

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет біології, географії та екології
Кафедра біології людини та імунології

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ В СУЧАСНІЙ
ЛАБОРАТОРНІЙ ПРАКТИЦІ В МІСТІ ХЕРСОН

Кваліфікаційна робота (проект)
на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»

Виконала: здобувачка 211М групи
Спеціальності 091. Біологія
Освітньо-професійної програми Біологія
Карплюк Валентина Павлівна
Керівник: к.б.н., доцент, Спринь О. Б.
Рецензент: завідувач лабораторного
відділення КНП «ХОКЛ» ХОР
Кравченко О. А.

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. Відомості про лікарню	5
1.1. Загальні відомості про Херсонську обласну клінічну лікарню.....	5
1.2. Структура лабораторного відділення	6
РОЗДІЛ 2. Загальні поняття про електрофорез	8
2.1. Поняття про електрофорез та його принцип методу.....	8
2.2. Різновиди електрофорезу та інтерпретація результатів	13
2.3. Електрофорез білків в поліакриламідному гелі	32
РОЗДІЛ 3. Діагностики захворювань за допомогою електрофорезу.....	43
3.1. Аналіз статистичних даних щодо діагностики захворювань за допомогою електрофорезу	43
3.2. Аналіз етапів діагностики та протікання хвороби у пацієнта.....	46
ВИСНОВКИ	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	52

ВСТУП

Однією з умов розвитку лабораторної медицини слід вважати розробку і впровадження високоефективних, але водночас доступних і відносно простих аналітичних методів діагностичних підходів. Таким методом, що відрізняється різноманітністю вирішуваних із застосуванням клінічних завдань, безперечно, є електрофорез.

На сьогоднішній день розроблена величезна кількість методичних варіантів електрофорезу та їх опису. Електрофорез, як метод аналізу, вже знайшов широке застосування у світовій лабораторній практиці. Використання його полягає в тому, що цей метод дозволяє отримати загальне уявлення про стан білкового обміну, ліпопротеїдів, ізоферментів в організмі, встановлює ймовірний діагноз і визначає алгоритм подальшого дослідження.

Мета дослідження: дослідити використання електрофорезу в лабораторній діагностиці та провести аналіз статистичних даних отриманих на базі лабораторного відділення Херсонської обласної клінічної лікарні.

Згідно до мети були поставлені наступні **завдання:**

1. Ознайомитися зі структурою лабораторного відділення;
2. За допомогою літературних джерел розглянути та опрацювати методику використання електрофорезу;

3. Ознайомитися із різновидами електрофорезу та їх використанням;
4. Провести аналіз статистичних даних щодо діагностики захворювань за допомогою електрофорезу за період 2018-2020рр..

Об'єкт дослідження: методика і різновид електрофорезу.

Предмет дослідження: використання електрофорезу в лабораторній діагностиці.

Методи дослідження: аналіз та узагальнення наукової літератури, спостереження та опрацювання методики лабораторного діагностування і статистичних даних.

Робота пов'язана з ініціативною темою дослідження кафедри: «Адаптаційні процеси організму в умовах цитокінового навантаження» (державний реєстраційний номер 0119U101093).

Наукова новизна роботи: вперше вивчено досвід роботи Херсонської обласної клінічної лікарні (ХОКЛ) та за даною методикою лабораторного діагностування дані висвітлюються також вперше.

Практичне значення: дана робота може бути корисною студентам біологічних, хімічних спеціальностей, а також спеціалістам лабораторного дослідження для теоретичного ознайомлення з роботою електрофорезу.

Матеріали використані із звіту, які були надані лабораторією.

Апробація: матеріали роботи були представлені:

на III Всеукраїнській студентській науково-практичній інтернет-конференції «Студентський науковий вимір проблем природничо-математичної освіти в контексті інтеграції України до єдиного європейського і світового освітнього простору» з темою «Використання електрофорезу в лабораторній діагностиці на сучасному етапі». Глухів. 2021. С. 20-23.

Структура та обсяг роботи: робота складається зі вступу, трьох розділів, висновків та списку використаних джерел.

РОЗДІЛ 1

Відомості про лікарню

1.1. Загальні відомості про Херсонську обласну клінічну лікарню

Херсонська обласна клінічна лікарня одна з найстаріших закладів охорони здоров'я в Україні, має історію понад 200 років. Основним напрямом роботи лікарні є покращення якості медичної допомоги спеціалістів на основі впровадження сучасних медичних технологій та її оновлення та стандартного контролю системи дотримання вимог. У лікарні є система контролю якості процесу лікування та діагностики.

В останні десятиліття лікарня стрімко розвивалася. У 1998 році лікарня першою пройшла національну сертифікацію, отримавши найвищий рівень сертифікації та медичну ліцензію. У 1998 році лікарні було надано клінічний статус. У 2003 році лікарня була визнана найкращим закладом охорони здоров'я в Україні за результатами оцінки «Лідерів 21-го століття» Міжнародного іміджевого проекту. Сьогодні Херсонська обласна клінічна лікарня є потужним сучасним третинним закладом, який надає широкий спектр професійних та якісних медичних послуг населенню регіону [17].

У лікарні є 19 стаціонарних відділень, включаючи 11 хірургічних. Лікарня має 575 ліжок і щорічно обслуговує понад 24 тис. пацієнтів. Виконується більше 14 500 операцій на рік. В обласній консультативній поліклініці (375 відвідувань на день) надходять 24 лікарняні спеціальності.

До складу лікарні входять регіональні діагностичні центри та інші центри медичної консультації та діагностичної допомоги.

- центр моніторингу хірургічної патології щитовидної залози та наднирників;
- медико-генетична консультація;
- центр планування сім'ї та репродукції людини;
- проктологічний центр;
- центр ендоскопічної хірургії хребта і суглобів;
- центр інтервенційної радіології;
- політравми;
- щелепо-лицьової травми;
- глаукомний;
- малоінвазивних урологічних втручань;
- мікрохірургії ока та лазерних технологій.

Лікарня є основною базою підвищення кваліфікації медичного персоналу в цій сфері. Команда пишається багатьма провідними спеціалістами лікарні, включаючи семеро кандидатів медичних наук та чотирьох українських почесних лікарів, а також українських почесних медичних працівників.

У лікарні є система контролю якості процесу лікування та діагностики. Вона базується на систематичній оцінці впровадження затверджених стандартів якості на всіх рівнях. Атестаційний комітет МОЗ України здійснив перевірку та оцінку роботи стаціонарних відділень, у ході якої Херсонська обласна клінічна лікарня підтвердила високу категорію і професіоналізм під керівництвом Заслуженого лікаря

України В. Л. Клименко. З вересня 2021 року лікарню очолює В. М. Короленко.

1.2. Структура лабораторного відділення

Лабораторне відділення є підрозділом обласної клінічної лікарні з 1944 року. Лабораторне відділення КНП «ХОКЛ»ХОР є самостійним структурним підрозділом, який безпосередньо підпорядкований заступнику директора з медичної частини та директору обласної лікарні. Загальне керівництво діяльністю лабораторного відділення здійснює завідувач. Завідувач несе відповідальність за об'єктивність та достовірність результатів вимірювань, що виконуються в лабораторії. Основними завданнями завідувача лабораторією є організація вчасного та якісного проведення необхідного обсягу лабораторних досліджень хворим стаціонару та відвідувачам поліклініки з діагностики та профілактики захворювань.

За лабораторним відділенням закріплені приміщення, засоби вимірювальної техніки (ЗВТ), випробувальне (ВО) та допоміжне обладнання, нормативні, організаційні і методичні документи. Відомості про них наведені в “Паспорті лабораторного відділення”.

Лабораторне відділення складається з відділів:

1. Загальноклінічний.
2. Гематологічний.
3. Біохімічний.
4. Імунологічний.
5. Мікробіологічний
6. Відділ генетичних досліджень.
7. Експрес – відділ.

РОЗДІЛ 2

Загальні поняття про електрофорез

2.1. Поняття про електрофорез та його принцип методу

Електрофорез – метод, який дозволяє розділити заряджені молекули в електричному полі. Електрофорез як біохімічний метод - дуже потужний пристрій для оцінки широкого спектру життєвих процесів.

Електрофорез застосовують щодо оцінки наявності кількісних (збільшення кількості фракцій) або якісних (утворення додаткових фракцій) аномалій в організмі. Ці аномалії дозволяють припустити той чи інший діагноз або ж підтвердити його. Застосування електрофорезу в ході моніторингу дозволяє спостерігати за розвитком захворювання, оцінити ефективність терапії [15, 35].

Принциповою основою всіх електрофоретичних методів є той факт, що молекули, які знаходяться в розчині мають електричний заряд, під дією сил електричного поля зміщуються в бік протилежно зарядженого електрода. Таке явище має назву електрофорез

Швидкість міграції речовини в середовищі з однієї і тієї ж силою електричного поля, залежить від розміру часток і їх електричного заряду. У разі білкових молекул, завдяки їх амфотерним властивостям, напрямком і швидкістю зсуву багато в чому залежить від рН середовища, в якій відбувається міграція. Заряд різних білків в розчинах з однаковим рН залежить від амінокислотного складу, так як дисоціація білкових ланцюгів призводить до утворення груп, що мають позитивний або негативний заряд [22]. Під впливом сил електричного поля компоненти розганяється системи розподіляються відповідно до їх заряду, набуваючи відповідну швидкість руху, тобто відбувається електрофоретичний поділ. Впровадження електрофоретичних "носіїв" привело до поліпшення технологій і одночасно до спрощення фракціонування. Як "носіїв" використовуються фільтрувальна папір, целюлоза, ацетат целюлози, різні гелі (поліакриламід), агароза і ін. При цьому під час електрофорезу, поряд з поділом часток згідно їх зарядів, вступає в силу так званий "молекулярно-ситовий ефект", коли гелева структура поводить себе по відношенню до іонів як фільтр. Іони, що перевищують її пористість не проходять або проходять дуже повільно, а більш дрібні іони швидше проникають через пори матриці. Таким чином, швидкість пересування залежить не тільки від заряду іона, а й від величини пор гелю, форми пор, величини рухомих іонів, взаємодії між матрицею гелю і рухомими іонами (адсорбція та ін.) [32].

Розмір пор в агарозних гелях залежить від концентрації агарози. Використання агарози в малій кількості (0,5 чи 1%) дає можливість елімінувати або значно зменшити вплив розміру молекули на її швидкість в агарозних гелях, що дозволить молекулам білка і ліпопротеїдів вільно мігрувати з мінімальною похибкою.

При проведенні електрофорезу електричне поле створюють за допомогою джерела живлення - стабілізованого випрямляча, здатного давати регульоване напруга до 500 - 1000 В при силі струму в декілька

десятків міліампер (мА). Переважно використовувати випрямляч зі стабілізацією по струму. Електрофорез проводять в однорідному електричному полі, тобто поле, напруженість якого у всіх точках однакова [6, 34].

При електрофорезі робота сили тертя заряджених компонентів суміші об середовище призводить до нагрівання гелю. Крім того, утворення тепла викликається проходженням електричного струму. В результаті відбувається значне зростання температури, яке погіршує результати електрофоретичного поділу, так як змінює в'язкість і провідність середовища, збільшує швидкість дифузії молекул, сприяє випаровуванню летючих компонентів, призводить до денатурації білків. Тому при проведенні електрофорезу слід забезпечити охолодження системи (наприклад, поміщаючи прилад для електрофорезу в холодильну камеру).

Отже, електрофоретична рухливість білка залежить:

- 1) від самої молекули: її розміру (молекулярної маси), форми;
- 2) електричного заряду, ступеня дисоціації і гідратації;
- 3) від концентрації молекул;
- 4) від середовища: її в'язкості, рН, температури і іонної сили;
- 5) від характеристик використовуваного електричного поля.

Основними типами електрофорезу є:

- зональний електрофорез;
- ізотахофорез;
- ізоелектричного фокусування.

В клінічній лабораторній діагностиці найбільш поширена зональна електрофорезна система. Незалежно від характеру використання щільного середовища розділення (фільтрувальний папір, ацетат целюлози агароза, поліакриламід, крохмаль) в процесі зонального електрофорезу виділяють декілька етапів:

1. електрофорезне розділення;

2. забарвлення;
3. детекція.

Забарвлення використовується для визначення локалізації фракції досліджуваної речовини. Вибір барвника залежить від типу досліджуваної речовини і характеру використання середовища розділення [10]. Умовою застосування того чи іншого барвника є його здатність до вибіркового зв'язування з молекулами речовини, яку визначають, причому необхідно, щоб ступінь фарбування була прямо пропорційна концентраціях аналіту. Для ацетатцелюлозних пластинок використовується фарбування розчином пунцевого червоного - Ponceau Red.

При електрофорезі на агарозі для виявлення білків застосовують Amido Black, для ліпопротеїнів - Sudan Black B, Oil Red O. Фарби типу Coomassie Brilliant Blue або Acid Violet мають високу чутливість і використовуються в основному для визначення білків в рідинах з низькою концентрацією (цереброспінальної рідина, сеча), а також для якісних визначень в імуноелектрофоричних методиках (електроімунофіксація і електроімунодифузія).

Останнім часом для виявлення білків і поліпептидів, що містяться в низьких концентраціях в біологічних рідинах, стали використовувати такі високочутливі барвники як нітрат срібла і колоїдне золото.

Розчини барвника можна використовувати багаторазово. Орієнтовно 100 мл барвника достатньо для фарбування ацетатцелюлозної чи агарозної матриці площею біля 400 см². Заміну барвника слід робити при виявленні вимивання барвника із білкової зони в знебарвлюються розчині, що зумовлено зниженням стабільності зв'язування білка з барвником [3, 21].

Детекція. Для оцінки забарвлених електрофореграм використовують методи якісного (візуального) або кількісного аналізу.

Кількісну оцінку вмісту окремих фракцій проводять, застосовуючи пряму денситометрію за допомогою спеціальних приборів денситометрів, або шляхом елюції кожної фракції із твердої фази з наступним спектрофотометричним аналізом [43].

При денситометрії електрофореграма проходить через вимірвальну оптичну систему, і кожна фракція відповідно до локалізації та світлопоглинанням відзначається у вигляді піку на реєструючому пристрої. Ширина піку відповідає ширині смужки кожної фракції, а висота відповідає її інтенсивності. Визначення площі піку дозволяє розрахувати процентний вміст кожної фракції. Елюційний метод включає поділ (нарізку) електрофореграми на окремі фракції з подальшим вимиванням (елюція) з кожної фракції адсорбованого барвника за допомогою розчинників (основні буфери, слабкі луги, розчини спиртів).

Для клінічної лабораторії денситометрія є методом вибору. Хоча денситометрія порівняно дорожча методика, але вона менш трудомістка і вимагає значно менших витрат часу для виконання аналітичної процедури [11].

При ізоелектричному фокусуванні в електрофоретичному середовищі виникає плавний градієнт рН. Білок зупиняється на ділянці, де рН дорівнює його ізоелектричній точці (рІ). Для створення градієнта рН для насичення носія зазвичай використовують розчин поліамін-полікарбоненої кислоти. За відсутності електричного поля рН цієї суміші зазвичай становить 6,5. Коли прикладається електричне поле, ці кислоти забезпечують лінійний градієнт рН від 3 до 10.

У разі ізотахофорезу заряджені іони спочатку відокремлюються відповідно до їх заряду та рухливості, а потім рухаються з однаковою та з постійною швидкістю в електричному полі [46].

Імуноелектрофорез поєднує електрофоретичний поділ білків з імунопреципітацією на основі реакції «антиген-антитіло». Цей тип

електрофорезу перевершує інші типи за чутливістю та роздільною здатністю.

Розрізняють за метою:

- 1) аналітичний тип (використовується для аналізу складу суміші, рідше - для отримання невеликої кількості відокремлених речовин) електрофорезу;
- 2) препаративний тип (використовується для отримання препаратів - великої кількості чистих речовин) електрофорезу.

За ступенем денатурації білків, які розділяються розрізняють:

- нативний електрофорез;
- електрофорез в умовах денатурації.

Електрофорез в умовах денатурації передбачає використання хімічних реагентів для руйнування просторової структури відокремленого білка, на відміну від нативного електрофорезу.

За напрямком фракціонування існує різновид електрофорезу, при якому білок рухається в одному напрямку, тоді як двовимірний електрофорез спочатку розділяється в одному напрямку, а потім відокремлюється у напрямку, перпендикулярному першому напрямку. Двовимірний електрофорез може значно покращити роздільну здатність при розділенні суміші, що складається з великої кількості різних білків.

Залежно від орієнтації носія (гель, папір тощо) електрофорез може бути вертикальним або горизонтальним [8].

2.2. Різновиди електрофорезу та інтерпретація результатів

Після проведення перших експериментів з електрофорезом в кількох лабораторіях з 1930-х по 1940-ті роки, включаючи першовідкривача електрофорезу-лауреата Нобелівської премії Арне Тізеліуса, подальший розвиток та застосування цього методу для поділу

білків розпочався у 1955 р. З розвитком зонального електрофорезу в крохмальному гелі, його виконав Олівер Смітс, а згодом лауреат Нобелівської премії. Цей метод був удосконалений і широко використовувався в експериментальній біохімії та молекулярній біології.

У 1959 р. був запропонований метод електрофорезу білка в поліакриламідному гелі (ПААГ), у 1962 р. - метод дискового електрофорезу, а у 1969 р. – використання денатуруючих агентів (SDS). У 1970 році Леммлі значно покращив електрофорез в ПААГ, відокремивши 28 білкових компонентів бактеріофагу Т4. У 1975 році з'явився двовимірний (2D) електрофорез. Білковий електрофорез широко використовується в біологічних дослідженнях, включаючи фундаментальні та прикладні дослідження.

На сьогоднішній день найбільш поширений електрофорез - це електрофорез білкових фракцій сироватки крові, а найменш поширений - електрофорез білка сечі, слизової рідини, лізату еритроцитів та спинномозкової рідини.

Електрофорез білкових компонентів є лабораторним аналізом, а його відділ вивчає кількісні та якісні характеристики білків крові в електричному полі.

Усі клітини організму складаються з білка. Білки - це складні молекули, що складаються з простіших «цеглинок» - амінокислот. Загалом усі білки крові називаються «загальним білком», який у свою чергу складається з компонентів-альбуміну та глобуліну.

Білки можуть набувати позитивних і негативних зарядів відповідно до кислотності середовища електрофорезу. Рух білка залежить від розміру заряду, форми та розміру молекули, її маси та характеристик середовища, в якій проводиться електрофорез [27, 14].

Позитивно заряджені молекули білка легше адсорбуються, ніж негативно заряджені молекули білка, тому негативні заряди

використовуються в електрофорезі білків. Альбумін має найбільший негативний заряд, тому він швидше рухається до анода.

Електрофорез білків сироватки людини базується на типах середовищ поділу для різних компонентів білка. Використовуйте ацетат целюлози або агарозу. Завдяки лужній реакції буфера, що використовується для електрофорезу, більшість білків мають негативний заряд і тому під впливом електричного поля переміщуються на позитивно заряджений електрод. Електрофоретична рухливість окремого білка залежить від розміру його негативного заряду та його відношення до молекулярної маси. Деякі сироваткові білки залишаються на місці нанесення і навіть рухаються до негативно зарядженого електрода.

Завдяки електрофоретичному поділу білків сироватки людини зазвичай можна виявити 5 або 6 (залежно від середовища поділу) чітко видимих фракцій:

- 1) Частина альбуміну, що демонструє біохімічну однорідність;
- 2) Чотири гістонові глобуліни - α_1 -, α_2 -, β -, γ -глобуліни:
 - Білки, які мігрують до α_1 -, α_2 -, β -областей, синтезуються в печінці;
 - Імуноглобулін, в гамма - області, синтезується лімфоїдними тканинами.

Коли електрофорез проводиться з плазмою, область між β та α може бути областю ϕ , що відповідає фібриногену. Кожен розділ електрофорезу містить багато окремих білків. Однак зміни в зображеннях електрофорезу за різних патологічних станів можуть бути викликані змінами підтримки білків, які зазвичай концентруються в сироватці крові [2].

Електрофорез білкових фракцій передбачає велику діагностичну інформацію, особливо коли дослідження доповнюється такими високоспецифічними тестами як імуноелектрофорез, кількісною

оцінкою імуноглобулінів та інших специфічних протеїнів, Т- і В-лімфоцитів і стадій трансформації лімфобластів.

Електрофоретичне поділ протеїнів дозволяє вивчати їх біологічні і фізичні характеристики, будучи індикатором захворювань печінки і нирок, імунної системи, злоякісної патології, гострих і хронічних інфекцій, генетичних поломок, захворювань центральної нервової системи і багатьох інших видів патології [20].

Показаннями до електрофорезу білка сироватки є:

1. Знижений рівень концентрації загального білка в сироватці крові <60 г/л.
2. Збільшення рівня концентрації загальна білка в сироватці крові > 85 г/л.
3. Зниження концентрації альбуміну в сироватці крові <35 г/л.
4. Збільшити швидкість осідання еритроцитів генезу (ШОЕ)> 25 мм / год

Існує дві форми результатів електрофорезу:

- графічне представлення результатів денситометричного сканування електрофореграми;
- числове вираження кожної фракції у відсотках або в концентраційних одиницях (г/л), розрахованих на підставі рівня загального білка сироватки.

Електрофореграма є результатом проведення електрофорезу. Електрофореграма отримується шляхом відокремлення складної суміші за допомогою електрофорезу та специфічного прояву. Електрофореграма білків біологічних рідин людини (спинномозкова рідина, сироватка крові, сеча тощо) дозволяють лікарям отримувати важливу діагностичну інформацію.

Наприклад, у здорових людей відносний вміст білкових фракцій при визначенні їх в сироватці крові шляхом електрофорезу на папері наступне:

- альбуміни- 55-65%;
- α 1-глобуліни 3-6%;
- α 2-глобуліни 7-10%;
- β -глобуліни - 7-12%;
- γ -глобуліни - 13-19%.

При багатьох захворюваннях співвідношення фракцій зміниться, тоді як загальна кількість білка зазвичай не сильно змінюється. Виявлення цих змін електрофорезом широко використовується в діагностичних цілях.

Електрофореграма білкових ферментів дозволяє вивчати зміни активності та ізоферментного спектра білка під впливом зовнішніх та внутрішніх факторів у людини та інших організмів.

Сироватковий білок ділиться на 5 або 6 частин. Кожна частина (область) містить один або кілька компонентів сироватки.

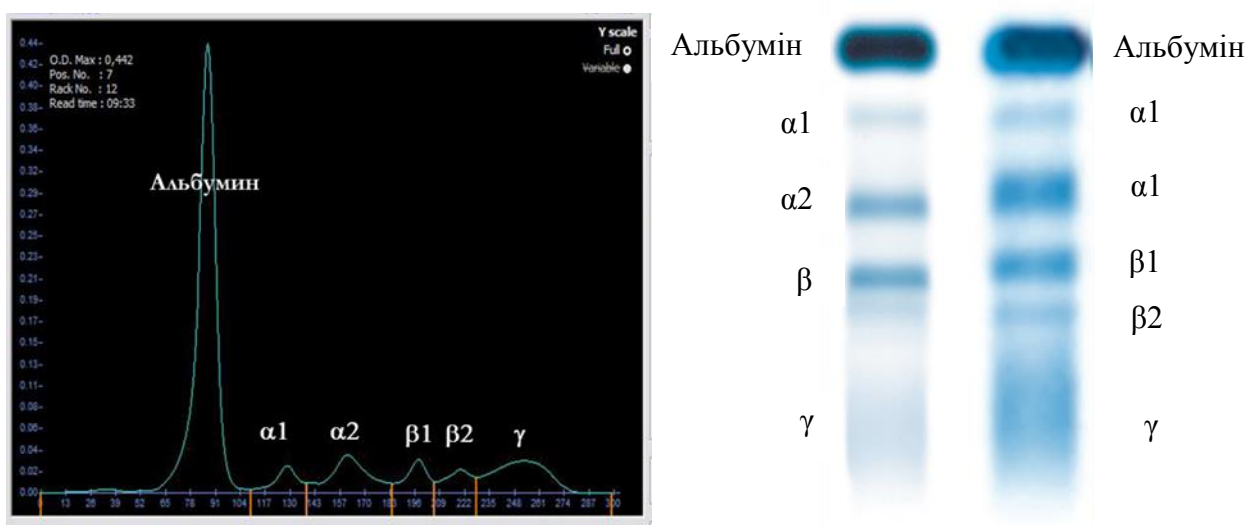


Рис. 1 Графічне зображення результатів протеїнограми сироватки крові

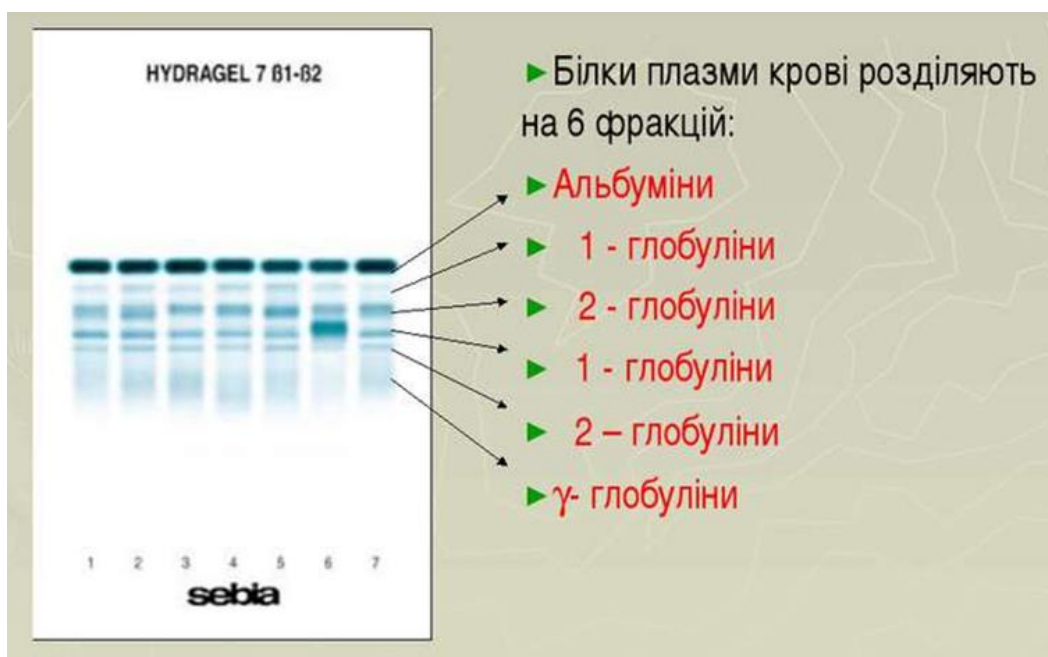


Рис.2. Електрофорез білків плазми крові Hydragel – агарозний гель

Таблиця 1

Вміст білків у різних фракціях

Фракція	Домінанті білки	Міnorні білки
Альбумінова	альбумін	преальбумін
Альфа-1-глобуліни	α 1-ліпопротеїни α 2-антитрипсин	α 1-антихімотрипсин
Альфа-2-глобуліни	α 2-макглобулін гаптоглобулін церулоплазмин Gc-глобулін	гемопексин антитромбін III інгібітор C1-естерази
Бета-глобуліни	трансферин C3-комплемет β -ліпопротеїн	C4-комплемет β 2-мікроглобулін
Гама-глобуліни	IgG IgA IgM	IgD IgE легкі ланцюги Ig лізоцим

В електрофореграмі кожна фракція містить цілий ряд білків: збільшення/зменшення однієї з фракцій може бути викликано різними білками. Електрофореграму слід оцінювати в цілому і порівнювати з "типовим профілем" [13].

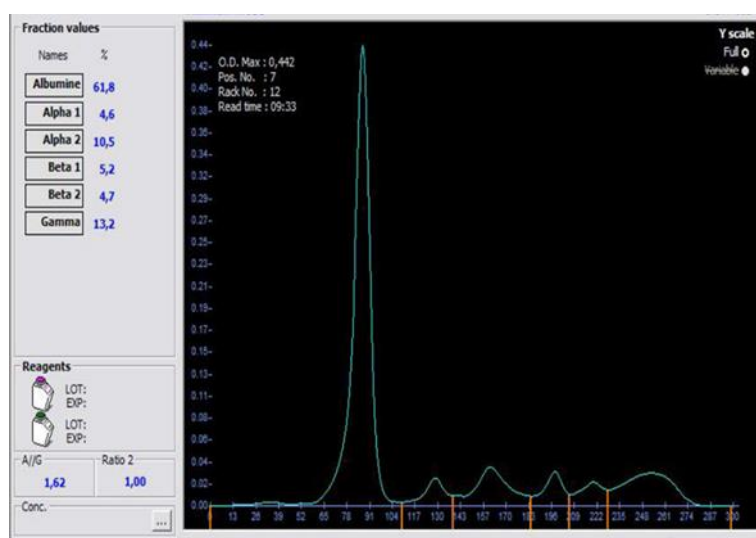


Рис.3 Електрофорез нормальної сироватки

Сироватка в нормі:

- Значення фракцій - в межах референсних інтервалів;
- Відсутність «зайвих» смуг / піків або деформації фракцій;
- Симетрична гамма-зона.

Оцінку результатів досліджень електрофорезу також можна проводити двома способами:

- оцінка типової картинки електрофорезу;
- кількісна оцінка змін кожної частини білка.

Крім того, діагностичне значення має співвідношення альбумін-глобулінових фракцій (A/G):

- $A / G \leq 1$ спостерігається у разі зниження рівня альбуміну та / або підвищення рівня глобуліну (цироз);
- $A / G \geq 2$ якщо рівень глобуліну знижений (гіпогамаглобулінемія).

Патологічні зміни вмісту загального білка в сироватці крові:

Концентрація загального білка сироватки крові складає 65-82 г/л у дорослих. В плазмі ця величина в середньому більша на 3 г/л за рахунок фібриногену і білкового згортання крові. Загальний білок у новонароджених складає 34-50 г/л, у дітей старше 1 року – 60-80 г/л.

Зміни у вмісті білка в сироватці крові може бути відносно (внаслідок коливання об'єму внутрішньо судинної рідини) і абсолютним (пов'язано з порушенням надходженням, синтезом і виведенням білка) [7].

Класифікація змін концентрацій загального білка в сироватці крові:

- 1) Гіперпротеїнемія (збільшення концентрації загального білка > 85 г/л;
 - Абсолютна обумовлена збільшенням в сироватці загального білка за рахунок γ -глобулінової фракції;
 - Відносна обумовлена зменшенням об'єму внутрішньосудинної рідини (гемоконцентрацією).

2) Гіпопротеїнемія (зниження концентрації ЗБ < 60 г/л).

Абсолютна обумовлена зменшенням концентрації ЗБ по причині:

- недостатнє надходження білка з їжею;
- мальабсорбція;
- втрата білка через шкірні покриви (опіки), з сечею (протеїнурія), через ШКТ (діарея);
- порушення синтезу білка (цироз печінки);
- збільшення катаболізму білків (септичний стан).

Відносна гіпопротеїнемія, обумовлена збільшенням об'єму внутрішньосудинної рідини (гемоділюція).

Рівень загального білка в сироватці крові <45 г / л при концентрації альбуміну <20 г / л є небезпечним для життя.

Диспротеїнемія – це зміна якісного та кількісного складу окремих білків сироватки при нормальному рівні загального білка. Причинами диспротеїнемії є запальні процеси, пухлини [9, 23].

Зміни вмісту окремих фракцій білків сироватки:

Зміни в альбуміновій фракції можуть характеризуватися подвійною смугою в зоні альбуміну (бісальбумінемія), яка може бути спадковою (перманентної) або надбаною (транзиторною):

- Спадкова бісальбумінемія обумовлена мутацією гена, що кодує молекулярну структуру білка, і на електрофореграмі зображується у вигляді подвійної смуги на місці фракції альбуміну. Клінічно ця патологія не виявляється.
- Придбана транзиторна бісальбумінемія спостерігається під час лікування беталактамними антибіотиками (пеніцилінового ряду) в високих дозах у хворих з нирковою недостатністю. У таких випадках, поява додаткової смуги обумовлено фракцією антибіотик- альбумін. При наявності панкреатичної фістули з гіперферментемією, що веде до внутрішньосудинному лізису альбуміну. Поява бісальбумінемії у пацієнтів з панкреатитом і /

або асцитом вказує на можливу наявність фістулірованої помилкової панкреатичної кісти, що є показанням для хірургічного втручання.

Також зміни в альбуміновій фракції можуть бути вродженою анальбумінемією, яка спостерігається дуже зрідка. Фракції альбуміну в електрофореграмі представлена слабо вираженою смугою. При цьому спостерігається значне підвищення чотирьох глобулінових фракцій як компенсація складної гіпоальбумінемії для підтримки онкотичного тиску плазми [16]. Клінічні симптоми цієї патології зазвичай проявляються органічними набряками і низьким артеріальним тиском.

Гіпоальбумінемія, причиною якої є:

- 1) недостатнє надходження білка з їжею;
- 2) порушення синтезу: гепатоцелюлярна недостатність (цирози, хронічні гепатити), тривалі поточні запальні захворювання;
- 3) втрата з сечею (протеїнурії), через шлунково-кишковий тракт (ексудативні гастроентеропатіях) або через шкірні покриви (великі опіки, ексудативні дерматити);
- 4) посилений катаболізм: ендокринні порушення (тиреотоксикоз, хвороба Кушинга), септичні стани.

Гіперальбумінемія може спостерігатися у хворих при дегідратації (гемоконцентрації) або в результаті внутрішнього введення розчинів альбуміну [26, 5].

Зменшення в α_1 -глобуліновій зоні спостерігається при гепатоцелюлярній недостатності, масивних втратах білка, недостатньому надходженню білка з їжею. В таких випадках зменшується α_1 -глобуліновій фракції супроводжується зниженням альбуміну, α_2 - і β глобулінів.

Також зменшення α_1 -глобуліновій зони спостерігається при вродженому дефіциті α_1 -антитрипстна – домінуючого білка в α_1 -зоні. Ізольоване зменшення в α_1 -зоні буде помірним у разі гетерозиготній

недостатності або вираженим у вигляді гомозиготного дефіциту. Ця білкова аномалія асоціюється з патологією печінки у дітей і захворюваннями легень у дорослих.

Збільшення $\alpha 1$ -глобулінової зони спостерігається в основному при гострій запальних захворюваннях і супроводжується збільшенням $\alpha 2$ -глобулін за рахунок «гострофазних» білків, які локалізуються в цих зонах: орозомукоїда і $\alpha 1$ -антитрипсину в $\alpha 1$ -зоні і гаптоглобіна в $\alpha 2$ -зоні.

Зміни в $\alpha 2$ -глобулінової зоні відображаються подвійною смугою в $\alpha 2$ -глобулінової зоні, якщо виключити ймовірність гемолізу, може бути обумовлена:

- наявністю фенотипічних варіантів гаптоглобіна, які проявляють різну електрофоретична рухливість, що відрізняється від звичайного гаптоглобіна;
- рідше присутністю γ -ліпопротеїнів з $\alpha 2$ -аномальної електрофоретичної рухливістю;
- присутністю моноклональних вільних легких ланцюгів, мігруючих в цю зону.

Зменшення $\alpha 2$ -глобулінової зони: обумовлене гепатоцелюлярної недостатністю, порушенням харчування або втратою білка; обумовлене внутрішньосудинним гемолізом (особливо це виражено при наявності супутнього гострого запалення, коли спостерігається невідповідність між значним збільшенням $\alpha 1$ -зони і зниженням інтенсивності $\alpha 2$ -зони) [12].

Збільшення $\alpha 2$ -глобулінової зони в основному спостерігається при двох типах синдромів і пов'язане зі збільшенням вмісту двох основних білків, мігруючих в $\alpha 2$ -зону - гаптоглобіна і $\alpha 2$ -макроглобуліну:

- при запальному синдромі внаслідок збільшення вмісту гаптоглобіну, що супроводжується з гіпер- $\alpha 1$ -глобулінемією;
- при нефротичному синдромі із-за значного збільшення $\alpha 2$ -макроглобуліна, що часто супроводжується гіпоальбумінемією

(втрати з сечею), гіпер- β -глобулінемією (особливо при люпоїдному нефрозі) і масивної протеїнуриєю (>3 г / л).

Зміни в зоні β -глобулінів проявляються у вигляді зменшення зони β -глобулінів:

- обумовлюють гепатоцелюлярною недостатністю, втратою білка або недостатністю його із надходженням їжі, що приводить до зниження рівня трансферина, який локалізується в $\beta 1$ -зоні;
- пов'язане зі споживанням С3-комплемента, що локалізується в $\beta 2$ -зоні. Зникнення $\beta 2$ -зони часто зустрічається при використанні несвіжої сироватки для електрофорезу.

Збільшення зони β -глобулінів не пов'язане з появою моноклональних фракцій (зазвичай в обмеженому обсязі): гіпер- $\beta 1$ -глобулінемія внаслідок гіпертрансферінемії при залізодефіцитної анемії, а також при збільшенні рівня β -ліпопротеїнів. Гіпер- $\beta 2$ -глобулінемія внаслідок обструкції жовчовивідних шляхів (через зниження катаболізму С3-комплемента клітинами Купфера). Тотальне посилення інтенсивності β -зони, що супроводжується злиттям β - і γ -фракцій, через поліклональної гіперпродукції IgA, наприклад, при алкогольних цирозах.

Збільшення зони β -глобулінів обумовлене ще моноклональними білками: Ig A (найбільш часто) або IgG при мієломної хвороби, IgM при хворобі Вальденстрема, каппа (κ) або лямбда (λ) вільні легкі ланцюги імуноглобулінів при хворобі легенів ланцюгів (супроводжується гіпо- γ -глобулінемією) або при амілоїдозі.

- зміни в γ -глобулінової зоні γ -фракція- це зона міграції Ig G, A, M, D, E. При інтерпретації змін в цій зоні необхідно враховувати клінічні дані, а також вік пацієнта. Причини гіпо- γ -глобулінемії зумовлено: фізіологічною гіпо- γ -глобулінемією у новонароджених;
- первинний гуморальний імунодефіцит у дітей і дорослих;

- гіпо- γ -глобулінемія, розвивається на фоні лікування глюкокортикостероїдами, імуносупресивної терапії, хіміотерапії або радіотерапії;
- гіпо- γ -глобулінемія при захворюваннях легких ланцюгів (діагноз підтверджується виявленням вільних легких ланцюгів імуноглобулінів в сечі).

Причини гіпер- γ -глобулінемія є поліклональна гіпер- γ -глобулінемія (дифузне збільшення γ -зони) спостерігається при інфекційних захворюваннях печінки, СНІД або при аутоімуних захворюваннях.

Ще одна причина це моноклональна гіпер- γ -глобулінемія (поява «М»-градієнта вузької електрофоретичної гомогенної смуги на протеїнограмі) спостерігається при злоякісних (множинна мієлома, хвороба Вальденстрема) або доброякісних (протікають безсимптомно) гамопатіях. «М» - градієнта може проявлятися при хронічному лімфолейкозі, лімфомах. При виявленні «М»-градієнта в β - γ -просторі (ϕ -зона) необхідно виключити ймовірність наявності залишків фібриногену. Для цього слід обробити сироватку тромбіном, який перетворює розчинний фібриноген в нерозчинний фібрин, що призведе до зникнення псевдо- «М» -г радієнта, викликаного фібриногеном, на повторній електрофореграмі [4].

Олігоклональна гіпер- γ -глобулінемія зумовлює появу кількох вузьких гомогенних смуг, що виявляються тільки на електрофоретичних середовищах з високим дозволом, наприклад, агарозному гелі. Така електрофоретична картина пов'язана з одночасною появою субкласів імуноглобулінів (антитіл) у відповідь на стимуляцію декількома антигенами.

Отримання інформації щодо властивостей моноклональних імуноглобулінів у клінічних лабораторіях використовуються один із найсучасніших методів – імунофіксаційний електрофорез.

Моноклональна гамапатія характеризується неконтрольованою проліферацією клону плазматичних клітин за рахунок інших клітин. Ця дисфункція зазвичай призводить до синтезу великої кількості окремих імуноглобулінів або їх субодиниць із нормальним рівнем імуноглобулінів. Водночас виявлено, що на електроферограмі різко зростає пік у β - γ -області рис.3.

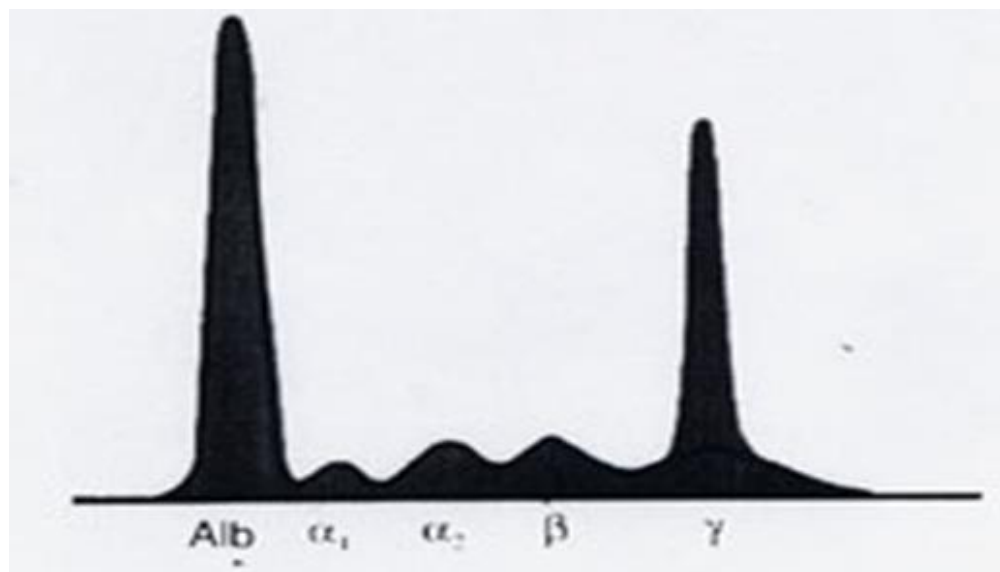


Рис.4 Моноклональна гамапатія

Вони використовуються для підтвердження природи М-градієнта та його типування (визначення типів важких та легких ланцюгів, що входять до його складу).

Призначення йде:

- за результатами електрофорезу білкових фракцій – при виявленні піку в гамма-зоні та при ізольованому збільшенні бета- фракції;
- при підозрі на наявність моноклональної гамапатії.

Ще один із різновидів електрофорезу це метод капілярного електрофорезу (КЕ) заснований на поділі компонентів складної суміші в кварцовому капілярі під дією прикладеного електричного поля. Після подачі до кінця капіляра високого тиску (до 30 кВ) компоненти суміші починають проходити по капіляру з різними швидкостями, які в

основному залежать від заряду і маси (точніше – величини іонного радіусу) і, відповідно, надходять у різний час досягаючи зони детектування, отримана послідовність піків називається електрофореграмою, при цьому якісною ознакою речовини є параметр утримання (час міграції), а кількісна - висота або площа піку, яка пропорційна концентрація речовини [9].

Порівняно з іншими методами поділу, метод капілярного електрофорезу має багато переваг:

- у кварцовому капілярі досягається ефективність поділу компонентів суміші - сотень тисяч теоретичних пластин;
- завдяки різноманіттю варіантів методу КЕ поділяються іонні, нейтральні, гідрофільні, гідрофобні, хіральні компоненти, від наночастинок до макромолекул;
- швидкість проведення аналізу;
- дуже низька витрата реагентів та розчинників (мікролітрів);
- для більшості об'єктів використовується проста підготовка зразків-переважно просто фільтрація, дегазація та розведення;
- відсутність дорогих колонок з сорбентами і проблем з їх старінням і заміною;
- низька вартість одиничного аналізу.

Капілярний електрофорез використовується для визначення білків і амінокислот у біологічних рідинах глікованого гемоглобіну.

Метод ізоферментного електрофорезу полягає у поділі різних ізоферментів з подальшим ензиматичним фарбуванням з використанням хромогенного субстрату і утворення в результаті нерозчинних фарбованих продуктів. Метод має високу чутливість, так як, в результаті багаторазового здійснення реакції ферментом, в гелі накопичується значна кількість пофарбованого продукту [36].

Ферменти – білки, що володіють однією ферментативною активністю, але різні за структурою: різні ізоферменти можуть

синтезуватися в різних тканинах/органах. У клінічній біохімії найбільш часто застосовується аналіз ізоферментів лужної фосфатази (ЛФ), креатин-фосфокінази (КФК) і лактат-дегідрогенази (ЛДГ). У нормі - рівень ізоферментів ЛФ, ЛДГ і КФК в сироватці досить низький. Підвищення рівня окремих фракцій свідчить про патологію певних органів.

Метод електрофорезу дозволяє визначити всі ізоферменти одного типу (ЛФ, КФК або ЛДГ) в одному тесті. Фермент, який бере участь в перетворенні субстрату, виступає фермент зразка, що знаходиться в гелі.

На рис.5-8 показані різні фореграми при різних патологічних процесах в організмі:

Зазвичай поліклональна гамапатія найбільш часто зустрічається в клініці відхилення після гіпоальбумінемія. Зберігаюча поліклональна гамопатія має певну прогностичну значимість при ряді захворювань: хронічна патологія печінки, колагенози, хронічні інфекції, метастатична карцинома, опікова хвороба рис.5 [19].

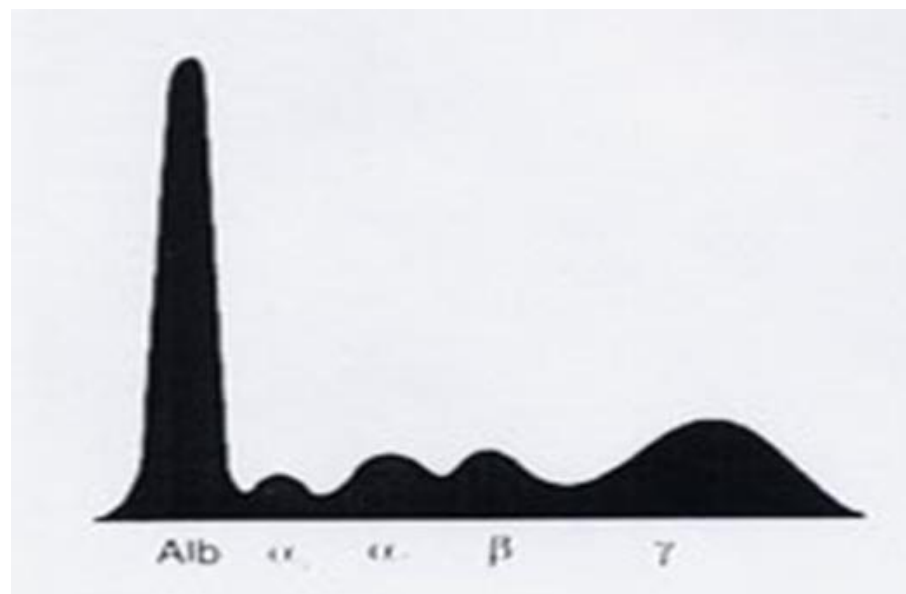


Рис.5 Фореграма при поліклональній гамапатії

Придбана недостатність імуноглобулінів в дорослому віці може бути вторинною, у вигляді моноклональній гамапатії або бути індукованої імуносупресивною терапією.

1. Гостре запалення характеризується локалізованим біохімічною відповіддю (активація комплементу) і реакцією на клітинному рівні (мобілізація фагоцитів, збільшення синтезу протеїнів), дає при електрофорезі білків сироватки збільшення рівнів α_1 - α_2 -глобулінів, фібриногену рис.6.

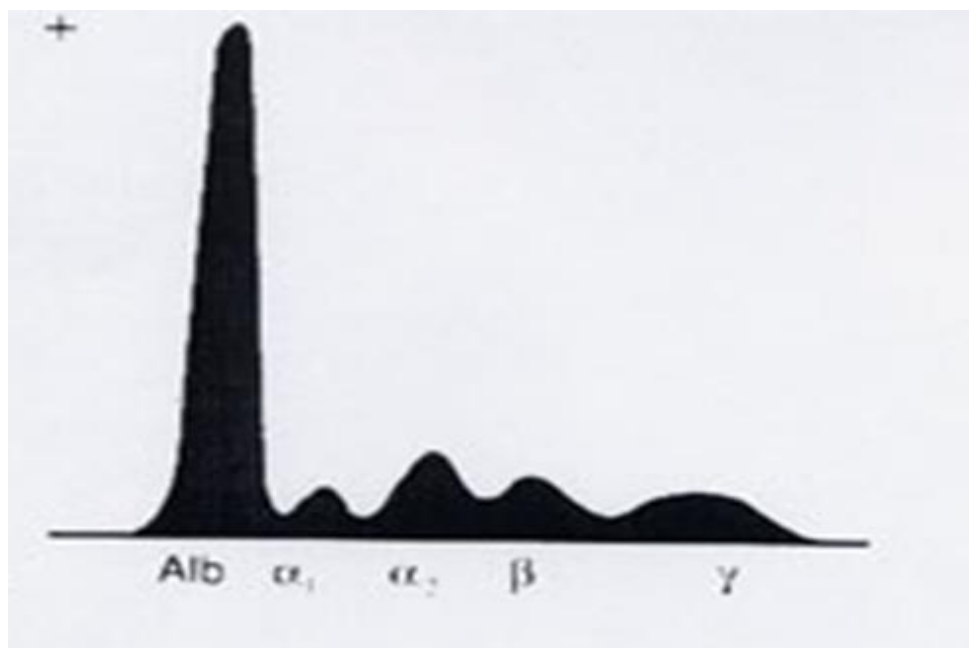


Рис.6 Фореграма при гострому запаленні

2. Хронічне запалення асоціюється зі збільшенням фракцій білків, що розглядаються як "білки хронічної фази". Електрофоретично це буде проявлятися помірним збільшенням α_2 -глобулінів і легким збільшенням β -глобулінів. Альбумін може бути злегка пригнічений на тлі поліклонального збільшення γ -глобулінів рис.7.

Такі відхилення, що характеризують хронічним запаленням, можуть проявлятися при хронічних інфекціях (бруцельоз, туберкульоз і ін.), колагенозах, алергіях, аутоімунних процесах, а також при малігнізації.

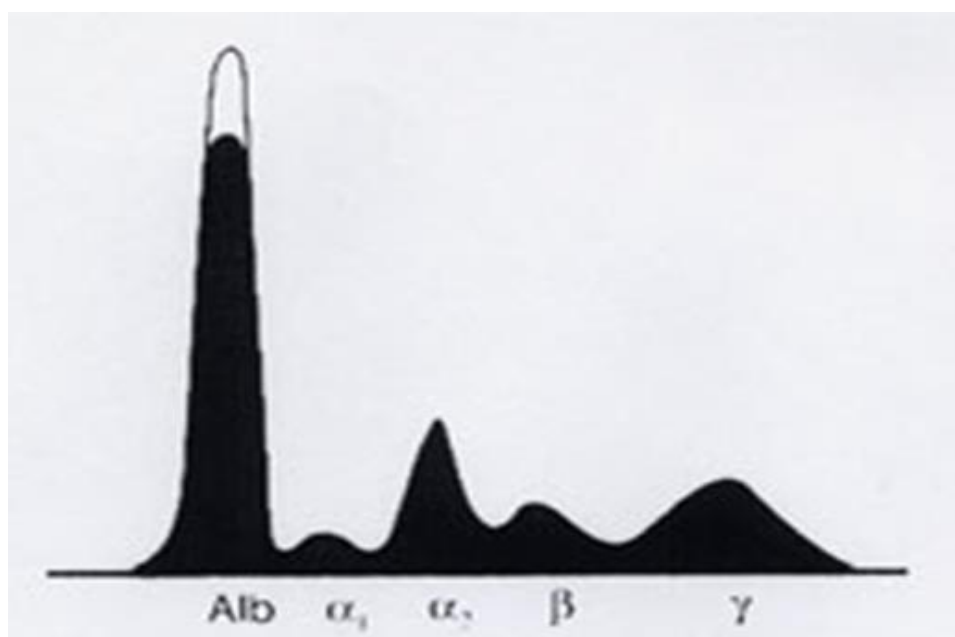


Рис.7 Фореграма при хронічному запалені

3. Захворювання печінки. У зв'язку з тим, що в печінці синтезуються альбумін і α -глобулін, захворювання цього органу, що зачіпають білково-синтезувальну функцію можуть супроводжуватися зниженням їх рівнів в крові, що відповідно позначиться на електрофореграмах рис.8 [24].

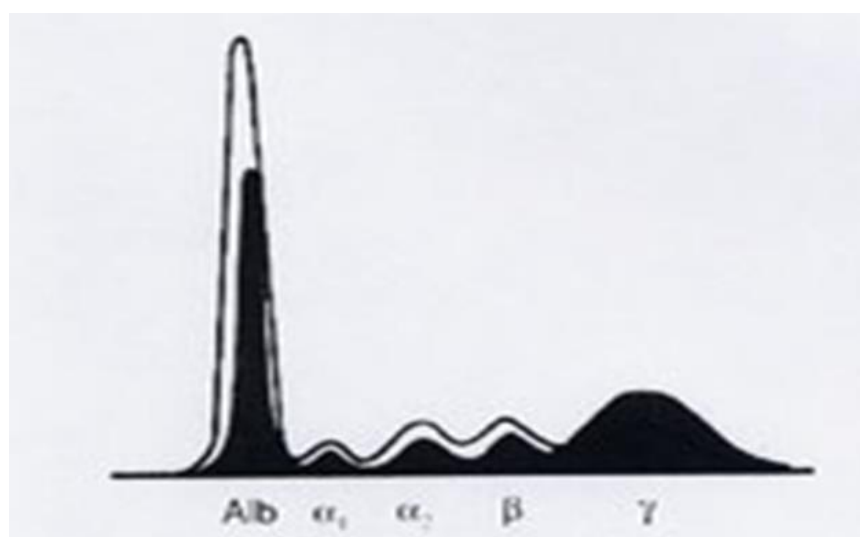


Рис.8 Фореграма при тяжкій формі гепатиту

Слід однак пам'ятати, що печінка має значні резерви синтезуючої здатності, тому виявлення даних порушень свідчатиме про глибокі гепатоцелюлярні порушення.

4. Нефротичний синдром може бути обумовлений різними патологічними процесами (діабет, захворювання сполучної тканини, гломерулонефрити та ін.). Для даного синдрому характерна втрата великої кількості альбуміну в зв'язку з порушенням фільтраційної здатності нирок. При цьому альбумін та інші низькомолекулярні білки (трансферин і α 1-антитрипсин) виходять через гломерулярні канальці. Це супроводжується збільшенням в крові рівнів високомолекулярних протеїнів (макроглобулін, IgM, ліпопротеїни). Електрофоретична картина при цьому виявляє істотне зниження піку альбуміну і збільшення α 1- і α 2-глобулінів рис.9 [30].

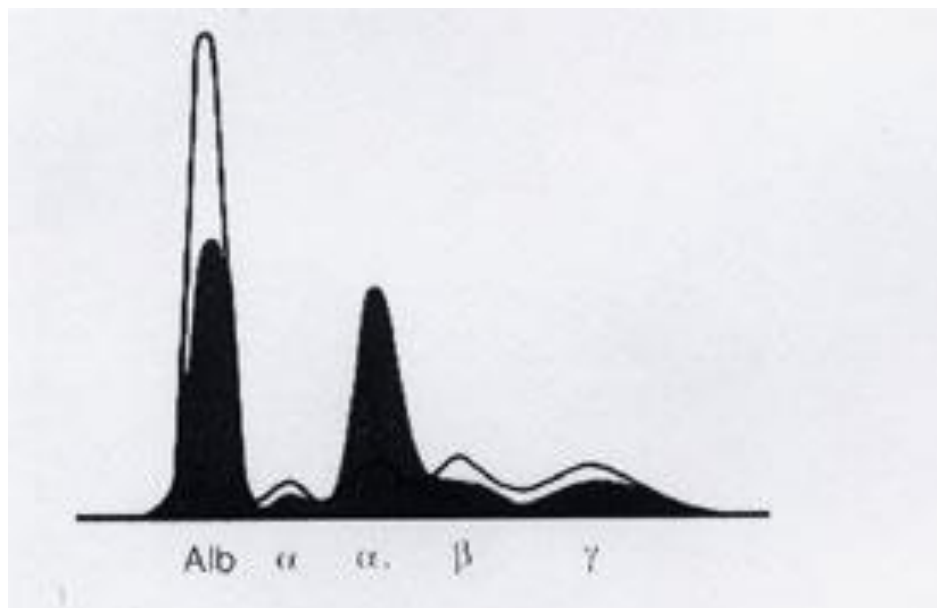


Рис. 9 Фореграма при нефротичному синдромі

Потужний технічний прогрес останніх десятиліть і розвиток комерціалізації в медицині дали поштовх для розвитку новітніх технологій на базі відомих принципів електрофорезу. Діагностична значимість даного методу підтверджується величезною різноманітністю що випускаються в даний час систем для електрофорезу.

Автоматизована система для проведення електрофорезу з агарозним гелем HYDRASYS - 2 - це компактна автоматизована система електрофорезу. Точність досліджень, максимально широкий спектр визначних параметрів і висока продуктивність систем електрофорезу SEBIA роблять їх незамінними в сучасній клініко-діагностичній лабораторії. Наразі система Hydrasys-2 є єдиною в світі ЕФ системою, меню тестів якої налічує понад 20 різних методик і постійно поповнюється новими тестами: поділ білків сироватки на 5 або 6 фракцій, диференціація протеїнурії, імунофіксація (визначення М-протеїну), визначення білка Бенс-Джонса, аналіз фракцій ліпопротеїнів, аналіз фракцій ізоферментів ЛДГ, аналіз фракцій ізоферментів ЛФ, аналіз фракцій ізоферментів КФК, аналіз фракцій гемоглобіну, аналіз фракцій спинномозкової рідині.



Рис.10 Система для проведення електрофорезу Hydrasys 2 французької фірми Sebia, який використовується в лабораторному відділенні Херсонської обласної лікарні.

Використання сучасних електрофоретичних аналізаторів дозволяє з високою точністю і мінімальними затратами досліджувати найширший спектр біохімічних параметрів з метою уточнення діагнозу і моніторингу патологічного процесу.

Можливість спростити процес обробки великої і різнобічної інформації, одержуваної в результаті електрофоретичних та інших досліджень дає використання лабораторної комп'ютерної системи рис.11.

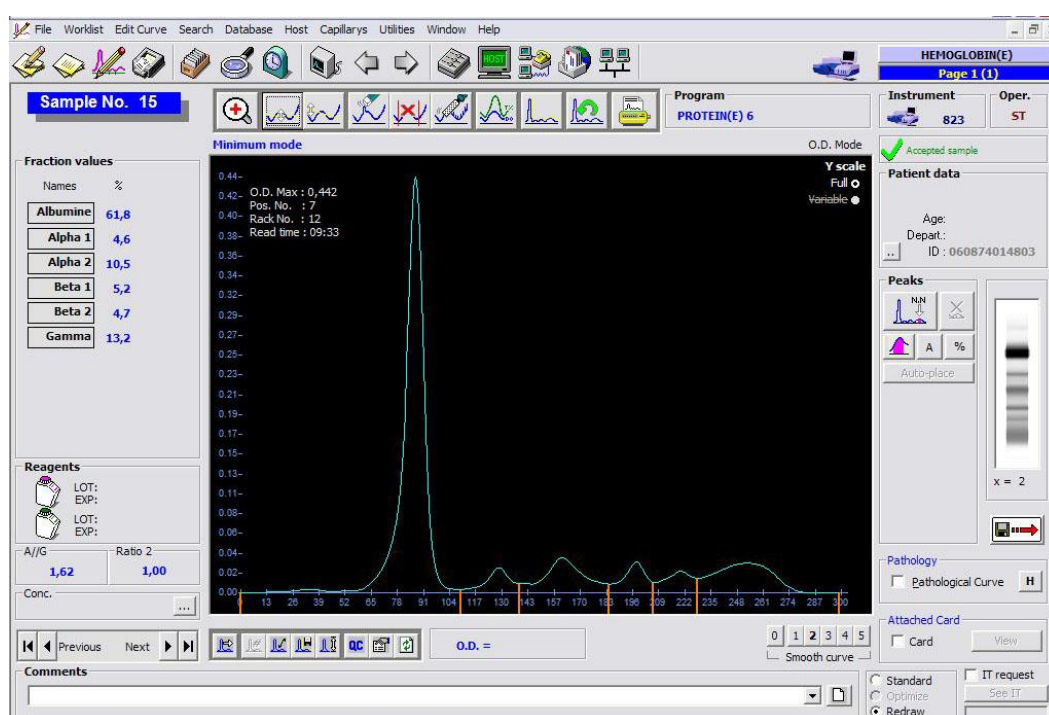


Рис. 11 Вигляд програми для оцінки результату електрофорезу

Таким чином, далеко не повний перелік можливостей клінічного застосування електрофорезу, дає лише загальне уявлення про незамінність ролі даного методу для диференціювання патологічних відхилень у складному процесі діагностичних обстежень.

2.3. Електрофорез білків в поліакриламідному гелі

Метод, який дозволяє розділяти суміш білків в поліакриламідному гелі (ПААГ) відповідаючи їхньої електрофорної рухливості називається електрофорез білків в поліакриламідному гелі. Цей спосіб ц якому відбуваються фракціювання білків і пептидів може широко використовуватися в сучасній біохімії і молекулярній біології.

В даний час розроблено велику кількість модифікацій електрофорезу білків в поліакриламідному гелю для вирішення різних проблем та націлювання на різні білки та пептиди. Найпоширенішим типом є електрофорез білка в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію по Леммли.

Електрофоретична рухливість біополімеру в гелі залежить від багатьох параметрів. Швидкість міграції пропорційна заряду молекули і у вільній рідині з тим самим питомим зарядом молекули рухаються з однаковою швидкістю. Коли середовище з жорсткою просторовою матрицею має однакову кількість в середовищі молекул, поділ відбувається через тертя з гелем. Сила тертя залежить від просторової конфігурації молекули, включаючи її розмір. Отже, у разі електрофоретичного поділу нативних білків їх розподіл буде складною картиною залежно від вищезазначених факторів [10].

У 1970 році Леммли запропонував метод поділу білків електрофорезом у поліакриламідному гелі на основі їх молекулярної маси для вивчення процесу збирання капсиду бактеріофагу Т4. Для цього перед нанесенням на гель зразок кип'ятять у присутності додецилсульфату натрію (SDS) та 2-меркаптоетанолу. Під впливом 2-меркаптоетанолу дисульфідний зв'язок відновлюється, тим самим запобігаючи формуванню петлі денатурованим пептидом і збільшуючи його рухливість. SDS – сильний детергент, його молекула складається з дванадцятичленного аліфатичного нерозгалуженого та ковалентно-зв'язаного сульфату, який у розчині негативно заряджений.

При використанні методу ґрунтуються на таких припущеннях:

- білок після обробки SDS знаходиться в повністю денатурованому стані;
- кількість молекул SDS, пов'язаних з поліпептидом, пропорційна його довжині, а отже, пропорційна його молекулярній масі;
- власний заряд поліпептиду є несуттєвим у порівнянні з зарядом пов'язаного з ним SDS.

За цих умов усі поліпептиди мають однаковий питомий заряд і обернено пропорційні логарифму їх молекулярної маси. Практика підтвердила правильність цих припущень у більшості випадків.

Для денатування електрофорезу в ПААГ використовуються різні буферні системи. Однією з найбільш часто використовуваних систем є буферна система Леммлі. Крім того, у більшості робіт використовується так званий disc-електрофорез, в якому використовується гель з двох частин. При концентрованому гелі рН становить 6,8, а концентрація поліакриламідру - від 2 до 8%. Роздільний гель має рН в межах 8,5-9 і концентрацію поліакриламідру від 5 до 20%. Вибір щільності гелю залежить від молекулярної маси досліджуваного білка. Усі буфери не містять неорганічних солей, і основним переносником струму у цих буферах є гліцин. Загальний заряд молекули гліцину близький до нуля, якщо її рН дорівнює 6,8. Тому, щоб перенести певний заряд (визначається силою струмом в електричному осередку), негативно заряджені комплекси поліпептидів з SDS мають рухатися з великою швидкістю. Якщо рН становить 8,8 гліцин має негативний заряд, тому концентрація та поділ цього білка різко пригнічується на межі гелю (зараз у перенесенні одного заряду на одиницю площі бере участь більше заряджених молекул, тому вони мають меншу швидкість). Результатом є концентрація білка на межі гелю, що значно покращує роздільну здатність методу. В окремому гелі міграція білків залежить від довжини поліпептидного ланцюга, яка обернено пропорційна молекулярній масі [18].

Для того, щоб візуалізувати результати електрофорезу, це найбільш часто використовуваний барвник Кумасі або срібло для фарбування білка в гелі. Для вестерн-блоттингу білок переноситься з гелю на нітроцелюлозну мембрану.

У більшості випадків результати електрофоретичного розділення досить отримати шляхом візуальної оцінки гелю. Однак, щоб отримати достовірні дані та правильно записати результати, для сканування просвітів гелю використовується високочутливий денситометр. По суті, денситометр – це сканер, який є контрольно-вимірювальним пристроєм, і підлягає перевірці з метою визначення та підтвердження відповідності характеристик вимірювального приладу встановленим вимогам. Ці вимоги до денситометра дозволяють не тільки достовірно визначити положення білка в гелі, але й визначити оптичну щільність білкової плями. Цифрове зображення гелю обробляється спеціальним програмним забезпеченням, яке може достовірно визначити такі параметри, як електрофоретична рухливість білка, чистота та кількість білка в плямі.

Гель калібрують на основі молекулярної маси міченого білка, відокремленого паралельно з досліджуваним зразком. Доступні різні діапазонами якості мічених білкових сумішей. Існують різні діапазони якості мічених білкових сумішей. Калібрування передбачає побудову залежності відносної електрофоретичної рухливості (R_f) кожного міченого білка від десяткового логарифму його молекулярної маси. У більшості випадків ця залежність набуває форми сигмовидної кривої. Молекулярна маса досліджуваного білка розраховується щодо його R_f , використовуючи регресійний аналіз. Якщо довжина шляху мічених білків становить не менше 80% довжини гелю для поділу, а залежність їх R_f від логарифму молекулярної маси лінійна ($R^2 > 0,95$), результат вважається достовірним. Для цих розрахунків буде використана лише

певна частина калібрувальної кривої, яка зможе покрити електрофоретичну рухливість досліджуваного білка.

У методі SDS-PAGE по Леммлі чутливість обернено пропорційна молекулярній масі досліджуваного білка. Наприклад, в діапазоні 10-20 кДа ці білки можна розділити, з різницею лише 0,1 кДа (різниця може становити лише в один амінокислотний залишок). Однак для отримання задовільних результатів слід дотримуватися кількох простих рекомендацій. Оскільки висока провідність досліджуваного зразка істотно змінить електрофоретичну рухливість білка, їх іонна сила повинна бути якомога меншою і приблизно рівною. Іншою важливою умовою визначення надійності молекулярної маси є оптимальне навантаження білка на гель. При фарбуванні Coomassie Brilliant Blue R250 оптимальний вміст білка в плямі повинен бути в межах 0,1-1 мкг, що принаймні на порядок нижче при фарбуванні сріблом. В іншому випадку білки в гелі будуть утворювати широкі плями, що ускладнює визначення їх електрофоретичної рухливості. Незважаючи на високу чутливість та простоту цього методу, молекулярна маса білка, визначена за допомогою SDS-PAGE, зазвичай відрізняється від істинного значення. Різниця коливається від кількох кДа для низькомолекулярних білків до десятків кДа для високомолекулярних білків [20].

Метод SDS-PAGE незамінний в разі необхідності кількісного визначення індивідуального білка в складному не тільки за білковим складом зразку. Прикладом такого зразка можуть бути грубі екстракти або лізати клітин. При цьому метод придатний для дослідження як нативних білків, так і білків, що змінили свою структуру. Такими білками можуть бути полімери, агрегати або повністю денатуровані молекули. Відносна невимогливість методу до складу зразка і структурному станом в ньому білків вигідно відрізняють SDS-PAGE від

інших методів кількісного визначення, наприклад, високоефективної рідинної хроматографії або імуноферментного аналізу.

Кількісне визначення білка за допомогою SDS-PAGE передбачає необхідність калібрування гелю щодо залежності інтенсивності забарвлення білкової плями в гелі від кількості білка в цій плямі. Для цього в гелі паралельно з досліджуваними зразками розділяють кілька зразків для порівняння з точною різною відомою кількістю еталонного білка. Після візуалізації білків в гелі за допомогою денситометра проводять вимірювання густини кожного білкової плями зразків порівняння. Визначають залежність цієї щільності від кількості білка. Калібрований гель використовують для розрахунку кількості досліджуваного білка щодо щільності його плями, використовуючи при цьому метод регресійного аналізу. Достовірними результати вважаються в разі, якщо залежність щільності білкових плям для еталонного білка від кількості білка в плямі є лінійною ($R^2 > 0,95$). Отже, для здійснення розрахунків користуються лише тією ділянкою калібрувальної кривої, який покриває щільність плями досліджуваного білка. При цьому слід зазначити, що підбір оптимальної концентрації білка в досліджуваному зразку здійснюють емпірично.

При кількісному визначенні білків за допомогою SDS-PAGE слід враховувати одну істотну особливість цього методу. Так, в зв'язку з тим, що ефективність забарвлення білка в гелі залежить від його природи, наприклад, амінокислотного складу, молекулярної маси, наявності простетичних груп, еталонний білок, який використовується для калібрування гелі, і досліджуваний білок повинні бути ідентичними. У разі відступу від цього правила різниця між істинним і отриманою кількістю може відрізнятись в кілька разів [22].

Метод SDS-PAGE по Леммлі дозволяє кількісно визначити зміст тільки тих домішок, які відрізняються своєю молекулярною масою від молекулярної маси досліджуваного білка. Для цього в одному гелі

поділяють досліджуваний зразок паралельно з одним або декількома зразками порівняння, кількість еталонного білка в яких можна порівняти з очікуваним кількістю домішок в розчині досліджуваного білка. Наприклад, якщо концентрація білка в досліджуваному зразку складає 1 мг / мл, а очікувана кількість домішок в ньому перебувати в межах 1%, то в якості зразка порівняння використовують мінімум один розчин еталонного білка з концентрацією 10 мкг / мл. Після візуалізації білків в гелі за допомогою денситометра проводять вимірювання густини кожного білкової плями для досліджуваного зразка і зразка порівняння.

Метод SDS-PAGE придатний для визначення димерів і полімерів білка, що накопичуються за рахунок спонтанного замикання міжмолекулярних дисульфідних зв'язків, наприклад, під час неналежного зберігання препарату. Для цього досліджуваний білок і білок порівняння поділяють в гелі у відновлювальних і невідновлювальних умовах. Домішки є димерами і полімерами в тому випадку, якщо вони виявляються у відновлювальних і не виявляються у невідновлювальних умовах. При цьому їх молекулярна маса повинна бути кратна молекулярної масі випробуваного білка. Таким чином, оцінка чистоти білкового препарату методом SDS-PAGE у відновлювальних умовах дозволяє визначити тільки негомологічні білкові домішки.

Результати визначення чистоти зразка можуть бути як напівкількісними, так і кількісними. У тому випадку, якщо порівняння щільності плям білків в домішку проводять щодо одної плями еталонного білка, отриманий результат є напівкількісним. Його формулювання може звучати, наприклад, так: зміст білкових домішок в досліджуваному розчині не перевищує 1%. Кількісне визначення білкових домішок проводять згідно з рекомендаціями до кількісного визначення білків методом SDS-PAGE.

На додачу до описаних підходів в деяких лабораторіях практикується спосіб визначення гомогенності препарату без використання зразків порівняння. В такому випадку чистота досліджуваного білка визначається по щільності плями в гелі, яке оцінюється у відсотках від суми щільності всіх виявлених білкових плям. Такий підхід не відображає справжню кількість домішок, проте може служити якісною оцінкою чистоти препарату. Метод не можна віднести до кількісних в зв'язку з тим, що число і щільність виявлених білкових плям прямо пропорційно кількості загального білка в випробуваному зразку і чутливості методу визначення білків в гелі. До того ж, залежність щільності білкової плями від кількості в ньому білка в діапазоні, що перевищує один порядок, часто не лінійна.

Буферні розчини, які використовуються в якості електрофорезу білка в ПААГ використовують: TBE, Тріс-тріцін, Тріс-НСІ, TBE з сечовиною, а також Bis-Tris.

Фарбування самих білків і їх локалізація після того як вони поділилися за допомогою електрофорезу в ПААГ буде здійснюватися фарбуванням їх в гелі. Зони, у вигляді пофарбованих смужок або ж плями з різною інтенсивністю, незалежно від того, який в них вміст білка. Щоб забарвити гель його потрібно вимочити в самому розчині барвника, який дифундується всередину нього і міцно зв'язується з білками. Декілька годин займе лише процес дифузії. Щоб не допустити розмивання смуг білки потрібно фіксувати і вимочувати в 10-50%-вої трихлороцтовій (ТХО) кислоті. Цю фіксацію зазвичай поєднують з фарбуванням, при цьому використовують розчин барвника в суміші метанолу і оцтової кислоти або ж в ТХО [42].

Барвник пов'язується не тільки з білками, але і з гелем, тому проводять промивання-вимочування в великому обсязі розчинника з декількома змінами. Даний процес здійснюється за рахунок просторової заміни буферного гелю на розчин барвника, так і в процесі первинної

сорбції на гелі. Однак зв'язування барвника з гелем значно менш міцніше, ніж з білками, тому від «фону» вдається без особливих зусиль позбутися «відмиванням» гелю, наприклад вимочуванням його у відносно великому обсязі розчинника з декількома змінами. Якщо відмивання йде тільки за рахунок дифузії барвника з гелю, вона займає кілька годин, зазвичай її ведуть протягом ночі. Щоб уникнути розчинення обложених білків барвник відмивають теж оцтовою кислотою, часто в суміші з метанолом, який покращує розчинність барвника. Відмивання прискорюється при підвищеній температурі (37-50 °) і перемішуванні розчинника, однак при цьому є небезпека ослаблення забарвлення смуг.

Всі типи зазвичай використовуваних барвників для білків несуть на собі електричний заряд того чи іншого знаку, тому відмивання гелю можна ще прискорити, якщо в розчиннику суспендувати трохи іонообмінної смоли, що зв'язує барвник і тим самим зрушує рівновагу дифузії. Часто використовують для цієї мети смолу змішаного типу AG 501x8. Нарешті, процес відмивання можна скоротити до десятків хвилин, якщо скористатися електрофорезом. Електричне поле накладають на гель в поперечному напрямку - перпендикулярно осі трубки або поверхні пластини. Не пов'язані з білками молекули барвника завдяки своєму заряду швидко виходять з гелю. Зрозуміло, для цієї мети потрібно мати спеціальний, хоча і дуже простий, прилад для поперечного електрофорезу.

До цих пір мова йшла про неспецифічної забарвленні білків. Якщо в ході електрофорезу ферменти втрачають своєї біологічної активності, то їх локалізацію в гелі можна здійснити за допомогою специфічної ферментативної реакції або ланцюгової реакції, що дають пофарбовані продукти. В цьому випадку гель вимочують в розчині відповідних субстратів. Зрозуміло, що фіксувати білки осадженням в цьому випадку не можна і доводиться миритися з деякими розмиванням білкових смуг.

Втім, низькомолекулярні субстрати часто дифундують в гелі швидше, ніж досить великі молекули барвників, і тривалість вимочування можна бути скоротити. Іноді виникає необхідність вести спостереження за міграцією білкових зон в ході електрофорезу. Для цього вихідну суміш білків можна забарвити барвником «Remazol», який ковалентно зв'язується з білком і мігрує разом з ним. Чутливість фарбування білків багаторазово збільшується при використанні перерахованих нижче флуоресцентних барвників. Багато з них зв'язуються з білками або пептидами, в основному по кінцевим аміногрупам. Їх також можна використовувати для спостереження за ходом електрофорезу після попередньої обробки вихідного препарату.

Для фіксації білкових смуг фарбування ведуть в кислому середовищі. Який би буфер не використовувалася для електрофорезу, до моменту фарбування він замінюється на розчин ТХО, тому переважний заряд будь-якої білка виявляється позитивним за рахунок залишків лізину, аргініну і гістидину, так що для білків використовують переважно кислі барвники, що несуть залишки сульфокислоти. Вони зберігають свій негативний заряд і при низькому рН.

Тривалість фарбування залежить від товщини гелю і його пористості і займає від 2 до 12 год. Для прискорення процесу підвищують температуру. Гель з трубки відмивають в пробірці, пластинки - у ванні. Пофарбований гель з трубки можна сканувати в спеціальному приладі або з допомогою приставки до спектрофотометра. Але не слід занадто покладатися на співвідношення розмірів піків такої електрофореграми при оцінці кількісного співвідношення білків в смугах, тому що зв'язування барвника залежить не тільки від концентрації, а й від хімічного складу і конформації білка. Гель можна сканувати по УФ - поглинання білків [25].

Також для кількісних вимірювань використовується розрахунок радіоактивності в білкових смугах за умови однорідності

радіоактивності за всіма компонентами суміші. Для фіксації основних білків, низькомолекулярних пептидів і гормонів, що осідають при традиційній обробці, застосовується вимочування протягом 1 год. в 5% - ому розчині формальдегіду і 25% -ному етанолі з додаванням барвника.

Для забарвлення кислих фосфопротеїдів використовують їх високу ступінь спорідненості до тривалентним металів. Білки забарвлюють іонами срібла в присутності невеликої добавки іонів міді. До гелю, попередньо обробленого формальдегідом, вносять водний розчин нітратів срібла і міді з етанолом і піридином [1].

Цей метод має велику чутливість. Існує кілька модифікацій цього методу з використанням аміачного срібла або з допомогою фотохімічного відновлення срібла, що здешевлює метод, спрощує і прискорює його.

РОЗДІЛ 3

Діагностика захворювань за допомогою електрофорезу

3.1. Аналіз статистичних даних щодо діагностики захворювань за допомогою електрофорезу

Аналіз статистичних даних було проведено на базі лабораторного відділення Херсонської клінічної обласної лікарні.

Статистичні дані враховують дослідження проведені за період з 2018 по 2020 роки.

Таблиця 2

Виявлення патологій білкового обміну за допомогою електрофорезу

2018		2019		2020	
Всього	Патологій	Всього	Патологій	Всього	Патологій
388	190	511	240	486	215
Загальна кількість проведених досліджень: 1335					

В лабораторному відділенні Херсонської клінічної обласної лікарні за період 2018-2020рр. було проведено 1335 діагностик за допомогою електрофорезу. В 2018 році патологій виявили 190 із 388, в наступному

2019 році – 240 патологій із 511, і в 2020 році було виявлено 215 патологій із 486 проведених діагностик. З цього можна зробити висновок, що з проведених всього досліджень виявили 48% патологічних змін.

Таблиця 3

Кількість патологічних досліджень виявлених при моніторингу пацієнтів з мієломною хворобою (за статтю)

2018		2019		2020	
Чол.	Жін.	Чол.	Жін.	Чол.	Жін.
64	59	130	121	88	104

При діагностиці мієломної хвороби, найбільше виявлених патологій було в 2019 році, при цьому у чоловіків 130 патологій, а в жінок – 121. Найменше зафіксовано в 2018 році, з показником патологій у чоловіків 64, а в жінок 59. Загалом розподіл за статтю між чоловіками та жінками за період 2018-2020рр. становить 50:50. Отже, мієломна хвороба однаково вражає як чоловіків так і жінок.

Таблиця 4

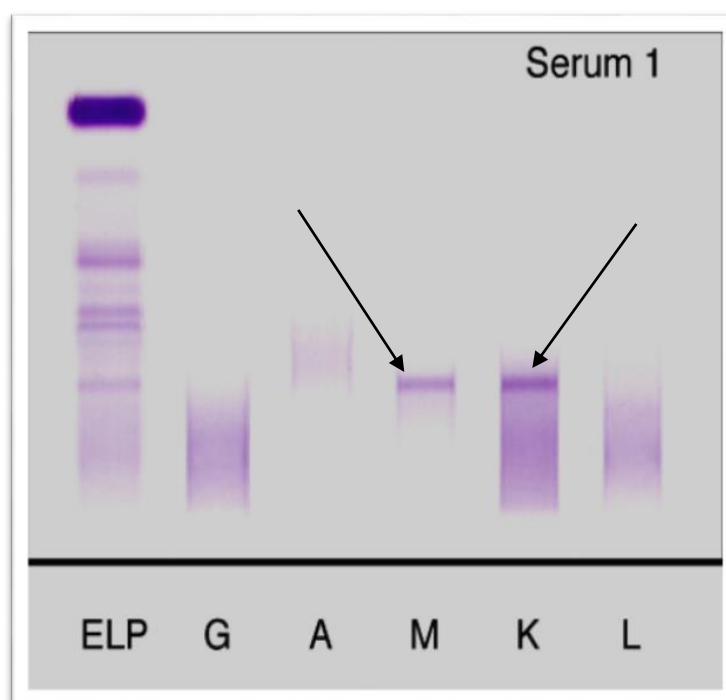
Типування М-градієнта при мієломній хворобі

Імуноглобуліни	2018		2019		2020	
	лямбда	каппа	лямбда	каппа	лямбда	каппа

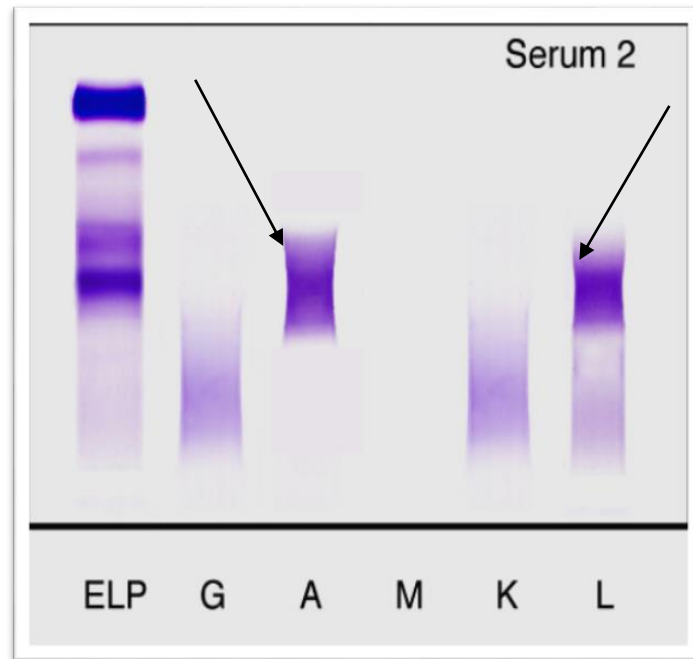
	ланцюг	ланцюг	ланцюг	ланцюг	ланцюг	ланцюг
Ig G	9	11	4	7	4	10
Ig A	2	2	2	1	-	5

При типуванні патологічного білку (М-градієнту) більша його кількість представлена імуноглобуліном класу G та за рахунок каппа ланцюгів. А найменша його кількість представлена імуноглобуліном класу A та за рахунок каппа ланцюгів.

Імунофіксація на гелі



Ig M каппа ланцюг



IgA лямбда ланцюг

3.2. Аналіз етапів діагностики та протікання хвороби у пацієнта

Згідно з якими симптомами необхідний електрофорез білка крові:

- Болі в кістках - особливо в хребті та тазу;
- Сильний головний біль;
- Зміни показання в аналізі сечі – протеїнурія;
- Видима загальна слабкість і втома;
- •Поширені інфекційні захворювання.

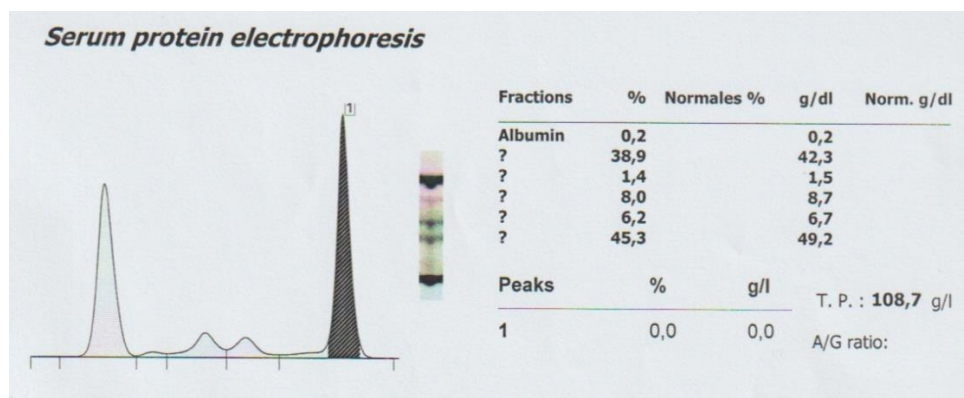
Електрофорез білків крові проводили разом із такими дослідженнями:

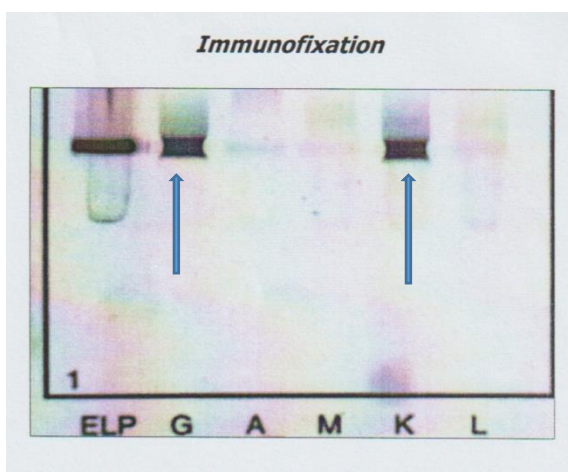
- Загальний аналіз крові;
- Загальний аналіз сечі;
- Проби печінки - білірубін, AST, ALT, GGT, лужна фосфатаза;
- Проби нирок - креатинін, сечовина, сечова кислота;
- Загальний білок крові, альбуміну, глобуліну;
- Імунофіксація сироваткового альбуміну;
- Моноклональний імуноглобулін;

- Поліклональний імуноглобулін;
- Вільні легкі ланцюги в крові;
- β -2-мікроглобулін;
- Альбумін у сечі;
- Електрофорез білків сечі;
- Імунофіксація білка сечі;
- Вільні легкі ланцюги в сечі.

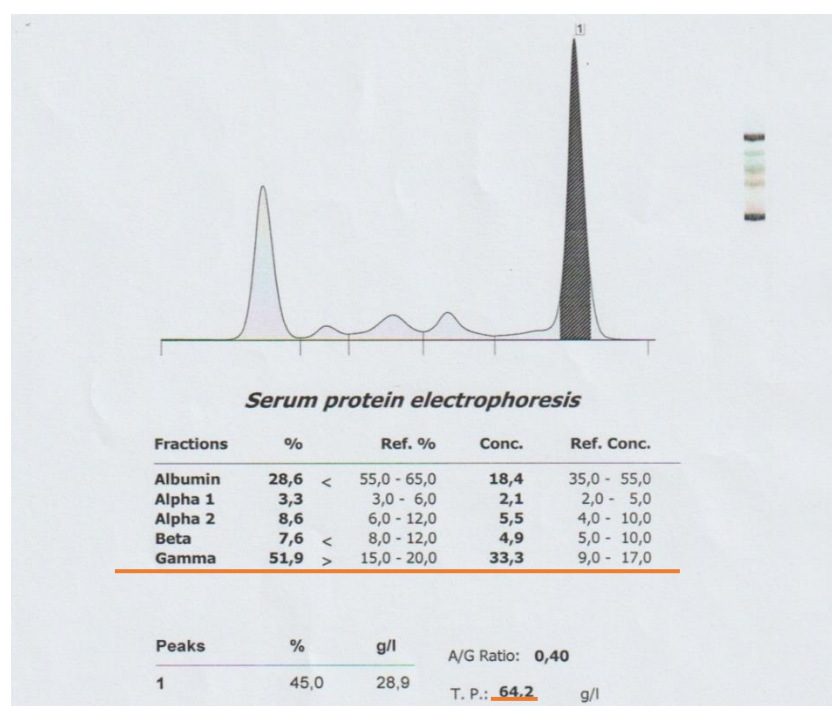
Пацієнтка К. звернулась до лікаря гематолога з приводу підозри на мієломну хворобу. Лікарем було призначено обстеження: рівень загального білка та альбуміну, електрофорез білків, рівень IgA, IgG, IgM, рівень каппа та лямбда ланцюгів. Була провели обстеження на початку літа 2018 року, було виявлено збільшення рівню загального білка крові, а при проведенні електрофорезу виявлено патологічний білок М- градієнт, представлений піком в γ -зоні, що підтверджує діагноз мієломна хвороба. Показник загального білка становив 108,7 г/л, виявлено IgG - 39,8г/л. При цьому було зроблено імунофіксацію М - градієнту, для його типування.

Висновки лабораторії: пацієнтка має ознаки секретуючої мієломи, патологічний білок знаходиться в γ -зоні, білок представлена IgG та продукую каппа ланцюги.

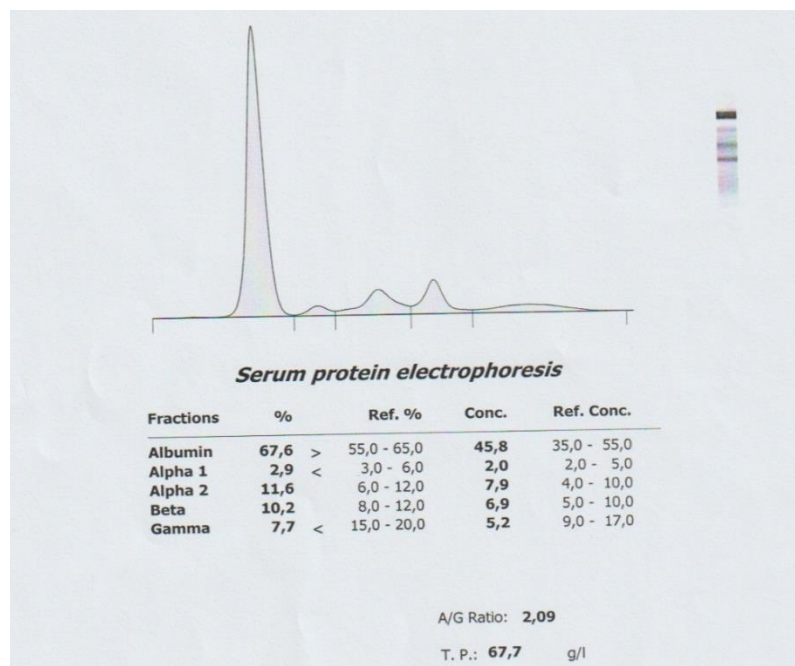




Наступне обстеження було проведено через місяць, яке виявило ріст показників, як загального білка так і піка в γ -зоні. Через декілька місяців показники лишились майже без змін, що може свідчити про те, що терапія так і не почалася. На шостому місяці після проведення першої діагностики було проведене чергове обстеження, яке показало рівень загального білка 130 г/л, а приріст в γ -зоні майже в два рази. Після цієї діагностики почалася терапія і вже через місяць рівень загального білка впав до 64,2 г/л, а пік в γ -зоні зменшився з показника 83,7 до 33,3. Пацієнт добре відповідав на терапію.



Через чотири місяці рівень ЗБ лишився без змін, а ось пік зменшився до показника 6,9, що відповідно референсу є дуже низьким. Впродовж наступного року рівень піку зменшувався, при цьому рівень альбумінів зменшувався, а рівень ЗБ коливався в межах норми. Пацієнт увійшов в стан ремісії.



При черговому обстеженні біло виявлено зростання М - градієнту, що свідчило про рецидив захворювання. Так показники рівня М - градієнту стали майже такими ж як і при першій діагностиці з показниками ЗБ – 103,2 і збільшеним піком в γ -зоні – 48,0. Це може свідчити про те, що пацієнт припинив свою терапію.

ВИСНОВКИ

1. При вивченні досвіду роботи лікарні, а саме лабораторного відділення було встановлено, що за лабораторним відділенням закріплені приміщення, засоби вимірювальної техніки (ЗВТ), випробувальне (ВО) та допоміжне обладнання, нормативні, організаційні і методичні документи. Лабораторне відділення складається з відділів: біохімічного, імунологічного, загальноклінічного, мікробіологічного та ін.
2. Електрофорез – це метод, що дозволяє відокремити заряджені молекули в електричному полі. Принципом всіх методів електрофорезу є те, що молекули в розчині мають електричний

заряд і рухаються до протилежно заряджених електродів під дією сили електричного поля.

3. Електрофорез як біохімічний метод - дуже потужний пристрій для оцінки широкого спектру життєвих процесів. Найбільша популярність до теперішнього часу належить електрофорезу білків, як одному з найбільш інформативних лабораторних тестів, які використовуються в даний час. Він передбачає велику діагностичну інформацію, особливо коли дослідження доповнюється такими високоспецифічними тестами як імуноелектрофорез, кількісною оцінкою імуноглобулінів та інших специфічних протеїнів. Електрофоретичний поділ протеїнів дозволяє вивчати їх біологічні і фізичні характеристики, будучи індикатором захворювань печінки і нирок, імунної системи, злоякісної патології, гострих і хронічних інфекцій, генетичних пошкоджень, захворювань центральної нервової системи і багатьох інших видів патології. Електрофорез дозволяє виявляти: кількісні аномалії – зменшення або збільшення фракцій; якісні аномалії – поява аномальних фракцій; скринінгові дослідження - виявлення аномалій; моніторинг захворювання - слідкувати за захворюванням та оцінювати ефективність терапії.

Електрофорез дозволяє виявити та спостерігати такі стани організму:

- гострофазну відповідь - підвищення α_1 і α_2 -глобулінів в зв'язку з посиленням біосинтезу в печінці білків гострої фази при запаленні будь-якої етіології (травма, хірургічне втручання, гострий інфаркт міокарда, інфекція та ін.).
- хронічне запалення - збільшення γ -глобулінів (хронічні гепатити різної етіології, ревматоїдний артрит, деякі хронічні інфекції).
- цироз печінки - збільшення γ -глобулінів, злиття β - і γ -глобулінів внаслідок мезенхімально-запального синдрому, при розвитку гепато-депресивного синдрому можливе зниження альбуміну.

- нефротичний синдром - підвищення α_2 -глобулінів в зв'язку з посиленням синтезу і підвищенням сироваткового рівня α_2 -макроглобуліну, можливе зниження альбуміну через його масивної втрати з сечею.
 - моноклональна гамопатія - поява на електрофореграмі окремої дискретної смуги в області глобулярних фракцій (моноклональний білок, М - градієнт, М - білок)
4. За результатами оцінки статистичних даних було виявлено, що за період 2018-2020рр. було проведено 1335 діагностик за допомогою електрофорезу. З цієї загальної кількості патологій біло виявлено лише в 645 випадків, тобто майже половина. При діагностиці мієломної хвороби за статтю між чоловіками та жінками за період 2018-2020рр. становить 50:50, про що може свідчити - мієломна хвороба однаково вражає як чоловіків так і жінок. При типуванні патологічного білку (М - градієнту) більша його кількість представлена імуноглобуліном класу G та за рахунок каппа ланцюгів. А найменша його кількість представлена імуноглобуліном класу A та за рахунок каппа ланцюгів.

СПИСОК ВИКОРАСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ануфриева Р. М., Бессчетнова Т. Ю., Каменцев Я. С. Система капиллярного електрофореза / Р. М. Ануфриева. СПб: Петрополис. 2001. 370 с.
2. Арсенин С. Л. Клинический электрофорез белков: современные аспекты клинической диагностики / С. Л. Арсенин. Helena. 2017. 43 с.
3. Ащеулова Т. В., Ковалёва О. Н., Латогуз Ю. И. Анализ мочи, функциональные пробы: метод. указ. для студентов к практ. занятиям по пропедевтике внутренней медицины / Т. В. Ащеулова. Харьков: ХНМУ. 2016. 16 с.

4. Бессмельцев С. С., Абдулкадиров К. М. Множественная миелома / С. С. Бессмельцев. Специальное Издательство Медицинских Книг. 2016. 504 с.
5. Бикчентаева, А. Г. Поверхностные явления и дисперсные системы / А. Г. Бикчентаева. Уфа. 1998. 256 с.
6. Бойко Т. І. Клінічні лабораторні дослідження: підручник 2-ге / Т. І. Бойко. перероб. І доп. – ВСВ «Медицина». 2015. 352 с.
7. Гааль Э. А., Медьеша Г. Д., Веерцкеи Л. Г. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. А. Гааль. М.: Мир. 1982. 355 с.
8. Гильманов А. Ж. Электрофорез белков сыноротки крови: современные возможности анализа / А. Ж. Гильманов., Салыхова Р. М. Лаборатория. 2006. 36 с.
9. Голубева В. Л. Изменения белков крови в диагностике заболеваний пациентов разных возрастных групп / В.Л. Голубева, В.В. Белова. Медицина. Фармация. - 2011. - №22. вып.16/1. С. 5-9.
10. Горбачева Д. В. Электрофоретическое исследование белков в лабораторной практике / Д. В. Горбачева. Г: ГУ «РНПЦ РМиЭЧ». 2020. 43 с.
11. Долгов В. В., Меньшиков В. В. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство / В. В. Долгов. М.: ГЭОТАР – Медиа. 2012. 928 с.
12. Долгов В. В., Шевченко О. П. Лабораторная диагностика нарушений обмена белков: учеб. пособие / В. В. Долгов. Тверь: Триада. 2002. 68 с.
13. Зайко М. Н., Биць Ю. В., Патологія / М. Н. Зайко. К.: Медицина. 2008. 704 с.
14. Камышников В. С. Лабораторная диагностика в клинической практике врача: учебное пособие / В. С. Камышников. Минск: Адукацыя выхаванне. 2019. 632 с.

15. Камышников В. С. Методы клинических лабораторных исследований / В. С. Камышников. М.: МЕДпресс-информ. 2020. 736 с.
16. Камышников В. С. Норма в лабораторной практике. Справочное пособие / В. С. Камышников. М.: МЕДпресс-информ. 2014. 336 с.
17. Карплюк В.П., Спринь О.Б. Використання електрофорезу в лабораторній діагностиці на сучасному етапі // Збірник наукових праць студентів III Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції «Студентський науковий вимір проблем природничо-математичної освіти в контексті інтеграції України до єдиного європейського і світового освітнього простору». Глухів. 2021. С.20-24.
18. Киселевский Ю. М., Оганесян Н. Г., Костин Г. В., Конколь К. В. Электрофоретические методы в лабораторной диагностике: методические рекомендации / Ю. М. Киселевский. Гродно: ГГМИ. 1999. 100 с.
19. Кишкун, А. А. Биохимические исследования в клинической практике. Руководство для врачей / А. А. Кишкун. М.: Медицинское информационное агентство. 2014. 528 с.
20. Комаров Ф. И., Коровкин Б. Ф., Меньшиков В. В. Биохимические исследования в клинике / Ф. И. Комаров М.: Medicina. 2017. 384 с.
21. Куксинский В. А., Чурляев Ю. А., Никифорова Н. В. и др. Содержание белков-маркеров спинномозговой жидкости при тяжелой черепно-мозговой травме / В. А. Куксинский. Клиническая лабораторная диагностика. 1997. С. 11 - 13.
22. Куліков А. Ю., Чернишова О. С., Нікітіна Н. О. Електрофоретичні методи аналізу / А. Ю. Куліков. Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна. 2013. 68 с.
23. Лапин С. В., Тотолян А. А. Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний. Издательство "Человек". СПб. 2010. 258 с.

24. Лаповець Л. Є., Лебедь Г. Б., Ястремська О. О. Клінічна лабораторна діагностика / Л.Є. Лаповець. Київ: Медицина. 2019. 472 с.
25. Луньової Г. Г. Клінічна біохімія / Г. Г. Луньової. К.: Атіка. 2013. 1156 с.
26. Луцик Б. Д., Лаповець Л. Є., Лебедь Г. Б. Клінічна лабораторна діагностика / Б.Д. Луцик. Київ: Медицина. 2011. 288 с.
27. Никитенко Е. А., Фомина Т. В. Фотохимическое взаимодействие *p*-диметиламинобензальдегида с белками в зависимости от содержания в них триптофана / Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии: Сборник работ XIX Зимней молодежной научной школы / Е. А. Никитенко. Москва. 2007. С.30.
28. Никитенко Е. А., Фомина Т. В., Зайцев В. Г. Перспективы фотохимического определения иммуноглобулинов сыворотки крови человека при гипергаммаглобулинемиях / Е. А. Никитенко. Клиническая лабораторная диагностика. 2008. 52 с.
29. Никитенко Е.А., Фомина Т.В. Сравнительный анализ методов определения γ -глобулиновой фракции сыворотки крови при γ -глобулинемии / Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Материалы 65-й юбилейной научной конференции студентов и молодых ученых ВолГМУ / Е. А. Никитенко. Волгоград. 2007. С. 28-29.
30. Онкоров А. Н. Диагностика болезней внутренних органов / А. Н. Онкоров. Витебск. 2019. 630 с.
31. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Л. А. Остерман. М: МЦНМО. 2002. 248 с.
32. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л. А. Остерман. М: Наука. 1981. 288 с.
33. Семак И. В., Зырянова И. В., Губич О. И. Биохимия белков / И. В. Семак. Минск: БГУ. 2007. 49 с.

34. Спиридович Е. В., Гончарова Л. В. и др. Электрокинетические явления: теория и методы / Е. В. Спиридович. Минск: БГУ. 2011. 64 с.
35. Стручкова И. В., Кальясова Е. А. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле / И. В. Стручкова. Нижний Новгород: Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского. 2012. 60 с.
36. Стручкова И. В., Кальясова Е. А. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле / И. В. Стручкова. Нижний Новгород: Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского. 2012. 60 с.
37. Трубникова Т. И., Гуцол Л. О., Колесниченко Л. С., Гаврилов С. С. Диагностическая ценность капиллярного электрофореза белков сыворотки крови и мочи у пациентов с множественной миеломой / Т. И. Трубникова. Acta Biomedica Scientifica. 2013. 99 с.
38. Шлопов В. Г. Патологічна анатомія / В. Г. Шлопов. Вінниця: НОВА КНИГА. 2004. 768 с.
39. Эмануэль В. Л., Первакова М. Ю. Информативность лабораторных методов определения парапротеина для диагностики моноклональных гаммапатий / В. Л. Эмануэль. Медицинский алфавит. 2016. 43 с.
40. Baxevanis A. D., Ouellette B. F. Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins / A. D. Baxevanis. John Wiley & Sons, Inc. 2001. 354 p.
41. Chernecky C. C., Berger B. J. Laboratory Tests and Diagnostic Procedures / C.C. Chernecky. Saunder Elsevier. 2008. 288 p.
42. Dhawan B. C. Textbook of Electrophoresis / B. C. Dhawan. Pearl Books. 2008. 232 p.
43. Ghowsi K. Electrophoresis / K. Ghowsi. InTech Press. 2012. 234 p.
44. Karp G. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments / G. Karp. Wiley and Sons. 2009. 836 p.

45. Keren D. Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis / D. Keren. ASCP Press. 2012. 402 p.
46. Magdeldin S. Gel Electrophoresis –Principles and Basics / S. Magdeldin. InTech Press. 2012, 366 p.
47. Sheehan D., Tyther R. Two-Dimensional Electrophoresis Protocols (Methods in Molecular Biology) / D. Sheehan. Springer. 2009. 250 p.
48. Westermeier R. Electrophoresis in Practice / R. Westermeier. Wiley: VCH. 2001. 354 p.