

Т.И. Трубникова ¹, Л.О. Гуцол ², Л.С. Колесниченко ², С.С. Гаврилов ¹**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ И МОЧИ У ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ**¹ ОГАУЗ «Иркутский областной клинический консультативно-диагностический центр» (Иркутск)² ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (Иркутск)

Авторы утверждают, что капиллярный электрофорез белков сыворотки крови и мочи является одним из определяющих методов в выявлении и подтверждении наличия парапротеина при множественной миеломе. Простота и доступность этого метода, а также неоспоримые преимущества, которые он даёт при выполнении измерений, позволяют надеяться на динамичное развитие методического обеспечения и скорейшее включение капиллярного электрофореза в обязательный перечень биохимических методов анализа, наиболее часто применяемых в повседневной лабораторной практике клиническими врачами.

Ключевые слова: электрофорез белков, общий белок, М-пик, парапротеины, множественная миелома

DIAGNOSTIC VALUE OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF BLOOD SERUM PROTEINS AND URINE IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMAT.I. Trubnikova ¹, L.O. Gutsol ², L.S. Kolesnichenko ², S.S. Gavrilov ¹¹Irkutsk Regional Clinical Advisory and Diagnostic Center, Irkutsk²Irkutsk State Medical University, Irkutsk

The authors state that capillary electrophoresis of blood and urine proteins is one of the defining method in revealing and confirmation of the presence of paraprotein at multiple myeloma. Simplicity and availability of this method as well as the advantages which it provides at the performing of measurements allow to hope for dynamic development of methodic supplying and the nearest including of capillary electrophoresis in mandatory list of biochemical methods of analysis, the most frequently used by clinical physicians in everyday laboratory practice.

Key words: electrophoresis of proteins, whole protein, M-peak, paraproteins, multiple myeloma

Множественная миелома (ММ) – парапротеинемический гемобластоз, относящийся к группе иммуноглобулин(Ig)-секретирующих В-клеточных лимфатических опухолей [2]. Вследствие мутации генов, ответственных за выработку иммуноглобулина, миеломные клетки синтезируют и секретируют патологические иммуноглобулины с измененной структурой (PIg), так называемые парапротеины (ПП), или моноклональные белки (МБ), которые при электрофорезе белков сыворотки крови и мочи регистрируются в виде М-пика в β- или γ-зоне глобулинов (рис. 1) [3]. Наиболее характерными проявлениями ММ являются анемия, гиперкальциемия, связанная с деструктивным поражением скелета, а также поражения почек [1]. ММ занимает 1 % среди всех онкологических заболеваний, составляя при этом 10 % от всех злокачественных заболеваний системы крови. Распространенность заболевания ММ в России и Европе колеблется от 1,2 до 6 случаев на 100 тыс. населения в год [1]. Появление новых лекарственных препаратов и новых возможностей выявления заболевания на ранних сроках течения. В настоящее время в г. Иркутске и Иркутской области, несмотря на наличие средств современного высокотехнологичного лечения, отсутствует единый алгоритм первичной диагностики выявления МБ при ММ. Поэтому, вопрос о критериях оценки эффективности терапии в различных лечебно-профилактических учреждениях остается открытым и сегодня.

Цель исследования – изучить возможности ранней диагностики ММ с применением современного

метода лабораторной диагностики – капиллярного электрофореза белков сыворотки крови и мочи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было выполнено в период с января 2009 г. по декабрь 2012 г. на базе лаборатории биохимии Иркутского диагностического центра.

Было проведено 9247 анализов электрофореза белков сыворотки крови, 672 электрофореза белков мочи. Из общего количества выявленных парапротеинемий нами в исследование включено 100 пациентов с диагнозом «множественная миелома». Контрольную группу (контроль) составили 25 здоровых человек с нормальными показателями общего белка, белковых фракций сыворотки крови и мочи в возрасте 55–70 лет, проживающие в г. Иркутске и Иркутской области.

Исследуемые биологические материалы: периферическая кровь и разовая моча. Методы исследования: 1) количественное определение содержания общего белка в сыворотке крови и моче; 2) электрофорез белков с визуальным определением наличия патологических белков при увеличении зоны β- или γ-глобулинов; 3) проведение иммунофиксации для подтверждения и идентификации выявленного патологического моноклонального белка.

Общий белок сыворотки крови определяли биуретовым методом на анализаторе Modular (спектрофотометрия) фирмы «Roche». Электрофорез белков сыворотки крови и мочи выполнялся методом капиллярного электрофореза на анализаторе Paragon CZE 2000 фирмы «Bectan Coulter» USA 2006 г. выпуска.

Сыворотка крови не требовала пробоподготовки и использовалась после центрифугирования в обычном режиме. Пробоподготовка мочи зависела от уровня общего белка в моче, который определялся методом окраски пирогалловым красным на биохимическом анализаторе Хитачи (спектрофотометрия) фирмы «Roche». При общем белке в моче менее 0,2 г/л мочу концентрировали в специальных пробирках Centrisart-1 (Germani) в режиме 4000 об./мин в течение 20 мин. Моча пропусклась через колонки с дисольтирующим раствором для очистки от примесей и солей. Фракцию мочи с содержанием белковых компонентов объемом 0,7 мл собирали в пробирку «Эппендорф» [9].

Статистическую обработку материала выполняли с использованием стандартного пакета программ прикладного статистического анализа (Statistica for Windows v. 6.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении капиллярного электрофореза у всех больных с выявленной ММ на электрофореграмме увеличены зоны β - или γ -глобулинов и формируется М-пик (или М-градиент) (рис. 1).

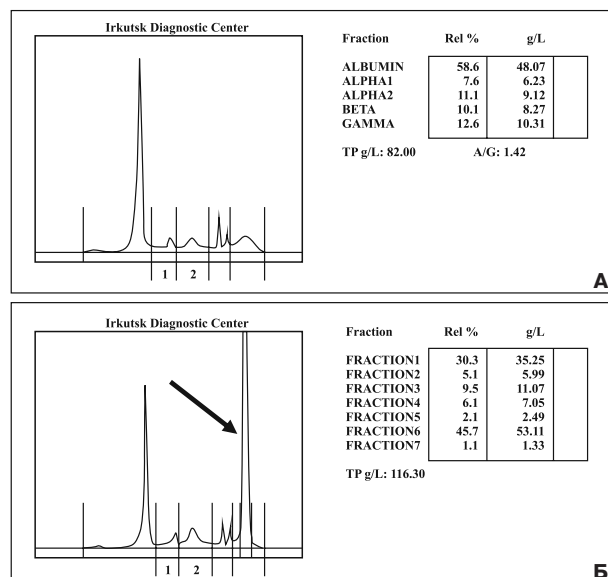


Рис. 1. Электрофорез белков сыворотки крови в пределах физиологической нормы (**А**). Электрофореграмма при ММ: в зоне γ -глобулинов выявляется М-градиент (обозначен стрелкой), составляющий 45,7 % (53,1 г/л) от суммы всех белков сыворотки крови (**Б**).

У 29 % пациентов моноклональный пик определялся в β -зоне, у 71 % – в γ -зоне.

Содержание общего белка в крови у исследованных больных ММ колебалось в интервале от 51,7 до 164 г/л, в группе контроля – $74,11 \pm 0,86$ г/л (рис. 2).

После анализа уровня содержания общего белка сыворотки крови все пациенты с ММ были разделены нами на 3 группы (рис. 2, 3):

1-я группа (содержание общего белка в пределах нормы, $73,86 \pm 0,14$ г/л, $p > 0,1$) – 5 % больных;

2-я группа (содержание общего белка повышено, $94,3 \pm 1,87$ г/л, $p < 0,05$) – 75 % больных;

3-я группа (содержание общего белка ниже нормы, $66,45 \pm 1,6$ г/л, $p < 0,05$) – 20 % больных.

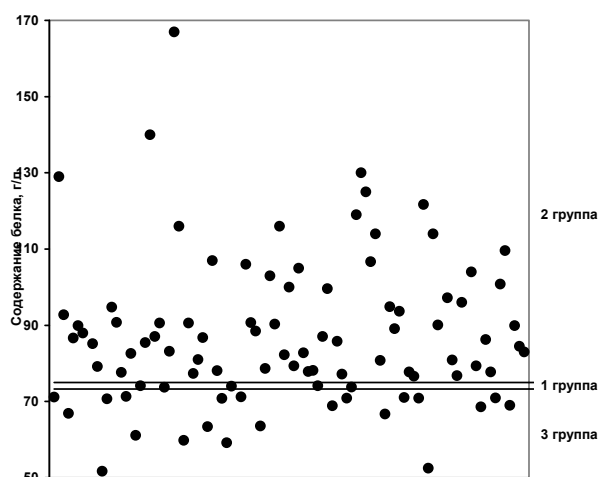


Рис. 2. Колебание содержания общего белка в сыворотке крови больных ММ. Непрерывной линией обведены значения в пределах нормы.

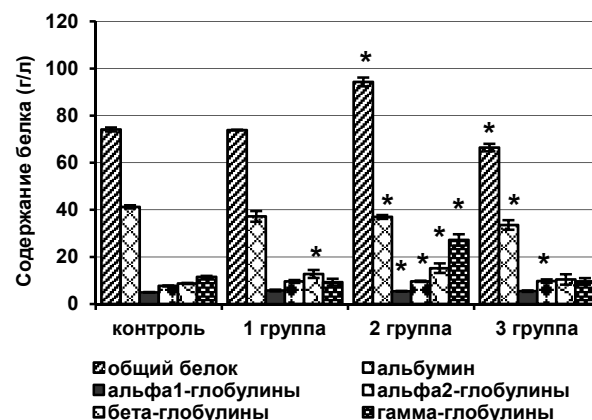


Рис. 3. Количественное распределение общего белка и белковых фракций в сыворотке крови здоровых и пациентов с ММ по группам: * – статистически значимые отличия от нормального уровня белка в сыворотке крови.

В первой группе при нормальном уровне общего белка сыворотки крови проведение капиллярного электрофореза белков сыворотки крови показало, что все белковые фракции находятся в пределах нормы, кроме фракции β -глобулинов, содержание которых увеличилось по сравнению с нормой в полтора раза ($p < 0,05$). ПП в крови присутствует, но не оказывает значительного влияния на содержание общего белка и его фракций.

Во второй группе наблюдается статистически достоверное повышение содержания общего белка сыворотки крови и всех фракций белка, кроме альбуминов, содержание которых снижалось ($p < 0,05$). Такие результаты являются классическим вариантом присутствия ПП в сыворотке крови [1, 5].

В третьей группе наблюдалось достоверное снижение содержания общего белка и альбумина ($p < 0,05$), повышение содержания $\alpha 2$ -глобулинов ($p < 0,05$). Гипопротеинемия сформирована в основном за счет снижения фракции альбумина, подавления нормального синтеза общих иммуноглобулинов. Это больные с выраженным иммунодефицитом, нарушением синтетической функции белков печени,

ХПН, увеличенным синтезом иммуноглобулинов ЛЦ, которые свободно фильтруются в мочу.

Частым осложнением у больных ММ является почечная недостаточность [6–8]. Причиной развития нефропатии при ММ является повреждение различных структур нефрона секретлируемым моноклональным иммуноглобулином и/или его фрагментами [10]. В 90 % случаев нефропатия развивается при секреции моноклональных легких цепей Ig – белка Бенс-Джонса (BJ) [12]. При фильтрации легких цепей иммуноглобулинов через гломерулярный фильтр и нарушении процессов канальцевой реабсорбции свободные легкие цепи попадают в мочу и могут быть обнаружены при электрофоретическом анализе белка мочи [3].

Вследствие вышесказанного параллельно с исследованием сыворотки крови проводился электрофорез белков мочи на наличие белка BJ с предварительным количественным определением общего белка мочи (рис. 4).

Содержание белка в моче в каждой из 3 групп имело свои особенности.

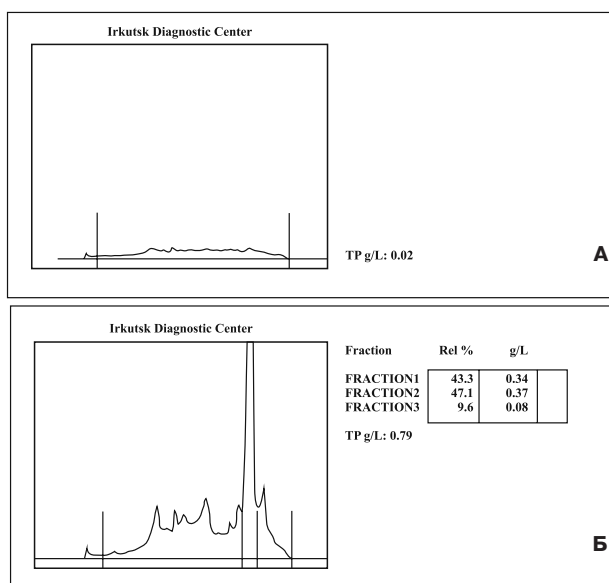


Рис. 4. Электрофорез мочи: общий белок – 0,02 г/л. Белок мочи в пределах физиологической нормы (А). Общий белок мочи – 0,79 г/л. В зоне γ-глобулинов выявляется моноклональная фракция (белок BJ), составляющая 47,1 % (0,37 г/л) от суммы всех белков мочи (Б).

В первой группе больных при нормальном общем белке сыворотки крови повышение уровня белка в моче наблюдалось у 40 % больных. У всех больных на электрофореграмме мочи определялся М-пик. Эти данные дают основание предполагать повышение белка в моче за счет белка BJ (рис. 4, 5).

Во второй группе больных с повышенным уровнем белка сыворотки крови содержание белка в моче повышалось у 66,7 % больных. При этом у 16 % больных при повышенном белке в моче не определялся на фореграмме М-пик в моче. По-видимому, повышение содержания белка в моче у этих больных вызвано патологией почек, не связанной с ММ, а белок BJ не образуется в количестве достаточном

для обнаружения в моче. У 50,7 % больных из второй группы повышенный белок сопровождался М-пиком на фореграмме. Эти данные дают основание предполагать повышение белка в моче за счет белка BJ (рис. 4, 5).

В третьей группе больных с пониженным уровнем белка сыворотки крови содержание белка в моче повышалось у 100 % больных. У 60 % больных этой группы методом капиллярного электрофореза мочи был выявлен М-пик и идентифицирован BJ. У 40 % отмечалось повышение содержания белка в моче без М-пика на электрофореграмме, т.е. у этих больных BJ в моче не обнаруживался.

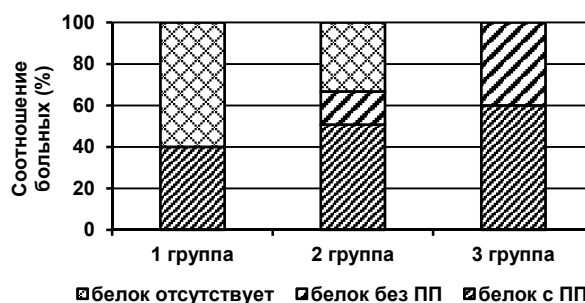


Рис. 5. Процентное соотношение больных с различным содержанием в моче белка и ПП.

Заболевание ММ относится к парапротеинемиям, для которых характерно увеличение содержания белков в крови. В зависимости от тяжести заболевания содержание общего белка и моноклонального белка в крови больного различно. При незначительной секреции ПП содержание общего белка в крови может не изменяться, гиперпротеинемия не формироваться и отсутствовать белок в моче. В нашем исследовании относительно контрольной группы таких больных оказалось 3 %. Если сравнивать с референсными значениями (64–85 г/л) [9], то в эту группу попали бы 12 % больных ММ. При обследовании таких пациентов в клинике, при отсутствии других результатов исследований, патология может быть не обнаружена. Наличие патологических белков в крови отражалось в этих случаях только на электрофореграмме, выполненной методом капиллярного электрофореза. Поэтому, анализируя полученные результаты, можно прийти к выводу, что нельзя делать заключения о состоянии здоровья пациента только на основании содержания общего белка в крови и моче.

У 20 % пациентов в нашем исследовании наблюдалось снижение содержания общего белка сыворотки крови. У таких больных врач скорее заподозрит патологию почек, печени, кишечника. Информация, полученная с помощью электрофореза белков, позволяет сузить количество необходимых для постановки диагноза исследований.

При обследовании больных на наличие ПП необходимо проводить исследование параллельно в сыворотке крови и моче, так как отсутствие патологического белка в крови не обязательно означает его отсутствие в моче. В трех случаях в нашем исследовании в крови ПП не выявлялся, а в моче М-пик регистрировался.

Приведенные данные показывают, что информация только об уровне содержания общего белка и его фракций в крови и моче не всегда бывает достаточной и не дает исчерпывающих оснований для определения состояния здоровья пациентов, но позволяет выявить наличие ПП в крови и моче на ранней стадии заболевания. Врач КДЛ, получив результаты электрофоретического разделения белков сыворотки крови и мочи, при выявлении моноклональной фракции должен провести иммунофиксацию для подтверждения наличия парапротеина и идентификации класса патологического иммуноглобулина. При подтверждении дать рекомендацию о консультации больного у гематолога.

На сегодняшний день электрофоретический метод в КДЛ является скрининговым и стоит у истоков ранней диагностики ММ, позволяет отслеживать патологический процесс и проводить адекватную терапию. Простота и доступность этого метода, а также неоспоримые преимущества, которые он дает при выполнении измерений, позволяют надеяться на динамичное развитие методического обеспечения и скорейшее включение капиллярного электрофореза в обязательный перечень биохимических методов анализа, наиболее часто применяемых в повседневной лабораторной практике клиническими врачами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бессмельцев С.С., Абдулкадыров К.М. Множественная миелома. – СПб.: Диалект, 2004. – 446 с.
2. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. – М.: Ньюдиамед, 2003. – С. 151–184.
3. Долгов В.В., Шевченко О.П. Лабораторная диагностика нарушений обмена белков // Уч. пособие. – М.: Эко-Мед – Полл, 1997. – С. 3–34.
4. Лапин С.В., Тотолян А.А. Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний. – СПб.: Человек, 2010. – 272 с.
5. Лапин С.В. Современные подходы к диагностике парапротеинемий. Оснащение современной лаборатории // Справочник заведующего КДЛ. – № 6. – июнь 2011.
6. Сендерова О.М., Орлова Г.М. Почечная недостаточность у больных с различными иммунохимическими вариантами множественной миеломы // Сборник тезисов VI съезда научного общества нефрологов России. – М., 2005. – С. 239.
7. Сендерова О.М., Орлова Г.М. Почечная недостаточность в дебюте множественной миеломы // Сиб. мед. журн. – 2006. – № 1. – С. 47–50.
8. Сендерова О.М., Капорская Т.С., Силян А.П. Особенности поражения почек при миеломной болезни: клинические наблюдения // Сиб. мед. журн. – 2006. – № 1. – С. 90–92.
9. Практическое руководство к прибору капиллярный электрофорез «Paragon CZE 2000» фирмы «Becman Coulter». – Becman Coulter, 2006. – 53 с.
10. Irish A.B., Winearls C.G., Littlewood T. Presentation and survival of patients with severe renal failure and myeloma // Oxford Journals: Medicine. – 1997. – Vol. 90, N 12. – P. 773–780.
11. Sanders P.W. Myeloma kidney // Kidney Int. – 1993. – Vol. 25. – P. 1–7.
12. The ultrastructural basis of renal pathology in monoclonal gammopathies / M. Santostefano [et al.] // J. Nephrol. – 2005. – Vol. 18. – P. 659–675.

Сведения об авторах

Гуцол Людмила Олеговна – доктор медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии с курсом клинической иммунологии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1)

Колесниченко Лариса Станиславовна – доктор медицинских наук, профессор кафедры химии и биохимии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России