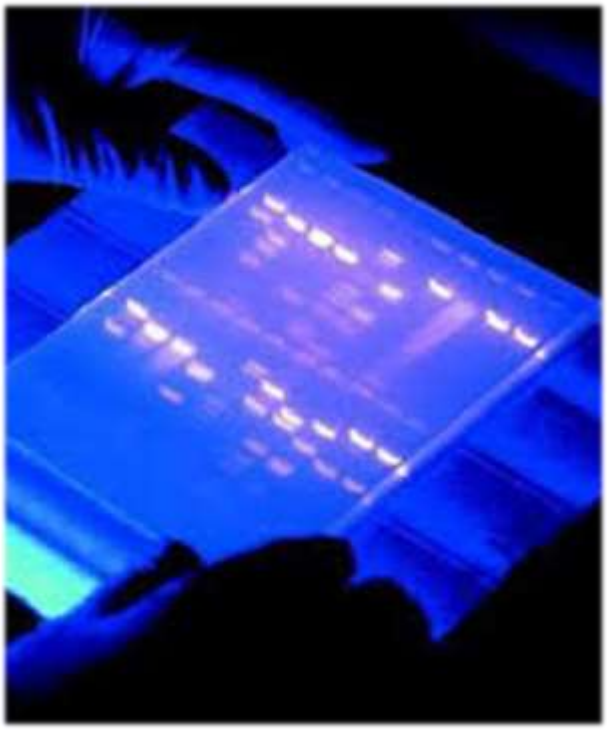
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГУ «РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР РАДИАЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ И ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»

Д.В. Горбачева

Электрофоретическое исследование белков в лабораторной практике

Практическое пособие для врачей



Гомель, ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2020

УДК 616.153.96-076(075.8)

Составитель: Д.В. Горбачева, врач лабораторной диагностики клинико-диагностической лаборатории государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

Рецензенты:
И.А. Новикова, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии УО «Гомельский государственный медицинский университет», доктор медицинских наук, профессор
Т.С. Петренко, врач лабораторной диагностики отделения трансфузиологии У «Гомельская областная клиническая больница», кандидат медицинских наук, доцент
А.А. Кудря, врач лабораторной диагностики лаборатории клеточных технологий ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

Горбачева Д.В.
Электрофоретическое исследование белков в лабораторной практике / Д.В. Горбачева, – Гомель: ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2020. – 42 с.

В практическом пособии дана общая характеристика проведения метода электрофореза, перечислены основные виды и их клинико-диагностическое значение. Описаны характеристики и причины изменений белковых фракций на электрофореграммах. Даны рекомендации по преаналитическому этапу. Пособие предназначено для врачей лабораторной диагностики, врачей всех клинических специальностей, слушателей курсов системы последипломного медицинского образования.

Рекомендовано к изданию на заседании Ученого совета ГУ «РНПЦ РМиЭЧ»
протокол № __ от _____2020 г.

© Составитель: Горбачева Д.В.
© ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2020

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

ЛП	Липопротеин
ЛПВП	Липопротеины высокой плотности
ЛПНП	Липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	Липопротеины очень низкой плотности
СРБ	С-реактивный белок
КК	Креатинфосфокиназа
ЛДГ	Лактатдегидрогеназа
ЩФ	Щелочная фосфатаза

СОДЕРЖАНИЕ

Введение 5

Электрофорез белков 6

Альбумин 9

α_1-глобулины 13

α_2-глобулины 14

β-глобулины 16

γ-глобулины 20

Основные типы протеинограмм 25

Основные виды электрофореза, используемые в клинической практике 27

Электрофорез с иммунофиксацией 31

Автоматические системы для электрофореза с иммунофиксацией 35

Применение электрофореза в клинической диагностике 37

Преаналитический этап 38

Ошибки при электрофорезе 40

Список использованной литературы 42

Введение

Современная диагностика в любой области медицины основана на высоком уровне технического обеспечения исследований, включаемых в сложный цикл клинического обследования. Повышение доступности и информативности различных лабораторных тестов при минимальных затратах является приоритетом в развитии клинико-диагностических лабораторий.

Аналитические методы, основанные на предложенном Тиселиусом в 1937 году принципе электрофореза, представляют все увеличивающуюся область диагностических исследований, проводимых в клинических лабораториях. Однако, из-за недостаточной осведомленности врачей о современных возможностях данного метода его значимость в диагностическом процессе еще не полностью оценена.

Принципиальной основой всех электрофоретических методов является тот факт, что находящиеся в растворе молекулы, располагающие электрическим зарядом, под действием сил электрического поля смещаются в сторону противоположно заряженного электрода.

Электрофорез как биохимический метод — очень мощное приспособление для оценки широкого спектра жизненных процессов. Он предполагает огромную диагностическую информацию, особенно когда исследование дополняется такими высокоспецифичными тестами как иммуноэлектрофорез, количественная оценка иммуноглобулинов и других специфических протеинов, Т- и В-лимфоцитов и стадий трансформации лимфобластов.

Наибольшая популярность до настоящего времени принадлежит электрофорезу белков как одному из наиболее информативных лабораторных тестов. Практически все физиологические и патофизиологические реакции в организме происходят при непосредственном участии белков. Электрофорез позволяет изучать их биологические и физические характеристики, являясь

индикатором заболеваний печени и почек, иммунной системы, злокачественной патологии, острых и хронических инфекций, генетических поломок, заболеваний центральной нервной системы и многих других видов патологии.

В последние годы все большую диагностическую значимость приобретает электрофорез с иммунофиксацией. Это один из современнейших методов в клинической лаборатории для получения характеристик моноклональных иммуноглобулинов.

В целом использование современных электрофоретических анализаторов позволяет с высокой точностью и минимальными затратами исследовать широчайший спектр биохимических параметров с целью уточнения диагноза, мониторинга патологического процесса и обоснования методов терапии заболеваний.

1. Электрофорез белков

Плазма крови содержит большое количество белков, различающихся между собой по структуре, физико-химическим свойствам, функции. Сыворотка крови отличается от плазмы отсутствием фибриногена и некоторых минорных белков каскада свертывания (протромбин, фактор Виллебранда, факторы V, VIII и другие).

Электрофорез белков (Serum Protein Electrophoresis, SPE) — это способ разделения смеси белков на фракции или индивидуальные белки с помощью электрического тока в проводящей среде в зависимости от их размера и заряда.

Заряд различных белков в растворах с одинаковым pH зависит от аминокислотного состава, так как диссоциация белковых цепей приводит к образованию групп, имеющих положительный или отрицательный заряд. Под влиянием сил электрического поля компоненты разгоняемой системы

распределяются согласно их заряду, приобретая соответствующую скорость движения, т.е. происходит электрофоретическое разделение.

Внедрение электрофоретических «носителей» привело к улучшению технологий и одновременно к упрощению фракционирования. В качестве «носителей» используются фильтровальная бумага, целлюлоза, ацетат целлюлозы, различные гели (полиакриламид), агароза и др. При этом во время элекрофореза, наряду с разделением частиц согласно их зарядам, вступает в силу так называемый «молекулярно ситовой эффект», когда гелевая структура ведет себя по отношению к ионам как фильтр. Ионы, превышающие ее пористость не проходят или проходят очень медленно, а более мелкие ионы быстрее проникают через поры медиума. Таким образом, скорость передвижения зависит не только от заряда иона, но и от величины пор геля, формы пор, величины движущихся ионов, взаимодействия между матрицей геля и движущимися ионами (адсорбция и др.).

Процесс электрофоретического исследования белков сыворотки крови включает следующие стадии:

1. проведение электрофореза
2. фиксация
3. окраска
4. отмывка
5. сканирование

Далее следует этап анализа и интерпретации результатов исследования.

Количественная оценка соотношений фракций белков осуществляется с помощью прямой денситометрии. Денситометрия состоит в сканировании просветленных, окрашенных и зафиксированных полос носителя. Результаты выражаются в графической форме череды пиков и в цифровой форме процентных соотношений.

Материалом для исследования является сыворотка крови. Используя ацетат целлюлозу, можно разделить сывороточные белки на 5 фракций (Таблица 1, Рисунок 1).

Наиболее гомогенной является фракция альбумина, почти исключительно состоящая из этого доминантного белка сыворотки крови. В составе других электрофоретических фракций содержится несколько индивидуальных белков, обладающих близким электрическим зарядом и, соответственно, одинаковой электрофоретической подвижностью.

Таблица 1. Белковые фракции

Фракция	**Доминантные белки**	**Минорные белки**
Альбуминовая	альбумин	преальбумин
Альфа1-глобулины	α_1-липопротеин(ЛПВП) α_1-антитрипсин	α_1-антихимотрипсин орозомукоид
Апьфа2-глобулины	α_2-макроглобулин гаптоглобин церулоплазмин Gc-глобулин	гемопексин антитромбин III ингибитор С1-эстеразы СРВ
Бета-глобулины	трансферрин С3-комплемент β-липопротеин (ЛПНП)	С4-комплемент β2-микроглобулин
Гамма-глобулины	IgG IgA IgM	IgD IgE легкие цепи lg

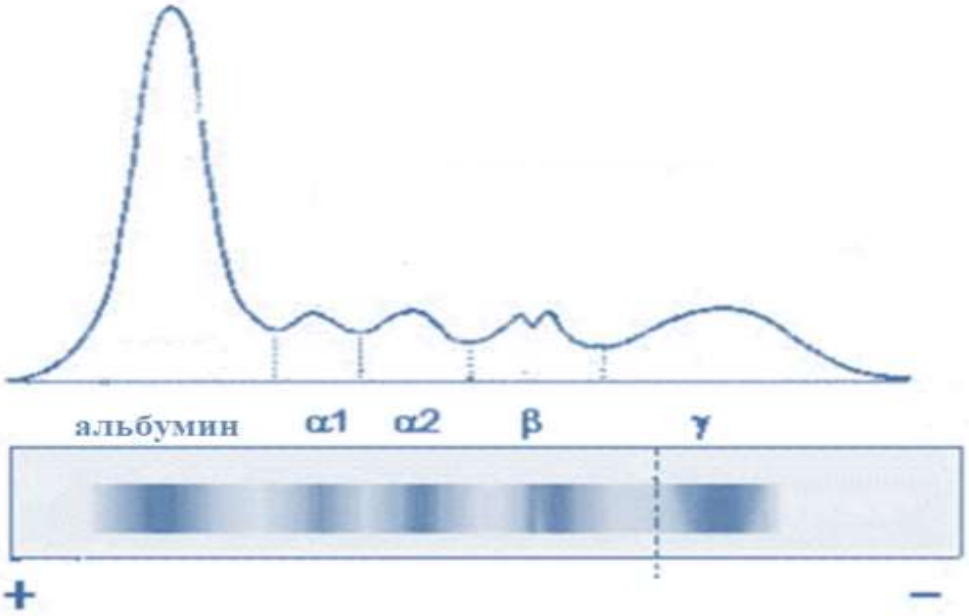


Рисунок 1. Электрофореграмма белков крови

Значение электрофореза заключается в обнаружении аномалий белкового профиля:

- ✓ Количественные аномалии: увеличение или уменьшение отдельных фракций.
- ✓ Качественные аномалии: наличие аномальных фракций.

Соотношение отдельных фракций белков сыворотки крови здоровых лиц может незначительно различаться в зависимости от возраста, но практически не зависит от пола. Заметные отличия могут быть выявлены у беременных и женщин, принимающих оральные контрацептивы.

1.1. Альбумин

Альбумин — белок, синтезируемый печенью. На долю альбумина приходится 55-60% белка в сыворотке крови. Основные функции альбумина: транспорт, поддержание постоянства коллоидно-осмотического давления и обеспечение клеток аминокислотами. При гипоальбуминемии снижается

онкотическое давление плазмы, жидкость не возвращается в кровеносное русло, по такому принципу развиваются белковые («голодные») отеки.

Время полужизни альбумина в плазме составляет 15-20 суток, поэтому даже полное прекращение синтеза альбумина печенью не должно сопровождаться значительным его снижением в сыворотке крови на протяжении 3-4 суток. В острых ситуациях гнпоальбуминемия наблюдается при потере альбумина с мочой или при пропотевании вместе с жидкостью в ткани и полости.

Неблагоприятна пониженная концентрация альбумина, особенно тяжелый прогноз у больных с хроническими заболеваниями печени. Для них повышение концентрации альбумина после гипоальбуминемии указывает на успешное лечение.

Значение альбумина в крови:

- ✓ поддержание коллоидно-осмотического давления;
- ✓ богатый и быстро реализуемый резерв белка;
- ✓ транспортная функция – связывание и перенос длинноцепочечных жирных кислот – основная физиологическая функция сывороточного альбумина.

Изменения фракции альбумина

Бисальбуминемия — изменение электрофореграммы, при котором выявляется двойная полоса в зоне альбумина—ближе к катоду или переходная полоса или мутное пятно, опережающее нормальный альбумин (Рисунок 2).

Наследственная мутация (врожденная) клинически не проявляется.

Приобретенная (транзиторная):

- ✓ при приеме беталактамных антибиотиков. Причина — высокие дозы у больных с почечной недостаточностью. На электрофореграмме проявляется как 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.

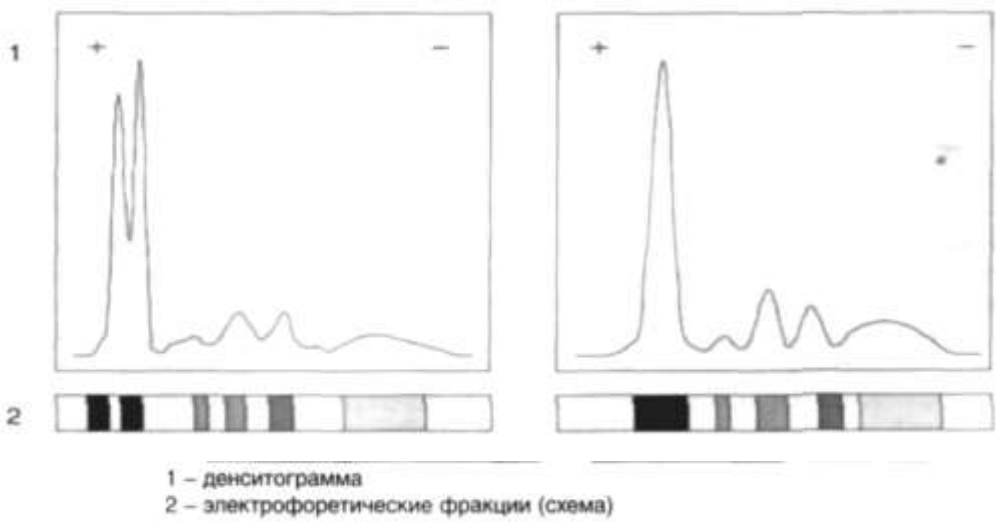


Рисунок 2. Электрофореграмма сыворотки крови при бисальбуминемии (слева) и здорового человека (справа).

Анальбуминемия — врожденная патология, которая встречается крайне редко и проявляется на элсктрофореграмме слабо выраженной полосой в зоне альбумина (Рисунок 3).

Обычно анальбуминемия сочетается с гиперглобулинемией, которая носит компенсаторный характер и в условиях дефицита альбумина обеспечивает, насколько это возможно, поддержание осмотического давления. Клинически анальбуминемия проявляется отеками, либо никак не проявляется.

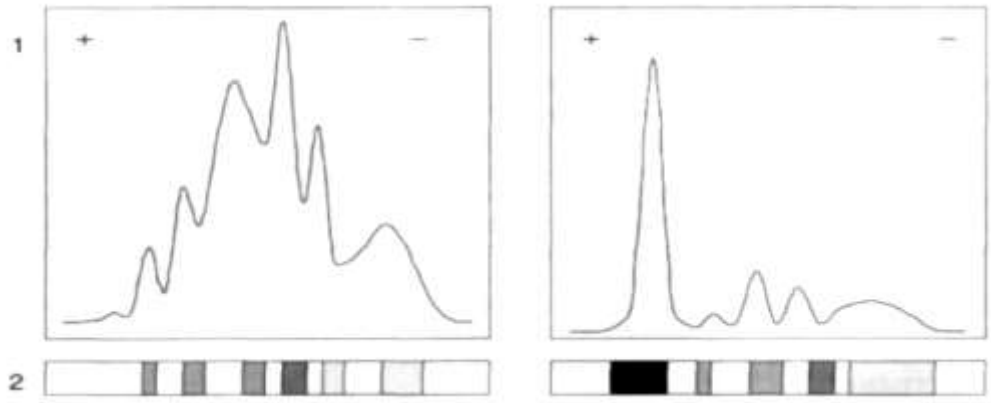


Рисунок 3. Электрофореграмма сыворотки крови при анальбуминемии (слева) и здорового человека (справа). 1- денситограмма, 2 – электрофоретические фракции (схема).

Гипоальбуминемия — снижение содержания фракции альбумина. Может быть обусловлено следующими причинами:

- ✓ нарушением питания, недостаточным поступлением белка с пищей;
- ✓ нарушением всасывания в желудочно-кишечном тракте;
- ✓ нарушением синтеза белка, связанным с повреждением гепатоцитов (при циррозах, гепатитах), при воспалительных заболеваниях. Уменьшение синтеза альбумина при воспалении происходит компенсаторно, за счет быстрого усиления продукции острофазных белков;
- ✓ потерей белка с мочой (при нефротическом синдроме), через желудочно-кишечный тракт, через кожные покровы. При ожоговой болезни — вследствие потери жидкости, изменении сосудистой проницаемости, угнетении синтеза;
- ✓ при повышенном катаболизме белков, который может иметь место при эндокринных (тиреотоксикоз, синдром Иценко-Кушинга) и воспалительных заболеваниях.

Гиперальбуминемия — повышение содержания фракции альбумина. Может иметь место у здоровых лиц. Связано это, как правило, с

гемоконцентрацией вследствие потери организмом значительного количества жидкости.

У больных гипераль буминемия может выявляться после внутривенного введения растворов альбумина.

Следует учитывать, что гипераль буминемия может быть артефактом, в частности, при взятии венозной крови в момент стаза.

1.2. α_1-глобулины

Уменьшение содержания фракции α_1-глобулинов может происходить в тех же случаях, которые приводят к гипоальбуминемии:

- ✓ при заболеваниях печени в результате нарушения синтеза белков;
- ✓ при массивных кровопотерях;
- ✓ при нарушениях питания.

Избирательное уменьшение интенсивности зоны α_1-глобулинов может быть обусловлено врожденным дефицитом белка α_1-антитрипснна (α_1-ингибитора протеиназ), одного из главных компонентов этой зоны (Рисунок 4).

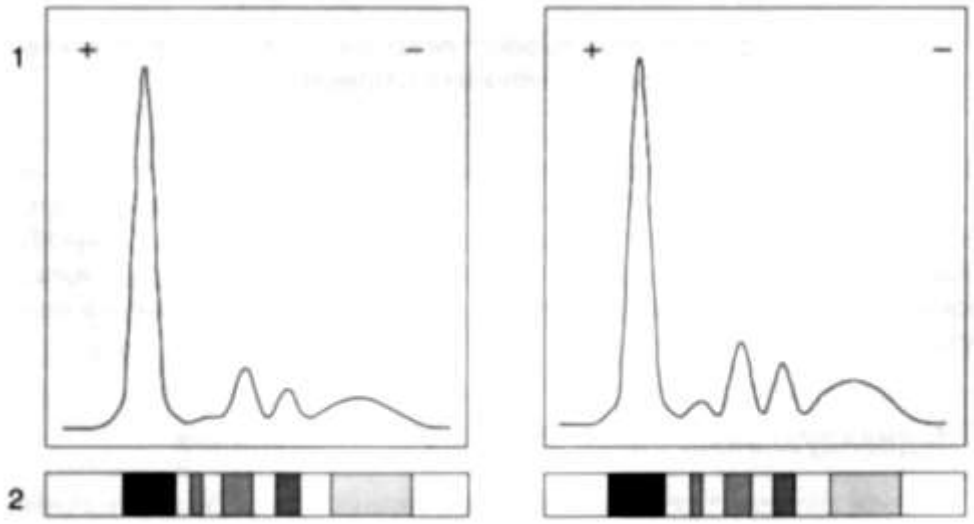


Рисунок 4. Электрофореграмма сыворотки крови при дефиците трипсина (слева) и здорового человека (справа). 1- денситограмма, 2 – электрофоретические фракции (схема).

Незначительное уменьшение или гетерогенность фракции α_1-глобулинов связаны с гетерозиготной, более выраженные — с гомозиготной недостаточностью. Дефицит α_1-антитрипсина у детей сопровождается печеночной патологией, а у взрослых — заболеваниями легких.

Увеличение интенсивности фракции α_1-глобулинов (Рисунок 5) преимущественно связано с острыми воспалительными заболеваниями.

Обычно эти заболевания также сопровождаются увеличением фракции α_2-глобулинов. Подобные изменения электрофореграммы обусловлены повышением концентрации в сыворотке крови острофазных белков, таких как орозомукоид и α_1-антитрипсин, которые локализуются в зоне α_1-глобулинов, и гаптоглобина, расположенного в зоне α_2-глобулинов.

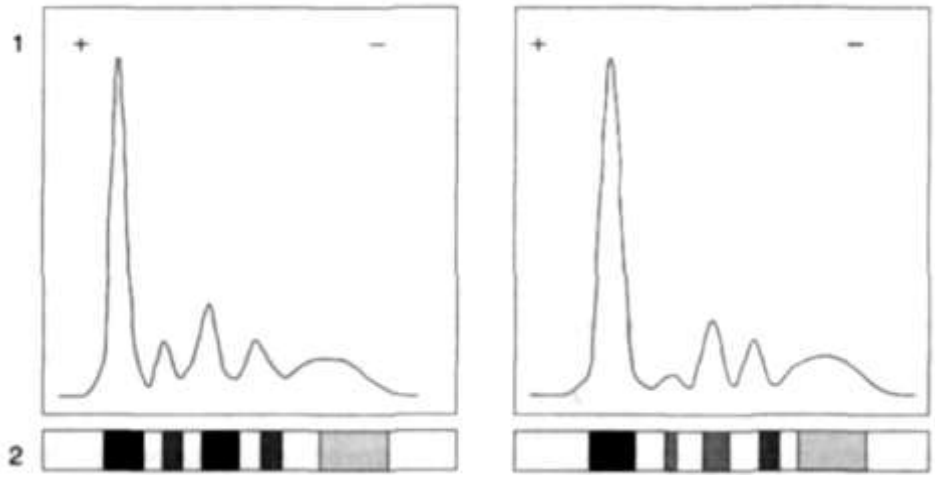


Рисунок 5. Электрофореграмма сыворотки крови
при остром воспалительном синдроме (слева) и у здорового человека (справа).1- денситограмма, 2 – электрофоретические фракции (схема).

1.3. α_2-глобулины

При появлении двойной полосы в зоне α_2-глобулинов необходимо убедиться, что этот эффект не связан с гемолизом. Если гемолиз исключен,

дополнительный пик в зоне α_2-глобулинов может быть образован следующими компонентами:

- ✓ разными фенотипическими вариантами гаптоглобина. Электрофоретическая подвижность фенотипов гаптоглобина 1-1 и 2-2 отличается от таковой у обычного (1-2) гаптоглобина;
- ✓ свободными легкими цепями иммуноглобулинов, обладающими подвижностью α_2-глобулинов;
- ✓ реже — β-липопротеидом, имеющим аномальную подвижность α_2-глобулина.

Большей частью *уменьшение зоны α_2-глобулинов* связано с:

- ✓ снижением поступления белка в организм в результате нарушения питания или всасывания в желудочно-кишечном тракте;
- ✓ снижением синтеза белка при гепатоцеллюлярной недостаточности;
- ✓ значительной потерей белка;
- ✓ с внутрисосудистым гемолизом, при котором происходит снижение уровня гаптоглобина, обладающего подвижностью α_2-глобулинов.

Этот эффект, связанный с уменьшением концентрации гаптоглобина, особенно выражен на электрофореграмме в условиях воспалительного синдрома, когда наблюдается несоответствие между значительным увеличением α_1-зоны и снижением интенсивности α_2-зоны.

Увеличение содержания фракции α_2-глобулинов в основном бывает связано с увеличением содержания двух основных белков, мигрирующих в α_2-зону, — гаптоглобина и α_2-макроглобулина, и наблюдается при заболеваниях, сопровождающихся следующими синдромами:

- ✓ воспалением с повышением содержания острофазных белков, к которым относятся гаптоглобин (относительное содержание фракции α_2-глобулинов может увеличиваться на 15%), а также орозомукоид и α_1-антитрипсин, при этом увеличивается также зона α_1-глобулинов;

- ✓ нефротическим синдромом, из-за существенного увеличения концентрации α_2-макроглобулина (Рисунок 6). В условиях потери с мочой низкомолекулярных белков и альбумина, повышение содержания в сыворотке крови и α_2-макроглобулина и других высокомолекулярных белков носит компенсаторный характер. Увеличение содержания α_2-глобулинов при нефротическом синдроме обычно сочетается с другими нарушениями белкового спектра:
  - — гипопротеинемией, гипоальбуминемией, из-за потери белков с мочой;
  - — гипер-β-глобулинемией, из-за повышения уровня апоВ-липопротеина;
  - — гипо-γ-глобулинемией, развивающейся преимущественно при липоидном нефрозе;
  - — массивной протеинурией.
  - —

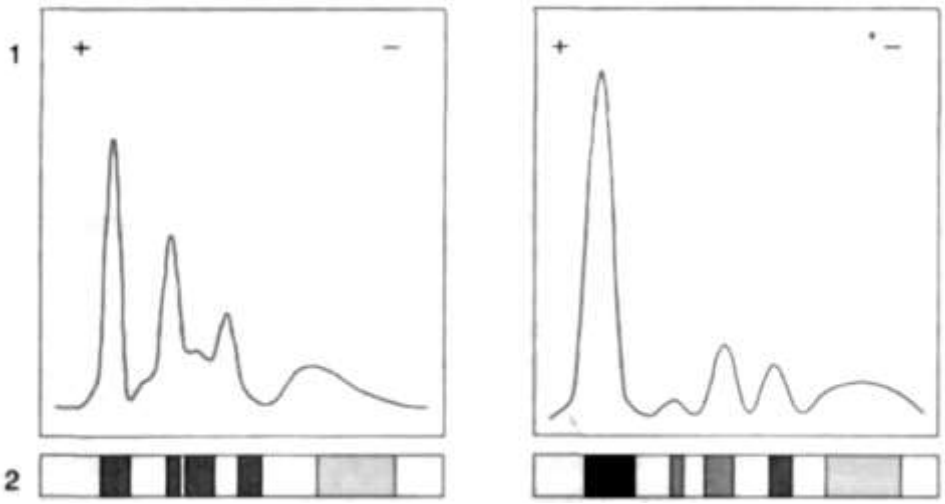


Рисунок 6. Электрофореграмма сыворотки крови
при нефротическом синдроме (слева) и здорового человека (справа).
1- денситограмма, 2 – электрофоретические фракции (схема).

1.4. β-глобулины

Уменьшение интенсивности зоны β-глобулинов может выявляться:

- ✓ при гепатоцеллюлярной недостаточности, потере белка, дефиците или нарушениях питания. Преимущественно связано со снижением уровня трансферрина, обладающего подвижностью β_1-глобулинов;
- ✓ при дефиците С3-компонента комплемента, который локализуется в β_2-зоне. Среди всех компонентов комплемента, С3-компонент содержится в сыворотке крови здорового человека в наибольшей концентрации, достаточной для того, чтобы ее изменения влияли на содержание соответствующей электрофоретической фракции белков сыворотки. Врожденный дефицит С3-компонента комплемента встречается только в педиатрической практике, поскольку пациенты с этой патологией погибают в детском возрасте. Большинство случаев связано с повышенным потреблением С3-компонента комплемента.

Важно помнить, что отсутствие или ослабление полосы в β_2-зоне часто обнаруживается при использовании для электрофореза несвежей сыворотки и в таком случае не является признаком патологии. Этот эффект в значительной мере связан с изменениями, которым подвергаются белки системы комплемента при хранении сыворотки крови: образуются продукты активации (такие как С3а, С3в, С3с и др.). Конверсия компонентов комплемента, особенно С3- и С4-компонентов, является важнейшим биологическим и лабораторным феноменом. Она может иметь диагностическое значение, если содержание продуктов активации повышено в свежих образцах сыворотки крови и является признаком иммунопатологических процессов (активации комплемента), происходящих в организме. В то же время, образование продуктов активации комплемента уже «in vitro», если период от взятия крови до исследования достаточно продолжителен, может быть источником лабораторной ошибки или неадекватной интерпретации результатов.

Умеренно выраженное увеличение содержания фракции β-глобулинов, не связанное с появлением моноклональных фракций, обычно наблюдается в следующих ситуациях:

- ✓ гипер-β-глобулинемия при железодефицитной анемии вследствие увеличения содержания трансферрина (Рисунок 7);
- ✓ при увеличении уровня аполипопротеина-В;
- ✓ в гемолизированных сыворотках, за счет гемоглобина;
- ✓ гипер-β_2-глобулинемия, обусловленная повышением уровня С3-компонента комплемента, что может быть признаком воспаления, а также иметь место при обструкции как внутри печеночных, так и внепеченочных желчевыводящих протоков. При указанных состояниях происходит снижение катаболизма С3-комплемента клетками Купфера;
- ✓ усиление интенсивности β-зоны со снижением пика β-глобулинов и слиянием β- и γ-фракций в результате увеличения содержания поликлонального IgA характерно для алкогольного цирроза печени (Рисунок 8).

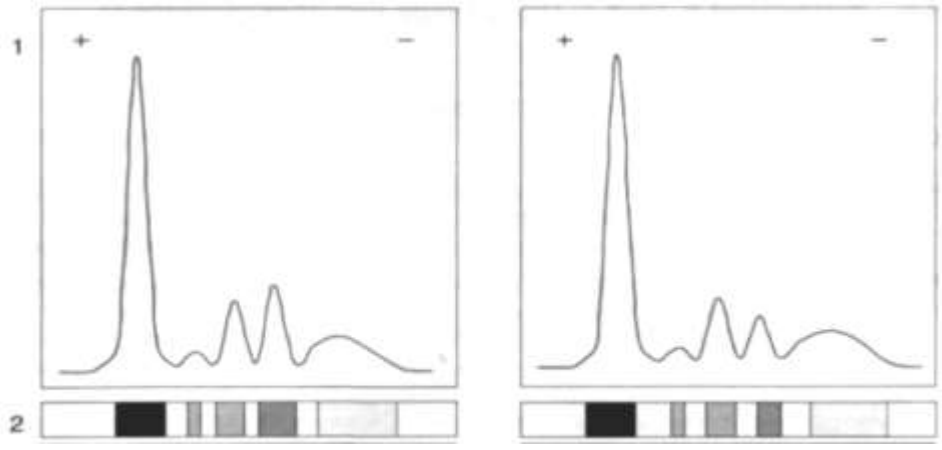


Рисунок 7. Электрофореграмма сыворотки крови
с гипертрансферринемией при анемии (слева) и здорового человека (справа).
1- денситограмма, 2 – электрофоретические фракции (схема).

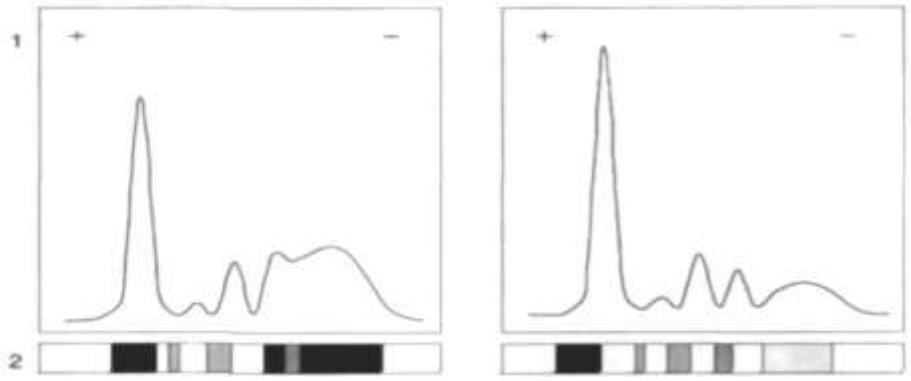


Рисунок 8. Электрофореграмма сыворотки крови при алкогольном циррозе печени (слева) и здорового человека (справа). 1- денситограмма, 2 – электрофоретические фракции (схема).

Увеличение содержания фракции β-глобулинов может быть обусловлено моноклональными белками:

- ✓ иммуноглобулинами А (наиболее часто) или G;
- ✓ при болезни Вальденстрема за счет моноклонального иммуноглобулина М;
- ✓ при амилоидозе или болезни легких цепей, из-за присутствия в β-фракции каппа и лямбда (κ и λ) свободных легких цепей иммуноглобулинов. Эта патология часто сопровождается гипо-γ-глобулинемией (Рисунок 9).

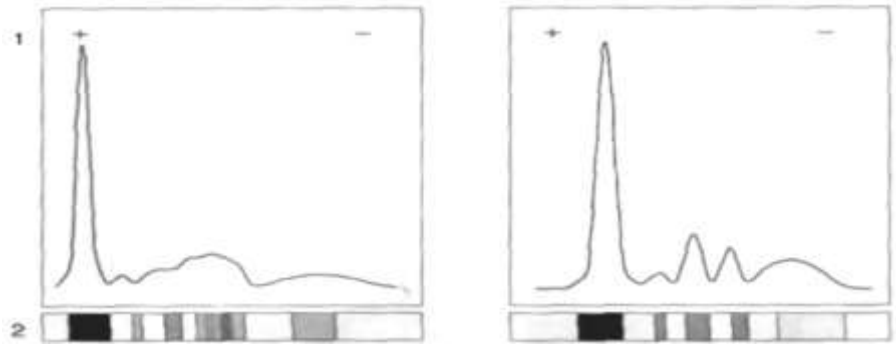


Рисунок 9. Электрофореграмма сыворотки крови при болезни легких цепей (слева) и здорового человека (справа). 1- денситограмма, 2 – электрофоретические фракции (схема).

1.5. γ-глобулины

γ-фракция — это зона миграции иммуноглобулинов Ig G, A. M, D, E. Уровень иммуноглобулинов, характерный для взрослых лиц, достигается в возрасте 10-16 лет. При интерпретации изменений в этой зоне необходимо учитывать клинические данные, а также возраст пациента.

Гипо-γ-глобулинемия:

- ✓ Физиологическая гипо-γ-глобулинемия имеет место у новорожденных.
- ✓ Первичный гуморальный иммунодефицит встречается у детей и взрослых и сопровождается недостатком одного или нескольких классов иммуноглобулинов (Рисунок 10).
- ✓ Вторичная гипо-γ-глобулинемия развивается при лечении глюкокортикостероидами, иммунодепрессантами, химиотерапии и радиотерапии.
- ✓ Гипо-γ-глобулинемия развивается при болезни легких цепей. Диагностика этой патологии верифицируется при обнаружении белка Бенс-Джонса в моче.

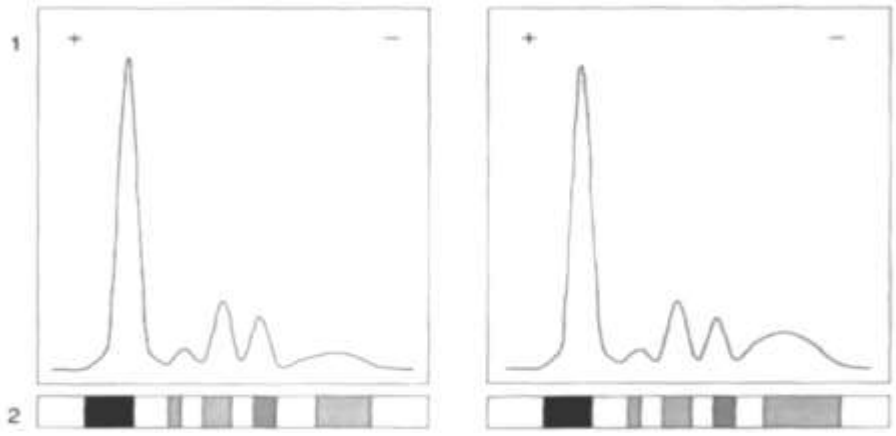


Рисунок 10. Электрофореграмма сыворотки крови при гипо-γ-глобулинемии (слева) и у здорового человека (справа). 1- денситограмма, 2 – электрофоретические фракции (схема).

Гипер-γ –глобулинемия:

Гиперпродукция антител имеет место:

— при некоторых вирусных заболеваниях, в том числе у инфицированных ВИЧ серопозитивных лиц, при вирусном гепатите, менингите, цитомегаловирусной инфекции;
— хроническом лимфолейкозе;
— злокачественных новообразованиях;
— обострении хронического гепатита;
— аутоиммунном ответе у больных после трансплантации органов под влиянием терапии иммунодепрессантами.

На элетрофорегремме

✓ Поликлональная гипер-γ-глобулинемия проявляется диффузным усилением зоны γ-глобулинов. При этом имеет место повышение уровня всех γ-глобулинов. Поликлональная гипер-γ-глобулинемия характерна для инфекционных заболеваний печени, СПИДа и аутоиммунных заболеваний (Рисунок 11).

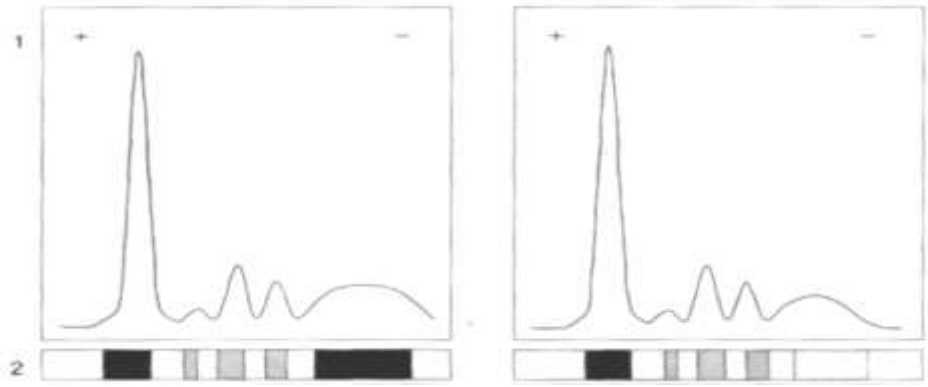


Рисунок 11. Электрофореграмма сыворотки крови при поликлональной гипер-γ-глобулинемии (слева) и здорового человека (справа).
1- денситограмма, 2 – электрофоретические фракции (схема).

✓ Олигоклональная гипер-γ-глобулинемия характеризуется появлением нескольких гомогенных полос в зоне γ-глобулинов. Такой эффект может быть результатом синтеза в организме одновременно нескольких типов антител к различным антигенам (Рисунок 12). Олигоклональная гаммапатия может быть отражением накопления

аутоантител при системных ревматических заболеваниях: ревматоидном артрите, системной красной волчанке, синдроме Шегрена, системной склеродермии и др.

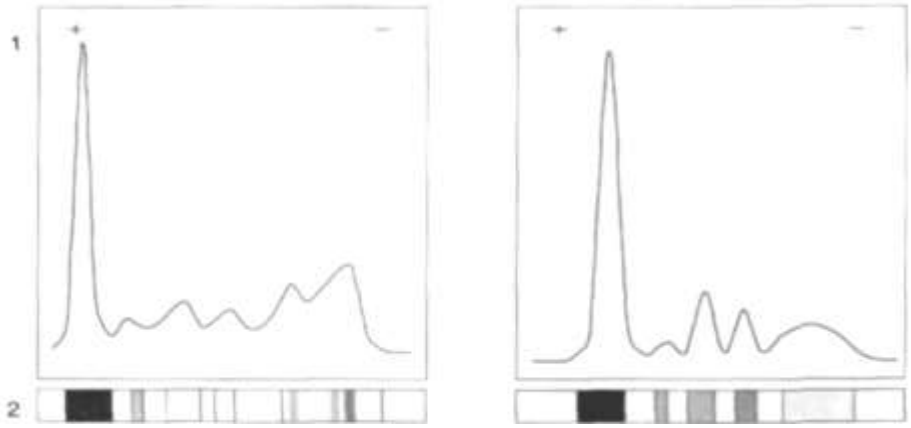


Рисунок 12. Электрофореграмма сыворотки крови
при олигоклональной гаммапатии (слева) и здорового человека (справа).
1- денситограмма, 2 – электрофоретические фракции (схема).

- ✓ Моноклональная гипер-γ-глобулинемия характеризуется появлением узкой гомогенной полосы на фоне γ-глобулиновой фракции и бывает патогномоничным признаком собственно злокачественной гаммапатии, сопровождающей злокачественные заболевания (миелома, лимфома, хронический лимфолейкоз, болезнь Вальденстрема и др.). У пожилых лиц часто обнаруживается доброкачественная гаммапатия, которая протекает бессимптомно (Рисунок 13).

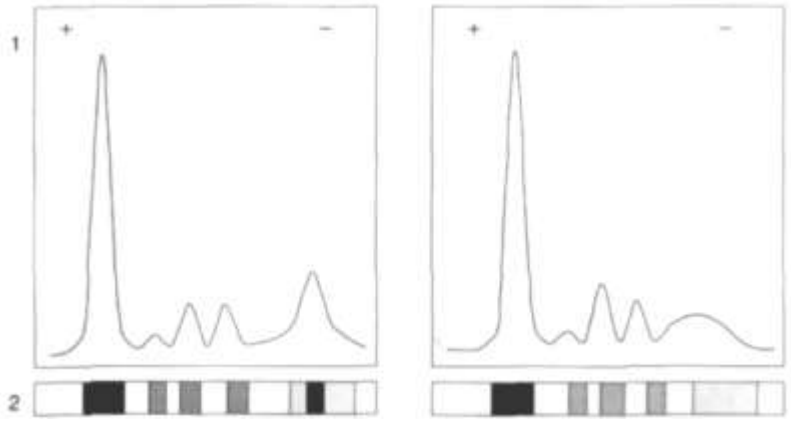


Рисунок 13. Электрофореграмма сыворотки крови пожилого пациента с моноклональным компонентом (слева) и здорового человека (справа)
1- денситограмма, 2 – электрофоретические фракции (схема).

Наличие тонкой полосы в зоне γ-глобулинов может быть ранним признаком множественной миеломы, выявляемым еще до появления клинических симптомов, а также во время ремиссии. Обычно при электрофорезе появляется отчетливая полоса в зоне γ- или β-глобулинов, но иногда из-за образования комплексов моноклональных иммуноглобулинов с альбумином такая полоса может быть в зоне α_2- или α_1-глобулинов.

В некоторых случаях на электрофореграмме может быть две полосы с различной подвижностью, что может быть вызвано присутствием следующих вариантов парапротеинов:

- ✓ моноклональный IgA в виде мономера и полимера;
- ✓ поликлональный полиморфизм IgG, что обусловлено двумя разными субъединицами, различающимися электрическим зарядом;
- ✓ два IgG или два IgA, содержащие одинаковые легкие цепи, но тяжелые цепи различных субклассов (IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4 или IgA 1 и IgA 2);
- ✓ повышенная продукция свободных легких цепей иммуноглобулинов, присутствующих в сыворотке крови наряду с IgG или полной молекулой моноклонального IgA;

- ✓ биклональная гаммапатия, когда два моноклональных иммуноглобулина имеют одинаковые тяжелые цепи и разные легкие цепи или различные тяжелые цепи.

Слабая моноклональная полоса, на фоне тотальной гипо-γ-глобулинемии при клинической диагностике может свидетельствоватъ о миеломе свободных легких цепей, реже – об IgD или IgE миеломе.

Для подтверждения диагноза злокачественной моноклональной гаммапатии одного исследования недостаточно. Если не считать транзиторного (от нескольких недель до нескольких месяцев) появления моноклональных компонентов при инфекционных заболеваниях, спонтанно моноклональные иммуноглобулины исчезают довольно редко.

Концентрация моноклонального компонента, как правило, стабильна и не связана с клиническими проявлениями заболевания. Почти в 10% случаев злокачественный моноклональный компонент продолжает выявляться в течение нескольких лет. При выявлении злокачественных парапротеинов, чем моложе пациент, тем выше риск лимфопролиферативных заболеваний.

Появление дополнительной полосы в γ-зоне или между β- и γ-фракциями может быть не признаком моноклональной гаммапатии, а следствием наличия в образце фибриногена. Чтобы исключить возможность присутствия фибриногена повторяют электрофорез, предварительно обработав сыворотку тромбином. В этом случае растворимый фибриноген превращается в фибрин, который осаждается из пробы (Рисунок 14).

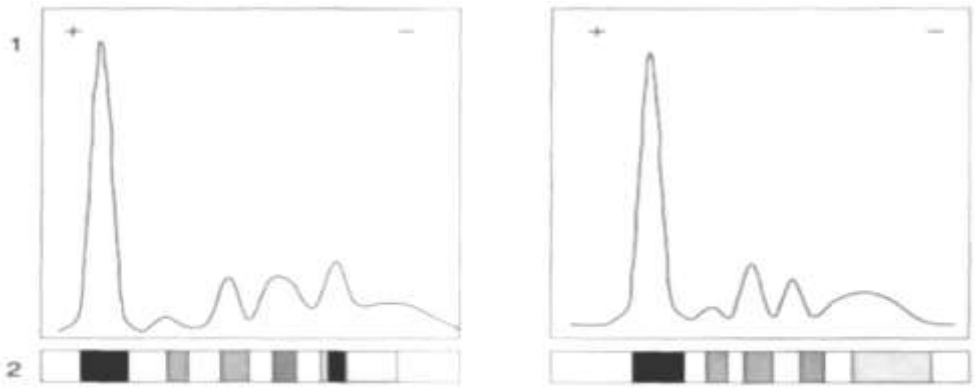


Рисунок 14. Электрофореграмма сыворотки крови с дополнительной полосой, обусловленной присутствием фибриногена (слева), и того же образца после обработки тромбином (справа).
1- денситограмма, 2 – электрофоретические фракции (схема).

1.6. Основные типы протеинограмм

Изменение соотношения белковых фракций в сыворотке крови (диспротеинемия) наблюдается при многих патологических состояниях, но исследование белковых фракций клинически информативно лишь при парапротеинемических гемобластозах, системных аутоиммунных патологиях, нефротическом синдроме, хронических гепатитах и циррозе печени разной этиологии, в ряде случаев острого и хронического воспаления. За исключением диагностики парапротеинемических гемобластозов, более точную информацию позволяют получить исследования отдельных белков в сыворотке крови (специфических белков), их изменения специфичны для соответствующего патологического состояния.

В клинической практике для сыворотки выделяют следующие основные типы электрофореграмм (протеинограмм), соответствующих различным патологическим состояниям, представленные в Таблице 2.

Таблица 2. Основные типы протеинограмм

ТИПЫ ПРОТЕИНОГРАММ, СООТВЕТСТВУЮЩИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫМ ВИДАМ ЗАБОЛЕВАНИЙ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ

тип протеинограммы, соответствующий...	альбумин	глобулины				вероятные патологические состояния
		α_1	α_2	β	γ	
... острым воспалительным процессам	значительно снижен	увеличены	увеличены	не изменены	не изменены	острый воспалительный процесс, сепсис, обширный свежий инфаркт миокарда, начальная стадия пневмоний, экссудативный туберкулез легких, острый полиартрит, обострение хронического воспалительного процесса
... хроническому воспалению	умеренно снижен	умеренно увеличены	значительно увеличены	не изменены	значительно увеличены	синдром хронического воспаления (холецистит, цистит, пиелит, поздняя стадия пневмоний, хронические формы туберкулеза легких)
... нефротическому симптомокомплексу	значительно снижен	не изменены	увеличены	увеличены	умеренно снижены	нарушение функции почечного фильтра, выраженный токсикоз (токсикоз беременных), кахексия, нефротический симптомокомплекс, нефрит, терминальная стадия туберкулеза легких и ряд других заболеваний
... злокачественным новообразованиям	резко снижен	значительно увеличены	значительно увеличены	значительно увеличены	значительно увеличены	метастатические новообразования с различной локализацией первичной опухоли
... гепатитам	умеренно снижен	не изменены	не изменены	умеренно увеличены	увеличены	гепатиты, последствия токсического повреждения печени, гемолитические процессы, лейкемии, злокачественные новообразования кроветворного и лимфатического аппарата, некоторые формы полиартрита, дерматомиозиты
... циррозам	значительно снижен	не изменены	значительно снижены	увеличены	значительно увеличены	цирроз печени, тяжелые формы индуративного туберкулеза легких, хронического полиартрита, коллагенозов
... обтурационной желтухе	умеренно снижен	не изменены	умеренно увеличены	умеренно увеличены	умеренно увеличены	обтурационная желтуха (камень в общем желчном протоке, закупорка общего желчного протока опухолью, злокачественные новообразования в головке поджелудочной железы)
... β-глобулиновым плазмоцитомам	снижен	снижены	снижены	резко увеличены	снижены	β-глобулиновые плазмоцитомы (β_1 - плазмоцитома, β_1 - плазмоклеточная лейкемия, макроглобулинемия Вальденстрема)
... γ-глобулиновым плазмоцитомам	значительно снижен	снижены	значительно снижены	значительно снижены	увеличены	γ - глобулиновые плазмоцитомы, макроглобулинемии
... α_2-глобулиновым плазмоцитомам	снижен	снижены	увеличены	снижены	снижены	α_2 - глобулиновые плазмоцитомы

2. Основные виды электрофореза, используемые в клинической практике

В клинической практике применяется зональный электрофорез, когда возможно разделение смеси вещества на фракции или отдельные зоны.

Электрофорез на ацетатцеллюлозной мембране

Мембрана ацетатцеллюлозы как носитель для электрофореза имеет ряд преимуществ по сравнению с бумагой: однородность, строго определенный размер пор, пониженная адсорбционная способность, что исключает образование размытых полос позади зон. Для окрашивания зон применяют методы аналогичные методам окрашивания зон на бумаге. Ацетатцеллюлоза до сегодняшнего дня остается одним из самых популярных методов.

Преимущества — недорогой метод.

Недостатки — небольшое количество методов, невозможность проведения иммунофиксации.

Электрофорез в гелях

«Золотой стандарт» в электрофорезе. В этом методе в качестве опорной среды используют крахмальный, агар-агаровый, полиакриламидный гели. Характерной особенностью этой разновидности зонального электрофореза является его высокая разрешающая способность, поскольку гели функционируют как молекулярные сита: крупные молекулы проходят сквозь него тем медленнее, чем меньше размер пор в геле.

Методом электрофореза в агаровом геле в сыворотке крови выявляется до 7-8 фракций, а при электрофорезе в крахмальном или полиакриламидном геле — до 20 фракций.

Агаровый гель ввиду большого количества воды в нем и вследствие этого большой скорости движения ионов используется в иммуноэлектрофорезе для обнаружения антигенов.

Самым перспективным является полиакриламидный гель, так как он прозрачен, обладает значительной механической прочностью, однороден по составу, химически инертен, размер пор у этого геля можно варьировать в широких пределах и его можно использовать с самыми различными буферными растворами.

Скорость движения белков пропорциональна их заряду и молекулярной массе.

Преимущества — благодаря высокому содержанию жидкости, электрофорез идет, как в жидкой среде, в то же время структура геля уменьшает свободную диффузию, как в процессе разделения, так и после. Большой выбор методов.

Изоэлектрическое фокусирование

Это метод разделения белков, основанный на перемещении их молекул под действием постоянного электрического тока в область с величиной pH, соответствующей изоэлектрической точке данного белка. Между анодом и катодом создается градиент pH с помощью амфолитов. Каждый белок мигрирует к соответствующему электроду и прекращает движение, попадая в зону с pH = pJ (фокусируется). Таким образом, молекулы, имеющие одинаковую изоэлектрическую точку, сконцентрируются в узкой зоне.

Капиллярный электрофорез

Самый современный и автоматизированный метод.

В основе капиллярного электрофореза лежат электрокинетические явления — электромиграция заряженных частиц и электроосмос. Эти явления возникают в растворах при помещении их в электрическое поле, преимущественно, высокого напряжения.

Если раствор находится в тонком капилляре, например, в кварцевом, то электрическое поле, наложенное вдоль капилляра, вызывает в нем движение заряженных частиц и пассивный поток жидкости, в результате чего проба разделяется на индивидуальные компоненты, так как параметры

электромиграции специфичны для каждого сорта заряженных частиц. В то же время, такие возмущающие факторы, как диффузионные, сорбционные, конвекционные, гравитационные и т. п., в капилляре существенно ослаблены, благодаря чему достигаются рекордные эффективности разделений.

Преимущества — высокая разрешающая способность, воспроизводимость, производительность, полная автоматизация процесса.

Недостатки — перечень методов значительно ниже, чем у гелевого.

Электрофорез липопротеинов

Электрофорез липопротеинов позволяет количественно оценить содержание отдельных фракций— хиломикроны, ЛПНП, ЛПОНП, ЛПВП и ЛП(а) — в сыворотке крови или плазме.

Важным преимуществом данного метода определения ЛП(а) является отсутствие ошибок, связанных с перекрестными реакциями на плазминоген и апопротеин В. Диагностические возможности:

- ✓ диагностика и мониторинг атеросклероза;
- ✓ типирование дислиопротеинемий согласно классификации Фридриксона.

Электрофорез патологических форм гемоглобина

Диагностика талассемий методом электрофореза патологических форм гемоглобина.

Методика включает в себя три возможных этапа:

- ✓ скрининг наличия патологических форм гемоглобина электрофорезом в щелочной среде;
- ✓ подтверждение наличия патологических форм гемоглобина электрофорезом в кислой среде;
- ✓ определение патологических форм гемоглобина методом изоэлектрофокусирования (референсный метод).

Электрофорез изоферментов

Электрофорез изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме крови позволяет выделить 5 фракций, в том числе фракции, необходимые для диагностики острого инфаркта миокарда.

Электрофорез изоферментов креатинкиназы (КК) в плазме крови позволяет выделить фракции ММ, МВ и ВВ. Также рекомендуется для диагностики острого инфаркта миокарда.

Электрофорез изоферментов щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови позволяет выделить интерстициальную и макрогепатическую (воспаление печени), костную (заболевания костной ткани), плацентарную (мониторинг нарушений при беременности) и печеночную (диагностика рака печени) фракции.

Изоэлектрофокусирование олигоклонального IgG

Изоэлектрофокусирование иммуноглобулина G — это метод, предназначений для диагностики рассеянного склероза. В настоящее время является единственным в мире референсным методом, позволяющим диагностировать рассеянный склероз с точностью свыше 96%.

В основу определения IgG положен рекомендованный международными экспертами метод изоэлектрофокусирования с последующим иммуноблоттингом. Для определения олигоклонального IgG достаточно всего 5 мкл биологического материала (сыворотки и цереброспинальной жидкости).

Изоэлектрофокусирование трансферрина

Изоэлектрофокусирование трансферрина — быстрый и неинвазивный метод диагностики нарушений гликозилирования трансферрина. Позволяет определить изоформу трансферрина β-2 (что имеет важнейшее диагностическое значение при черепно-мозговых травмах).

Наряду с числом компонентов, их качественной и количественной характеристикой иногда возникает необходимость дальнейшего более подробного исследования.

3. Электрофорез с иммунофиксацией

Электрофорез с иммунофиксацией (Immunoelectrophoresis, IFE) — это двухступенчатый процесс, использующий электрофорез протеинов на первом этапе и иммунопреципитацию на втором. При этом исследованию может быть подвергнута сыворотка крови, моча, спинномозговая или другая жидкость организма.

Впервые иммунофиксация была применена в 1964 году E. Afonso, который предложил после окончания электрофореза наносить антитела непосредственно на поверхность пластины геля. В результате в геле образуются зоны преципитации округлой или овальной формы. В настоящее время иммунофиксация широко используется в клинической лабораторной практике.

При проведении электрофореза один и тот же образец наносится, как правило, шесть раз. Один из них необходим для получения обычной электрофореграммы. На каждый из остальных образцов после окончания процедуры электрофореза наносят иммунные сыворотки, содержащие различные специфические антитела против иммуноглобулинов Ig G, A, M, каппа и лямбда (κ и λ) цепей, что позволяет идентифицировать моноклональные линии, обнаруженные при электрофорезе (Рисунок 15).

Взаимодействие между макромолекулами белка, обладающими антигенными свойствами, и специфическими по отношению к ним преципитирующими антителами сопровождается образованием преципитата.

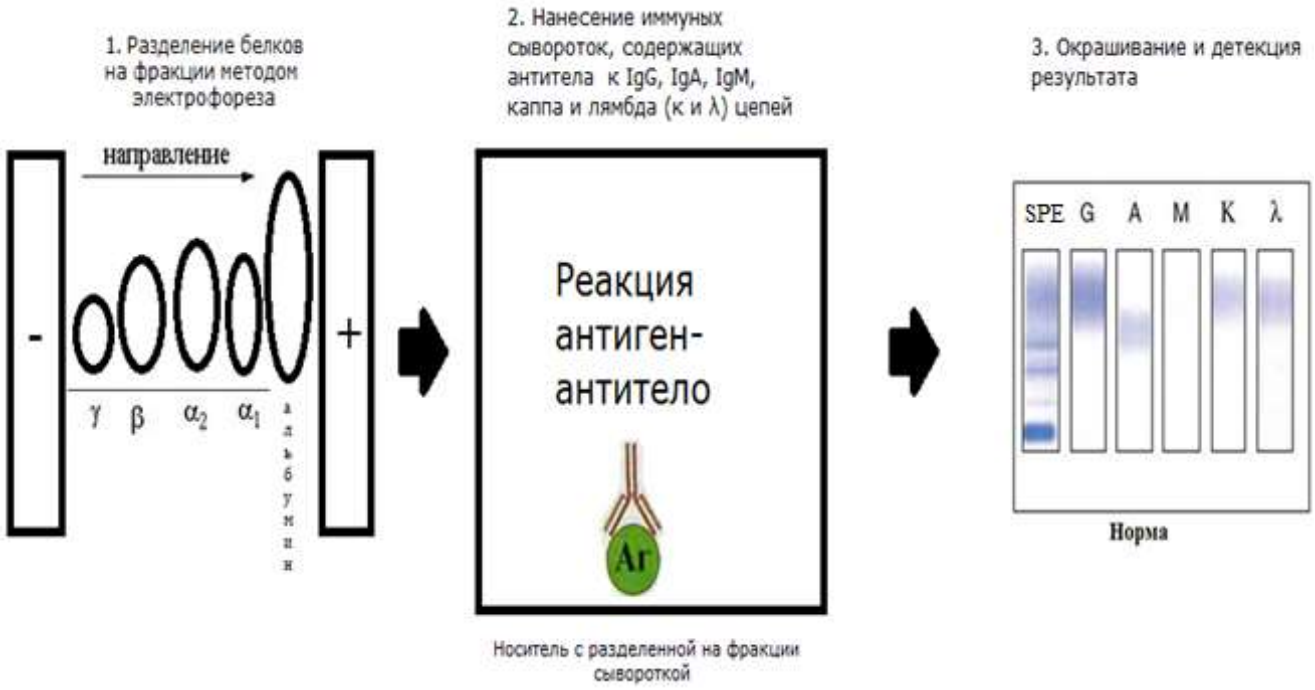


Рисунок 15. Схема электрофореза с иммунофиксацией

Иммунный электрофорез объединяет преимущества электрофореза и иммунной реакции: высокая разрешающая способность метода, разделяющая компоненты анализируемой системы на основе электрофоретической мобильности и высокая специфичность иммунных антисывороток.

Результаты иммунофиксации, при которой образуются гомогенные полосы, интерпретировать легче, чем результаты, полученные при иммуноэлектрофоретическом анализе.

В диагностике и прогнозе учитывают класс выявленного парапротеина, его концентрацию в момент установления диагноза, скорость повышения его концентрации в динамике. Наличие парапротеина является маркером ряда гематоонкологических заболеваний (Рисунок 16).

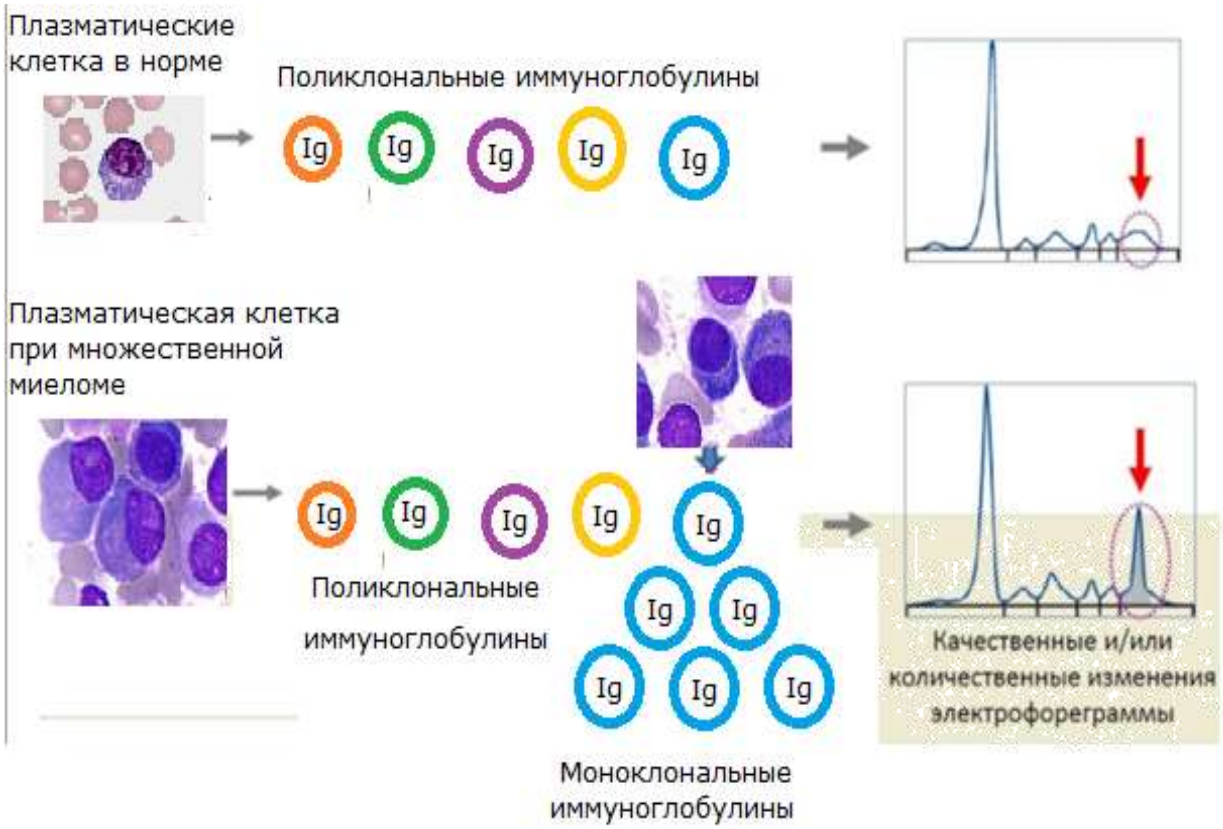


Рисунок 16. Электрофорез белков при множественной миеломе

При обследовании пациентов, применяющих лекарственные препараты на основе моноклональных антител (могут использоваться в качестве противоопухолевой терапии, иммунодепрессантов и др.), следует учитывать, что на пиковых концентрациях после введения такие препараты иногда могут быть причиной выявления при электрофорезе малых аномальных полос белка иммуноглобулиновой природы.

Иммунофиксация позволяет окончательно диагностировать заболевания объединенные в группу «моноклональная гаммапатия» — множественная миелома, индолентная миелома, плазмоцитома, болезнь легких цепей, болезнь Вандельстрема, болезнь тяжелых цепей, амилоидоз, моноклональная гаммапатия неясного генеза (Рисунок 17).

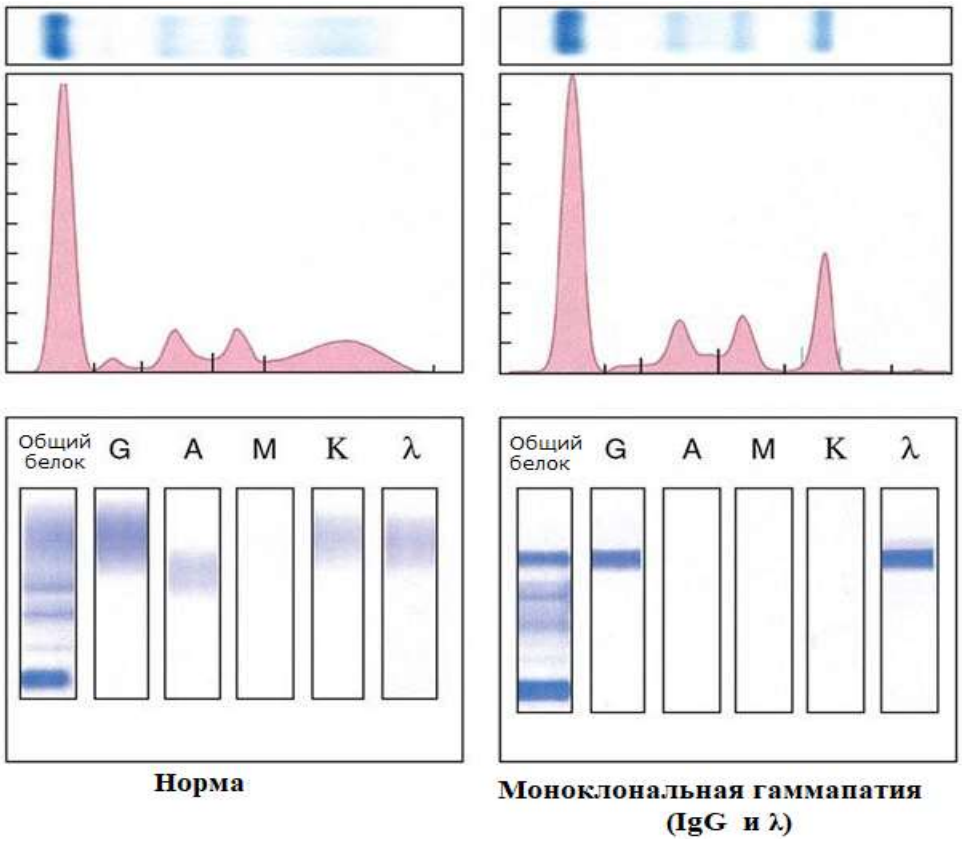


Рисунок 17. Электрофорез белков сыворотки с иммунофиксацией. Сверху вниз: электрофорез белков, денситограмма, электрофорез с иммунофиксацией

Электрофорез белков мочи с иммунофиксацией

После электрофореза белков мочи и выявления патологических образцов, следующим необходимым шагом для диагностики типа протеинурии является типирование белков методом иммунофиксации .

Иммунофиксация позволяет окончательно диагностировать тип протеинурии (Рисунок 18): канальцевая — Micro-антисыворотка; клубочковая (селективная и не селективная) — Macro-ангисыворотка; болезнь тяжелых цепей — антисывортка GAM; болезнь легких цепей, белок Бене Джонса — κ и λ антисыворотки.

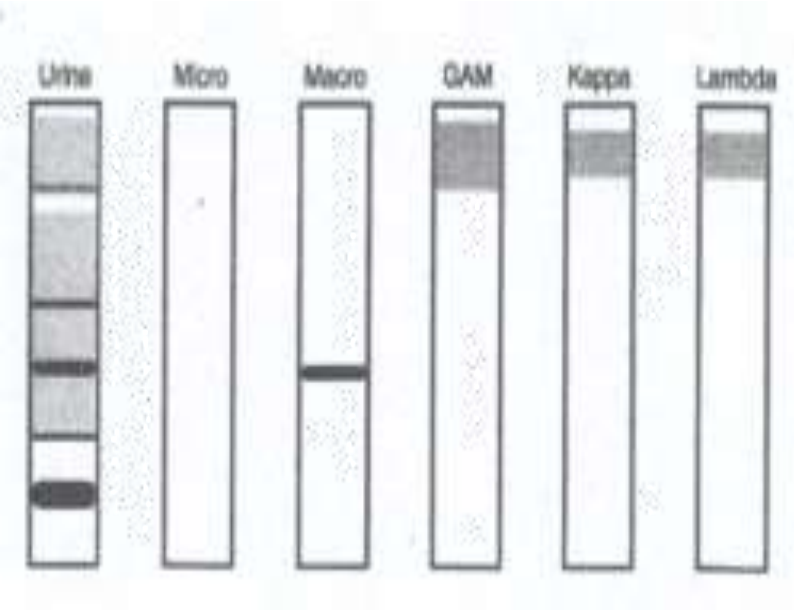


Рисунок 18. Клубочковая протеинурии

4. Автоматические системы для электрофореза с иммунофиксацией

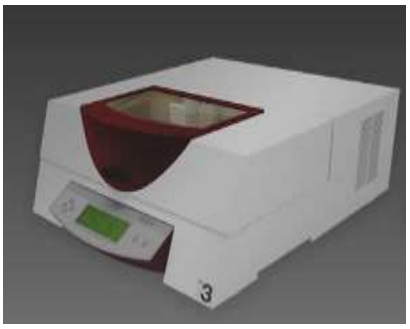
Для электрофореза белков используются различные аппараты: ручные, полуавтоматические и автоматические.

Современные комплексы оснащены микропроцессорными блоками питания и управляются компьютером. В большинстве систем на последней стадии исследования окрашенных мембран или гелевых пластинок (определения относительного количества белков в каждой фракции) используется электронный цветной сканер или миниатюрная фотокамера, что существенно повышает точность и воспроизводимость результатов.

Программное обеспечение дает возможность усредненного расчета оптической плотности отдельных фракций путем автоматического определения границ "дорожек" и многократного сканирования каждой из них в нескольких "разрезах", что позволяет исключить ошибки из-за локальных микродефектов и неровного положения носителя, а также до определенной степени нивелировать искривление дорожки и влияние окрашенного фона

при неполной отмывке. На экран дисплея и на принтер выводится график-денситограмма с рассчитанным содержанием отдельных белковых фракций. При необходимости маркеры границ фракций на графике можно скорректировать, при этом будет произведен автоматический пересчет их показателей. В компьютере, как правило, создается архив электрофореграмм, их можно в любое время извлечь и просмотреть.

Автоматического анализатор SAS-3



Анализатор обеспечивает автоматическое нанесение на гель и электрофоретическое разделение до 60/100 образцов одновременно (до 9 образцов – в методиках с иммунофиксацией).

Процедура электрофоретического разделения осуществляется по одной из 20 программ, выбираемых пользователем в зависимости от выполняемого исследования.

Рекомендуется использовать анализатор SAS-3 совместно с системой обработки гелей SAS-4.

Автоматического анализатор SAS-4

Окрашивание, осветление и сушка гелей выполняется автоматически по одной из 20 программ, выбираемых пользователем в зависимости от выполняемого исследования. Прибор допускает несколько режимов сушки и позволяет использовать несколько красителей. Систему обработки гелей SAS-4 следует использовать совместно с автоматическим электрофоретическим анализатором SAS-3.

5. Применение электрофореза в клинической диагностике

Определение типа электрофореграммы может подтвердить предполагаемый клинический диагноз, помочь выявить скрытую патологию, оценить тяжесть заболевания, мониторировать процесс лечения и восстановление биосинтетической функции печени и лимфоидной ткани.

Таблица 3

Электрофорез белков	• Миеломная болезнь и злокачественные новообразования; • Иммунодефициты; • Гемоглобинопатии; • Генетические нарушения (дефициты или аномалии белков); • Гипопротеин и гипоальбуминемии; • Контроль парентерального питания; • Диагностика заболеваний печени; • Нефротический синдром.
Электрофорез липидов	○ Дифференциальная диагностика нарушений липидного обмена; ○ Оценка риска развития атеросклероза.
Изоэлектрофокусирование IgG	• Диагностика рассеянного склероза.
Электрофорез гемоглобинов	○ Наследственные патологии синтеза Hb (серповидно-клеточная анемия); ○ Угнетение синтеза цепей Hb (талассемия); ○ Персистенция фетального Hb
Электрофорез изоферментов (КК, ЛДГ, ЩФ)	• Инфаркт миокарда и ИБС - ЛДГ, КК; • Черепно-мозговая травма - КК; • Инфаркт легкого - ЛДГ; • Рак печени и легких - КК; • Дистрофия мышц - КК, ЛДГ; • Цирроз печени - ЩФ; • Обструкция желчный путей - ЩФ; • Заболевания костных тканей, остеосаркома - ЩФ; • Паратиреоидные расстройства - ЩФ

6. Преаналитический этап

Следует знать, что результаты электрофореза сильно зависят от подготовки пробы.

На результаты определения содержания общего белка, как и отдельных фракций, могут оказывать влияние и методические факторы, такие как хранение образцов до исследования, метод исследования, способ получения крови. Например, жгут, наложенный до венопункции, и «работа рукой» через несколько минут, приводят к повышению результата определения концентрации белка в сыворотке.

Исследование проводится утром, натощак. С последнего приема пищи должно пройти не менее 8 часов. Исключить прием алкоголя не менее чем за 24 часа до взятия биоматериала.

Исследование с сывороткой крови необходимо провести в течение 2 часов. Сыворотку крови можно хранить 3 дня при температуре 4-8^{o}C, а также месяц при температре -20^{o}C.

Следует избегать примеси фибриногена из-за преждевременного отделения сыворотки. В пробе не должно быть следов гемолиза; в противном случае свободный гемоглобин и его комплекс с гаптоглобином могут образовать дополнительные полосы в области α_2- и β-глобулинов. В присутствии ионов кальция и под влиянием некоторых лекарственных веществ возможно расслоение β-фракции на две подфракции, что объясняется нарушением подвижности С3-компонента комплемента.

Концентрация общего белка в плазме может быстро меняться: через 30 мин в положении стоя после длительного лежания она может увеличиться на 10-20%, после венопункции может измениться в течение нескольких минут. В обоих случаях это связано с перераспределением внугрисосудистой и межклеточной жидкости. Факторы, влияющие на концентрацию белков в плазме, представлены в таблице 4.

Таблица 4. Факторы, влияющие на концентрацию белков плазмы крови.

Возраст		Общий белок:
	Недоношенные	36-60 г/л
	Новорожденные	46-70 г/л
	1 неделя	44-76 г/л
	Дети до 1 года	51-73 г/л
	до 2 лет	56-75 г/л
	свыше 2 лет	60-80 г/л
	Взрослые	64-83 г/л
Пол	Мужские и женские половые гормоны влияют на концентрацию многих белков: α-фетопротеин, ферритин, IgM	
Лекарства	Влияние оказывают оральные контрацептивы, тестостерон, фенотиазины, эстрогены, глюкокортикостероиды, цитостатики	
Физическая нагрузка	Активная физическая работа повышает уровень белка дополнительно до 10 % к исходному	
Генетические факторы	Имеют значение фенотипы, связанные с расовыми различиями, наследственный дефицит отдельных белков	
Питание	Влияет на уровень комплемента, преальбумина, ретинол-связывающего белка	
Беременность	Влияет на транспортные белки, существенно возрастает уровень α-фетопротеина	
Сон	Продолжительный сон может изменять концентрацию белков	

7. Ошибки при электрофорезе

Одним из важных условий для получения четкой электрофореграммы является нанесение адекватного количества исследуемого образца сыворотки крови. При разделении и анализе спектра белков сыворотки крови избыточное количество образца приводит к серьезным искажениям электрофореграммы.

При исследовании мочи и спинномозговой жидкости таких проблем не возникает, поскольку содержание белка в них гораздо ниже, чем в сыворотке крови.

Если при электрофорезе использована плазма, а не сыворотка крови, в зоне γ-глобулинов или между β- и γ-глобулинами можно обнаружить дополнительную фракцию. Наличие этой дополнительной фракции объясняется присутствием фибриногена, который отсутствует в правильно приготовленной сыворотке крови. Однако следует учитывать, что образование и осаждение фибрина может задерживаться, если сыворотку отбирают в пластиковую пробирку или если кровь берут у пациента, который получает гепариноподобные антикоагулянты (в этих случаях анализ следует проводить после обработки сыворотки тромбином).

Если разделению подвергают сильно гемолизированные образцы сыворотки крови, на электрофореграмме может быть усилена β-фракция, или появляется дополнительная полоса между α_{2-} и β-фракциями за счет присутствия в сыворотке гемоглобина.

Большое значение для получения качественной электрофореграммы имеет состав буферного раствора, при подборе которого необходимо учитывать характеристики исследуемых белков. Если pH буферного раствора близка к значениям изоэлектрических точек белков, их миграция будет слишком медленной или даже совсем отсутствовать, в некоторых случаях возможна преципитации белков.

Носитель для электрофореза подбирают с учетом размеров молекул, подлежащих разделению. Использование в качестве поддерживающей среды материалов с недостаточными, по сравнению с величиной молекул образца, размерами пор приводит к слишком медленной миграции или образованию чрезмерно узких полос.

Фиксацию необходимо провести как можно скорее после окончания электрофореза. В противном случае диффузия молекул, которая продолжается и после отключения электрического тока, приводит к размыванию границ зон и ухудшению качества электрофореграммы.

Основные ошибки, которые при проведении электрофореза могут явиться причиной артефактов или вызвать наиболее типичные проблемы, дополнены и суммированы в таблице 5.

Таблица 5 . Типичные ошибки при электрофорезе белков

Ошибки при проведении	**Возможная проблема**
Отсутствие напряжения	Нет миграции белков
Несоблюдение полярности	Нет миграции белков
Перепады напряжения	Искажение вида фракций
Низкое напряжение	Медленная миграция
Несоответствие pH буфера	Нет миграции, преципитация на матрице
Высокая ионная сила буфера	Медленная миграция
Размер молекул белка превышает размеры пор матрицы	Тонкие и интенсивные полосы на электрофореграмме
Перегревание или высушивание матрицы	Деформация электрофореграмм по краям матрицы
Наличие солей в образце	Размытость стартового (катодного края полос)
Избыточное количество образца	Искажение вида фракций

Список использованной литературы

1. Арсенин С.Л. Клинический электрофорез белков - современные аспекты клинической диагностики/С.Л. Арсенин// «Helena». - 2017 - с.1-42.
2. Гильманов А.Ж., Саляхова Р.М. Электрофорез белков сынороткн крови: современные возможности анализа/А.Ж. Гильманов, Р.М. Саляхова// Лаборатория. - 2006. - №3. - с.3-7.
3. Голубева В.Л., Белова В.В. Изменения белков крови в диагностике заболеваний пациентов разных возрастных групп/ В.Л. Голубева, В.В. Белова [и др.]// Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. - 2011. - №22 - с. 5-9
4. Камышников В.С. Лабораторная диагностика в клинической практике врача: учебное пособие /В.С.Камышников. – Минск: Адукацыя I выхаванне, 2018г. – 632 с. : ил.
5. Клинический анализ лабораторных исследований крови и мочи — М: МНМЦ Мысль, 2008. — 30 с.
6. Клиническая лабораторная диагностика; национальное руководство: в 2 т. — Т. I. / под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. — М.: ГЭОТАР-Мелиа, 2012. - 928 с.
7. Лабораторная диагностика нарушений обмена белков: учеб. пособие /. В. В. Долгов, О. П. Шевченко. – Тверь: «Триада», 2002. – 68с.
8. Электрофорез в клинической лаборатории. I. Белки сыворотки крови/ Шевченко О.П., Долгов В.В., Олефиренко Г.А. - М. Изд. «Реафарм», 2006 - 160 стр.
9. Эмануэль В.Л., Первакова М.Ю. Информативность лабораторных методов определения парапротеина для диагностики моноклональных гаммапатий/В.Л. Эмануэль, М.Ю. Первакова [и др.]// Медицинский алфавит. - 2016. - № 23 - с.40-43