в третьем триместре, бывает при первичном раке яичника, желудка, поджелудочной железы, саркоме и у курильщиков

К рис 25 изо ЩФ

- +

- При электрофорезе получают:
 - печеночная (L_1)+костная (В)+плацентарная (Р)
 - печеночная (L_2)
 - кишечные
 - плацентарная

Для улучшения разделения образцы обрабатывают (нейроминидаза, антисыворотки, селективные ингибиторы)

Изоферменты ЩФ

- +26-с 44

Лектин – связывает
сиаловые кислоты,
входящие в состав ЩФ,
замедляет подвижность

При проведении анализа
образец наносится
дважды – один проходит
через лектин.

Подвижность
образовавшихся
комплексов с лектином
снижается

Изоферменты ЩФ

- Изоферменты ЩФ больных с ХПН, находящихся на программном гемодиализе
- +
- 27,28

Подвижность изоферментов щелочной фосфатазы

Креатинкиназа

+

- Находится в скелетных мышцах, миокарде, мозге
- Локализована в цитоплазме (40-45%), митохондриях (20-40%), 15-25% связана с миофибриллами, ЭР
- Изоферменты
- КК-ММ – 97-100%
- КК-МВ - 0-3% при активности 15-500 Е/л
- 0-4% при активности <500 Е/л
- КК-ВВ – 0%

Электрофорез изоферментов креатинкиназы сыворотки крови

- 30 31

Белки ликвора

- Содержание белка – 0,15-0,35 г/л
- 20% белков продуцируется клетками ЦНС, 80% - попадает из крови
- Через ГЭБ проходят в основном белки с небольшой молекулярной массой (альбумин, преальбумин, трансферрин), иммуноглобулинов – не более 3-5%
- СМЖ необходимо сконцентрировать
- При сравнении белкового спектра сыворотки крови и ликвора образцы нужно получить с интервалом не более 6 часов
- Сыворотку развести, чтобы концентрация белка стала одинаковой

Электрофорез белков ликвора

- 32

- Альбумин- основная фракция
- α -глобулины содержатся в небольшом количестве
- β -глобулины – содержат трансферрин
- γ -глобулины – широкая, но слабо окрашенная полоса

Электрофореграмма
концентрированной СМЖ и
сыворотки крови

Электрофорез белков мочи

- **Разделение в соответствии с электрофоретической подвижностью** – не пригоден для характеристики протеинурии (подвижность α_1 -микроглобулина = подвижности орозомукоида, и т.д.)
- **Разделение в соответствии с молекулярной массой** – позволяет разделить белки низкомолекулярные (<67 кДа) – канальцевого происхождения и высокомолекулярные – (>67 кДа) – преимущественно клубочковые
- Метод основан на взаимодействии белков с детергентом додецилсульфатом натрия (SDS). В этих комплексах все белки приобретают одну и ту же конформацию и одинаковый отрицательный заряд на единицу массы. Разделение зависит только от молекулярной массы

Схема расположения белков при электрофорезе мочи

- 41

- 42

Электрофорез мочи в SDS-агарозе

Электрофореграмма в SDS-геле белков мочи и белков с известной молекулярной массой

- 43

Физиологическая протеинурия

- 44
 - За сутки до 150 мг белка
 - Четкая полоса альбумина, неразделенные фракции глобулинов

Преренальная протеинурия

- 45
- Следствие увеличения содержания низкомолекулярных белков (массивный лизис клеток)

С добавлением
SDS

Гломерулярная протеинурия

- 45
- Повреждение клубочков почки, через почечный барьер проходят белки с Мм >67 кДа

Селективная гломерулярная протеинурия

- 47
 - Развивается при изменении заряда на гломерулярной мембране
 - Проходят белки средние белки – альбумин и трансферрин

С добавлением
SDS

Неселективная гломерулярная протеинурия

- 48
 - Увеличены размеры пор в мембране
 - В мочу проходят белки с Мм до 100 кДа
 - Электрофореграмма мочи сходна с электрофореграммой сыворотки крови

Канальцевая протеинурия

- 49
 - Патологические изменения в канальцах
 - Нарушена реабсорбция белков из первичной мочи
 - Выводятся белки с Мм менее 40 кДа
 - Доля альбумина < 40%

Канальцевая протеинурия

- 50

Смешанная протеинурия

- 51

- 52

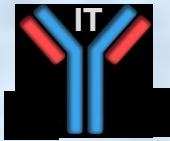
Появляются белки , характерные как для клубочковой, так и для канальцевой формы

Постренальная протеинурия

- 53
- Попадают в мочу из мочевого пузыря и уретры
- Похожа на гломерулярную протеинурию
- Дифференцировать по белкам с высокой молекулярной массой (- α_2 - макроглобулин отсутствует при гломерулярной, но появляется при постренальной протеинурии)

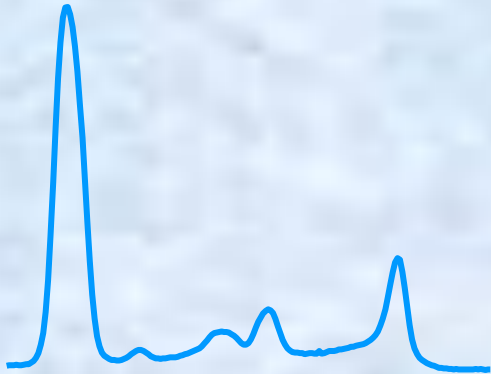
Иммунофиксация

- Иммунофиксация – качественный метод, позволяющий установить природу моноклонального компонента
- Методы определения – гелевый электрофорез на агарозе и капиллярный (иммунозамещение)
- Дополнительные полосы, которые обнаруживаются в гамма зонах, могут соответствовать моноклональным белкам, что указывает на наличие гаммапатий.
- В основе идентификации лежит реакция образования комплекса антиген-антитело, при добавлении к сыворотке пациента моноспецифических антител к IgG, IgM, IgA, к κ и λ -легким цепям.



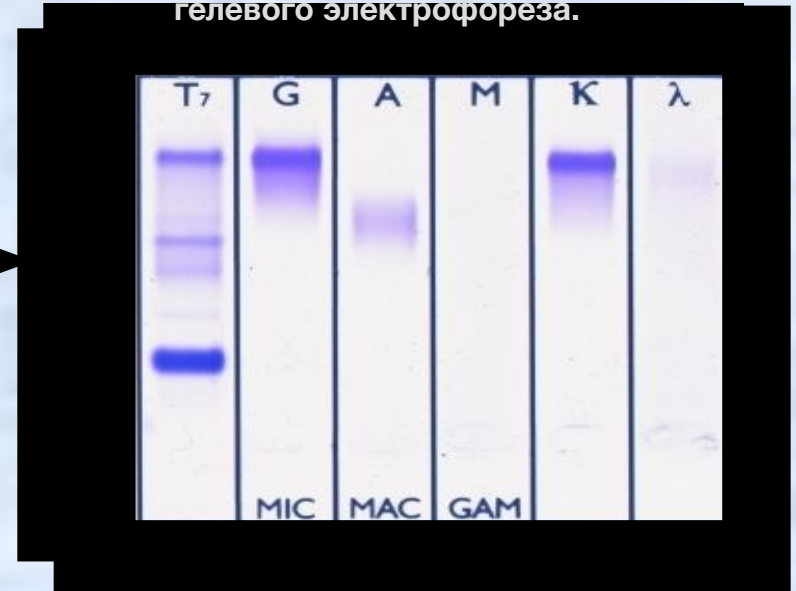
Иммунофиксация в гелевом электрофорезе

Выявление моноклональных гаммапатий



IgG κ

Выделение и выявление моноклональных гаммапатий методом гелевого электрофореза.



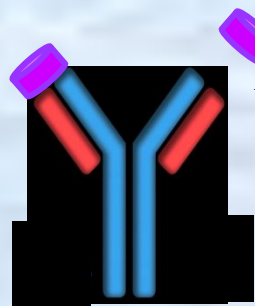
На агарозном геле разделение белков IFE в сыворотке происходит в соответствии с их зарядом. Затем белки инкубируют с моноклональными антисыворотками, промывают и окрашивают, проявившиеся иммунопреципитаты качественно интерпретируют.



Иммунотипирование в капиллярном электрофорезе

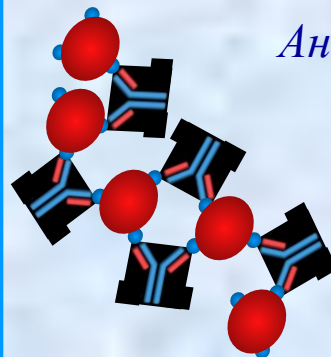
Выявление моноклональных гаммапатий

1.



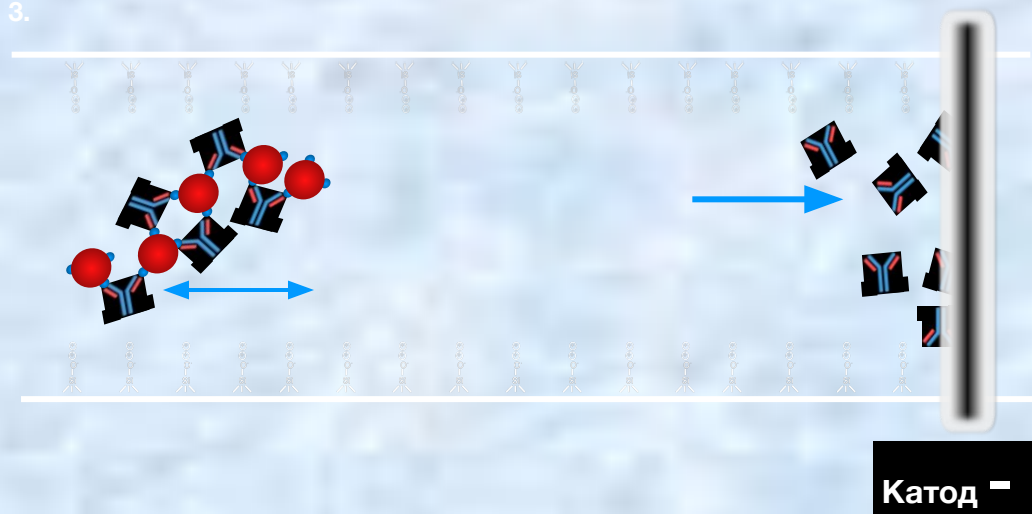
Антисыворотка добавляется непосредственно к пробе. Если есть антитела, то происходит образование комплекса Антиген-Антитело.

2.



Антисыворотка передвигается по капилляру к катоду в соответствии с зарядом. Электрофоретическая подвижность комплекса Антиген-Антитело, значительно ниже.

3.



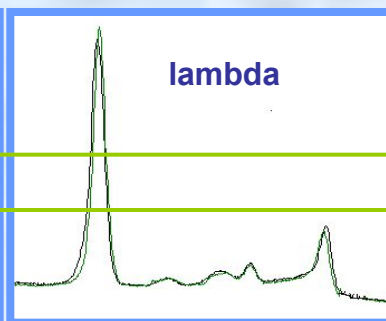
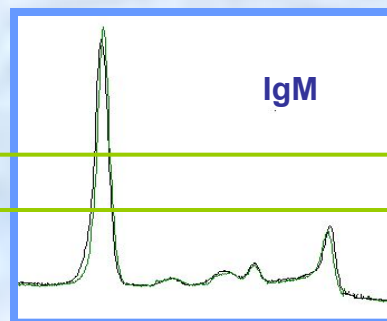
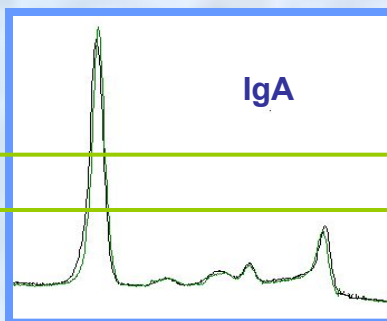
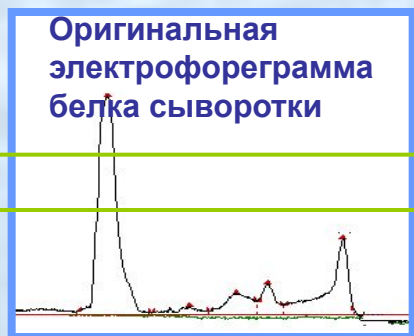
Комплекс антисыворотка-антитело детектируется при прохождении от анода к катоду. Моноклоны удаляются (замещаются) из электрофореграммы.



Иммунотипирование в капиллярном электрофорезе

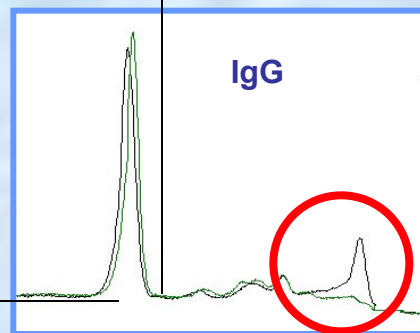
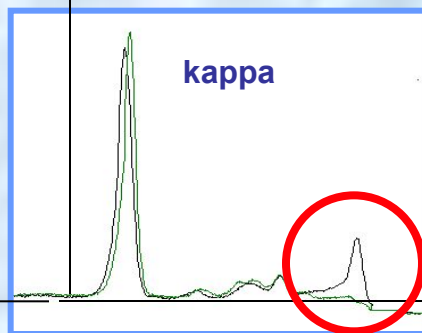
Выявление моноклональных гаммапатий

При иммунотипировании происходит наложение электрофореграммы с добавлением антисыворотки на электрофореграмму без добавления антисыворотки.



При наложении электрофореграмм, после добавления трех антисывороток, происходит почти полное совпадение контура без исчезновения пика в области гамма-зоны.

Из-за удаления (замещения) гамма глобулинов в течении проведения капиллярного электрофореза два наложения на оригинальную электрофореграмму будут показывать исчезновение пика из области гамма-зоны, т.е. комплекс Ag-Ат будет перемещен в другую не видимую нами зону.



Можно сделать следующий вывод:
IgG kappa

СНАГОВО ЗАБРАНИТЕ

BIO-RAD

POWER PAC 1000

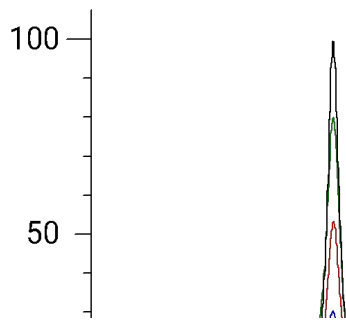




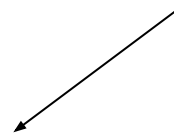


Определение фракций белков в моче (примеры)

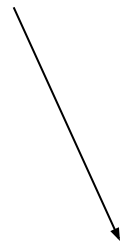
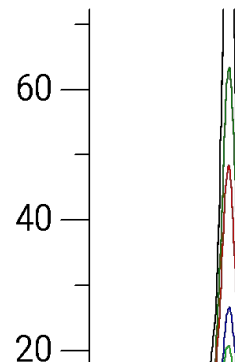
- Определение фракций белков в моче должно проводиться после концентрирования и обессоливания образца
- Метод валидирован проф. Mussap, Genoa ITALY.

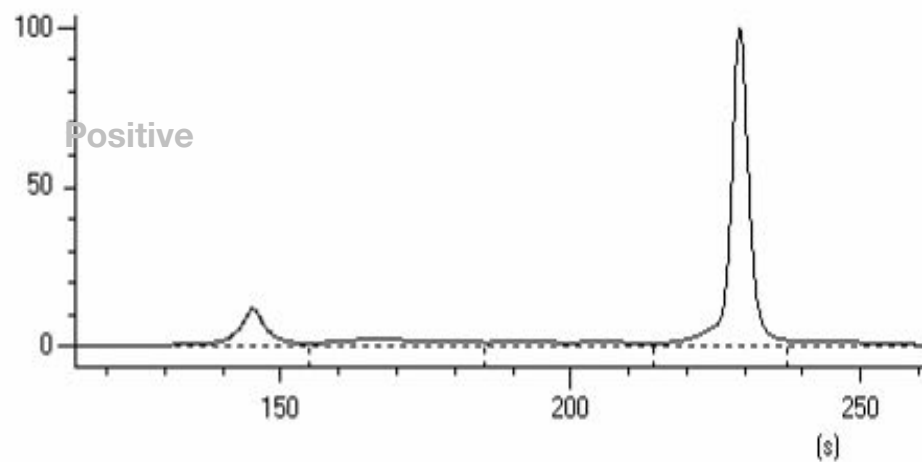
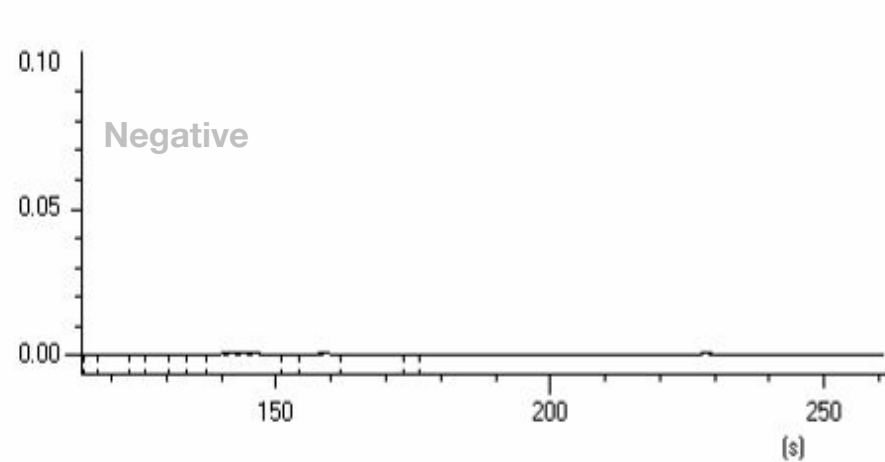


Чувствительность центрифужного метода 20mg/L

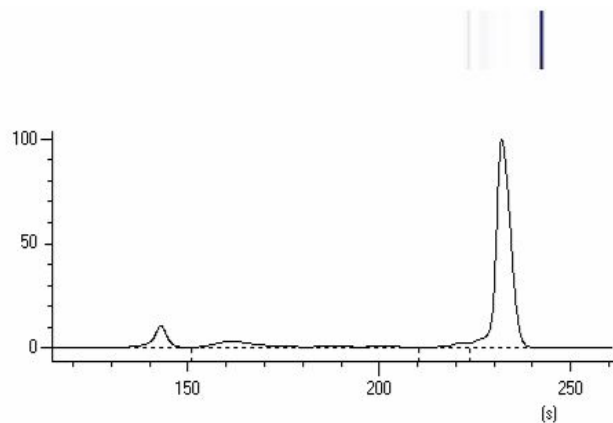


Чувствительность колоночного метода 20mg/L



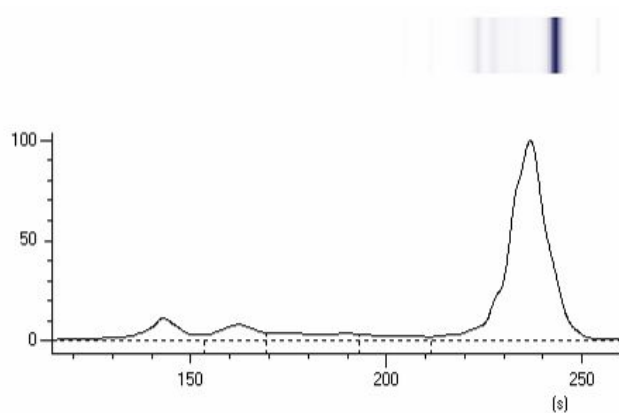


Определение фракций белков в моче (примеры)



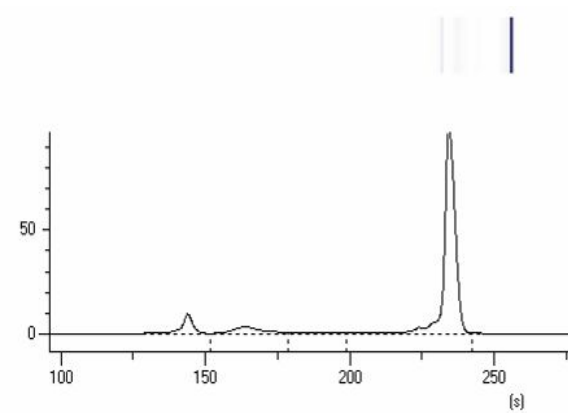
1	Band 1	9.62%
2	Band 2	11.47%
3	Band 3	2.65%
4	Band 4	76.25%

Total



1	Albumina	11.38%
2	Alfa 1	5.80%
3	Alfa 2	5.33%
4	Beta	2.98%
5	Gamma	74.51%

Total



1	Albumina	9.07%
2	Alfa 1	7.81%
3	Beta	2.38%
4	Beta	79.71%
5	Gamma	1.04%

Total

5