



---

# ОСНАЩЕНИЕ СОВРЕМЕННОЙ ЛАБОРАТОРИИ

---

## Современные подходы к диагностике парапротеинемий

**С.В. Лапин**

---

*канд. мед. наук, заведующий лабораторией диагностики  
аутоиммунных заболеваний,*

**А.В. Мазинг**

---

*канд. мед. наук, ученый секретарь,*

**В.Л. Эмануэль**

---

*д-р мед. наук, проф., директор*

*Научно-методический центр по молекулярной медицине*

**М.В. Болотин**

---

*ассистент кафедры ГУ “Российская детская клиническая  
больница” Федерального агентства по здравоохранению  
и социальному развитию, г. Москва*

При пролиферации клона плазматических клеток увеличивается синтез иммуноглобулина, представленного одним классом, подклассом и изотипом, в состав которого входят тяжелые и легкие белковые цепи одного типа. При электрофоретическом разделении белков сыворотки крови этот иммуноглобулин мигрирует в виде компактной полосы, которая определяется на фоне других белковых фракций. Такой иммуноглобулин называют моноклональным иммуноглобулином или парапротеином (ПП). Термин “парапротеин” был впервые использован Aritz в 1940 г. для обозначения моноклональных белков в крови, моче и тканях, которые производятся миеломными клетками. В биохимических лабораториях прижился термин “М-пик” или “М-градиент”, отражающий форму ПП при денситометрии результатов электрофореза белков сыворотки крови. Задолго до этого, еще в 1846 г., Willam MacIntyre описал моноклональную фракцию белков мочи, которая получила название “белок Бенс-Джонса”, который также относят к ПП.

Диагностическое применение ПП имеет ряд общих черт с известными онкомаркерами. При опухолевой трансформации синтез иммуноглобулина, как и большинства онкомаркеров, значительно возрастает, а также приобретает новые свойства. Продукция ПП прирастает пропорционально объему опухоли, а концентрация в крови отражает общую опухолевую массу. При моноклональных гаммапатиях концентрация ПП обычно превышает 30 г/л, а синтез других классов иммуноглобулинов, не связанных с ПП, подавлен. Эффективное лечение множественной миеломы (ММ) и других парапротеинемий снижает содержание ПП в сыворотке крови ниже детектируемого.

### **Строение и особенности молекул парапротеина**

Молекулы ПП происходят из молекул иммуноглобулинов и синтезируются плазматическими клетками или плазмацитами. Поликлональные молекулы иммуноглобулинов включают тяжелую (IgA-альфа, IgG-гамма, IgM-мю, IgD-дельта, IgE-эпсилон) и легкую (каппа или лямбда) белковые цепи. Тяжелая цепь иммуноглобулина определяет его класс и подкласс. В каждой плазматической клетке экспрессируются легкие цепи только одной разновидности, причем в норме соотношение каппа и лямбда легких цепей в составе иммуноглобулинов сыворотки составляет 2 : 1 – 3 : 1. В отличие от поликлональных иммуноглобулинов, ПП представлены моноклональным иммуноглобулином или его свободной белковой цепью. Накопление массы злокачественных плазматических клеток приводит к уменьшению популяции плазматитов костного мозга, что ведет к снижению продукции нормальных иммуноглобулинов. За счет этого при ММ практически весь иммуноглобулин сыворотки крови состоит из ПП. При транзиторных парапротеинемиях синтез ПП происходит на фоне сохранения продукции поликлональных иммуноглобулинов, что не ведет к угнетению синтеза защитных иммуноглобулинов крови.

Изолированный синтез тяжелой цепи наблюдается крайне редко и отмечается при группе заболеваний, объединяемых под названием “болезни тяжелых цепей”. Синтез свободных легких цепей иммуноглобулинов является более частым явлением. Избыточный синтез поликлональных свободных легких цепей иммуноглобулинов отмечается при острых и хронических иммунных ответах, например при системной красной волчанке, рассеянном склерозе и других аутоиммунных заболеваниях. Обладая небольшим молекулярным весом, свободные легкие цепи проходят через почечный фильтр, но при сохраненной функции проксимальных канальцев полностью реабсорбируются и катаболизируются клетками канальцев. При нарушении процессов канальцевой реабсорбции свободные легкие цепи фильтруются в мочу и могут быть обнаружены при ее иммунохимическом или электрофоретическом анализе. При моноклональных гаммапатиях продукция ПП сопровождается синтезом моноклональных свободных

легких цепей, а при миеломе Бенс-Джонса ПП представлен только свободной легкой цепью иммуноглобулина. При миеломе с гиперпродукцией моноклональных легких цепей возможности реабсорбции канальцев быстро истощаются, и значительные количества белка оказываются в моче. При всех ММ легкие цепи обоих видов обладают нефротоксическим действием. Моноклональные легкие цепи обладают способностью к самоагрегации, что приводит к их спонтанной полимеризации в просвете канальцев с образованием белковых цилиндров. Увеличенная ионная сила мочи в дистальных канальцах приводит к ко-полимеризации легких цепей и белка Тамм-Хорсфала. При электрофорезе белков мочи и иммунофиксации наряду с мономерной легкой цепью обычно выявляются полимеры легких цепей. Другим проявлением повышенной способности легких цепей иммуноглобулинов к полимеризации является формирование AL-амилоида. При амилоидозе легкие цепи ассоциируются с белками сыворотки крови, прежде всего с сывороточным амилоидом P (SAP), и образуют характерный фибриллярный материал, окрашивающийся Конго-красным и обладающий способностью к двойной поляризации. Отложения AL-амилоида могут быть обнаружены в клубочках почки, сердце, нервах и стенке кишечника. Амилоидоз AL-типа чаще возникает при продукции цепей лямбда-типа. Легкие цепи каппа-типа при их гиперпродукции также могут откладываться в органах, однако отложений AL-амилоида не происходит. Это состояние носит название “болезнь отложений легких цепей”.

Под воздействием онкологической трансформации нарушаются посттрансляционные модификации синтезированных в плазматической клетке молекул иммуноглобулинов. Прежде всего это ведет к снижению гликозилирования иммуноглобулинов и, как следствие, их повышенной склонности к самоагрегации молекул ПП. Проявлением такой способности при моноклональных гаммапатиях является криоглобулинемия. Криоглобулины представляют собой циркулирующие иммунные комплексы, состоящие из моноклонального ПП, растворимость которых зависит от температуры. При снижении температуры ниже 35 °С происходит спонтанная преципитация иммунных комплексов. Клинические проявления криоглобулинемии включают кожные высыпания, артрит, в тяжелых случаях полиневрит и поражение почек. Преципитация обратима при повторном нагревании сыворотки *in vitro*, однако может привести к ложноотрицательным результатам выявления ПП, т. к. криоглобулины оседают на поверхности эритроцитов и остаются в сгустке при сепарации сыворотки крови.

Нарушение процессов созревания молекул иммуноглобулинов в злокачественной плазматической клетке приводит к тому, что изменяются число и структура цистеиновых мостиков в молекулах IgA и IgM. В результате антигены молекул ПП классов IgA и IgM могут быть “маскированы” и недоступны для выявления с помощью антисывороток. Для демаскирования используется обработка восстанавливающим агентом (обычно 2-меркап-

тоэтанолом), который разрушает сульфгидрильные мостики и позволяет антисыворотке связаться со своими эпитопами.

Моноклональный иммуноглобулин в составе ПП может быть направлен против собственных антигенов, т. е. являться аутоантителом. Так моноклональные ПП, индуцированные хронической инфекцией вирусным гепатитом С, представлены IgM и обладают активностью ревматоидного фактора. Это приводит к образованию крупных криоглобулиновых иммунных комплексов, в состав которых входит поликлональный IgG. Моноклональный IgM при парапротеинемических полинейропатиях направлен против миелин-ассоциированного гликопротеина (MAG). При холодовой гемолитической анемии моноклональные холодовые гемолизины класса IgM способны активировать комплемент, что приводит к разрушению эритроцитов.

### **Клинические проявления заболеваний, ассоциированных с синтезом парапротеинов**

Заболевания, при которых может быть выявлен синтез ПП, представляют собой широкий спектр процессов. Перечень основных нозологических форм и их клинических разновидностей, а также сравнительная встречаемость ПП при этих процессах представлены в таблице. Очевидно, что ПП отмечается как при классических гематоонкологических заболеваниях, таких как ММ и болезнь Вальденстрема, так и при разнообразных неонкологических процессах, имеющих разный прогноз и требующих различной терапии. Кроме того, ПП может быть транзиторно индуцирован при некоторых инфекционных или аутоиммунных заболеваниях.

#### **Основные заболевания и состояния, связанные с парапротеинами, и их сравнительная встречаемость \***

Характеристика процесса	Нозологическая форма	Характеристика парапротеинемии	Встречаемость при выявлении парапротеинов, %
1	2	3	4
Предзаболевания	Моноклональная гаммапатия неясного значения (МГНЗ)	Транзиторная парапротеинемия	20
		Доброкачественная парапротеинемия (свыше 5 лет)	
	Асимптоматическая (тлеющая) миелома	Без прогрессии (МГНЗ)	

---

\* На основе анализа 600 клинических образцов в специализированной клинике [6].

1	2	3	4
Неонкологические заболевания	Парапротеинемическая полинейропатия	IgM >> IgA=IgG	20
	Моноклональный ревматоидный фактор/криоглобулинемия	I тип – Моноклональный II тип – Эссенциальный (смешанная) III тип – Поликлональный	
	Холодовая гемолитическая анемия (моноклональная)	Холодовые агглютинины IgM/каппа	
	Амилоидоз	AL-амилоидоз Болезнь отложения легких цепей	
	Мисседатозный лишай (склеромикседема)	IgG/каппа	Редко
	РОEMS*-синдром	болезнь Кастелмана	Редко
Онкологические заболевания	Множественная миелома	IgG	50
		IgA	20
		Миелома Бенс-Джонса (болезнь легких цепей)	15
		Биклональная	2–4
		Несекретирующая	Редко
	Редкие формы: IgD > IgM > IgE	Редко	
	Макроглобулинемия Вальденстрема	IgM	4
	Солитарная плазмацитома		1
	Лимфопролиферативные заболевания	Лимфома/ХЛЛ	5
Болезнь тяжелых цепей	Альфа/гамма/мю	Редко	

\* РОEMS – полинейропатия, органомегалия, полиэндокринопатия, моноклональный компонент, кожные изменения.

При скрининговых обследованиях выявляемость ПП в популяции после достижения 50 лет резко увеличивается и достигает 4–7% у лиц старше 65 лет. Однако большинство впервые выявленных случаев парапротеинемии в общей популяции представляют собой бессимптомные моноклональные гаммапатии невыясненного значения (МГНЗ). Термин “МГНЗ” указывает на случаи парапротеинемии без других признаков онкогематологического заболевания, которые не требуют специфического лечения. К числу таких признаков относят увеличение числа плазматических клеток костного моз-

га, анемию, гиперкальцемию, поражения почек и изменения костей. Концентрация ПП при МГНЗ ниже 30 г/л и обычно не превышает 10–15 г/л. Кроме того, при МГНЗ ПП выявляется на фоне поликлональных иммуноглобулинов, т. е. угнетения нормального синтеза иммуноглобулинов не происходит. К МГНЗ относят случаи транзиторного выявления ПП, обычно обусловленные дисрегуляцией иммунной системы на фоне перенесенной инфекции, а также доброкачественную парапротеинемию, которая отмечается при сохранении ПП без прогрессирования в ММ или другое заболевание в течение 5 лет наблюдения. При транзиторной парапротеинемии концентрация ПП обычно ниже 3 г/л.

В большинстве случаев при МГНЗ моноклональный компонент в моче не выявляется. Обнаружение клоальности синтеза свободных легких цепей в сыворотке крови при МГНЗ является неблагоприятным признаком, указывающим на высокий риск злокачественной трансформации. Наибольшим риском в отношении развития ММ обладают формы асимптоматической (тлеущей) миеломы, которые сопровождаются высокой концентрацией ПП в сыворотке крови и значительным процентом плазматических клеток в костном мозге. При обнаружении ПП менее 15 г/л в отсутствие клинической симптоматики электрофорез белков сыворотки должен проводиться ежегодно. Особый риск представляет собой выявление ПП у пациентов без симптомов миеломы моложе 50 лет, поскольку частота МГНЗ у лиц до 50 не превышает 1%. В этом случае большинство выявленных случаев парапротеинемии будут указывать на ММ.

При выявлении ПП у обследованных моложе 50 лет необходимы более частые повторные обследования, поскольку у них отмечается высокий риск развития ММ. Если концентрация ПП составляет более 15 г/л, вне зависимости от возраста рекомендуется проведение расширенного обследования, включающего электрофорез 24-часового образца мочи и иммунофиксацию каждые 3–6 месяцев, поскольку риск злокачественной трансформации очень высок.

Основным заболеванием, которым сопровождается ПП, является ММ. В популяции Северной Европы ежегодная заболеваемость ММ составляет 50 случаев на 1 млн жителей, пик заболеваемости приходится на 70 лет. При ММ в сыворотке крови ПП чаще всего представлен IgG (60%), реже IgA (20%). Оставшиеся около 20% случаев приходятся на миелому Бенс-Джонса, связанную с продукцией свободных легких цепей каппа или ламбда (20%), которые могут быть обнаружены в моче. В 2–4% случаев миеломы может отмечаться биклональный ПП, представленный иммуноглобулинами разных классов или одного класса, но содержащий легкие цепи разных классов. Изменения концентрации ПП служит показателем эффективности лечения ММ. Мониторинг концентрации ПП при миеломе на фоне терапии должен осуществляться каждые 3 месяца. Если содержание ПП снизилось

ниже детектируемого, повторное измерение целесообразно проводить через 6 или 12 месяцев.

Макроглобулинемия Вальденстрема представляет собой лимфоплазматическую лимфому с продукцией моноклонального IgM. Лимфоплазматические опухолевые клетки с характерным иммунофенотипом диффузно распределены в лимфатических узлах, селезенке и костном мозге. Высокая концентрация моноклонального IgM часто превышает 30 г/л и приводит к увеличению вязкости крови и ряду характерных жалоб, включающих спутанность сознания, слепоту, склонность к кровоточивости, сердечную недостаточность и гипертензию. При макроглобулинемии высокое содержание ПП крови может быть причиной ряда клинических состояний, таких как криоглобулинемия 1-го типа, парапротеинемическая полинейропатия и холодовая гемолитическая анемия. При других разновидностях лимфом и хроническом лимфолейкозе ПП класса IgM отмечается у 20% больных, однако концентрация ПП обычно ниже, чем 30 г/л.

Болезнь тяжелых цепей, при которой синтезируется только тяжелая цепь иммуноглобулина, очень редко встречается в европейской популяции. Болезнь альфа-цепи чаще развивается у выходцев с Ближнего Востока и сопровождается тяжелой малабсорбцией в тонком кишечнике. Болезнь тяжелой цепи гамма напоминает лимфому и часто сопровождается аутоиммунными проявлениями, например ревматоидным артритом, синдромом Шегрена и системной красной волчанкой. Болезнь мю-цепи протекает с клиникой хронической лимфоцитарной лейкемии и может сопровождаться синтезом свободной легкой цепи, однако синтез полной молекулы иммуноглобулина отсутствует.

Криоглобулины выявляются при криоглобулинемических васкулитах (криоглобулинемиях). Выделяют три типа криоглобулинемии. Криоглобулины первого типа характеризуются присутствием в плазме ПП, обычно классов IgM или IgG. Основными причинами их появления являются лимфопролиферативные заболевания, прежде всего макроглобулинемия Вальденстрема, реже миелома, хронический лимфоцитарный лейкоз и различные формы лимфом. Криоглобулины выявляются у 20% больных с парапротеинемиями на фоне лимфопролиферации, однако менее чем в половине случаев отмечается клиническая симптоматика, связанная с увеличением вязкости крови, например головные боли, нарушения зрения, геморрагии сосудов сетчатки и синдром Рейно. При втором типе криоглобулины имеют смешанный состав, включая моноклональный компонент, обычно ревматоидный фактор класса IgM, и поликлональный IgG. Основным инфекционным агентом, приводящим к развитию смешанной криоглобулинемии, является гепатит С. Реже смешанная криоглобулинемия является случайной находкой у больных с заболеваниями соединительной ткани, лимфопролиферативными процессами и скрытыми инфекциями. При поликлональной криоглобулинемии третьего типа ПП в составе криопреципитата не отмечается.

Феномен холодовой гемагглютинации был впервые обнаружен К. Landsteiner в 1903 г. Антиэритроцитарные антитела (холодовые агглютинины), представленные ПП класса IgM, являются основной причиной холодовой аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА). Отличительной особенностью моноклональных агглютининов является их способность к гемагглютинации в большом диапазоне температур. Холодовые агглютинины направлены против I-антигена эритроцитов и являются комплемент-фиксирующими. Анти-(I) антитела обычно выявляются при первичной холодовой АИГА и АИГА на фоне лимфопролиферативных заболеваний и инфекций, в т. ч. микоплазменной пневмонии и цитомегаловируса.

При хронических периферических нейропатиях у 20–30% больных могут быть обнаружены моноклональные аутоантитела к компонентам периферических нервов: ганглиозидам, гликолипидам и антитела к MAG. Часто аутоантитела появляются на фоне МГНЗ или макроглобулинемии Вальденстрема. “Парапротеинемический нейропатический синдром”, возникающий на фоне парапротеинемии IgM, проявляется клиникой сенсорной полинейропатии с атаксией и офтальмоплегией. Периферическая невропатия является основным клинически значимым проявлением МГНЗ и может отмечаться у 5–20% больных. Моноклональный компонент может не выявляться с помощью электрофореза белков сыворотки, однако может быть обнаружен при использовании более чувствительных методов, например изоэлектрофокусирования. В ряде случаев холодовая АИГА и полинейропатия на фоне парапротеинемии могут сочетаться, что обусловлено перекрестной реакцией аутоантител к гликолипидам периферических нервов и сиаловым остаткам гликолипидных антигенов эритроцитов. Полинейропатия может выступать компонентом “РО-EMS синдрома”, представляющего сочетание остеосклеротической миеломы и болезни Кастелмана. При этом симптомокомплексе развивается характерное поражение ряда внутренних органов, включая эндокринопатию, отек зрительного нерва, органомегалию, изменения кожи. Основную роль в развитии РО-EMS синдрома играет нарушение синтеза цитокинов, таких как VEGF и IL-6. Близким по механизмам патогенеза РОEMS синдрому является микседематозный лишай или склеромикседема. Это редкое заболевание кожи, связанное с диффузными изменениями и уплотнением кожи на конечностях, туловище и лице, с отложением муцина в дерме и выраженным фиброзом. У большинства больных в сыворотке крови может быть обнаружен ПП класса IgG/каппа.

Диагностическая значимость обнаружения ПП значительно увеличивается при характерной клинической картине, указывающей на миелому или макроглобулинемию. При скрининге методом электрофореза или иммунофиксации у лиц с отсутствием клинических проявлений миеломы обнаружение ПП указывает на МГНЗ. К клиническим показаниям для исследования ПП относят боли в костях, патологические переломы, полинейропатию, лихорадку, анемию. Для парапротеинемий характерны такие



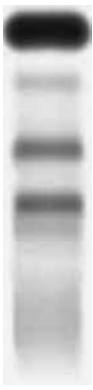
лабораторные показатели, как увеличение скорости оседания эритроцитов, протеинурия и азотемия, гиперкальцемию, увеличение содержания общего белка сыворотки, а также изменения в составе основных белковых фракций. Инфекционные процессы также часто сопутствуют миеломе, поскольку синтез парапротеина подавляет синтез нормальных иммуноглобулинов, что ведет к нарушению функций иммунной системы. Иммунохимическое исследование основных иммуноглобулинов сыворотки крови IgG, IgA, IgM позволяет выявить изменение их синтеза. Однако при измерении ПП иммунохимическое определение иммуноглобулинов не рекомендовано в связи с частым феноменом “прозоны” при высоких концентрациях и неточностью измерения моноклональных молекул, поскольку особенности синтеза в миеломной клетке меняют антигенные свойства ПП. Во всех этих случаях методом выбора для выявления и измерения ПП является электрофорез с иммунофиксацией белков сыворотки и мочи.

### **Выявление парапротеинов с помощью электрофореза и иммунофиксации**

Для клинического исследования ПП целесообразно использовать электрофорез в агарозном геле или капиллярный электрофорез. В зависимости от условий электрофореза и состава буфера может формироваться 5 или 6 фракций белков. В последнем случае бета-фракция разделяется на бета-1 и бета-2 (минорную) фракции. В каждой фракции в норме присутствует определенный набор белков, поэтому результат электрофореза белков сыворотки дает комплексное представление об изменении синтеза и катаболизма многих белков организма (рис. 1). Клиническая интерпретация результатов электрофореза белковых фракций изложена в ряде руководств по клинической лабораторной диагностике.

Для выявления ПП методы электрофореза и иммунофиксации должны использоваться совместно. Электрофорез с денситометрической оценкой белковых фракций позволяет предположить наличие ПП, а иммунофиксация – подтвердить его наличие в той или иной фракции. Денситометрия является предпочтительным методом оценки содержания белка в составе белковых фракций и позволяет оценить концентрацию ПП. Предел чувствительности метода электрофореза, ассоциированного с иммунофиксацией, позволяет определять 0,5 г/л моноклонального ПП в составе иммуноглобулина.

Классический результат обнаружения ПП с помощью электрофореза представляет выраженную полосу (M-пик) в зоне гамма-глобулинов. Интенсивная фракция ПП выявляется на бледном фоне, который указывает на подавление синтеза поликлональных иммуноглобулинов. Только в этой ситуации с большой уверенностью можно интерпретировать полученный результат как ПП и определить его концентрацию. Здесь иммунофиксация позволяет типировать ПП, т. е. описать его состав. В большинстве же случаев выявление моноклонального ПП в образце не так однозначно (рис. 2),

	Альбумин	Альбумин Преальбумин
	Альфа-1 глобулины	α1-антитрипсин, α1 антихемотрипсин, α1-гликопротеин, α1 липопротеин
	Альфа-2 глобулины	Церулоплазмин, Альфа2-макроглобулин, Гаптоглобин
	Бета-глобулины	Трансферрин, Бета-липопротеин, СРБ, С3 фактор комплемента, IgA, IgM
	Гамма-глобулины	IgG, IgM, IgD, IgE

**Рис. 1.** Основные фракции белка сыворотки крови и их компоненты

т. к. ПП происходит из поликлональных молекул иммуноглобулинов, которые обладают разными физико-химическими свойствами и могут мигрировать в составе различных фракций белков сыворотки (Vavricka SR et al., 2009). Чаще всего ПП класса IgG и IgM обнаруживаются в гамма-фракции, а ПП классов IgA и свободные легкие цепи мигрируют в составе альфа2- и бета-фракций. Нарушение синтеза иммуноглобулинов затрудняет выявление ПП при поликлональной гипергаммаглобулинемии (рис. 2.7), увеличение продукции IgA при циррозе (рис. 2.5), олигоклональный синтез иммуноглобулинов при хронических воспалительных заболеваниях. Гипоглобулинемия может быть проявлением миеломы Бенс-Джонса с угнетением синтеза собственных иммуноглобулинов (рис. 2.8). В последнем случае свободные легкие цепи обычно мигрируют в составе бета- или альфа2-фракции глобулинов. Изменения альфа2- и бета-фракций могут имитировать присутствие ПП. Дополнительные яркие полосы отмечаются в гамма-фракции при высоком содержании фибриногена в сыворотке (рис. 2.4), гемолизе с образованием комплексов “гемоглобин – гаптоглобин” в альфа2-фракции (рис. 2.3). Увеличение и изменение бета-фракции происходит при повышении трансферрина при железодефицитной анемии, выявлении генетических вариантов трансферрина, высокого С-реактивного белка или С3-фактора комплемента при воспалении. Подозрения на ПП могут возникать при нарушениях метаболизма при нефротическом синдроме (рис. 2.6) или индукции синтеза белков, например альфа-фетопротеина при раке печени.

Стандартного алгоритма для проведения иммунофиксации по результатам электрофореза белков сыворотки крови нет, поэтому решение о проведении дообследования клиницист и врач клинической лабораторной диагностики должны принимать совместно в зависимости от клинических находок и результатов лабораторных показателей. Обнаружение даже небольшого



**Рис. 2.** Детекция парапротеина с помощью электрофореза белков сыворотки и основные феномены, затрудняющие его выявление

содержания ПП может указывать на тяжелое онкогематологическое заболевание, такое как лимфома или миелома. Определение свободных легких цепей иммуноглобулинов и их соотношения может использоваться в качестве дополнительного метода в постановке диагноза, однако такая оценка неточна при биклональной миеломе и небольшом содержании ПП (менее 5 г/л). Поэтому увеличение глобулиновых фракций сыворотки крови (альфа2, бета, гамма) требует проведения иммунофиксации. Гипогаммаглобулинемия, особенно в сочетании с протеинурией, является основным признаком миеломы Бенс-Джонса. В случае гипогаммаглобулинемии должен быть выполнен электрофорез 24-часовой мочи для обнаружения белка Бенс-Джонса.

Имунофиксация является двустадийным процессом, который объединяет горизонтальный электрофорез в агарозном геле и детекцию иммуноглобулинов с помощью специфических антисывороток. Моноспецифические антисыворотки к тяжелым и легким цепям иммуноглобулинов наносятся на гель и проникают в его структуру за счет пассивной диффузии. Благодаря малой толщине геля линии преципитации антисыворотки-иммуноглобулина образуются сравнительно быстро (через 20–30 мин), однако эффективность преципитации зависит от ряда факторов, включая концентрацию антигена, ионную силу и рН раствора, а также температуру.

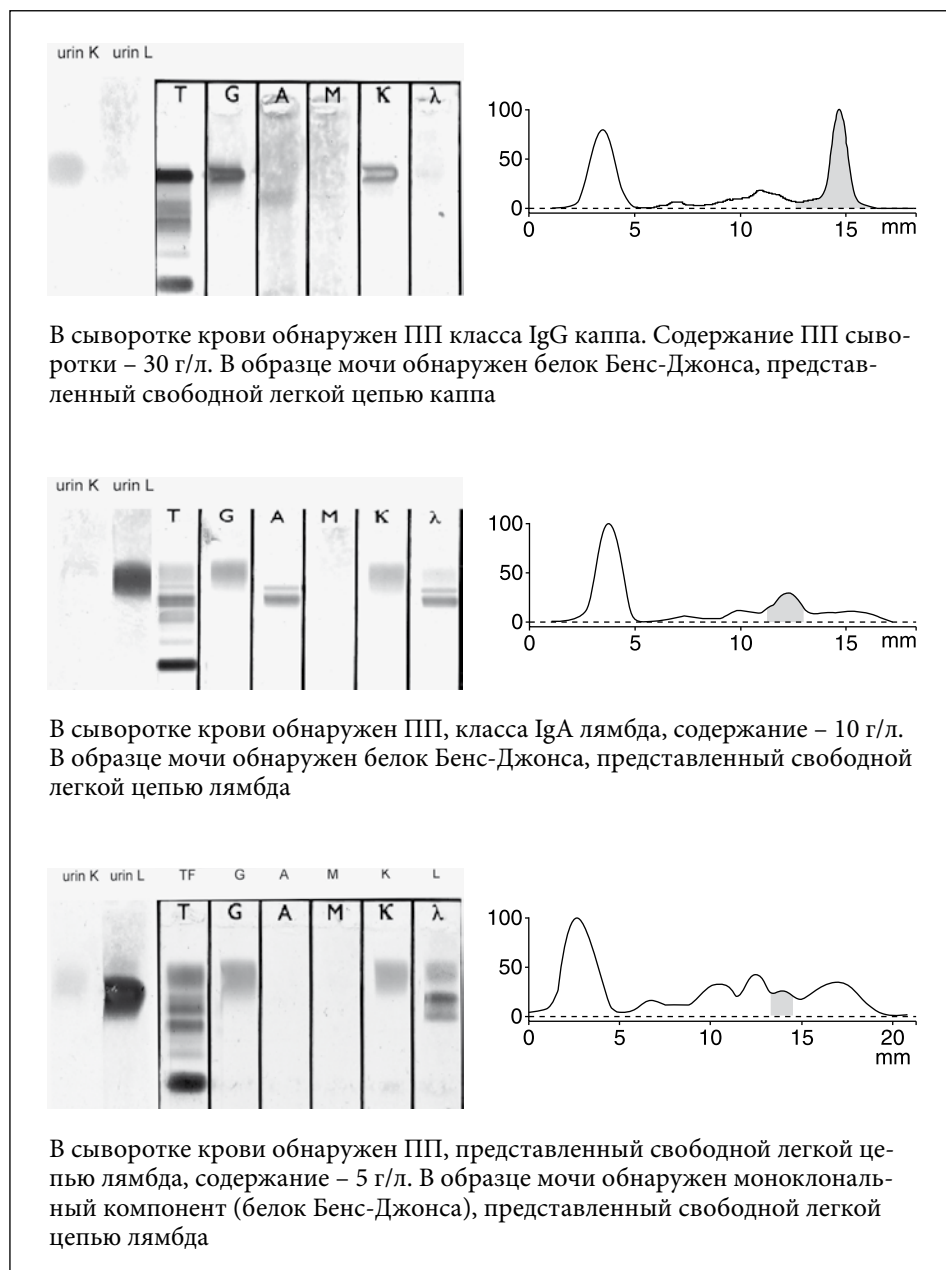
Образовавшиеся иммунные комплексы являются нерастворимыми и фиксируются в порах геля. Отмывка позволяет удалить несвязавшиеся белки, а иммунные комплексы окрашиваются белковым красителем.

Иммунофиксация производится одновременно на 6 дорожках, из которых в одну вносится фиксатор белков, в пять остальных – антисыворотки к тяжелым цепям IgG, IgA, IgM и легким цепям каппа и лямбда. Обнаружение характерной фракции белка, которая реагирует с антисыворотками против тяжелых и легких цепей, указывает на обнаружение ПП, представленного целой молекулой одного из основных классов иммуноглобулинов. Если фракция реагирует только с антисывороткой против легкой цепи, то рекомендуется повторное исследование с антисыворотками к IgD и IgE. Отсутствие реакции с антисыворотками к IgD и IgE указывает на то, что ПП представлен свободной легкой цепью иммуноглобулина. Болезнь тяжелых цепей представляет редкий лабораторный диагноз, который должен устанавливаться только при очевидном выявлении изолированного синтеза тяжелой цепи иммуноглобулина. Следует учитывать, что миелома класса IgA может походить на болезнь тяжелых цепей, т. к. структура ПП IgA может затруднять распознавание легких цепей соответствующими антисыворотками. Примеры обнаружения ПП с помощью иммунофиксации приведены на рис. 3. При выявлении ПП необходимо сопоставить результат иммунофиксации с электрофорезом белковых фракций, провести денситометрическое выделение моноклональной фракции и ее измерение.

Высокое содержание ПП в патологических образцах часто приводит к феномену “прозоны”, который заключается в растворении иммунных комплексов при высокой концентрации антигена. Феномен прозоны может приводить к ложноотрицательным результатам тестирования. Для устранения этого явления может потребоваться повторное исследование с многократным разведением тестируемой сыворотки для снижения концентрации ПП в образце. Высокая концентрация иммунных комплексов, ревматоидного фактора, криоглобулинов может привести к преципитации в месте нанесения сыворотки на всех дорожках. В этом случае может потребоваться использование восстанавливающих веществ, например 2-меркаптоэтанола, для растворения агрегатов и повтора исследования.

Удобным вариантом сочетания методов электрофореза белков сыворотки и иммунофиксации является исследование с пентавалентной антисывороткой. Это скрининговый метод, представляющий разновидность иммунофиксации с использованием одной антисыворотки, направленной против IgG, IgM, IgA, каппа и лямбда цепей. Окраска амидо-черным красителем позволяет проводить прямую денситометрию белковых фракций и одновременную количественную оценку ПП на основании выявленных моноклональных фракций. Этот метод не только позволяет проводить скрининговое обследование, но и сравнительно дешевле развернутого теста, т. к. вместо 6 используются только 2 дорожки.

Для выполнения клинического электрофореза и проведения иммунофиксации в нашей лаборатории с 2008 г. мы пользуемся системой клинического электрофореза SAS-1plus/SAS-2 и готовыми наборами реактивов фирмы Helena Biosciences Europe (Великобритания). Все реактивы для



В сыворотке крови обнаружен ПП класса IgG каппа. Содержание ПП сыворотки – 30 г/л. В образце мочи обнаружен белок Бенс-Джонса, представленный свободной легкой цепью каппа

В сыворотке крови обнаружен ПП, класса IgA лямбда, содержание – 10 г/л. В образце мочи обнаружен белок Бенс-Джонса, представленный свободной легкой цепью лямбда

В сыворотке крови обнаружен ПП, представленный свободной легкой цепью лямбда, содержание – 5 г/л. В образце мочи обнаружен моноклональный компонент (белок Бенс-Джонса), представленный свободной легкой цепью лямбда

**Рис. 3.** Варианты выявления парапротеина методом иммунофиксации на системе SAS1/SAS2 фирмы Helena Biosciences Europe (Великобритания)

электрофореза объединены в системе “гель – буфер”, что исключает необходимость работы с буфером для электрофореза. На один гель может быть нанесено до 24 образцов, причем система нанесения образцов позволяет комбинировать образцы различного биологического материала, что целесообразно при одновременном проведении иммунофиксации образцов сыворотки крови и мочи. Заслуживает отдельного внимания уникальная система автоматического нанесения образцов на гель, которая может сконцентрировать биоматериал непосредственно на геле. За счет этого метод имеет высокую аналитическую чувствительность, составляющую 0,25 г/л белка на белковую фракцию сыворотки и до 10 мг/л на фракцию белков мочи. Электрофорез проводится в реакционной камере при постоянной температуре и влажности. Вся процедура фиксации, окрашивания и сушки геля стандартизована, выполняется в автоматическом режиме и не требует вмешательства персонала. Для обработки, редактирования, анализа и архивирования данных, а также ведения карт внутрилабораторного контроля качества используется русифицированный пакет программного обеспечения Platinum III. Его дополнительным преимуществом является возможность создания удобной формы заключения по результатам исследования, а также интегрирование в лабораторную информационную систему.

### Список использованной литературы

1. *Липин С.В., Толоян А.А.* Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний. СПб: Человек, 2010. 272 с.
2. *Blade J., Dimopoulos M., Rosinol L. et al.* Smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: current diagnostic criteria, new predictors of outcome, and follow-up recommendations // *J. Clin. Oncology*. 2010. Vol. 28, N 4. P. 690–697.
3. *Kyle R.A., Rajkumar S.V.* Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma // *Leukemia*. 2009. Vol. 23, N 3. P. 3–9.
4. *Kyle R.A., Katzmann J.A.* Immunochemical characterization of immunoglobulins / *Manual of Clinical Laboratory Immunology* 5<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington. 1997. P. 156–176.
5. *Lin P., Hao S., Handy B.C., Bueso-Ramos C.E., Medeiros L.J.* Lymphoid neoplasms associated with IgM paraprotein: a study of 382 patients // *Am J Clin Pathol*. 2005. Vol. 123 (2). P. 200–205.
6. *Riches P.G., Hobbs J.R.* Laboratory investigation of paraproteinaemia // *J Clin Pathol*. 1988. Vol. 41, N 7. P. 776–785.
7. *Sengul S., Li M., Batuman V.* Myeloma kidney: toward its prevention—with new insights from in vitro and in vivo models of renal injury // *J Nephrol*. 2009. Vol. 22, N 1. P. 17–28.
8. *Vavricka S.R., Burri E., Beglinger C., Degen L., Manz M.* Serum protein electrophoresis: an underused but very useful test // *Digestion*. 2009. Vol. 79, N 4. P. 203–210.