

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MELITA PIGNAR

**PRIMERJAVA METOD ZA DOLOČANJE TRANSFERINA Z ZMANJŠANO
VSEBNOSTJO OGLJIKOHIDRATOV KOT BIOKEMIČNEGA OZNAČEVALCA
ŠKODLJIVE RABE ALKOHOLNIH PIJAČ**

**COMPARATIVE EVALUATION OF METHODS FOR DETERMINATION OF
CARBOHYDRATE DEFICIENT TRANSFERRIN AS A BIOCHEMICAL
MARKER OF HARMFUL ALCOHOL USE**

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetnega Kliničnega centra Ljubljana, pod mentorstvom prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom dr. Marije Prezelj, univ. dipl. kem., spec. med. biokem..

Zahvala

Za strokovno pomoč, mnoge spodbude in izkazano zaupanje se zahvaljujem Petri Finderle mag. farm., somentorici dr. Mariji Prezelj, univ. dipl. kem., spec. med. biokem in mentorju prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem.. Zahvala tudi vsem članom komisije za hitro in korektno delo.

Iskrena hvala tudi mojim najbližjim, prijateljem in sodelavcem, ki so mi stali ob strani.

Hvala tudi vsem zaposlenim v laboratoriju na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetnega Kliničnega centra Ljubljana, za prijetno delovno vzdušje.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorice dr. Marije Prezelj, univ. dipl. kem., spec. med. biokem..

Ljubljana, januar 2009

Melita Pignar

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. S. Pečar

Članica diplomske komisije: prof. dr. J. Lukač Bajalo, spec. med. biokem.

Vsebina

Vsebina.....	i
Povzetek	iii
Abstract.....	iv
Seznam okrajšav	v
1. Uvod	1
1.1 Etanol.....	2
1.1.1 Absorpcija, presnova in izločanje etanola	3
1.1.2 Učinki etanola.....	5
1.1.3 Alkoholna okvara jeter	7
1.2 Označevalci škodljive rabe alkoholnih pijač	8
1.2.1 Klasični biokemični označevalci	9
1.2.1.1 Etanol.....	9
1.2.1.2 Metanol.....	10
1.2.1.3 Aspartat-aminotransferaza (AST) EC 2.6.1.1	11
1.2.1.4 Alanin-aminotransferaza (ALT) EC 2.6.1.2.....	11
1.2.1.5 De Ritisov koeficient (razmerje AST/ALT).....	12
1.2.1.6 Gama-glutamil transferaza (GGT) EC 2.3.2.2	12
1.2.1.7 Povprečni volumen eritrocitov (PVE).....	13
1.2.1.8 Sečnina	13
1.2.1.9 Holesterol velike gostote (HDL)	13
1.2.2 Novejši biokemični označevalci	14
1.2.2.1 5-hidroksitriptofol (5-HTOL).....	14
1.2.2.2 Whole Blood Associated Acetaldehyde (WBAA)	15
1.2.2.3 Etilni estri maščobnih kislin (FAEE)	15
1.2.2.4 Etil glukuronid (EtG).....	15
1.2.2.5 Etil sulfat (EtS)	16
1.2.2.6 Fosfatidil etanol (PEth).....	16
1.2.2.7 Early Detection of Alcohol Consumption (EDAC).....	16
1.3 Transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov (CDT)	17
1.3.1 Transferin (Tf)	17
1.3.2 CDT	20
1.3.3 Metode za določanje CDT	22

1.3.3.1 Ionsko izmenjevalna kromatografija z imunoturbidimetrično detekcijo.....	24
1.3.3.2 Kapilarna elektroforeza (CE).....	24
1.3.3.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).....	25
2. Namen dela.....	27
3. Materiali in metode.....	28
3.1 Vzorci.....	28
3.2 Metode za določanje CDT.....	28
3.2.1 Ionsko izmenjevalna kromatografija z imunoturbidimetrično detekcijo.....	28
3.2.1.1 Reagenti.....	29
3.2.1.2 Aparature in pribor.....	29
3.2.1.3 Opis metode.....	30
3.2.2 Kapilarna elektroforeza.....	31
3.2.2.1 Reagenti.....	32
3.2.2.2 Aparature in pribor.....	32
3.2.2.3 Opis metode.....	32
3.2.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.....	33
3.2.3.1 Reagenti.....	34
3.2.3.2 Aparature in pribor.....	34
3.2.3.3 Opis metode.....	35
3.3 Metode za določanje katalitične aktivnosti encimov AST, ALT, GGT in AP.....	36
3.3.1 Reagenti.....	36
3.3.2 Aparature in pribor.....	37
3.3.3 Opis metode.....	37
3.4 Vrednotenje rezultatov.....	39
4. Rezultati in razprava.....	40
4.1 Statistično vrednotenje rezultatov %CDT.....	40
4.2 Grafični prikaz izooblik transferina.....	51
4.3 Primerjave aktivnosti encimov in vrednosti %CDT.....	60
4.4 Skupina gastroenteroloških bolnikov.....	63
5. Sklep.....	71
6. Literatura.....	73

Povzetek

Škodljiva raba alkoholnih pijač predstavlja velik problem sodobnega časa. Tudi v Sloveniji je uživanje alkoholnih pijač zelo razširjeno. Za ugotovitev in potrditev škodljivega uživanja alkoholnih pijač se uporabljajo biokemijski označevalci: gama-glutamiltransferaza, aspartat-aminotransferaza, alanin-aminotransferaza, De Ritisov koeficient, povprečni volumen eritrocitov in tudi razni vprašalniki. Biokemijski označevalci so učinkovit pripomoček v diagnostiki in spremljanju škodljivega uživanja alkoholnih pijač. Za najbolj specifičen in tudi najbolj razširjen biokemijski označevalec škodljive rabe alkoholnih pijač pa danes velja transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov (CDT; carbohydrate deficient transferrin). Njegovo povišano serumsko vrednost lahko povzroči že neprekinjeno dnevno uživanje 60 do 80 g etanola vsaj 14 dni zaporedoma. Običajno se določa s kromatografskimi ali elektroforetskimi metodami. Pri našem delu smo primerjali tri najpogosteje uporabljene metode za določanje CDT: ionsko izmenjevalno kromatografijo z imunoturbidimetrično detekcijo, kapilarno elektroforezo in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Na podlagi statistične analize rezultatov 105 vzorcev seruma naključno izbranih preiskovancev, ki so imeli na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (Univerzitetni klinični center Ljubljana) naročeno redno analizo CDT, smo ugotovili, da vse tri metode korelirajo med seboj in so ustrezne za uporabo v kliničnih laboratorijih. Z metodo z ionsko izmenjevalnimi kolonami smo dobili 10 % več pozitivnih rezultatov kakor s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti in kapilarno elektroforezo. Prednost metod kapilarne elektroforeze in tekočinske kromatografije visoke ločljivosti je grafični izpis ločenih izooblik transferina, s pomočjo katerega lahko ugotovimo prisotnost motečih snovi v vzorcu in genetskih variant transferina. Priporočljivo je, da se vsak povišan in hkrati dvomljiv rezultat CDT, določen z metodo z ionsko izmenjevalnimi kolonami, potrdi z eno izmed metod, ki omogočajo grafični izpis ločenih transferinskih izooblik. Pri našem delu nismo ugotovili ujemanja med vrednostmi CDT, določenimi s tremi različnimi metodami in katalitičnimi aktivnostmi encimov aspartat aminotransferaza, alanin aminotransferaza, gama-glutamiltransferaza in alkalna fosfataza. Prav tako nismo uspeli dokazati primerljivosti metod za določanje CDT v skupini 20 vzorcev seruma gastroenteroloških bolnikov. V skupini gastroenteroloških bolnikov smo ugotovili, da so bile vrednosti jetrnih encimov pogosteje in bolj povišane kot vrednosti CDT. Vrednosti CDT so bile povišane le pri boleznih jeter, povezanimi z uživanjem alkoholnih pijač. Prav tako sta bila pri bolnikih z jetrno cirozo vedno prisotna značilen elektroferogram in kromatogram.

Abstract

Harmful alcohol use is a huge problem of the modern world. Alcohol consumption is widely spread also in Slovenia. For determining and confirming the harmful use of alcohol the following biochemical markers are used: γ -glutamyltransferase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, De Ritis coefficient, erythrocyte mean corpuscular volume and different questionnaires. Biochemical markers are an effective tool in diagnosing and monitoring of harmful use of alcohol. The most specific and widely used biochemical marker of harmful use of alcohol is carbohydrate deficient transferrin (CDT). Daily consumption of 60 to 80 g of ethanol 14 days consecutively can increase the value of carbohydrate deficient transferrin in serum. Usually it is determined with chromatographic or electrophoretic methods. We compared three most commonly used methods for CDT determination: ion exchange columns with immunoturbidimetric detection, capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. Statistical analysis of 105 human serum samples, chosen randomly among subjects who had regular examination of CDT at the Clinical Institute of Clinical Chemistry and Biochemistry (University medical centre Ljubljana) showed good correlation of all three methods. All three methods can be used in routine measurement of CDT in clinical laboratories. There were 10 % more positive results obtained with the ion exchange columns method in comparison to the results obtained with high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. Advantage of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography is the graphical pattern of the separated transferrin isoforms which enables to detect the presence of interfering substances in the sample and gives information about the transferrin genetic variants. It is recommended that each elevated and doubtful CDT value determined with the ion exchange columns method should be verified using one of the methods that have a graphical output of the separated transferrin isoforms. We did not demonstrate correspondence between CDT values obtained with three different methods and the catalytic activity of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, γ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase. The comparability between methods for determination of CDT in a group of 20 serum samples of gastroenterological patients has not been established. In a group of gastroenterological patients the values of liver enzymes were more frequently elevated and to a larger extent compared to CDT values. The latter were elevated only in liver diseases induced with alcohol consumption. In samples of patient with cirrhosis of the liver characteristic electropherogram and chromatogram were always present.

Seznam okrajšav

ADH	alkoholna dehidrogenaza
ALDH	aldehidna dehidrogenaza
ALT	alanin-aminotransferaza
AP	alkalna fosfataza
AST	aspartat-aminotransferaza
BIS-TRIS	2,2-bis(hidroksietil)-imino-tris(hidroksimetil)-metan
CAT	katalaza
CDG	prirojena motnja glikozilacije (angl.: Congenital disorder of glycosylation)
CDT	transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov (angl.: Carbohydrate-Deficient Transferrin)
CE	kapilarna elektroforeza (angl.: Capillary Electrophoresis)
CYP21	izoencim citokroma P450 2E1
EDAC	early detection of alcohol consumption
EIA	encimskoimunska metoda (angl.: Enzyme Immunoassay)
EtG	etil glukuronid
EtS	etil sulfat
FAEE	etilni estri maščobnih kislin (angl.: Fatty Acid Ethyl Esters)
GGT	gama-glutamilttransferaza
GLDH	glutamatdehidrogenaza
5-HIAA	5-hidroksiindol-3-ocetna kislina (angl.: 5-HydroxyIndole-3-Acetic Acid)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl.: High Performance Liquid Chromatography)
5-HTOL	5-hidroksitriptofol
IEC	ionsko izmenjevalna kromatografija z imunoturbidimetrično detekcijo (angl.: Ion Exchange Columns with Immunoturbidimetric Detection)
IEF	izoelektrično fokusiranje (angl.: Isoelectric Focusing)
IFCC	Mednarodna federacija za klinično kemijo (angl.: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine)
LDH	laktat-dehidrogenaza
MDH	malat-dehidrogenaza

MEOS	mikrosomski etanol oksidirajoči sistem
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid, reducirana oblika
NCCLS	Ameriška nacionalna komisija za klinične laboratorijske standarde (angl.: National Committee for Clinical Laboratory Standards)
PEth	fosfatidil etanol
pI	izoelektrična točka
PVE	povprečni volumen eritrocitov (angl.: Erythrocyte Mean Corpuscular Volume (MCV))
QCS	standardi kontrole kakovosti (angl.: Quality Control Standard)
r	Pearsonov koeficient korelacije
ROS	reaktivne kisikove spojine (angl.: Reactive Oxygen Species)
RIA	radioimunokemijska metoda (angl.: Radioimmunoassay)
sd	standardni odklon
Tf	transferin
TIA	imunoturbidimetrična metoda (angl.: Turbidimetric Immunoassay)
TRIS	tris(hidroksimetil)-aminometan
WBAA	acetaldehid vezan na proteine v krvi (angl.: Whole Blood Associated Acetaldehyde)

1. Uvod

Uživanje alkoholnih pijač je v Sloveniji široko razširjeno. Mnogi se ne zavedajo in si ne želijo ali nočejo priznati, da so tudi bolni, ki so posledice prekomernega uživanja alkoholnih pijač hud problem sodobnega časa. V primerih prekomernega uživanja alkoholnih pijač ni prizadet le posameznik, temveč tudi njegovi najbližji družinski člani. Zgodnje odkrivanje škodljive rabe alkoholnih pijač je zelo pomembno zaradi negativnih posledic, ki jih le-ta pusti na človeškem organizmu in psiho-socialnem življenju.

Opijanje lahko vodi do takojšnjih posledic kot so zastrupitve, prometne nezgode, nasilje v družini, dolgotrajno opijanje pa lahko privede do kroničnih zdravstvenih in socialnih problemov (1). Najpogostejši vzrok med vsemi akutnimi naključnimi zastrupitvami pri odraslih so ravno akutne zastrupitve samo z alkoholnimi pijačami ali v kombinaciji z drugimi strupi (2). Slovenija je uvrščena visoko na lestvici porabe alkoholnih pijač v Evropi. V preglednici I so navedene registrirane količine porabe alkoholnih pijač v Sloveniji leta 2005. Verjetno pa je poraba alkoholnih pijač še višja, ker je potrebno upoštevati tudi neregistrirano uporabo alkoholnih pijač (domača pridelava alkoholnih pijač in v državo neregistrirano uvožene alkoholne pijače).

Preglednica I: Registrirane količine porabe alkoholnih pijač v Sloveniji leta 2005

	Poraba na prebivalca	Preračunana poraba na odraslega* prebivalca
Preračunano na čisti etanol	8,8 litra	10,3 litra
Pivo	70,9 litra	82,65 litra
Vino	39,9 litra	46,53 litra
Žgane pijače	2,2 litra	2,61 litra

* Osebe stare 15 let in starejše

Škodljivo uživanje alkoholnih pijač in njene posledice so tudi veliko finančno breme za družbo zaradi manjše ali izgubljene produktivnosti ljudi (posledica bolezni in prezgodnjih smrti) ter zaradi visokih stroškov v zdravstvu, socialnem varstvu, prometnem sektorju ter kazenskem sodstvu (1).

V večini primerov je škodljivo rabo alkoholnih pijač in posledično bolezni povezane z njo težko odkriti pravočasno. Motnje zaradi prekomernega uživanja alkoholnih pijač lahko

mnogokrat kažejo na bolezni drugih vzrokov, posledica česar so pogosto dolgotrajne in drage preiskave, ker zdravnik ne ugotovi vzroka pravočasno oziroma pacient zanika uživanje alkoholnih pijač. Za zanesljivo potrditev diagnoze škodljive rabe alkoholnih pijač bi bilo potrebno imeti idealni biokemični pokazatelj, ki bi bil specifično vezan na prisotnost etanola v organizmu ali na njegov metabolizem, odvisen od količine zaužite alkoholne pijače, dovolj občutljiv za povezavo med količino zaužite alkoholne pijače ter tveganjem za psiho-somatskimi obolenji in bi imel tudi sposobnost spremljanja bolnika med abstinencijskim obdobjem (3). Tem zahtevam se najbolj približa transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov (CDT; carbohydrate deficient transferrin). Danes CDT velja za najbolj specifičen biokemični označevalec škodljive rabe alkoholnih pijač (3, 4). V kombinaciji z drugimi diagnostičnimi pristopi, ki temeljijo na anamnestičnih podatkih, na kliničnih preiskavah, raznih vprašalnikih in z drugimi biokemijskimi pokazatelji škodljive rabe alkoholnih pijač, kot so gama-glutamilttransferaza (GGT), aspartat-aminotransferaza (AST), alanin-aminotransferaza (ALT), glutamatdehidrogenaza (GLDH) in povprečni volumen eritrocitov (PVE), je CDT nedvomno najbolj specifičen in tudi najbolj razširjen biokemični označevalec škodljivega uživanja alkoholnih pijač (4).

1.1 Etanol

Etanol oziroma etilni alkohol s kemijsko formulo C_2H_5OH je sestavina alkoholnih pijač. Kot sinonim za etanol se najpogosteje uporablja izraz alkohol. Etanol je brezbarvna, bistra, hlapljiva, higroskopska in vnetljiva tekočina značilnega vonja z vreliščem okoli $78\text{ }^{\circ}C$ in relativno gostoto med 0,790 in 0,793. Etanol se uporablja tudi kot tehnično topilo, antiseptik, v zdravilnih tinkturah in kozmetiki (2, 5). V nizkih koncentracijah ima etanol bakteriostatično delovanje (zavira rast in razmnoževanje bakterij), v višjih koncentracijah pa deluje tudi kot baktericid (snov, ki ubija bakterije). Etanol ni primeren za razkuževanje kirurškega in zobozdravniškega materiala, ker je slabo učinkovit proti bakterijskim sporam; jih ne uniči (6). Etanol je produkt alkoholnega vrenja sladkornih raztopin. Je alifatična spojina s polarno skupino in nepolarnim delom zato je vodotopna ter tudi lipidotopna in lahko prehaja lipidni dvosloj celičnih membran (7). Brez transportnih mehanizmov se prenaša po krvnem obtoku, vstopa v celice ter prehaja hematoencefalno bariero in placento (posteljico zarodka) (6).

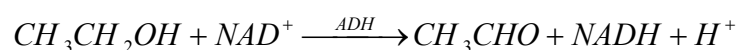
1.1.1 Absorpcija, presnova in izločanje etanola (8, 9)

Etanol najpogosteje vnesemo v telo z zaužitjem (skozi usta), redko se absorbira skozi kožo in skozi dihala. Etanol se iz prebavil hitro in popolnoma absorbira. Na hitrost absorpcije vplivajo hrana v želodcu oziroma upočasnjena peristaltika in patološka stanja črevesne sluznice. Ta stanja upočasnijo absorpcijo. Absorpcija je pospešena po resekciji želodca (odstranjen del želodca). Absorpcija zaužitega etanola poteka v želodcu, tankem in debelem črevesu. Manj kot 20 % etanola se absorbira v želodcu, večina se absorbira v tankem črevesju. Absorpcija v ustih, požiralniku in debelem črevesju je minimalna. Do absorpcije preko pljuč prihaja pri vdihovanju etanolnih hlapov (2, 6).

Etanol se enakomerno razporedi po telesu, po vseh tkivih in telesnih tekočinah. Prehaja tudi v posteljico zarodka in tako pride v plodov krvni obtok. 30 do 60 minut po zaužitju so koncentracije etanola v krvi najvišje.

Jetra so glavni presnovni organ etanola. V njih se z oksidacijo metabolizira od 90 do 98 % vsega etanola. Oksidacijo etanola v jetrih omogočijo trije encimski sistemi: citosolna alkoholna dehidrogenaza (ADH), mikrosomski etanol oksidirajoči sistem (MEOS) in katalaza (CAT) v peroksisomih.

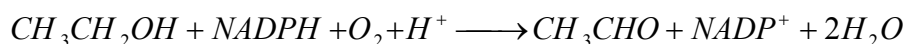
a) Pri nealkoholikih je glavna presnovna pot povezana z encimom ADH, ki je prisoten v citosolu jetrnih celic. ADH je najpomembnejši encim v procesu razgradnje etanola. Katalizira oksidacijo etanola v acetaldehid. V tej reakciji je nujno potreben tudi koencim nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+), ki se reducira do NADH.



Nastali acetaldehid, ki je zelo reaktiven in toksičen glavni produkt presnove etanola, močno pripomore k poškodbi tkiva in verjetno tudi k procesu nastanka odvisnosti od etanola.

b) Mikrosomalni etanol oksidirajoči sistem je drugi encimski sistem za razgradnjo etanola. Izoencimi citokroma P450, vključno s CYP2E1 se nahajajo v jetrnem gladkem endoplazmatskem retikulumu in kot del MEOS kompleksa pomagajo pri etanolni oksidaciji v jetrih.

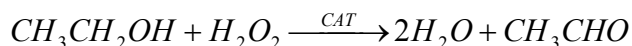
Sistem MEOS oksidira etanol v acetaldehid ob prisotnosti kisika in reducirane NADPH.



Pri uživanju alkoholnih pijač krajše časovno obdobje etanol zavira delovanje encimov MEOS, pri dolgotrajnem uživanju alkoholnih pijač pa pride do pospešene pomnožitve sistema in zvišanja njegove aktivnosti, predvsem pa povečane sinteze in povišane aktivnosti citokroma P450 (CYP2E1). CYP2E1 ima pomembno vlogo pri presnovi etanola do acetaldehida pri povišanih koncentracijah etanola in tudi pri tvorbi reaktivnih kisikovih spojin (ROS, reactive oxygen species), ki še dodatno povečajo tveganje za poškodbe tkiva. Ker CYP2E1 poleg etanola metabolizira tudi mnoga zdravila, njegova povečana aktivnost pri kroničnem uživanju alkoholnih pijač prizadene tudi presnovo zdravil; v večini primerov zmanjša njihovo učinkovitost.

c) Katalaza je prisotna v peroksisomih (celičnih mešičkih) in sodeluje v tretjem mehanizmu presnove etanola. Oksidacija etanola poteka ob prisotnosti vodikovega peroksida (H_2O_2) in je z njegovo količino tudi omejena. Nastanek H_2O_2 je uravnavan z encimskim kompleksom NADPH oksidazo ali encimom ksantin oksidazo.

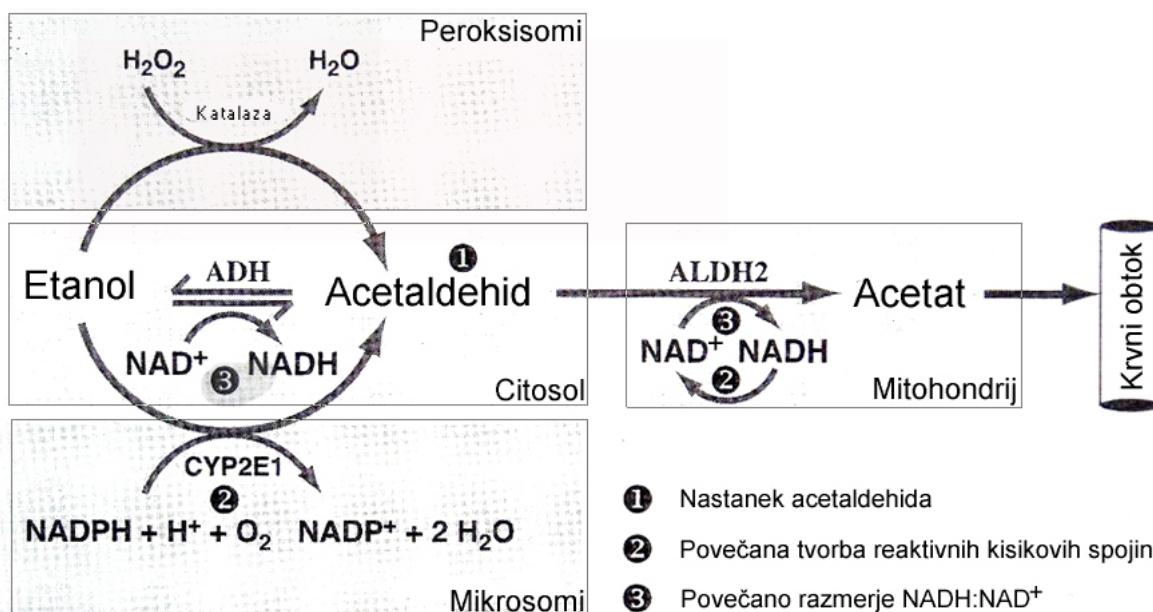
Sistem katalaze je pomemben pri oksidaciji etanola v primeru, ko pride do intenzivne sinteze purinov, ki pospeši nastanek peroksida s pomočjo ksantin-oksidade.



Nastali acetaldehid iz vseh encimskih sistemov se v mitohondrijih hepatocitov hitro oksidira v acetat. Katalizator v reakciji je aldehydna dehidrogenaza (ALDH).



Acetat se sprosti v kri, kjer ga periferna tkiva oksidirajo v CO_2 in H_2O . Del acetata se metabolizira do acetilkoencima A (AcCoA), ki vstopa v sintezo maščobnih kislin in holesterola ali pa vstopi v Krebsov cikel in se oksidira do CO_2 in H_2O (2).



Slika 1: Oksidacijske presnovne poti etanola v jetrni celici

Preostali etanol (2 do 10 %) se nespremenjen izloči skozi ledvica, pljuča ter tudi z znojem. Pojavi se lahko v mleku in drugih izločkih (2, 6).

Telo je sposobno razgraditi 100 mg do 125 mg etanola na kg telesne teže na uro, pri dolgotrajnem uživanju alkoholnih pijač se ta količina zaradi indukcije jetrnih encimov poveča do 175 mg/kg na uro (2). Etanol se torej pri prekomernem uživanju alkoholnih pijač razgradi približno 1,5 krat hitreje (10). Pri nealkoholikih se v eni uri razgradi približno 10 g čistega etanola (1 enota), kar ustreza popitemu 1 dl vina, 2,5 dl piva ali 0,3 dl žgane pijače. Če posameznik popije večje količine alkoholnih pijač, se koncentracija etanola v krvi poveča.

1.1.2 Učinki etanola

Ljudje bi se morali izogibati prekomernemu uživanju alkoholnih pijač. Glede na količino alkoholnih pijač, ki jih posameznik uživa in kakšen odnos ima do alkoholnih pijač, razdelimo ljudi na več skupin. V prvi skupini so *abstinenti*, h kateri prištevamo ljudi, ki ob nobeni priložnosti ne pijejo alkoholnih pijač. V drugi skupini so ljudje, ki *zmerno pijejo* alkoholne pijače. Za zdravega odraslega moškega to pomeni do 20 g ali dve enoti na dan ali do 140 g oziroma 14 enot na teden in ne več kot 5 meric ob eni pivski priložnosti. Za zdravo odraslo žensko, ki ni noseča in ne doji, pa to pomeni do 10 g ali eno enoto na dan ali do 70 g oziroma 7 enot na teden in ne več kot 3 enote ob eni pivski priložnosti. Popite

enote je potrebno razporediti skozi ves teden in ne popiti vseh ob eni pivski priložnosti. Zmerno pitje alkoholnih pijač in mejo med zmernim in prekomernim uživanjem alkoholnih pijač je težko natančno definirati, ker se kultura pitja močno razlikuje med državami in ljudstvi. Hkrati pa enake količine alkoholnih pijač ne vplivajo enako na vsakega posameznika. Če ljudje uživajo večje količine od navedenih govorimo o *tveganem pitju* alkoholnih pijač. Takšen način pitja in višje količine alkoholnih pijač sčasoma privedejo do težav. V skupini ljudi pri katerih so že izražene posledice oziroma težave zaradi uživanja alkoholnih pijač govorimo o *škodljivem pitju*. Pri slednjih je že izražen sindrom odvisnosti od alkoholnih pijač in lahko govorimo o *alkoholizmu*. V stanju pijanosti pa pride do akutne zastrupitve z etanolom (6, 7).

Kratkotrajni učinki etanola

Neželeni učinki etanola naraščajo sorazmerno z vnosom alkoholnih pijač. Koncentracija etanola v krvi, ki povzroča različna stanja opitosti, se med posamezniki razlikuje. Stanje zavesti pri predhodno zdravem nealkoholiku je sorazmerno koncentraciji etanola v krvi. Prehodno obdobje stimulacije osrednjega živčevja z evforijo, nemirom in zmedenostjo (ekscitacijska faza), preko somnolence (hipnotična faza) in nezavesti (narkotična faza) zelo hitro preide v fazo z zastojem dihanja (2).

- Koncentracije do 180 mg/100 ml povzročijo zmanjšano ostrino vida, daljši reakcijski čas in čustveno nestabilnost.
- Pri koncentracijah od 180 mg/100 ml do 350 mg/100 ml deluje etanol kot navidezno poživilo. Zaradi depresije živčnega sistema se zmanjša sposobnost presoje, nejasen govor, dvojni in zamegljen vid, motnje ravnotežja in koordinacije, potenje, siljenje na bruhanje, bruhanje in nezmožnost zadrževanja urina.
- Koncentracije 350 mg/100 ml do 450 mg/100 ml povzročijo mrzlo in vlažno kožo, podhladitev, nizek krvni tlak, otopelost, komo, odpoved dihalnega centra.

Povprečna smrtna koncentracija etanola v krvi je približno ocenjena na 400 mg/100 ml do 500 mg/100 ml (6).

Kronični učinki etanola

Kronično uživanje alkoholnih pijač privede do poškodbe mnogih organov, še posebej toksičen učinek ima na srce in jetra (6). Stalen vnos alkoholnih pijač in s tem etanola v organizem in predvsem presnovki etanola povzročijo odvisnost od etanola (9). Etanol

negativno vpliva na centralni živčni sistem, česar posledice so pozabljivost, tremor, zmedenost, depresija, motnje spanja in periferne nevropatije (nevnetne bolezni živcev). Povzroči okvare gastrointestinalnega trakta, ki se kažejo z diarejo, siljenjem na bruhanje, bruhanjem, krvavitvami, pankreatitisom in ulkusno boleznijo. Oslabi tudi imunski sistem in s tem poveča pogostnost okužb in pljučnice. Preko vpliva na izločanje hormonov lahko pri moških kronično uživanje alkoholnih pijač privede do impotence, sterilnosti, atrofije testisov in ginekomastije (čezmernega razvoja žleznega tkiva dojke pri moških). Pri ženskah lahko povzroči neplodnost, amenorejo (izostanek menstruacije) in spontane splave (11). Med nosečnostjo se je potrebno izogibati uživanju alkoholnih pijač, ker imajo le te negativne posledice za plod. Povzročijo lahko fetalni alkoholni sindrom, katerega posledice so abnormalnosti na obrazu, različne manjše ali večje malformacije (nepravilno oblikovanje organa oziroma dela organa) in huda zaostalost v rasti z manjšo duševno razvitostjo. V primeru, da mati v času dojenja uživa alkoholne pijače, se lahko pri otroku pojavi omotica, prekomerno znojenje, globok spanec, slabotnost, upočasnjena rast in nenormalno povečanje telesne teže. Pri doječi materi, ki uživa alkoholne pijače, je zmanjšano izločanje mleka. Če po dolgotrajnem prekomernem uživanju alkoholnih pijač posameznik preneha s pitjem se lahko pojavi t.i. odtegnitveni sindrom. Značilni zanj so tremor (ritmično tresenje mišic, udov in drugih delov telesa), agitacija (huda tesnoba), občutek strahu, siljenje na bruhanje, bruhanje in znojenje. Lahko se pojavijo halucinacije, epileptični napadi in pijanska blaznost (6, 11). Posledica uživanja alkoholnih pijač je tudi povečano tveganje za nastanek nekaterih vrst karcinoma (6, 4).

1.1.3 Alkoholna okvara jeter (8)

Kot posledica dolgotrajnega prekomernega pitja alkoholnih pijač se lahko pojavi alkoholna jetrna bolezen. Histološko se lahko pokaže v različnih oblikah: kot maščobna infiltracija jeter (steatoza), alkoholni hepatitis in alkoholna ciroza. Alkoholna ciroza je najhujša oblika jetrne bolezni in je za razliko od prvih dveh bolezenskih sprememb tudi med abstinenco ireverzibilna ter lahko vodi v jetrno dekompenzacijo in smrt. Alkoholna ciroza se razvije pri 10 % hudih alkoholikov, alkoholni hepatitis pri 10 do 35 % in steatoza pri 90 do 100 % hudih pivcev. Za alkoholno jetrno steatozo je značilno kopičenje maščobe v jetrnih celicah. Že samo po treh do sedmih dneh prekomernega uživanja alkoholnih pijač se v jetrnih celicah pojavijo velike maščobne kapljice.

Razvoj alkoholne jetrne okvare ni vezan na vrsto alkoholnih pijač ampak na količino vnesenega etanola, pogostost uživanja alkoholnih pijač, trajanje uživanja alkoholnih pijač, trajanje obdobja abstinence; odvisen je tudi od spola, dednih dejavnikov, imunoloških nepravilnosti, prehranjenosti in hitrosti presnove etanola.

Pri ženskah se alkoholna jetrna bolezen pojavi prej kot pri moških; pri ženskah je potrebna manjša količina popitega etanola za njen nastanek. Pri moškem, ki je 10 do 20 let užival 40 g do 60 g etanola dnevno, je tveganje za razvoj alkoholne ciroze 6-krat višje, pri moškem, ki je popil 60 g do 80 g etanola dnevno pa kar 14-krat višje. Pri ženski se tveganje poveča že pri količini 20 g do 40 g etanola dnevno. Glavni vzroki za razlike v nastanku alkoholne jetrne bolezni so genetski dejavniki. Eden izmed dejavnikov za večjo dovzetnost žensk za alkoholno jetrno okvaro je manjše delovanje zaščitnega encima alkoholne dehidrogenaze. Zmanjšano delovanje encima spremeni hitrost presnavljanja etanola in poveča občutljivost za etanol. Različna občutljivost za etanol med populacijami je odvisna od genetskega zapisa v alelih, ki kodirajo izoencime alkoholne dehidrogenaze in aldehidne dehidrogenaze visoke presnovne aktivnosti.

Ko pride etanol v telo, hitro delujoča ADH povzroči visoke koncentracije acetaldehida in seveda z njim povezane neprijetne reakcije, kot so: zardevanje obraza, glavobol, tahikardije (hitro utripanje srca), slabosti in bruhanje. Pri ljudeh z neaktivno obliko aldehidne dehidrogenaze opazimo podobne učinke, ker ne morejo razgraditi acetaldehida. Tudi spremenjeno delovanje citokroma P450 je povezano s povečanim tveganjem za razvoj alkoholne jetrne bolezni. Genetski polimorfizem citokroma P450 2E1 vpliva na aktivnost encima; če je prisoten alel s povečano prepisovalno dejavnostjo, se posledično poveča tudi tveganje za razvoj bolezni. Specifičnega zdravila za zdravljenje alkoholne okvare jeter ni. Popolna in trajna abstinenca alkoholnih pijač je osnovno zdravljenje in tudi podlaga za uspešno zdravljenje alkoholne jetrne bolezni.

1.2 Označevalci škodljive rabe alkoholnih pijač

Škodljivo rabo alkoholnih pijač je pri vsakem posamezniku zelo težko dokazati in potrditi. Glavni problem nastane pri zgodnjem odkrivanju in zdravljenju te bolezni. Težko je pridobiti zanesljive, verodostojne podatke o pivskih navadah posameznika. Za pridobitev teh informacij se uporabljajo različni vprašalniki, v katerih pa ljudje, ki imajo težave povezane z uživanjem alkoholnih pijač, ne navajajo resničnih podatkov o svojih pivskih navadah. Večinoma zanikajo uživanje alkoholnih pijač oziroma navajajo manjše količine

popitih alkoholnih pijač kot jih v resnici zaužijejo (12). Vprašalniki sami nimajo diagnostične vrednosti, zato so pri ugotovitvi in potrditvi škodljive rabe alkoholnih pijač uporabni le v kombinaciji z biokemičnimi označevalci. Enega samega zanesljivega biokemičnega pokazatelja za potrditev škodljive rabe alkoholnih pijač zaenkrat še ni. V ta namen se uporablja kombinacija biokemičnih pokazateljev in diagnostičnih pristopov, ki temeljijo na anamnestičnih podatkih, na kliničnih preiskavah in raznih vprašalnikih (13).

Jasen dokaz uživanja alkoholnih pijač je prisotnost etanola v telesnih tekočinah (krvi, urinu, slini) ali izdihanem zraku. Ker pa se etanol hitro presnavlja in tudi izloča iz telesa, lahko njegovo prisotnost določimo le nekaj ur po zaužitju (12). Encimske aktivnosti jetrnih encimov v serumu: AST, ALT, GGT, De Ritisov koeficient (razmerje AST/ALT); GLDH in povprečni volumen eritrocitov ter sečnina, holesterol velike gostote (HDL, high-density lipoprotein cholesterol) v serumu so klasični biokemični označevalci škodljive rabe alkoholnih pijač (3, 4, 13, 14, 15, 16). Kot dokaz nedavnega uživanja alkoholnih pijač se lahko določata tudi metanol in 5-hidroksitriptofol (5-HTOL) v urinu (12, 17). V zadnjih letih so v središču pozornosti novejši biokemični označevalci: acetaldehid vezan na proteine (WBAA, whole blood associated acetaldehyde), etilni estri maščobnih kislin (FAEE, fatty acid ethyl esters) in najbolj specifičen med njimi transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov (4, 13, 18, 19). Direktni metaboliti neoksidativne presnove etanola, etil glukuronid (EtG), etil sulfat (EtS) in fosfatidil etanol (PEth) pa so nova veja v razvoju biokemičnih označevalcev škodljive rabe alkoholnih pijač. Ker imajo daljši razpolovni čas kot sam etanol, so primernejši za dokazovanje nedavnega vnosa etanola v telo (18, 20, 21). Poleg zgoraj naštetega lahko v serumu merimo koncentracije ioniziranega Mg, ki je v primeru nedavnega vnosa etanola znižan, in je boljši pokazatelj kot znižan celokupni Mg v serumu (22). Za določanje škodljive rabe alkoholnih pijač je uporaben tudi EDAC test (early detection of alcohol consumption) (23).

1.2.1 Klasični biokemični označevalci:

1.2.1.1 Etanol (12)

Koncentracija etanola se določa v krvi, urinu, slini ali izdihanem zraku. Zaradi hitre presnove etanola je njegovo prisotnost v krvi moč dokazati le do 24 ur po zaužitju. Etanol je v urinu prisoten malenkost dalj časa kot pa v krvi oziroma izdihanem zraku in zato ga lahko tam dokažemo dalj časa po zaužitju alkoholnih pijač. Etanol v krvi se ponavadi

določa s plinsko kromatografijo. Za določanje prisotnosti etanola v izdihanem zraku se uporablja alkotest. Nastanek zelene barve, ki je posledica oksidacije etanola z dikromatnim ionom, je dokaz za prisotnost etanola (7). S to metodo je težko določiti natančno koncentracijo etanola. Bolj natančni za določitev količine etanola v izdihanem zraku in posredno koncentracije v krvi so etilometri.

1.2.1.2 Metanol

Etanol in metanol sta endogena alkohola, ki sta v nizkih koncentracijah vedno prisotna v telesnih tekočinah. Tudi metanol se v jetrih z oksidativnimi procesi s pomočjo alkoholne dehidrogenaze presnovi do ustreznega aldehida. Alkoholna dehidrogenaza ima desetkrat višjo afiniteto do etanola kot do metanola. Med presnovo etanola (pri uživanju alkoholnih pijač) se torej metanol ne presnavlja zaradi zasedenosti alkoholne dehidrogenaze in se zato v telesu kopiči. K povišanim koncentracijam metanola po uživanju alkoholnih pijač pa prispeva tudi metanol, ki je velikokrat v majhnih količinah sestavina nekaterih alkoholnih pijač (17). Visoke koncentracije metanola v telesnih tekočinah in izdihanem zraku so torej, prav tako kot sam etanol, indikator nedavnega vnosa alkoholnih pijač. Metanol se v telesu kopiči med presnovo etanola in njegova koncentracija ostane povišana še 2 do 6 ur po tem, ko se koncentracije etanola ne da več določiti. Tudi koncentracije metanola v krvi in urinu se določajo s plinsko kromatografijo. Določanje koncentracije metanola je bolj občutljiva metoda za dokaz nedavnega vnosa alkoholnih pijač kot določanje koncentracije samega etanola. Izjemno visoke koncentracije metanola so lahko tudi znak dolgotrajnega prekomernega uživanja alkoholnih pijač. Po enkratnem vnosu alkoholnih pijač se koncentracije metanola pri zdravih odraslih preiskovancih, ki predhodno niso uživali alkoholnih pijač, niso tako močno povišale kot pri preiskovancih, ki so ponavljajoče prekomerno uživali alkoholne pijače (12). Vzrok temu je postopno kopičenje metanola v telesu. Po enkratnem vnosu alkoholnih pijač koncentracija metanola pade na normalno vrednost po desetih do dvanajstih urah, pri prekomernem uživanju alkoholnih pijač, pa se ta čas podaljša na nekaj dni. Močno povišane koncentracije metanola torej niso specifične za dokazovanje nedavnega vnosa alkoholnih pijač, lahko pa so uporabne pri določanju dolgotrajnega vnosa alkoholnih pijač. Metanol se mora vedno uporabljati v kombinaciji z drugimi bolj specifičnimi označevalci, kot je npr. razmerje 5-HTOL/5-HIAA (12, 17).

1.2.1.3 Aspartat-aminotransferaza (AST) EC 2.6.1.1

AST je nespecifičen encim, ki se nahaja v jetrih, srčni in skeletnih mišicah in v ledvicah. Nahaja se v obliki dveh izoencimov, 1/3 predstavlja citoplazemski (AST1) in 2/3 mitohondrijski (AST2), ki se ločita z elektroforezo. AST katalizira pretvorbo aspartata v oksaloacetat. Katalitična aktivnost aspartat-aminotransferaze je povišana pri miokardnem infarktu, mišični distrofiji, jetrni nekrozi in alkoholnem hepatitisu. Vzrok zvišanja pa so lahko tudi hudi fizični napori, mišične poškodbe in hemoliza (sprostitev hemoglobina iz eritrocitov, ki nastane zaradi poškodovanja njihove celične membrane) (13, 24, 25). Tako AST kot tudi ALT sta občutljiva kazalca parenhimske jetrne okvare. V serumu zdravih ljudi mitohondrijska AST prispeva k celokupni katalitični aktivnosti aspartat-aminotransferaze manj kot 10 %. Po dolgotrajnem vnosu alkoholnih pijač, pa za razliko od drugih vzrokov za hepatitis, etanol poveča katalitično aktivnost mitohondrijske aspartat-aminotransferaze. Etanol povzroči alkoholno okvaro mitohondrijev in gladkih mišic ter s tem sproščanje mitohondrijske aspartat-aminotransferaze iz celic. Posledica tega je povečana katalitična aktivnost aspartat-aminotransferaze v serumu. S tem pa se poviša tudi razmerje mitohondrijska AST proti celokupna AST (mAST:tAST) v serumu (8, 13, 24, 25). Razmerje (mAST:tAST) je v pomoč pri ugotavljanju vzroka jetrne bolezni; ali je nastala zaradi uživanja alkoholnih pijač oziroma zaradi drugih vzrokov (13). Vrednosti aminotransferaz pri alkoholni jetrni bolezni so običajno povišane za manj kot šestkrat (8).

1.2.1.4 Alanin-aminotransferaza (ALT) EC 2.6.1.2

ALT je specifičen encim za jetrne celice. ALT je izključno citoplazemski encim in ob kakršnikoli poškodbi jetrnih celic (v primeru povečane prepustnosti celične membrane) prehaja v kri in se njegova katalitična aktivnost v krvi poveča. ALT katalizira pretvorbo alanina v piruvat. Katalitična aktivnost alanin-aminotransferaze je povišana pri miokardnem infarktu in hepatobiliarnih boleznih (toksični, akutni infekcijski hepatitis in kronični pankreatitis) (24). Enako kot AST se tudi ALT poviša pri hudih fizičnih naporih, mišični poškodbi in hemolizi (sprostitev hemoglobina iz eritrocitov, ki nastane zaradi poškodovanja njihove celične membrane), vendar se ne zviša tako močno kot AST (25). ALT je bolj specifičen kazalec parenhimske jetrne okvare kot AST (25). ALT pri alkoholni jetrni bolezni poraste manj kot AST (8).

1.2.1.5 De Ritisov koeficient (razmerje AST/ALT)

De Ritisov koeficient je razmerje med aspartat-aminotransferazo in alanin-aminotransferazo. Diagnostično je bolj specifičen kot aktivnost vsakega posameznega encima. Uporaben je za ločitev med alkoholno in nealkoholno jetrno boleznijo. Razmerje med AST/ALT je pri zdravih ljudeh in tudi pri mnogih boleznih enako 1. Katalitična aktivnost aspartat-aminotransferaze je torej rahlo večja od katalitične aktivnosti alanin-aminotransferaze. Pri alkoholni jetrni bolezni ima de Ritisov koeficient, ki je večji od dve, diagnostično vrednost (8, 13, 24, 25).

1.2.1.6 Gama-glutamil transferaza (GGT) EC 2.3.2.2

GGT je celični encim, ki se nahaja skoraj v vseh organih razen v mišičnih celicah, kosteh in eritrocitih. V ledvicah, prostati, pankreasu, jetrih in epiteliju tankega črevesa so katalitične aktivnosti gama-glutamil transferaze najvišje (24). Aktivnost v ledvicah je štirikrat večja, v trebušni slinavki pa dvakrat večja kakor v jetrih. Je membranski encim pomemben pri transportu aminokislin preko celične membrane v celice, ker katalizira prenos gama-glutamilne skupine iz glutationa na amino kisline (26). Katalitična aktivnost v serumu je skoraj izključno odvisna od jetrne gama-glutamil transferaze (24). Je inducibilni encim, zato se njegova aktivnost v serumu poveča pri dolgotrajnem uživanju snovi, ki inducirajo mikrosomske encime (alkoholne pijače, nekatera zdravila). Povišane vrednosti gama-glutamil transferaze v serumu največkrat kažejo na obolenja jeter in žolča. Visoke vrednosti gama-glutamil transferaze so značilne za hepatitis, cirozo in pankreatitis, kadar so ti posledica škodljive rabe alkoholnih pijač (alkoholna jetrna okvara) (8, 24, 26). Povišana je zaradi indukcije jetrnih encimov, v manjši meri pa k povišanju prispeva tudi povečana tvorba encima zaradi sekundarne holestaze in povečanega sproščanja ter manjše razgradnje encimov zaradi poškodbe membran hepatocitov (8, 26). Pri dolgotrajnem uživanju alkoholnih pijač so skupaj z aktiviranim sistemom MEOS, povišane tudi serumske vrednosti gama-glutamil transferaze. Vrednosti niso povišane pri enkratnem uživanju alkoholnih pijač (26). Razpolovni čas gama-glutamil transferaze pri ljudeh je od 7 do 10 dni. Pri poškodbah jeter, katerih vzrok je uživanje alkoholnih pijač, se razpolovni čas lahko podaljša do 28 dni (24). Po dveh do petih tednih po prenehanju uživanja snovi, ki inducirajo encime (alkoholne pijače in nekatera zdravila) se vrednost gama-glutamil transferaze povrne na normalno (25). GGT je široko uporaben biokemični označevalec dolgotrajne škodljive rabe alkoholnih pijač z občutljivostjo od 34 do 85 % (27), vendar pa

tudi relativno nespecifičen označevalec škodljive rabe alkoholnih pijač (8, 27). Vrednosti GGT so povišane tudi pri bolnikih s sladkorno boleznijo, hipertiroidizmom (povečano delovanje ščitnice), revmatoidnim artritisom in obstruktivno boleznijo pljuč (24, 25, 27). GGT je zelo uporaben označevalec dolgotrajne škodljive rabe alkoholnih pijač v kombinaciji s CDT (27).

1.2.1.7 Povprečni volumen eritrocitov (PVE) (13)

PVE se zaradi nizke klinične specifičnosti in občutljivosti v diagnostiki škodljive rabe alkoholnih pijač uporablja skupaj z aktivnostjo gama-glutamil transferaze (16). Ker je življenjska doba eritrocitov 120 dni, ostanejo vrednosti povprečnega volumna eritrocitov povišane do treh mesecev po prenehanju uživanja alkoholnih pijač. Zaradi tega je sam PVE manj uporaben kot GGT pri spremljanju abstinence, torej uspešnosti zdravljenja škodljivega uživanja alkoholnih pijač (10). Povišane vrednosti povprečnega volumna eritrocitov povzročijo poleg alkoholnih pijač še bolezni ščitnice, pomanjkanje folatov, nedavna izguba krvi, druge jetrne bolezni, uporaba antiepileptikov, zloraba drog in kajenje. PVE se določa s hematološkim analizatorjem.

1.2.1.8 Sečnina (13)

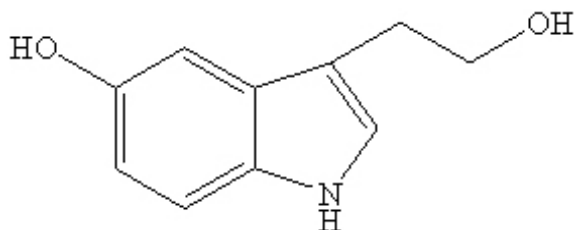
V diagnostiki škodljive rabe alkoholnih pijač se meri tudi koncentracija sečnine. Koncentracija sečnine v serumu je pri osebah, ki uživajo alkoholne pijače pogosto znižana. Etanol inhibira encime cikla uree in s tem poviša koncentracijo sečnine v serumu. Vrednosti sečnine so znižane še v primeru hude jetrne insuficience, zmanjšanega vnosa proteinov, pri terapiji z androgeni in rastnim hormonom ter v nosečnosti (28). Koncentracija sečnine se določa s kinetično metodo (29).

1.2.1.9 Holesterol velike gostote (HDL) (10)

HDL se poviša pri dolgotrajnem uživanju alkoholnih pijač. Koncentracije holesterola velike gostote so povišane že pri uživanju razmeroma majhnih količin alkoholnih pijač (≤ 5 enot dnevno). HDL je zato uporaben za zgodnje ugotavljanje težav povezanih z uživanjem alkoholnih pijač in za spremljanje bolnikov, pri katerih še niso izražene jetrne bolezni.

1.2.2 Novejši biokemični označevalci:

1.2.2.1 5-hidroksitriptofol (5-HTOL) (12, 17)



Slika 2: metabolit serotonina 5-hidroksitriptofol

Glavni metabolit serotonina (5-hidroksitriptamin) pod normalnimi pogoji je 5-hidroksiindol-3 očetna kislina (5-HIAA, 5-hydroxyindole-3-acetic acid), v manjši meri pa nastaja tudi 5-HTOL. Razmerje 5-HTOL/5-HIAA v urinu je zelo majhno. Tvorba 5-hidroksitriptofola se ob prisotnosti etanola močno poveča. Metabolit etanola acetaldehid tekmuje z biogenim aldehydom iz serotonina za aldehydno dehidrogenazo in glede na količino zaužitega etanola se pot metabolizma serotonina obrne v korist 5-hidroksitriptofola, posledično nastaja manj 5-hidroksiindol-3 očetne kisline in razmerje 5-HTOL/5-HIAA v urinu se značilno poveča. Razmerje 5-HTOL/5-HIAA v urinu ostane povečano še 6 do 15 ur po tem, ko se koncentracije etanola ne da več določiti. Zato je določanje koncentracije 5-hidroksitriptofola bolj občutljiva metoda za dokaz nedavnega vnosa alkoholnih pijač kot določanje koncentracije samega etanola ali metanola v krvi, izdihanem zraku ali urinu. Težko je določiti natančen čas do kdaj še lahko merimo 5-HTOL, ker je le ta odvisen od količine zaužitega etanola, časa zaužitja zadnje alkoholne pijače in tudi od časa vzorčenja. 5-HTOL v urinu se izrazi kot razmerje glede na 5-hidroksiindol-3 očetno kislino, da se preprečijo lažno pozitivni rezultati zaradi vnosa hrane bogate s serotoninom (banane, ananas, kivi, orehi). 5-HTOL in 5-HIAA v urinu se določata s plinsko kromatografijo - masno spektrometrijo in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC; high performance liquid chromatography). Za razliko od metanola se vrednosti razmerja 5-HTOL/5-HIAA enako povišajo pri dolgotrajnem prekomernem uživanju alkoholnih pijač kot pri enkratnem vnosu alkoholnih pijač, zato se lahko z razmerjem 5-HTOL/5-HIAA določa nedaven vnos alkoholnih pijač tako v primeru zmernega pitja kot tudi pri dolgotrajnem prekomernem uživanju alkoholnih pijač. Povečano razmerje 5-HTOL/5-HIAA je torej označevalec nedavnega vnosa alkoholnih pijač; vnos v zadnjih 24-ih urah.

1.2.2.2 Whole Blood Associated Acetaldehyde (WBAA) (9, 13)

Označevalec nedavnega vnosa alkoholnih pijač v telo je lahko tudi prvi metabolit etanola; acetaldehid. Je reaktivna molekula, ki se veže z določenimi aminokislinami proteinov (npr. lizin, cistein) in z njimi tvori adukte acetaldehid-protein. Nekatere aminokisliline proteinov so manj dovzetne za vezavo z acetaldehidom, druge bolj. Med drugim se acetaldehid veže tudi na lipoproteine, albumine, hemoglobin in kolagen. Mnogokrat pa telo prepozna spojine ki nastanejo (npr. adukt acetaldehid-lizin) kot tuje in se proti njim tvorijo protitelesa. Tudi ta protitelesa so označevalec nedavnega vnosa alkoholnih pijač. Acetaldehid se lahko določa na dva načina. S plinsko ali tekočinsko kromatografijo se meri prosti acetaldehid oziroma reverzibilno vezan acetaldehid na plazemske proteine ali krvne celice. Z imunološkimi metodami pa se lahko določajo epitopi, ki izvirajo iz acetaldehida vezanega na proteine v plazmi. Koncentracije acetaldehida vezanega na proteine so povišane tako pri akutnem zaužitju alkoholnih pijač kot pri dolgotrajnem prekomernem uživanju alkoholnih pijač.

1.2.2.3 Etilni estri maščobnih kislin (FAEE) (18)

FAEE so možni mediatorji vsaj za nekatere toksične učinke povezane z uživanjem alkoholnih pijač, zato so uporabni kot označevalci uživanja alkoholnih pijač. V serumu se jih lahko določi do 24 ur po zadnjem vnosu alkoholnih pijač, v laseh pa jih je moč določiti še nekaj mesecev po prenehanju uživanja alkoholnih pijač. Na odlaganje etilnih estrov maščobnih kislin v laseh, poleg individualnih razlik v tvorbi sebuma, vpliva tudi pogostnost in vrsta nege las in kvaliteta kozmetičnih izdelkov. Za določanje etilnih estrov maščobnih kislin se uporablja mikroekstrakcija in plinska kromatografija – masna spektrometrija.

1.2.2.4 Etil glukuronid (EtG) (20, 21)

EtG je manjši neoksidativni direktni metabolit etanola. EtG skupaj z EtS predstavlja specifičen in občutljiv označevalec nedavnega uživanja alkoholnih pijač. Uporaben je za spremljanje abstinence v programih zdravljenja, za preverjanje uživanja alkoholnih pijač na delovnih mestih in v šolah. Po uživanju alkoholnih pijač ostane EtG v urinu povišan še 5 dni (18). Določa se lahko s tekočinsko kromatografijo – masno spektrometrijo ali z encimsko imunološko metodo. Lažno pozitivni rezultati so posledica nenamernega uživanja etanola, npr. etanol v ustnih vodica in v razkužilih za roke. EtG je občutljiv na

bakterijsko hidrolizo in zato lahko v primeru prisotnosti bakterij v urinu pride tudi do lažno negativnih rezultatov. Zaradi tega se mora uporabljati skupaj z etil sulfatom, ki ni dovzeten na bakterijsko hidrolizo in je zato boljši označevalec nedavnega vnosa alkoholnih pijač.

1.2.2.5 Etil sulfat (EtS) (20, 21)

Tudi EtS je tako kot EtG manjši neoksidativni direktni metabolit etanola. Ker imata oba daljši eliminacijski čas kot sam etanol, sta uporabna kot specifična in občutljiva označevalca nedavnega uživanja alkoholnih pijač. Za razliko od etil glukuronida je EtS popolnoma odporen na bakterijsko hidrolizo. Zato je bolj priporočljiva uporaba določanja etil sulfata namesto etil glukuronida kot označevalca nedavnega vnosa alkoholnih pijač oziroma kombinacija obeh. Za določanje EtS se uporablja tekočinska kromatografija – masna spektrometrija.

1.2.2.6 Fosfatidil etanol (PEth) (18)

PEth je eden izmed novejših označevalcev škodljive rabe alkoholnih pijač. Koncentracije fosfatidil etanola v krvi ostanejo povišane do 14 dni po prenehanju uživanja alkoholnih pijač. Vrednosti fosfatidil etanola se ne povišajo v primeru enkratnega vnosa alkoholnih pijač, zato je PEth označevalec dolgotrajnega škodljivega uživanja alkoholnih pijač. Za določanje koncentracije fosfatidil etanola se uporablja HPLC-ELSD (high performance liquid chromatography electrospray mass spectrometric detection).

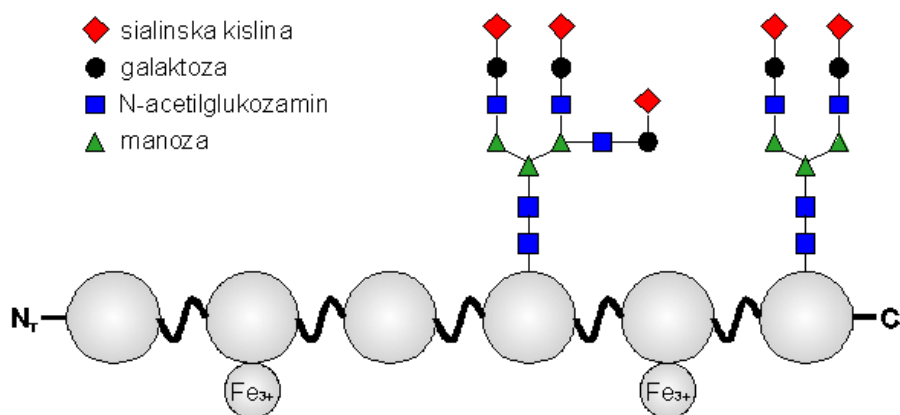
1.2.2.7 Early Detection of Alcohol Consumption (EDAC) (23)

EDAC test je statistična metoda, pri kateri se s pomočjo linearne diskriminantne funkcije analizira večje število rutinskih laboratorijskih preiskav (kombinacija 10 do 40 laboratorijskih preiskav). Rezultat analize je numerična vrednost, s katero se za vsakega posameznika lahko napove ali gre pri njem za zmerno pitje alkoholnih pijač oziroma za prekomerno uživanje alkoholnih pijač.

1.3 Transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov (CDT)

1.3.1 Transferin (Tf)

Transferin je serumski globularni protein, ki prenaša ione železa v organizmu. Po svojih značilnostih je glikoprotein z molekularno maso 79750 Da. Sestavljen je iz ene same polipeptidne verige s 679 aminokisljinami, na katero sta na N-koncu na mestih 413 in 611 vpeti dve oligosaharidni verigi z molekularno maso 4400 Da (4, 16, 30). Molekula transferina je strukturno urejena v dve globularni domeni (N-terminalna domena, katero predstavljajo aminokisljine od 1 do 336 in C-terminalna domena, katero predstavljajo aminokisljine od 337 do 679), ki neodvisno druga od druge vežeta po en ion železa (30). Transferin se po elektroforezni ločbi beljakovin seruma na acetat celuloznem gelu nahaja v β -globulinski frakciji (19).



Slika 3: Shematski prikaz molekule transferina z dvema oligosaharidnima verigama in dvema vezavnima mestoma za Fe³⁺ (16).

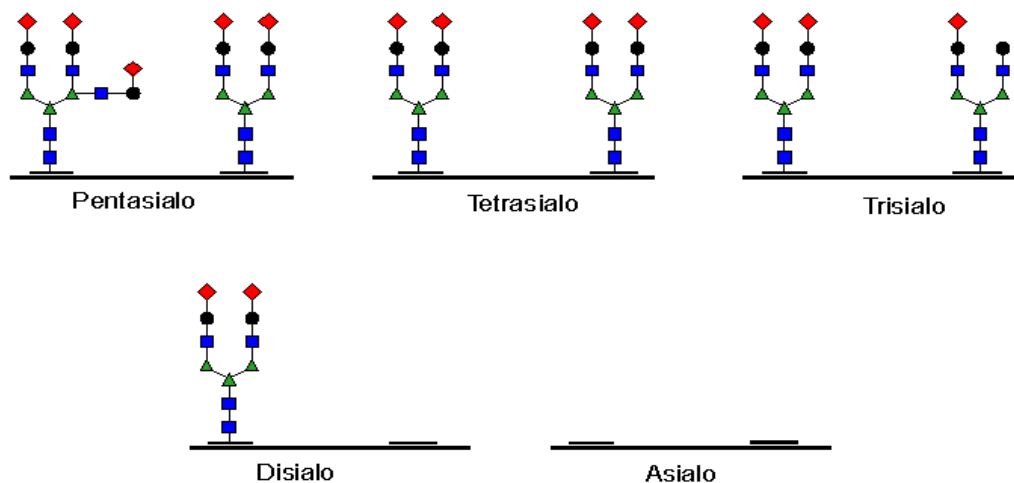
Vsaka N-glikanska veriga vsebuje N-acetilglukozamin, manozo, galaktozo in sialinsko kislino. Vsaka N-glikanska veriga se konča z negativno nabito molekulo sialinske kisline (znana tudi kot nevraminska kislina), ki je edini nabiti ogljikohidrat v transferinu (4, 16). N-glikanski verigi se razlikujeta v stopnji razvejanosti (di-, tri- in tetra- antenska struktura). Transferin ni homogena molekula, ampak izkazuje mikroheterogenost. Zaradi tega se, glede na stopnjo sialiniziranosti, lahko v serumu pojavijo različne izooblike transferina. Lahko se pojavi 9 različnih izooblik: od oblik brez sialinskih kislin (asialo-Tf) in do oblik z

osmimi sialinskimi kislinami (oktasialo-Tf). Izooblike asialo-, monosialo- in oktasialo-Tf so pri zdravih ljudeh, abstinentih in ljudeh, ki uživajo zmerne količine alkoholnih pijač, prisotne le v sledih. Prevladujoča izooblika je tetrasialo-Tf, ki predstavlja 64 do 80 % celotnega transferina. Heptasialo-Tf predstavlja manj kot 1,5 %, heksasialo-Tf od 1 do 3 %, pentasialo-Tf od 12 do 18 %, trisialo-Tf od 4,5 do 9 % in disialo-Tf manj kot 2,5 % celotnega transferina (19, 30). Število sialinskih kislin in položaj le teh določa izoobliko transferina in njegovo izoelektrično točko (pI). Z vsako sialinsko kislino vezano na N-glikansko verigo, se izoelektrična točka zniža za 0,1 pH enote (16, 30).

Vsaka molekula transferina lahko veže največ dva iona železa, v obliki Fe^{3+} . Normalno je z železom nasičenega okoli 30 % celokupnega serumskega transferina. Nasičenost je odvisna od zalog železa v organizmu. V primeru pomanjkanja železa se zasičenost transferina zmanjša in v krvi so prisotne večje količine transferina z vezanim samo enim ionom železa oziroma brez vezanega iona železa (apotransferin). V primeru hemokromatoze (kopičenje železa v tkivih) pa se zasičenost transferina poveča in v krvi so večinoma prisotne oblike transferina z vezanima dvema ionoma železa. Tudi železo vpliva na izoelektrično točko transferina. Vsak na transferin vezan železov ion zniža izoelektrično točko za 0,2 pH enoti.

Različne izoelektrične točke pri popolni nasičenosti z železom pomagajo pri ločitvi izooblik transferina glede na samo stopnjo sialiniziranosti. Najpogostejše transferinske izooblike imajo naslednje pI (19, 30):

- pentasialo-Tf s pI 5,2
- tetrasialo-Tf s pI 5,4
- trisialo-Tf s pI 5,6
- disialo-Tf s pI 5,7
- asialo-Tf s pI 5,9 (16).



Slika 4: Izooblike transferina z različnim številom negativno nabitih sialinskih kislin (16).

Ker je Tf najpomembnejši prenašalec ionov železa v telesu pri ljudeh, lahko na izooblike transferina vplivajo tudi fiziološki faktorji, ki imajo vpliv na presnovo samega železa. Na presnovo lahko vpliva spremenjeno hormonsko stanje, ki se pri ženskah pojavi pri nosečnosti, ob uporabi kontraceptivov in v primeru prehoda iz menstrualnega cikla v menopavzo (30). Vsebnost transferina v plazmi je uravnavana z razpoložljivostjo železa. Pri pomanjkanju železa se nivo transferina v plazmi poviša (30). Orientacijska referenčna vrednost koncentracije transferina v serumu za odrasle je med 2,2 in 4,0 g/l. Povišane vrednosti transferina so značilne za sideropenično anemijo, za nosečnice v zadnjem trimesečju, povišane so tudi pri pomanjkanju železa in uporabi peroralnih kontraceptivov. Medtem ko se znižane vrednosti transferina pojavijo pri cirozi jeter, infekcijah, hujšanju (vzrok je zmanjšana sinteza transferina), malignih obolenjih, hemokromatozi, nefrotskem sindromu in nefritisu (vzrok je izguba transferina z urinom) (31).

V serumu so odkrili tudi najmanj 38 genetskih variant transferina. Variante nastanejo kot posledica spremenjene polipeptidne verige in razlik v sestavi N-glikanskih verig. Samo 4 genetske variante pa se pojavljajo pri več kot 1 % ljudi (19). Biološki pomen teh variant še ni znan, razen v primeru, ko sta posledici genetske variante CDG sindrom (Congenital Disorder of Glycosylation syndrome, prirojena motnja glikozilacije) in atransferinemija (30).

Transferin se večinoma sintetizira v jetrih (v hepatocitih) in v manjši meri v retikuloendotelnem sistemu oziroma v endokrinih žlezah, kot so moda in jajčniki. Transferin se po glikozilaciji izloča v plazmo z eksocitozo, kjer potem opravlja svojo funkcijo. Njegova biološka razpolovna doba je približno 7 dni. Pri katabolizmu transferina v normalnih pogojih se iz transferina najprej odstrani sialinska kislina, asialoglikoproteinski receptorji jetrnih parenhimskih celic pa nato odstranijo desialinizirane proteinske verige (30).

1.3.2 CDT

O transferinu z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov so prvič poročali že leta 1976, ko so njegovo prisotnost dokazali v cerebrospinalni tekočini in v serumu alkoholikov (4, 30, 32). Od takrat naprej je bil predmet mnogih raziskav in je danes uporaben kot zanesljiv, objektivni, biokemični označevalec škodljive rabe alkoholnih pijač.

CDT je danes definiran kot delež disialo-, monosialo- in asialotransferina glede na celokupno količino transferina (4, 19, 33).

CDT torej predstavljajo izooblike transferina z izoelektrično točko $\geq 5,7$ (4). Po razvoju imunometričnih metod za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov so v CDT vključevali tudi 50 % trisialotransferina. Ker pa so raziskave pokazale, da ni korelacije med škodljivim vnosom alkoholnih pijač in trisialotransferinom, da se trisialo-Tf pojavlja v enakih koncentracijah pri povišanih in znižanih vrednostih CDT in da nima diagnostične vrednosti pri škodljivi rabi alkoholnih pijač, se trisialo-Tf od leta 2000 ne določa več v okviru CDT (19, 34). Povišana vrednost CDT v serumu potrdi sum prekomernega oziroma škodljivega uživanja alkoholnih pijač (19). Dnevno uživanje 60 do 80 g etanola vsaj 14 dni zaporedoma že lahko povzroči povišano serumsko vrednost CDT. Šestdeset gramov čistega etanola je v treh pollitrskih steklenicah piva (5 vol%), sedmih decilitrih vina (10 vol%) in dveh decilitrih žganja (40 vol%) (3, 4, 16). Vrednost transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov se normalizira po treh do štirih tednih abstinence, odvisno od stopnje povišanja (3, 16, 33, 35).

Transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov, tako kot Tf, nastaja in razpada v jetrih. Mehanizmi nastanka CDT še vedno niso popolnoma pojasnjeni. Etanol in njegovi metaboliti sprožijo v telesu številne reakcije. Vpliv na glikozilacijo proteinov je večstopenjski proces, ki poteka preko vpliva na transport proteinov in aktivnosti encimov. Primarni mehanizem okvare presnove proteinov povezane s škodljivim uživanjem

alkoholnih pijač bi lahko bila sprememba transporta proteinov med posttranslacijskimi modifikacijami. Pomembno vlogo v tem procesu verjetno igra acetaldehid, ki je bolj reaktiven od svoje prekursorske spojine (30). Etanol in metaboliti med drugim zmanjšajo aktivnost glikoziltransferaz (sialil-, galaktozil- in N-acetilglukozamin transferaz) v hepatocitih in s tem vplivajo na normalne procese glikozilacije proteinskih molekul, katerih sinteza poteka v jetrnih celicah (4, 16, 19, 33). Povečajo pa tudi aktivnost sialidaze, encima, ki s transferina odstranjuje ogljikohidratne skupine (10, 16, 33). Vplivajo tudi na fluidnost membrane in s tem povzročijo spremembo mikrookolja membrane, kar bi lahko bil vzrok za spremenjene aktivnosti encimov (30). Povzročijo lahko okvaro oziroma zmanjšano delovanje številnih receptorjev v jetrni celici (10). Zaradi vseh teh razlogov se pri vnosu etanola v telo pojavijo nesialinizirane in nizko sialinizirane izooblike transferina (4, 16, 19, 33). Za natančno razumevanje mehanizma vpliva etanola in metabolitov pa so potrebne nadaljnje raziskave (30).

Transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov trenutno velja za najbolj specifičen biokemični označevalec škodljive rabe alkoholnih pijač. V različnih virih so navedene različne vrednosti njegove diagnostične občutljivosti in diagnostične specifičnosti. Odvisne so od preiskovane populacije (abstinenti, zmerni pivci, ljudje, ki tvegano pijejo alkoholne pijače, ljudje, ki uživajo prekomerne-škodljive količine alkoholnih pijač, ženska populacija, moška populacija,...) in od uporabljene metode določevanja CDT. Številne in obsežne raziskave so v povprečju pokazale veliko diagnostično specifičnost 85 % (najvišjo do 98 %) in diagnostično občutljivost 65 % (najvišjo do 93 %) (4, 16, 19, 33, 36).

Primarno se CDT uporablja kot biokemični označevalec škodljive rabe alkoholnih pijač, njegove vrednosti pa se lahko spremenijo tudi pri določenih bolezenskih stanjih in s tem znižajo njegovo diagnostično specifičnost. Lažno pozitivni rezultati transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov so lahko prisotni pri bolnikih z napredovalo jetrno boleznijo, npr.: pri bolnikih s primarno biliarno cirozo, kroničnim virusnim hepatitisom, hepatocelularnim karcinomom in pri bolnikih, ki imajo z zdravili povzročeno jetrno insuficienco. Vrednosti CDT so povišane tudi pri redkih genetskih variantah transferina (D varianta), CDG sindromu, v nosečnosti, pri uporabi estrogenov, v primeru anemije zaradi pomanjkanja železa, v primeru zmanjšanih vrednosti feritina, povišanega celokupnega transferina in pri sočasni presaditvi ledvic in trebušne slinavke (13, 16, 19,

30, 33). Pri zelo redki B genetski varianti transferina se lahko pojavijo lažno negativni rezultati CDT (30).

1.3.3 Metode za določanje CDT

Analiza CDT sodi med zahtevne analize. Vzrok temu je mikroheterogenost samega transferina, strukturne podobnosti CDT izooblik transferina z izooblikami, ki so normalno prisotne in zaradi prisotnosti CDT izooblik v zelo nizkih koncentracijah. Zato so za analizo CDT potrebne selektivne, specifične in občutljive metode (19, 33). Osnova metod za določanje CDT je kvantifikacija ločenih izooblik transferina glede na njihov naboj in izoelektrično točko (pI od 5,2 do 5,9) (19). Izooblike transferina se lahko ločijo z *elektroforetskimi* ali *kromatografskimi* metodami, nato pa se ovrednotijo z *radioizotopskimi*, *imunoturbidimetričnimi* ali *encimskoimunskimi* reakcijami. Med novejšimi metodami pa so bile opisane tudi *spektrometrične* metode (4, 19). V prvi fazi analize je potrebna predpriprava vzorcev običajno z nasičenjem transferinskih molekul z železom (3, 4, 19). Popolna in stabilna nasičenost transferina z železom je temelj zanesljive analize CDT. Nepopolna nasičenost transferina z železom je lahko eden izmed vzrokov za lažno pozitivne rezultate (33).

Vrednosti CDT se lahko izrazijo kot absolutne vrednosti CDT (vrednosti izooblik transferina s $pI \geq 5,7$), oziroma kot delež nizko sialiniziranih oblik transferina glede na celokupno koncentracijo transferina. Ker je koncentracija transferina v telesu spremenljiva; spreminja se ob določenih fizioloških in patofizioloških procesih, je bolj priporočljivo CDT izraziti kot delež (%CDT) glede na celokupno koncentracijo transferina (30).

Od odkritja povezave CDT s škodljivo rabo alkoholnih pijač leta 1976 se je za določevanje le-tega razvilo mnogo analitskih metod (37). Sprva se je za določevanje CDT uporabljala metoda izoelektričnega fokusiranja (IEF), ki je dolgo časa veljala za referenčno metodo določevanja CDT. To je elektroforetska metoda, pri kateri se izooblike transferina med seboj ločijo zaradi razlik v pI. Osnova vseh elektroforetskih metod je potovanje proteinov v električnem polju, v odvisnosti od naboja, velikosti, oblike molekule, jakosti električnega polja in narave nosilca uporabljenega za izvedbo elektroforeze. Na potovanje proteinov vplivajo tudi pH, ionska jakost pufru, napetost in temperatura. Proteini potujejo tako daleč, dokler ne dosežejo pH, ki je enak pI, v kateri je naboj enak nič. Po ločbi izooblik sledi

imunofiksacija in barvanje frakcij ter denzitometrična kvantifikacija. Ker gre za zapleteno in dolgotrajno analizo, je bila le-ta neprimerna za vsakdanjo rutinsko uporabo (3, 4, 37). Od leta 1986 so začeli razvijati metode, ki bi bile uporabniku bolj prijazne, vendar je IEF ostala zlati standard do razvoja tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC; High performance liquid chromatography) in kapilarne elektroforeze (CE; Capillary electrophoresis) (3).

Leta 1993 so bili na tržišču dostopni prvi komercialno pripravljene testi za določevanje CDT. Reagenčni kiti so vsebovali anionsko izmenjevalne kolone (mikrokolone) za ločevanje transferinskih izooblik. Detekcija ločenih izooblik transferina v eluatu je potekala z imunokemijskimi metodami (RIA; Radioimmunoassay, EIA; Enzyme immunoassay, TIA; Turbidimetric immunoassay) (4, 16, 19, 33).

Med prvimi izmed testov so bili CDTECT-RIA (Pharmacia & Upjohn), nato je prišel na tržišče test CDT-EIA, kasneje pa so sledili testi %CDT Axis in Tinaquant-%CDT/transferin (Roche Diagnostics) (16, 19). V komercialno pripravljenih testih prve generacije, pri katerih je bil rezultat CDT izražen v mg/l oziroma U/l, je bilo poleg disialo-, monosialo- in asialotransferina, k rezultatu CDT prištetega tudi 50% trisialotransferina. Pri testih druge generacije, je bila zaradi modifikacije kolone, izooblika trisialotransferina izključena iz rezultata CDT (38). Osnova komercialno dostopnih testov je ločitev izooblik transferina z ionsko izmenjevalno kolono.

Kasneje so se pojavile mnoge druge polavtomatizirane kromatografske in elektroforezne metode, h katerim prištevamo HPLC in kapilarno elektroforezo (3, 4, 19).

Novost na tržišču, ki je bila predstavljena junija leta 2005, je bil direktni lateks imunološki test za določevanje CDT. Reagenčni kit proizvajalca Dade Behring se uporablja za neposredno določanje CDT, brez predhodne predpriprave vzorca s homogenim, imunonefelometričnim principom. Analiza temelji na reakciji monoklonskih protiteles, ki prepoznajo strukturo CDT izooblik transferina (metoda je specifična za disialo-Tf) ob sočasni določitvi celokupnega transferina. Posebna predpriprava vzorcev ni potrebna. Rezultat analize je delež CDT, ki je zaradi sočasne določitve transferina izračunan avtomatsko (39, 40).

Danes se za določanje CDT najpogosteje uporabljajo tri metode:

1.3.3.1 Ionsko izmenjevalna kromatografija z imunoturbidimetrično detekcijo (IEC; Ion exchange columns with immunoturbidimetric detection) (38, 41)

Sodi med kromatografske metode, katerih temelj je porazdelitev vzorca med stacionarno in mobilno fazo. V mobilni fazi je raztopljen vzorec, katerega molekule v odvisnosti od topnosti in adsorpcije, potujejo po stacionarni fazi. Izooblike transferina se ločijo v anionsko izmenjevalnih kolonah na osnovi različnih pI po predhodnem nasičenju z železom. Izooblike imajo zaradi različnega naboja različno afiniteto do nasprotno nabitih funkcionalnih skupin stacionarne faze na katere se vežejo.

V vzorcu se najprej nasiti transferin z raztopino soli železa, tako da se omogoči ločba transferinskih molekul izključno na osnovi stopnje sialiniziranosti. Del vzorca se prenese na ionsko izmenjevalno kolono (mikrokolono). Ustrezne frakcije transferina je nato potrebno sprati iz kolone. Selektivno izpiranje omogoči izbira ustreznega puфра s točno določeno pH vrednostjo ali ionsko jakostjo. Potrebno je zbrati ustrezno frakcijo eluata ter v njej kvalitativno in kvantitativno ovrednotiti separacijski postopek. Transferin v ustrezni frakciji eluata in v primarnem vzorcu nasičenemu z železom se lahko določi nefelometrično ali turbidimetrično. S specifičnimi antitransferinskimi protitelesi se tvorijo slabo topni imunski kompleksi, kateri se v prvem primeru določijo/detektirajo z intenziteto odbite svetlobe od imunskih kompleksov, v drugem pa z merjenjem prepustnosti raztopine, ki je zmanjšana zaradi povečane motnosti.

Delež CDT (%CDT) se izračuna kot razmerje med transferinskimi izooblikami z nizko vsebnostjo ogljikovih hidratov in celokupno koncentracijo transferina.

1.3.3.2 Kapilarna elektroforeza (CE) (42, 43)

Osnova kapilarne elektroforeze je elektroforetska ločba molekul, ki poteka v tanki kapilari. Steklene kapilare s SiO₂, ki se velikokrat uporabljajo pri kapilarni elektroforezi, so zaradi polimerne obloge izjemno upogljive. Molekule se ločijo na osnovi naboja in velikosti zaradi dveh nasprotno usmerjenih tokov: elektroosmoze in električnega polja. Določeni sistemi za kapilarno elektroforezo omogočajo avtomatizirano določitev CDT, brez predhodne predpriprave vzorcev; nasičenje raztopine vzorca z železom se izvede avtomatično v analizatorju. Ločevanje nabitih delcev poteka pri visoki napetosti, ki omogoči potovanje delcev po kapilari. Gibljivost delcev je odvisna od elektroforetske gibljivosti samih delcev v alkalnem pufru (kationi potujejo proti katodi, anioni so

usmerjeni proti anodi) in elektroosmoznega toka raztopine (v smeri od anode h katodi). Običajno je elektroosmotska sila zadostna, da usmeri gibanje vseh delcev v vzorcu mimo detektorja proti katodi, vključno z negativno nabitimi delci, ki so zaradi elektroforetske gibljivosti usmerjeni proti anodi. Detekcija ločenih izooblik transferina poteka na katodnem delu kapilare pri ustrezni valovni dolžini (običajno pri 200 nm). Najhitreje gibljivi delci prvi potujejo mimo detektorja in najpočasneje gibljivi delci potujejo mimo detektorja zadnji. Rezultat analize so ločene izooblike transferina, ki so kot ločene frakcije asialo-, disialo-, trisialo-, tetrasialo- in pentasialo-Tf grafično prikazane v elektroferogramu.

Vrednost %CDT se določi iz deleža ločenih transferinskih izooblik glede na celokupno površino pod krivuljo.

1.3.3.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) (44, 45)

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti prav tako kot IEC sodi med kromatografske metode. Glede na kemične in fizikalne interakcije z mobilno in stacionarno fazo se komponente vzorca ločijo med seboj. Reakcije so specifične in odvisne od analita, ter od sestave obeh faz. Gradientna HPLC je modifikacija klasičnega HPLC postopka pri kateri gre za stopenjsko spreminjanje elucijske moči mobilne faze.

Vzorci je potrebno pred nanosom na kolono nasiti z železom in oboriti lipoproteine. Izooblike transferina se ločijo v gradientnem sistemu HPLC z anionsko izmenjevalno stacionarno fazo in pufrom različnih ionskih moči. Detekcija ločenih izooblik poteka pri valovni dolžini 460 nm, pri kateri ima specifično absorpcijski maksimum kompleks Tf-železo. Rezultat analize je kromatogram z ločenimi frakcijami izooblik transferina: asialo-, disialo-, trisialo-, tetrasialo-, pentasialo- in heksasialo-Tf.

Vrednost %CDT se določi kot delež površine pod krivuljo posameznih CDT frakcij glede na celokupni transferin.

Potreba po pripravi mednarodne standardizirane metode za določanje CDT je bila izpostavljena leta 2000 v Berlinu na mednarodni konferenci, na kateri so bili prisotni mnogi znanstveniki iz različnih držav. Sprejet je bil dogovor, da se pripravi standardizirana HPLC metoda (45).

Leta 2005 je bilo prvo srečanje delovne skupine za standardizacijo CDT na Floridi, naslednji sestanek pa je bil leta 2006 v Nemčiji. Prvotni cilji delovne skupine za

standardizacijo CDT pod okriljem IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) so naslednji: določitev najustreznjšega analita za določitev CDT, izbira referenčne metode za določevanje CDT in priprava referenčnih standardov. Pozneje pa je potrebna še validacija analita, referenčne metode in referenčnih materialov in predlog kako uporabljati CDT v kliniki. Prvi predlog delovne skupine je, da je primarna tarčna molekula pri določanju CDT disialo-Tf. To naj bi bil edini analit na katerem bi temeljila standardizacija metode. Drugi predlog je, da trenutno HPLC velja za prehodno referenčno metodo, ki jo bo zamenjala ustrezna referenčna masna spektroskopija, ko bo le-ta na voljo. Priporočilo delovne skupine pa je tudi, da se CDT izraža kot delež (%CDT) glede na celokupno koncentracijo transferina (40).

2. Namen dela

CDT je trenutno najbolj specifičen biokemični označevalec škodljive rabe alkoholnih pijač. Danes je za določanje CDT na voljo več metod, s katerimi lahko transferinske izooblike ločimo med seboj. CDT izrazimo kot odstotek (%CDT) glede na celokupno koncentracijo transferina.

Primerjali bomo tri najpogosteje uporabljene metode za določanje CDT: ionsko izmenjevalno kromatografijo z imunoturbidimetrično detekcijo (IEC), kapilarno elektroforezo (CE) in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Za določanje bomo uporabili vzorce seruma naključno izbranih preiskovancev, kateri bodo imeli na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (Univerzitetni klinični center Ljubljana) redno naročeno analizo CDT. Znotraj te skupine bomo posebej obravnavali vzorce iz gastroenterološke klinike. Vsakemu vzorcu bomo poleg CDT določili še katalitične aktivnosti encimov aspartat-aminotransferaza (AST), alanin-aminotransferaza (ALT), gama-glutamiltransferaza (GGT) in alkalna fosfataza (AP) po priporočenih postopkih IFCC na biokemičnem analizatorju. Za nabor vzorcev in vrednotenje rezultatov bomo sledili priporočilom NCCLS (46). Na podlagi statistične analize rezultatov bomo ugotovili ali metode za določanje CDT med seboj korelirajo in kakšna je njihova uporabnost v skupini gastroenteroloških bolnikov.

3. Materiali in metode

3.1 Vzorci

Za določanje CDT smo uporabili 127 vzorcev seruma naključno izbranih preiskovancev, kateri so imeli na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (Univerzitetni klinični center Ljubljana) naročeno redno analizo %CDT. V obravnavani skupini je bilo 114 preiskovancev moškega spola in 13 ženskega spola. Vzorci so bili poslani iz 27 različnih zdravstvenih ustanov iz cele Slovenije; med njimi je bilo 20 vzorcev iz Gastroenterološke klinike, Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Vzorke seruma smo pridobili po centrifugiranju krvi, ki je bila odvzeta v epruveto brez dodanega antikoagulant, 15 minut pri 2500 g in 15 °C. Serum je tekoča frakcija krvi brez krvnih celic in brez fibrinogena. Vsi vzorci, ki smo jih analizirali, so bili do analize shranjeni pri 4 °C največ 7 dni.

Vsem vzorcem smo določili CDT s tremi metodami: ionsko izmenjevalno kromatografijo z imunoturbidimetrično detekcijo (IEC), kapilarno elektroforezo (CE) in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Vsakemu vzorcu smo poleg CDT izmerili še koncentracijo katalitične aktivnosti encimov aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), gama-glutamilttransferaza (GGT) in alkalna fosfataza (AP).

Ves material s katerim smo pri našem delu rokovali, smo obravnavali kot potencialno kužen in zato smo upoštevali vsa splošna navodila za varno rokovanje s kužnim materialom in analitskim sistemom.

3.2 Metode za določanje CDT

3.2.1 Ionsko izmenjevalna kromatografija z imunoturbidimetrično detekcijo (41)

Za analizo vzorcev smo uporabili reagenčni kit Tina-quant[®] %CDT proizvajalca Roche Diagnostics (Mannheim, Nemčija). Imunoturbidimetrično meritev koncentracije transferina v vzorcu smo merili na biokemičnem analizatorju Hitachi 917 (Roche Diagnostics). Kalibracijo in nastavitve ustreznih pogojev analizatorja, predpripravo vzorcev in samo analizo smo izvedli po navodilih proizvajalca.

3.2.1.1 Reagenti

- ◇ Tina-quant %CDT 2nd generation (Roche Diagnostics) vključuje:
 - Reagent R1: Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pufer: 100 mmol/l, pH 7,8; polietilenglikol: 70 g/l; konzervans;
 - Reagent R2: zajčja protitelesa proti humanemu transferinu; Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pufer: 100 mmol/l, pH 7,8; polietilenglikol: 40 g/l; konzervans;
- ◇ Control set %CDT 2nd generation (Roche Diagnostics) vključuje:
 - Liofilizat: reaktivna komponenta (CDT v humanem serumu) in nereaktivna komponenta (natrijev azid (< 1 %));
- ◇ C.f.a.s %CDT (kalibrator) 2nd generation (Roche Diagnostics) vključuje:
 - Reaktivno komponento (humani serum) in nereaktivno komponento (BIS-TRIS) pufer, 20 mmol/l; detergent, konzervans);
- ◇ Separation Kit %CDT 2nd generation (Roche Diagnostics) vključuje:
 - kolone z anionskim izmenjevalcem;
 - Raztopino 1: FeCl₃: 0,18 mmol/l; BIS-TRIS pufer: 20 mmol/l, pH 6,5; detergent; konzervans;
 - Raztopino 2: BIS-TRIS pufer: 20 mmol/l, pH 6,2; NaCl: ≥ 0,6 g/l; detergent; konzervans;
- ◇ Fiziološka raztopina (Krka)
 - 0,9 % raztopina NaCl (1000 ml vsebuje 154 mmol Na⁺ in 154 mmol Cl⁻; pH = 4,5–7,0);
- ◇ Redestilirana voda (Univerzitetni Klinični center Ljubljana, Lekarna)
 - (pH = 5,0–7,0).

3.2.1.2 Aparature in pribor

- Analizator Hitachi 917 (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija);
- Centrifuga Rotanta/S (Hettich, Tuttlingen, Nemčija);
- Električni stresalnik Vortex EV-100 (Tehtnica, Železniki);
- Avtomatske pipete Proline (Biohit) različnih volumnov: 5-100 µl, 50-1200 µl, 100-5000 µl;
- Nastavki za avtomatske pipete;
- Epruvete;
- Stojalo za epruvete;

- Stojalo za kolone;
- Posodice za zbiranje eluata;
- Steklena palčka;
- Štoparica.

3.2.1.3 Opis metode

Določitev %CDT z ionsko izmenjevalnimi kolonami smo opravili po navodilih proizvajalca reagenčnega kita Tina-quant %CDT 2nd generation. Vse kolone in kontrolni raztopini smo 1 uro pred začetkom analize hranili pri sobni temperaturi in jih pustili, da se ogrejejo na 20-25 °C. Kolone smo namestili v stojalo in jim odstranili najprej zgornji in šele nato spodnji zamašek, s čimer smo preprečili nastanek mehurčkov. Frito smo potisnili navzdol s stekleno palčko in s tem omogočili, da je pufer stekel iz kolon. Tako pripravljene kolone je bilo potrebno uporabiti v 1 uri.

Vzorcem seruma in kontrolnima vzorcema (100 µl) smo dodali 500 µl FeCl₃. Epruvete smo premešali z električnim stresalnikom in inkubirali 15 minut pri 20-25 °C. 500 µl z železom nasičenega vzorca smo prenesli na ionsko izmenjevalne kolone (mikrokolone) in spirali s pufrom (BIS-TRIS; pH 6,2) (1000 µl).

Prvi eluat, z izoelektrično točko (pI) nižjo kot 5,7, smo zavrgli, ker so bile v njem prisotne izooblike transferina, ki se ne prištevajo med CDT. Po ponovnem spiranju kolon z večjo količino pufru (BIS-TRIS; pH 6,2) (2000 µl) smo zbrali eluat s frakcijami transferina s pI > 5,7 in izmerili njihovo koncentracijo imunoturbidimetrično na analizatorju Hitachi 917 (Roche Diagnostics).

Del preostalega vzorca, nasičenega z FeCl₃, smo razredčili s fiziološko raztopino in v njem določili celotno koncentracijo transferina, prav tako na analizatorju Hitachi 917 (Roche Diagnostics).

V reagentu za določanje koncentracije transferina so prisotna specifična antitransferinska protitelesa, ki s transferinom tvorijo slabo topne imunske komplekse. Koncentracijo celokupnega transferina in CDT-izooblik transferina smo izmerili turbidimetrično z merjenjem prepustnosti svetlobe reakcijske zmesi, ki je zmanjšana zaradi povečane motnosti.

Odstotek CDT smo izračunali iz razmerja med CDT-izooblikami transferina in celokupno koncentracijo transferina v vzorcu, po enačbi [1]. Referenčna vrednost, ki jo priporoča proizvajalec, je do 3,0 %.

$$\%CDT = 322 \cdot \left[\frac{CDT[mg/l]}{TT[mg/l] \cdot F} \right] + 0,1$$

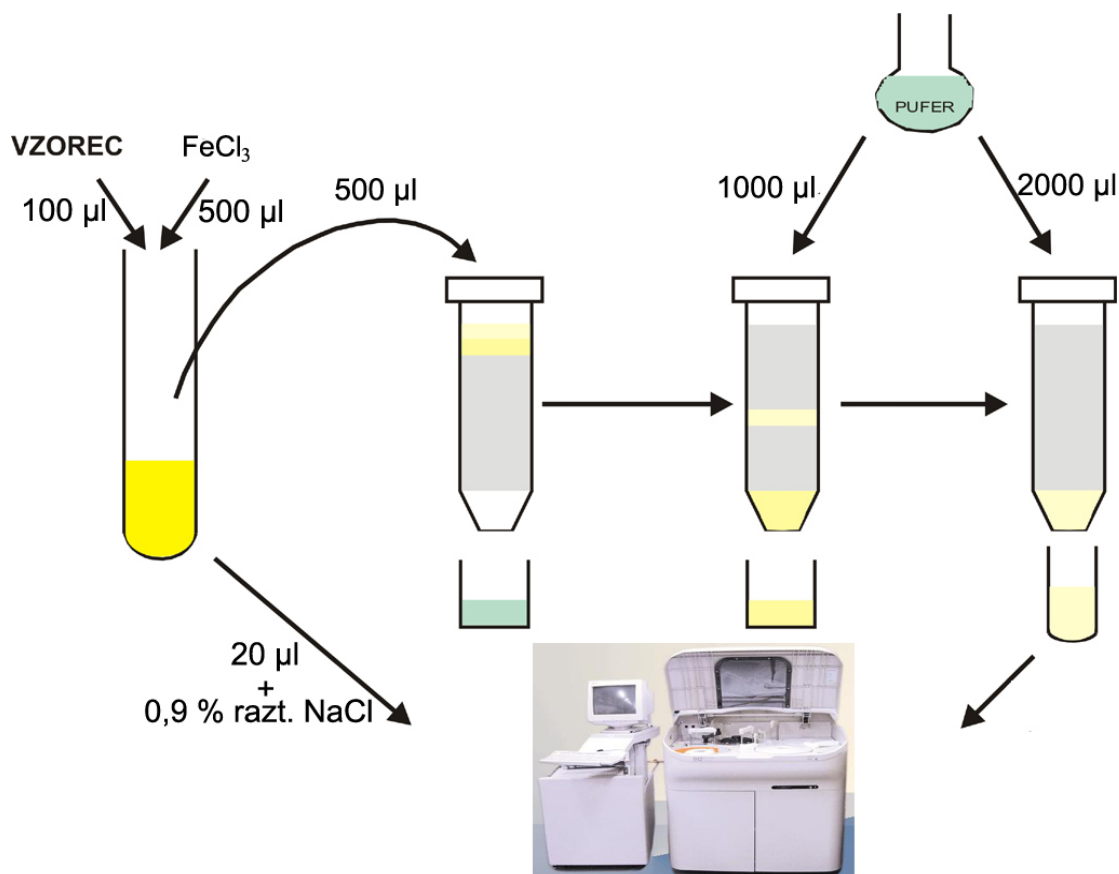
Enačba: [1]

% CDT.....delež transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov

CDT.....transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov

TT.....celokupni transferin

F.....faktor redčenja (= 41)



Slika 5: Shema določanja CDT z ionsko izmenjevalnimi kolonami

3.2.2 Kapilarna elektroforeza (42)

Za določitev CDT izooblik s kapilarno elektroforezo smo uporabili reagenčni kit Capillarys CDT PN.2008 (Sebia, Francija) in analizator Capillarys 2 (Sebia, Francija). Postopek za določanje CDT je popolnoma avtomatiziran. Analizo smo izvedli po navodilih proizvajalca (42).

3.2.2.1 Reagenti

◇ Capillarys CDT kit (Sebia. PN. 2008) vsebuje:

- Alkalni pufer pH 8,8 in aditive;
- Raztopino za redčenje vzorca;
- Raztopino za spiranje kapilar;
- Segmente za redčenje vzorca in kontrolnih raztopin;

◇ Redestilirana voda (Univerzitetni Klinični center Ljubljana, Lekarna)
(pH = 5,0–7,0).

3.2.2.2 Aparature in pribor

- Capillarys System 2 (Sebia, Francija);
- Stojalo za vzorce;
- Vsebniki za destilirano vodo, raztopino za spiranje in odpad (Container Kit supplied with Capillarys).

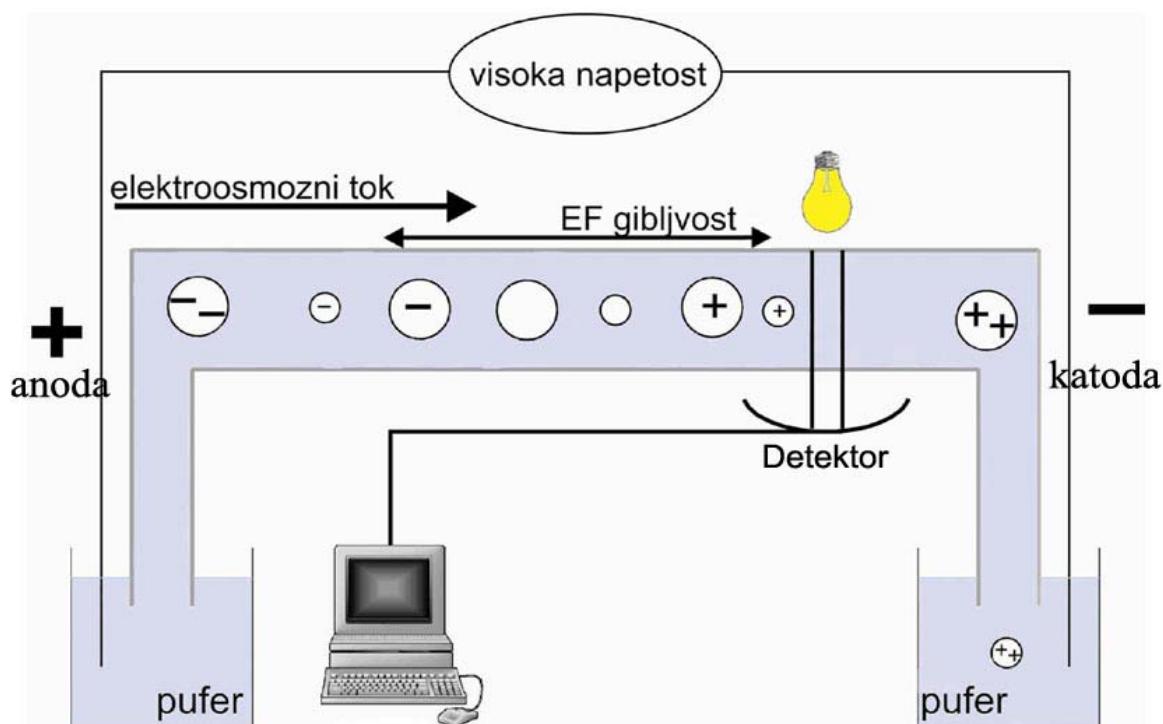


Slika 6: Capillarys 2 (Sebia, Francija)

3.2.2.3 Opis metode (42)

Celoten postopek določanja CDT s sistemom kapilarne elektroforeze Capillarys 2 (Sebia, Francija) je popolnoma avtomatiziran. Serumske vzorce in raztopino železovega klorida (raztopina za razredčitev in nasičenje vzorca) smo vstavili v stojalo v aparat. Nasičenje

transferina z raztopino soli železa se je izvedlo avtomatično v samem analizatorju. Ločba izooblik transferina je potekala v stekleni kapilari s SiO_2 , v alkalnem pufru (pH 8,8), pri konstantni napetosti 9200 V, konstantni temperaturi 40 °C, 8 minut. Izooblike so se ločile na osnovi njihove elektroforetske gibljivosti delcev (EF gibljivosti) v alkalni pufrski raztopini (kationi potujejo proti katodi, anioni so usmerjeni proti anodi) in elektroosmoznega toka pufra (v smeri od anode h katodi). Detekcija je potekala na katodnem delu kapilare pri 200 nm. Rezultat analize odčitamo na elektroferogramu, kjer so bile grafično prikazane transferinske izooblike kot ločene frakcije (od desne proti levi): asialo-, disialo-, trisialo-, tetrasialo- in pentasialo-Tf. Vrhovi od leve proti desni so razvrščeni po padajoči hitrosti gibljivosti delcev. Prvi rezultati celotnega analiznega postopka so na voljo v 20 minutah od samega začetka analize. Odstotek CDT smo določili iz deleža ločenih izooblik transferina. Priporočena referenčna vrednost proizvajalca za %CDT po tej metodi je do 1,3 %.



Slika 7: Shema kapilarne elektroforeze

3.2.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (44)

Za določanje CDT smo uporabili gradientni HPLC sistem VariantTM (Bio-Rad, München, Nemčija) in reagenčni kit %CDT by HPLC (Bio-Rad). Nastavitve ustreznih pogojev

analizatorja, predpripravo vzorcev in samo analizo smo izvedli po navodilih proizvajalca (44).

3.2.3.1 Reagenti

◇ %CDT by HPLC Reagent Kit (Bio-Rad; 195-6660) vključuje:

- Reagent 1: FeCl₃;
 - Reagent 2: NaHCO₃;
 - Reagent 3: dekstransulfat;
 - Reagent 4: MgCl₂;
 - Reagent 5: BIS-TRIS pufer, natrijev azid (< 0,1 %);
 - Mobilna faza 1: BIS-TRIS pufer, natrijev azid (< 0,1 %);
 - Mobilna faza 2: BIS-TRIS pufer, natrijev azid (< 0,1 %);
 - Mobilna faza 3: BIS-TRIS pufer, natrijev azid (< 0,1 %);
- Mobilne faze 1, 2 in 3 se razlikujejo glede ionske jakosti;
- Predkolono (Guard Cartridge);
 - Viale za vzorce;

◇ %CDT Control Set vključuje;

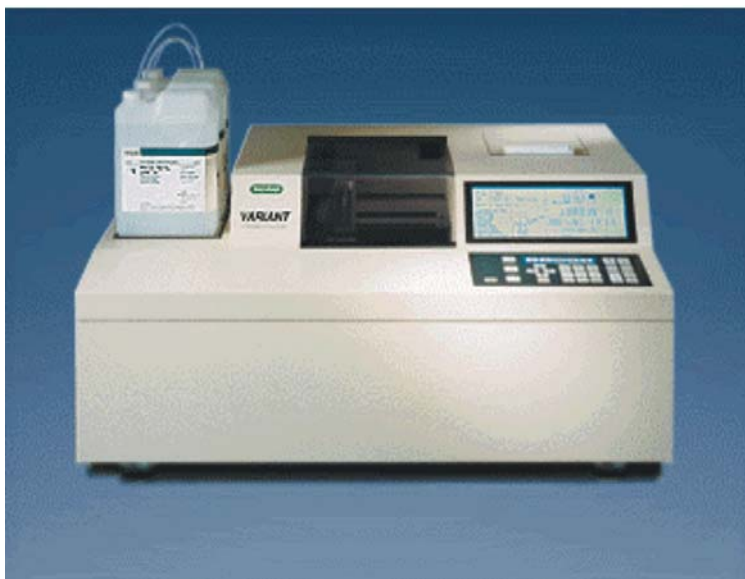
- Kontrolo I in kontrolo II, liofilizirani;

◇ Rastopina za spiranje;

◇ Redestilirana voda (Univerzitetni Klinični center Ljubljana, Lekarna)
(pH = 5,0–7,0).

3.2.3.2 Aparature in pribor

- HPLC sistem VARIANT™ (Bio-Rad, München, Nemčija);
- Centrifuga Rotanta/S (Hettich, Tuttlingen, Nemčija);
- Električni stresalnik Vortex EV-100 (Tehtnica, Železniki);
- Avtomatske pipete Proline (Biohit) različnih volumnov: 5-100 µl, 50-1200 µl, 100-5000 µl;
- Analitska kolona %CDT by HPLC Analytical Cartridge (Bio-Rad);
- Nastavki za avtomatske pipete;
- Epruvete;
- Stojalo za epruvete;
- Štoparica.



Slika 8: HPLC sistem VARIANT™ (Bio-Rad, München, Nemčija)

3.2.3.3 Opis metode (44)

Določanje CDT s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti je semiavtomatiziran postopek, pri katerem je potrebna ročna predpriprava vzorcev. Mešanico reagentov (10 μ l R1, 10 μ l R2, 10 μ l R3, 10 μ l R4 in 500 μ l R5) smo dodali vzorcem in kontrolnima vzorcema (v razmerju 500 μ l + 100 μ l) in dobro premešali z električnim stresalnikom. S tem smo v istem koraku nasitili transferin z železom in oborili lipoproteine v vzorcu z dekstransulfatom. Po inkubaciji od 30 do 60 minut pri sobni temperaturi (20-25 °C) smo vzorce centrifugirali 10 minut pri 3000 g in s tem odstranili oborjene lipoproteine. Supernatant (~400 μ l) smo prenesli v HPLC vial, katere smo neposredno vstavili v HPLC sistem. Nato je postopek potekal avtomatično. Transferinske izooblike so se ločile glede na stopnjo sialiniziranosti. Ločba je potekala 6,3 minute, pri tlaku 10 kg/cm² in pretoku 1,4 ml/min, pri 35-40 °C, z anionsko izmenjevalno stacionarno fazo in gradientom BIS-TRIS pufru različnih ionskih moči. Detekcija je potekala pri 460 nm, kjer je bližina absorpcijskega maksimuma kompleksa Tf-železo. Rezultat analize odčitamo iz kromatograma, v katerem so bile ločene vse detektirane izooblike transferina: asialo-, disialo-, trisialo-, tetrasialo- in pentasialo-Tf. Vrednost %CDT smo določili kot delež površine pod krivuljo posameznih CDT frakcij glede na celotni transferin. Priporočena referenčna vrednost proizvajalca za %CDT po tej metodi je do 1,9 %.

3.3 Metode za določanje katalitične aktivnosti encimov AST, ALT, GGT in AP (47, 48, 49, 50)

Katalitično aktivnost encimov smo izmerili na analizatorju Hitachi 917 (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) po priporočilih IFCC. Določili smo jih z barvnim testom, s spektrofotometrično detekcijo. Kalibracijo in nastavitve ustreznih pogojev analizatorja, predpripravo vzorcev in samo analizo smo izvedli po navodilih proizvajalca (47, 48, 49, 50). Analizator avtomatsko izračuna vrednosti encimov izražene v $\mu\text{kat/l}$ ($\text{U/l} \times 1/60$).

3.3.1 Reagenti

◇ AST po priporočilih IFCC s piridoksal-5-fosfatom (Roche Diagnostics)

- Reagent R1 (steklenički 1 in 1a, tablete piridoksal fosfata): TRIS pufer: 100 mmol/l, pH 7,8; L-aspartat: 300 mmol/l; NADH (kvas): 0,23 mmol/l; MDH (malat dehidrogenaza) (prašičje srce): $\geq 0,53 \text{ U/ml}$ (8,83 $\mu\text{kat/l}$); LDH (laktat dehidrogenaza) (mikroorganizmi): $\geq 0,75 \text{ U/ml}$ (12,5 $\mu\text{kat/l}$); piridoksal fosfat: $\geq 120 \mu\text{mol/l}$; konzervans;

- Reagent R2 (steklenička 2): α -ketoglutarat: 75 mmol/l; konzervans;

◇ ALT po priporočilih IFCC s piridoksal-5-fosfatom (Roche Diagnostics)

- Reagent R1 (steklenički 1 in 1a, tablete piridoksal fosfata): TRIS² pufer: 100 mmol/l, pH 7,8; L-aspartat: 300 mmol/l; NADH (kvas): 0,23 mmol/l; MDH (prašičje srce): $\geq 0,53 \text{ U/ml}$ (8,83 $\mu\text{kat/l}$); LDH (mikroorganizmi): $\geq 0,75 \text{ U/ml}$ (12,5 $\mu\text{kat/l}$); piridoksal fosfat: $\geq 120 \mu\text{mol/l}$; konzervans;

- Reagent R2 (steklenička 2): α -ketoglutarat: 75 mmol/l; konzervans;

◇ GGT po priporočilih IFCC (Roche Diagnostics)

- Reagent R1: NaOH/glicilglicin pufer (steklenički 1 in 1a); NaOH: 76 mmol/l; glicilglicin: 215 mmol/l, pH 7,7 (37 °C);

- Reagent R2: Substrat (steklenički 2 in 2a) L- γ -glutamil-3-karboksi-4-nitroanilid: 38 mmol/l; konzervans;

◇ AP po priporočilih IFCC (Roche Diagnostics)

- Reagent R1: 2-amino-2-metil-1-propanol: 1,12 mol/l, pH 10,44 (30 °C); magnezijev acetat: 2,49 mmol/l; cinkov sulfat: 0,50 mmol/l; N-(2-hidroksietil)-etilendiamin triocetna kislina: 2,49 mmol/l;

- Reagent R2: p-nitrofenil fosfat: 99,5 mmol/l, pH 8,5 (25 °C); konzervans;

- ◇ Kalibrator: C.F.A.S. (Roche Diagnostics);
- ◇ Kontroli: PreciNorm U (QCS) (Roche Diagnostics) in PreciPath U (QCS) (Roche Diagnostics);
- ◇ Fiziološka raztopina (Krka)
 - 0,9 % raztopina NaCl (1000 ml vsebuje 154 mmol Na⁺ in 154 mmol Cl⁻; pH = 4,5–7,0).

3.3.2 Aparature in pribor

- Analizator Hitachi 917 (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija);
- Epruvete;
- Stojalo za epruvete.

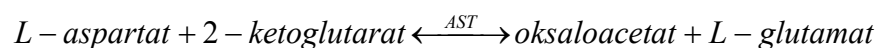


Slika 9: Analizator Hitachi 917 (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija)

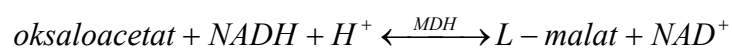
3.3.3 Opis metode (47, 48, 49, 50)

Vzorci za merjenje katalitične aktivnosti encimov smo vstavili v analizator Hitachi 917. Analiza je potekla avtomatično po naslednjih reakcijah:

Aspartat-aminotransferaza:



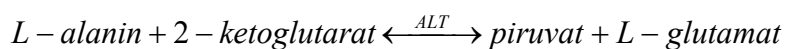
dodan piridoksal fosfat



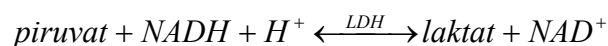
Z reagentom 1 smo vzorcu dodali koencim piridoksal fosfat, ki prenaša amino skupino iz ene aminokislino (aspartat) na drugo aminokislino (glutamat) preko ustrezne ketokislino. Katalizator reakcije je AST. Porast oksaloacetata se določa z indikatorsko reakcijo katalizirano z malat dehidrogenazo (MDH, malate dehydrogenase). Oksaloacetat smo reducirali z NADH v prisotnosti malat-dehidrogenaze. Analizator izmeri padeč absorbance zaradi nastalega NAD^+ pri valovni dolžini 340 nm, ki je premosorazmeren encimski aktivnosti aspartat-aminotransferaze v vzorcu.

Priporočene referenčne vrednosti so navedene v preglednici II.

Alanin-aminotransferaza:



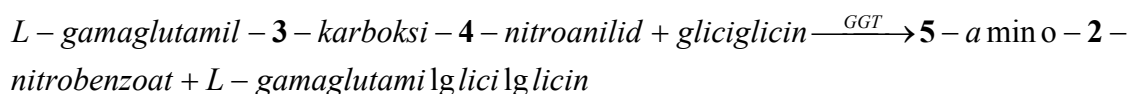
dodan piridoksal fosfat



Z reagentom 1 smo vzorcu dodali koencim piridoksal fosfat, ki prenaša amino skupino iz ene aminokislino (alanin) na ustrezno ketokislino, ketoglutarat, ki se posledično pretvori v L-glutamat. Sočasno poteče pretvorba alanina v piruvat. Katalizator reakcije je ALT. Porast piruvata se določa z indikatorsko reakcijo katalizirano z laktat dehidrogenazo. Piruvat smo reducirali z NADH v prisotnosti laktat-dehidrogenaze. Analizator izmeri padeč absorbance zaradi nastalega NAD^+ pri valovni dolžini 340 nm, ki je premosorazmeren encimski aktivnosti alanin-aminotransferaze v vzorcu.

Priporočene referenčne vrednosti so navedene v preglednici II.

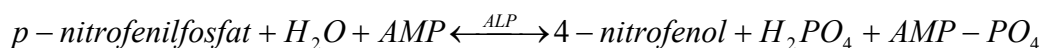
Gama-glutamyltransferaza:



Gama-glutamyltransferaza prenaša gama-glutaminsko skupino L-gama-glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilida na glicilglicin. Nastala produkta reakcije sta obarvani 5-amino-2-nitrobenzoat in gama-glutamylglicilglicin. Analizator izmeri absorbance obarvanega produkta pri valovni dolžini 415 nm, ki je premosorazmerna encimski aktivnosti gama-glutamyltransferaze v vzorcu.

Priporočene referenčne vrednosti so navedene v preglednici II.

Alkalna fosfataza:



dodana $Mg(OAc)_2$ in $ZnSO_4$

V prisotnosti Mg in Zn ionov se 4-nitrofenilfosfat z alkalno fosfatazo cepi do nitrofenola in fosfata. Pri valovni dolžini 450 nm izmeri analizator absorbanco 4-nitrofenola, ki je premosorazmerna encimski aktivnosti alkalne fosfataze v vzorcu.

Priporočene referenčne vrednosti so navedene v preglednici II.

Preglednica II: Priporočene referenčne vrednosti AST, ALT, GGT in AP

	ženske	moški
AST	0,52 μ kat/l	0,58 μ kat/l
ALT	0,56 μ kat/l	0,74 μ kat/l
GGT	0,63 μ kat/l	0,92 μ kat/l
AP	1,74 μ kat/l	2,15 μ kat/l

3.4 Vrednotenje rezultatov

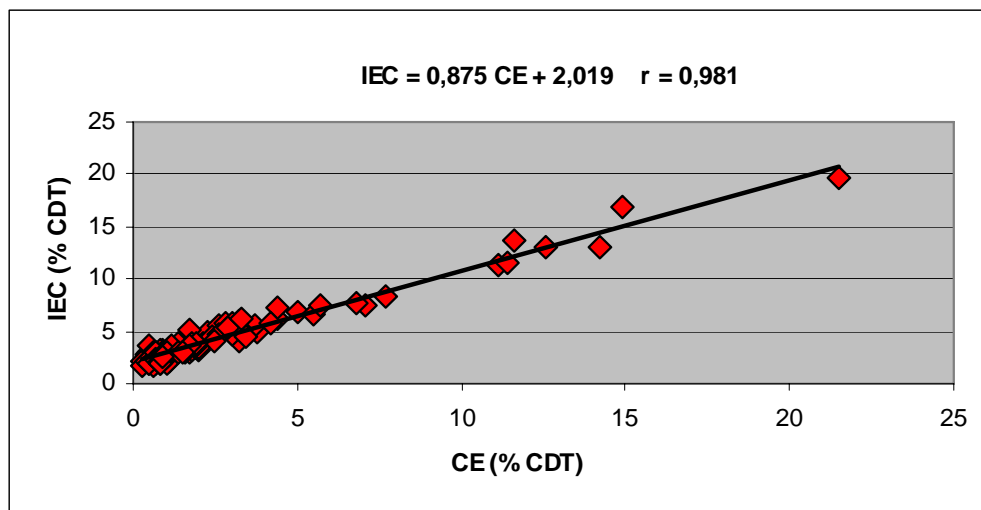
Povezavo med rezultati %CDT dobljenimi s tremi različnimi metodami smo izrazili z linearno regresijo in jo ocenili s Pearsonovim korelacijskim koeficientom. Za primerjavo metod smo uporabili tudi t-test. Metode smo primerjali tudi tako, da smo določili odstopanje rezultatov med metodami in preverili vrednosti sipanja rezultatov odstopanja, če so ustrezne. V statistično vrednotenje rezultatov nismo vključili vzorca, ki je kazal genetsko varianto transferina in vzorca, kjer je bil prisoten CDG sindrom. Skupino vzorcev seruma iz Gastroenterološke klinike, Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, smo obravnavali ločeno.

4. Rezultati in razprava

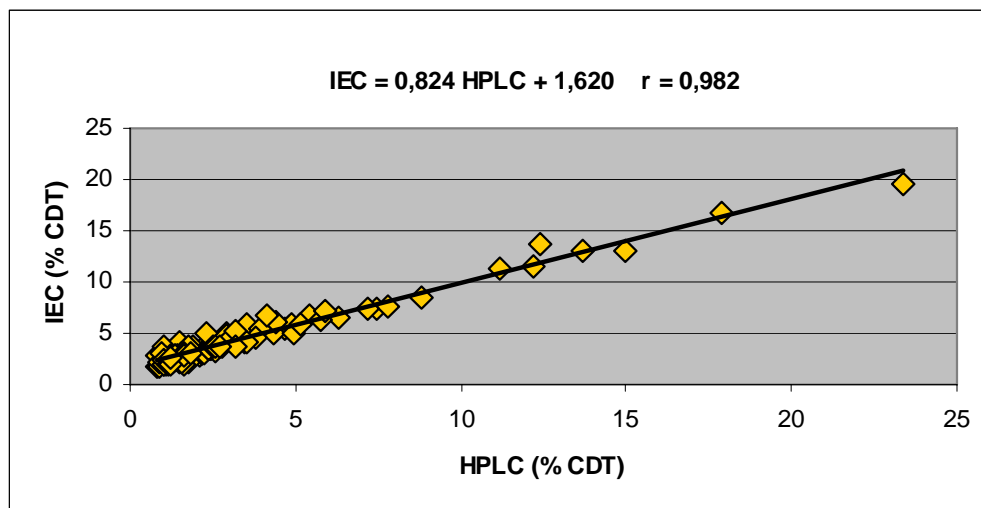
Pri našem delu smo obravnavali 127 vzorcev seruma naključno izbranih preiskovancev, ki so imeli na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (Univerzitetni klinični center Ljubljana) naročeno redno analizo %CDT. Statistično smo vrednotili 105 vzorcev seruma (skupina A). Vzorca, ki je kazal genetsko varianto transferina in vzorca, pri katerem je bil dokazan CDG sindrom, nismo vključili v statistično vrednotenje rezultatov. Prav tako smo iz statistične analize rezultatov izključili skupino 20 vzorcev seruma iz Gastroenterološke klinike, Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, katere smo obravnavali ločeno (skupina B).

4.1 Statistično vrednotenje rezultatov %CDT

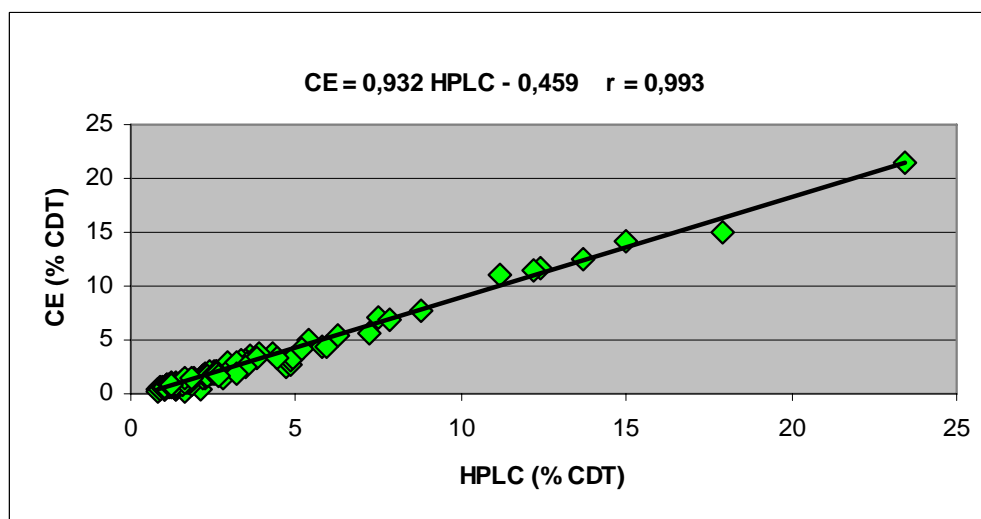
V skupini A smo primerjali rezultate %CDT izmerjene s tremi najpogosteje uporabljenimi metodami za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov: separacija z ionsko izmenjevalnimi kolonami z imunoturbidimetrično detekcijo (IEC), kapilarna elektroforeza (CE) in tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC). Za vse tri pare kombinacij (CE-IEC, HPLC-IEC in HPLC-CE) smo izračunali enačbo regresijske premice in Pearsonov korelacijski koeficient. Rezultati so prikazani na slikah 10, 11 in 12.



Slika 10: Graf korelacije z enačbo regresijske premice in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom za vrednosti %CDT izmerjene s CE in IEC.



Slika 11: Graf korelacije z enačbo regresijske premice in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom za vrednosti %CDT izmerjene s HPLC in IEC.

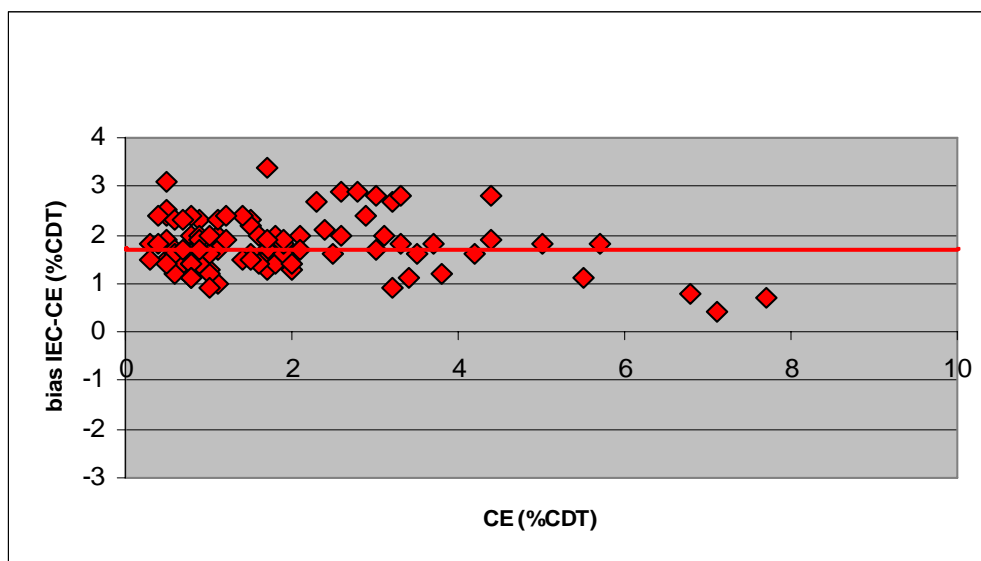


Slika 12: Graf korelacije z enačbo regresijske premice in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom za vrednosti %CDT izmerjene s HPLC in CE.

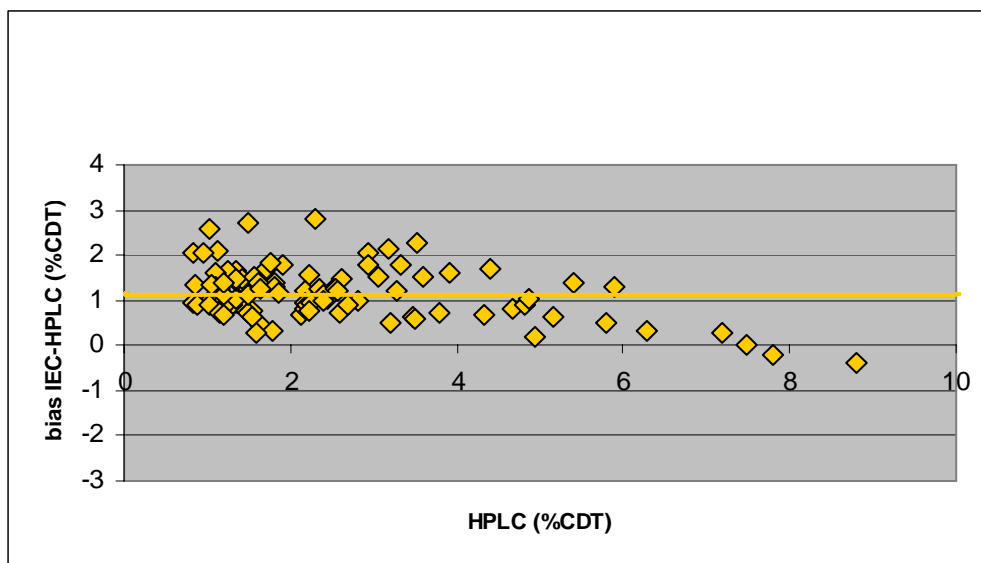
Metoda najmanjših kvadratov je pokazala zelo dobro korelacijo rezultatov med vsemi tremi metodami. Najboljša korelacija je bila med HPLC in CE, kar nam dokazuje najvišji Pearsonov korelacijski koeficient.

Primerljivost rezultatov različnih metod se lahko poda tudi z odstopanjem rezultatov testirane metode od referenčne metode. V primeru, da imata primerjani metodi enake referenčne vrednosti in se razlike sipajo okoli abscise, dajeta metodi primerljive rezultate. Kadar pa imata primerjani metodi različne referenčne vrednosti, se rezultati odstopanja ne

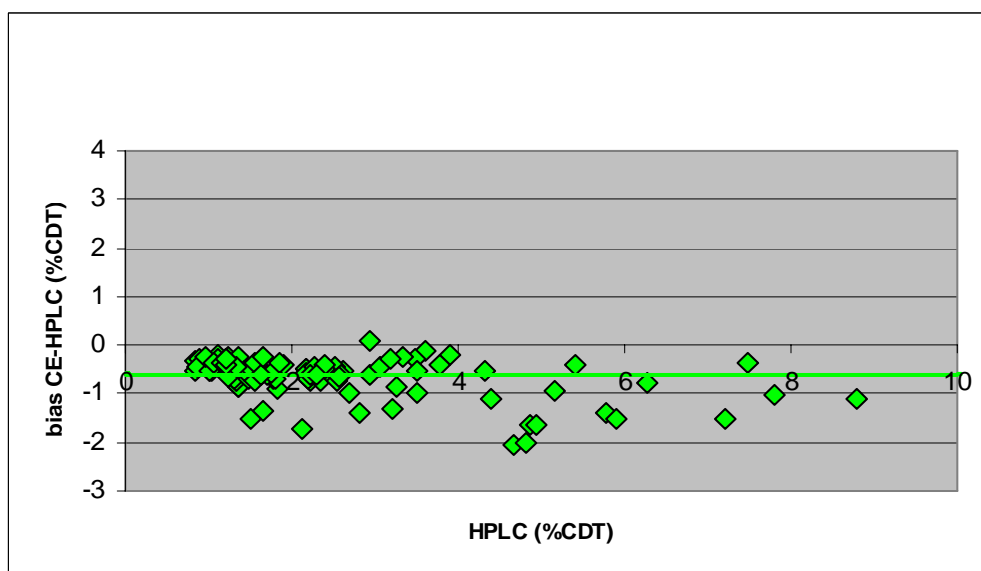
sipajo okoli abscise, temveč okoli vrednosti razlike med obema referenčnima vrednostma. Vse tri metode za določanje CDT, ki smo jih pri našem delu primerjali, imajo različne referenčne vrednosti in zato se rezultati odstopanja sipajo okoli razlike med priporočenimi referenčnimi vrednostmi in ne okoli abscise. Za vse tri pare kombinacij (IEC-CE, IEC-HPLC in CE-HPLC) je grafičen prikaz odstopanj prikazan na slikah 13, 14 in 15. Pri vsakem od parov je vidno sipanje okoli vrednosti razlike med referenčnima vrednostma obeh primerjanih metod. Rezultati odstopanja vrednosti %CDT izmerjene z IEC in CE se sipajo okoli vrednosti 1,7, kar je razvidno iz grafa 13. Rezultati odstopanja vrednosti %CDT izmerjene z IEC in HPLC se sipajo okoli vrednosti 1,1, kar je razvidno iz grafa 14. Rezultati odstopanja vrednosti %CDT izmerjene s CE in HPLC pa se sipajo okoli vrednosti -0,6, kar je prikazano v grafu 15. Najmanjše sipanje rezultatov odstopanja je opazno med %CDT rezultati izmerjenimi s CE in HPLC metodama, kar tudi sovпада s korelacijo med omenjenima metodama.



Slika 13: Sipanje rezultatov odstopanja vrednosti %CDT izmerjenih z IEC in CE.



Slika 14: Sipanje rezultatov odstopanja vrednosti %CDT izmerjenih z IEC in HPLC.



Slika 15: Sipanje rezultatov odstopanja vrednosti %CDT izmerjenih s CE in HPLC.

Oviro pri primerjavi rezultatov %CDT izmerjenih z različnimi metodami med laboratoriji predstavljajo različne referenčne vrednosti samih metod in različne referenčne vrednosti za %CDT v posameznih laboratorijih. Vsak laboratorij mora preveriti prenosljivost proizvajalčevih pričakovanih referenčnih vrednosti na lastno populacijo in na podlagi tega, če je potrebno, tudi spremeniti in določiti svoje referenčne vrednosti (41, 42, 44). V vsakem laboratoriju morajo poleg vrednosti rezultata %CDT vedno navesti še metodo s katero je bil CDT določen oziroma referenčno vrednost. S tem je vsaj deloma olajšana

primerjava rezultatov med laboratoriji (19, 30). Ker CDT trenutno velja za najbolj specifičen laboratorijski označevalec škodljive rabe alkoholnih pijač, se pojavlja vedno večja potreba po harmonizaciji in uskladitvi metod za določanje CDT (19, 40, 51). Z namenom uskladitve določevanja CDT z različnimi metodami, so številne raziskovalne skupine poskusile v prakso uvesti različne faktorje. Eden izmed teh je bil izračun razmerja disialo-/tetrasialo-Tf in tudi disialo-Tf/celotni Tf (30, 40, 51). Velika pomanjkljivost teh faktorjev je, da se lahko izračunajo samo pri metodah, pri katerih se lahko določijo posamezne izooblike transferina, torej HPLC in CE. Pri metodi IEC teh faktorjev ni moč izračunati. Ostaja pa nejasno ali ti faktorji sploh predstavljajo kakšno prednost pred določanjem celotnega CDT (30). Danes potreba po mednarodnem CDT standardu še ostaja, kljub temu da je k pravilnejšemu podajanju rezultatov CDT pripomogla uvedba kontrolnih materialov (13, 51, 52).

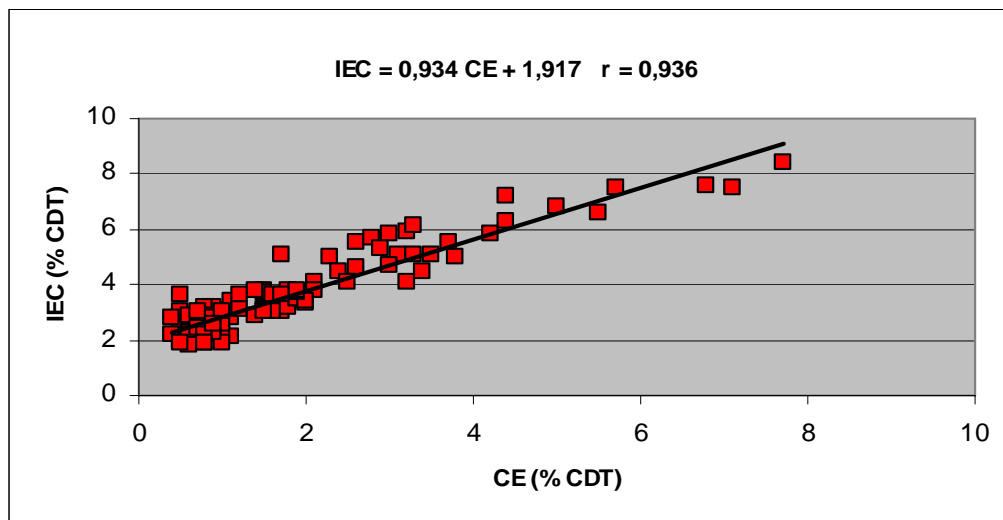
Preglednica III: Priporočene referenčne vrednosti, meje kvantifikacije, interval vrednosti %CDT rezultatov uporabljenih pri našem delu (po NCCLS priporočilih) in območje linearnosti testirano s strani proizvajalca za vse tri metode (41, 42, 44).

	ref. vred.	meja kvantifikacije	interval (po NCCLS)	območje linearnosti (testirano s strani proizvajalca)
IEC	3,0 %	konc. Tf 1 mg/l	1,8-19,6 %CDT	1,3-8,9 %CDT
CE	1,3 %	0,4 %	0,3-21,5 %CDT	0,35-8,74 %CDT
HPLC	1,9 %	0,3 %	0,8-23,4 %CDT	0,8-23,5 %CDT

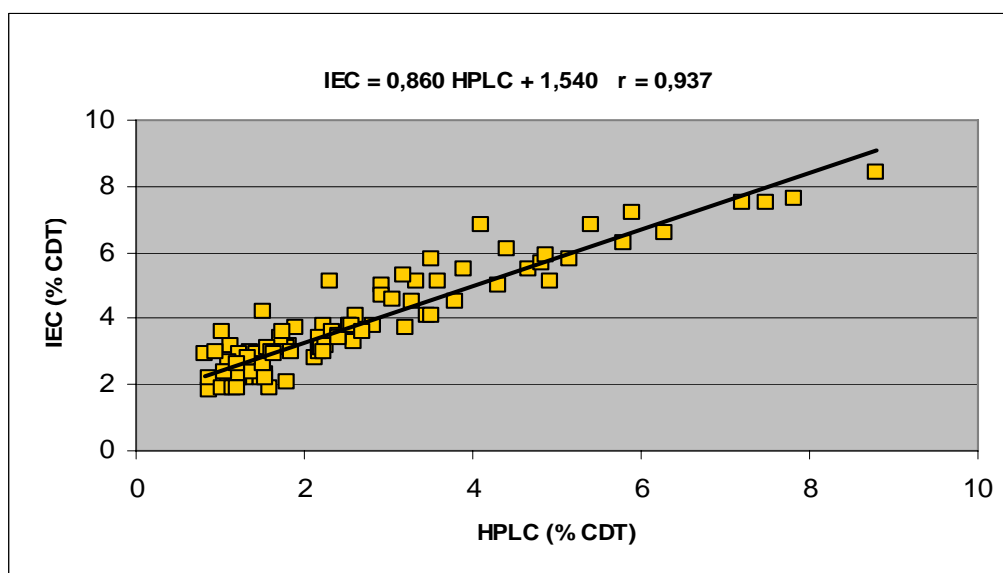
Za nabor vzorcev seruma smo sledili NCCLS priporočilom, zato smo vrednotili vzorce z vrednostmi %CDT v širšem območju glede na območje linearnosti, ki ga je testiral proizvajalec. Slednje so omejene samo na diagnostično pomembno območje %CDT rezultatov. Zato smo pri našem delu obravnavali tudi vzorce, katerim smo z IEC in CE določili višje vrednosti %CDT, kot so maksimalne mejne vrednosti območja linearnosti testiranega s strani proizvajalca. Primerjava intervalov vrednosti %CDT je prikazana v preglednici III.

Pri statistični obravnavi smo iz skupine vzorcev izločili vse vzorce z rezultati %CDT nad in pod območjem linearnosti testiranim s strani proizvajalca, ter preverili korelacijo

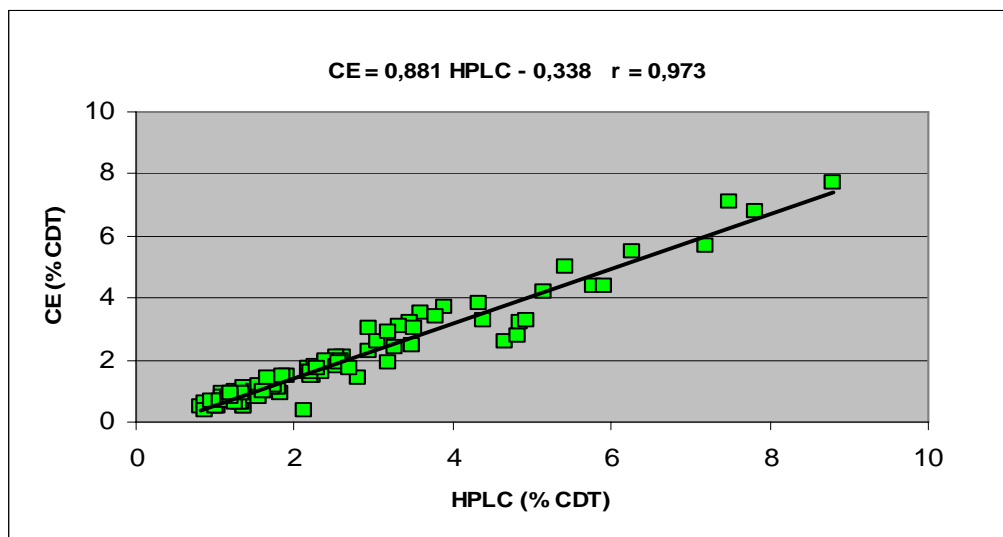
96 vzorcev znotraj tega območja (skupina C). Primerjava enačb regresijskih premic in Pearsonovih korelacijskih koeficientov je zbrana v preglednici IV. Na slikah 16, 17 in 18 pa je korelacija skupine vzorcev s %CDT rezultati znotraj območja linearnosti testiranega s strani proizvajalca prikazana tudi grafično.



Slika 16: Graf korelacije z enačbo regresijske premice in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom za vrednosti %CDT izmerjene s CE in IEC pri skupini C.



Slika 17: Graf korelacije z enačbo regresijske premice in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom za vrednosti %CDT izmerjene s HPLC in IEC pri skupini C.



Slika 18: Graf korelacije z enačbo regresijske premice in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom za vrednosti %CDT izmerjene s HPLC in CE pri skupini C.

Preglednica IV: Primerjava enačb regresijskih premic in Pearsonovih korelacijskih koeficientov za vrednosti %CDT v skupini 105 vzorcev naključno izbranih preiskovancev (skupina A) in 96 vzorcev z rezultati %CDT znotraj proizvajalčevega testiranega območja linearnosti (skupina C) izmerjene z IEC, CE in HPLC.

		skupina A (N=105)	skupina C (N=96)
CE in IEC	reg. prem.	$IEC = 0,875 \cdot CE + 2,019$	$IEC = 0,934 \cdot CE + 1,917$
	r	0,981	0,936
HPLC in IEC	reg. prem.	$IEC = 0,824 \cdot HPLC + 1,620$	$IEC = 0,860 \cdot HPLC + 1,540$
	r	0,982	0,937
HPLC in CE	reg. prem.	$CE = 0,932 \cdot HPLC - 0,460$	$CE = 0,881 \cdot HPLC - 0,338$
	r	0,993	0,973

Ugotovili smo, da metode med seboj korelirajo tudi izven območja linearnosti, ki ga je testiral proizvajalec. Metoda najmanjših kvadratov je pokazala zelo dobro korelacijo rezultatov med vsemi tremi metodami. Najboljša korelacija je bila prav tako med CE in HPLC. Ker smo pri izboru vzorcev in analizi rezultatov sledili priporočilom NCCLS, smo torej za nadaljnje statistično vrednotenje rezultatov upoštevali vseh 105 vzorcev, vključno z 9 vzorci z vrednostmi %CDT izven območja linearnosti testiranega s strani proizvajalca.

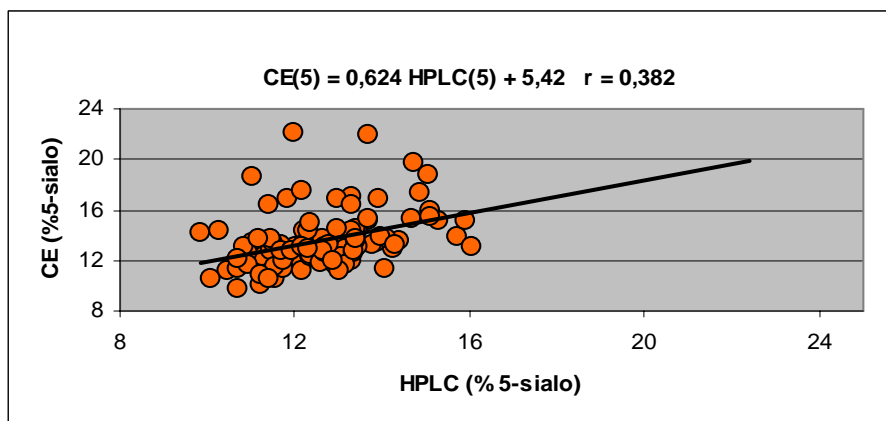
Preglednica V: Priporočene referenčne vrednosti, aritmetične sredine (\bar{x}), standardni odkloni (sd), najnižje vrednosti (min), najvišje vrednosti (max), najpogostejše vrednosti (modus) in mediane vrednosti za rezultate %CDT v skupini A določene s tremi testiranimi metodami (IEC, CE in HPLC).

	ref. vred.	$\bar{x} \pm sd$	min	max	modus	mediana
IEC [%]	3,0	4,4 \pm 3,1	1,8	19,6	3,0	3,4
CE [%]	1,3	2,7 \pm 3,5	0,3	21,5	0,8	1,5
HPLC [%]	1,9	3,4 \pm 3,7	0,8	23,4	1,4	2,2

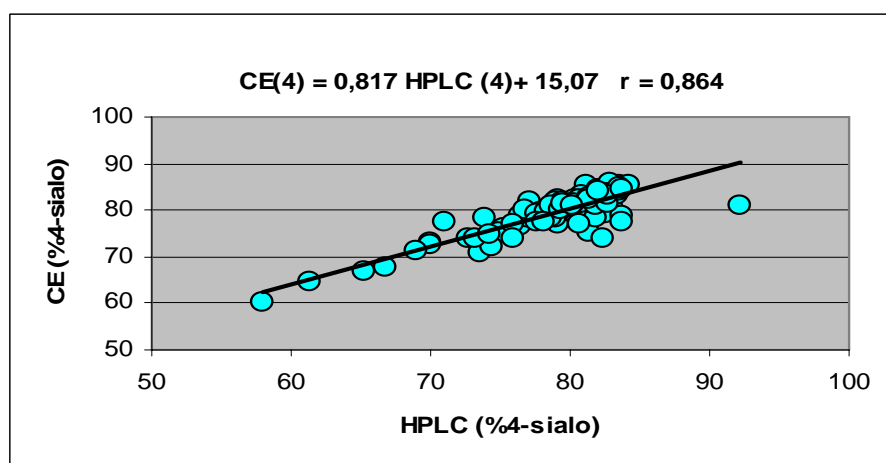
Za vse tri metode smo izračunali aritmetično sredino in standardni odklon, s katerim merimo statistično razpršenost enot. Iz rezultatov zbranih v preglednici V je razvidno, da aritmetične sredine korelirajo s priporočenimi referenčnimi vrednostmi in so standardni odkloni pri vseh treh metodah primerljivi. V preglednici so prikazane tudi najnižje in najvišje vrednosti, ki smo jih izmerili s posameznimi metodami.

Statistična analiza %CDT rezultatov 105 vzorcev s t-testom je pokazala značilno razliko med parom IEC in CE ($P < 0,01$), ter med parom IEC in HPLC ($P < 0,01$). Med CE in HPLC pa ni statistično značilne razlike ($P > 0,05$), torej so rezultati metod med seboj primerljivi.

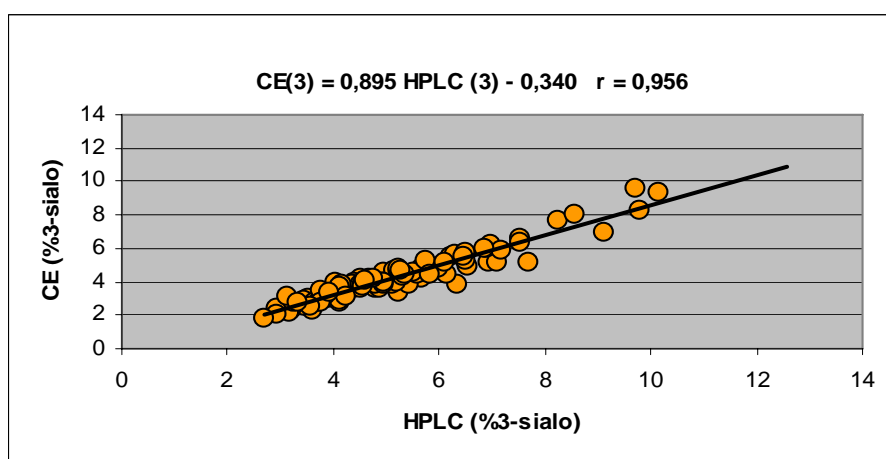
Metodi HPLC in CE imata v primerjavi z IEC nižji meji detekcije. Z obema metodama lahko zaznamo veliko nižje koncentracije CDT kot z metodo IEC. Meja kvantifikacije, to je najmanjša količina, ki jo lahko kvantificiramo z določeno stopnjo natančnosti in točnosti, je za CE do 0,4 % in za HPLC do 0,3 % (53) (glej Preglednica III). Metodi imata zelo podobni meji kvantifikacije, vendar pa imata glede na priporočeni referenčni vrednosti različni detekcijski območji. Ker je priporočena referenčna vrednost HPLC (do 1,9 %) višja od priporočene referenčne vrednosti CE (do 1,3 %) lahko sklepamo, da ima HPLC širše detekcijsko območje. Pri metodi IEC je meja kvantifikacije določena s koncentracijo transferina do 1 mg/l. HPLC in CE imata v primerjavi z IEC nižji meji kvantifikacije. To je povezano z dejstvom, da lahko z obema metodama določimo tudi asialo-Tf, ki je prisoten v redkih primerih in v zelo nizkih koncentracijah. Z obema metodama se lahko določijo posamezne izooblike transferina, medtem ko z IEC metodo posameznih izooblik ne moremo določiti. Na slikah 19, 20, 21, 22 in 23 je grafično prikazana korelacija za vrednosti posameznih izooblik transferina izmerjenih s CE in HPLC.



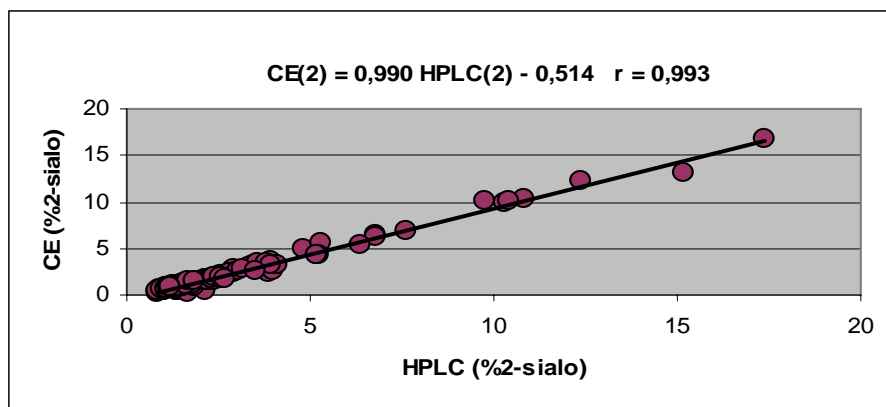
Slika 19: Graf korelacije z enačbo regresijske premice in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom za vrednosti pentasialo-Tf izmerjene s CE in HPLC.



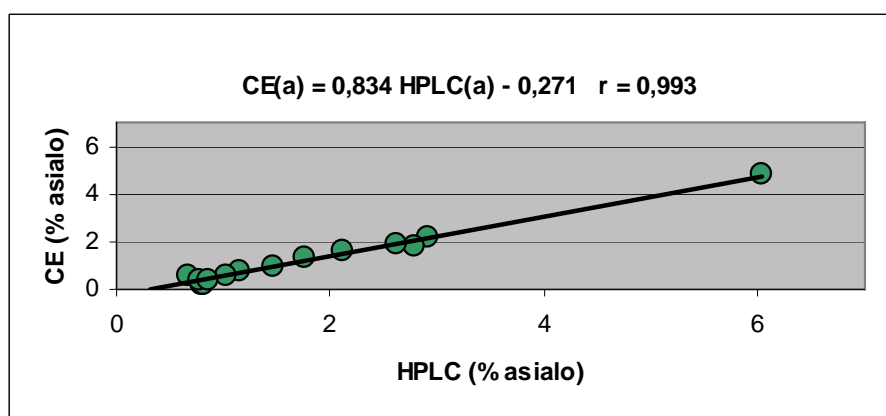
Slika 20: Graf korelacije z enačbo regresijske premice in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom za vrednosti tetrasialo-Tf izmerjene s CE in HPLC.



Slika 21: Graf korelacije z enačbo regresijske premice in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom za vrednosti trisialo-Tf izmerjene s CE in HPLC.



Slika 22: Graf korelacije z enačbo regresijske premice in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom za vrednosti disialo-Tf izmerjene s CE in HPLC.

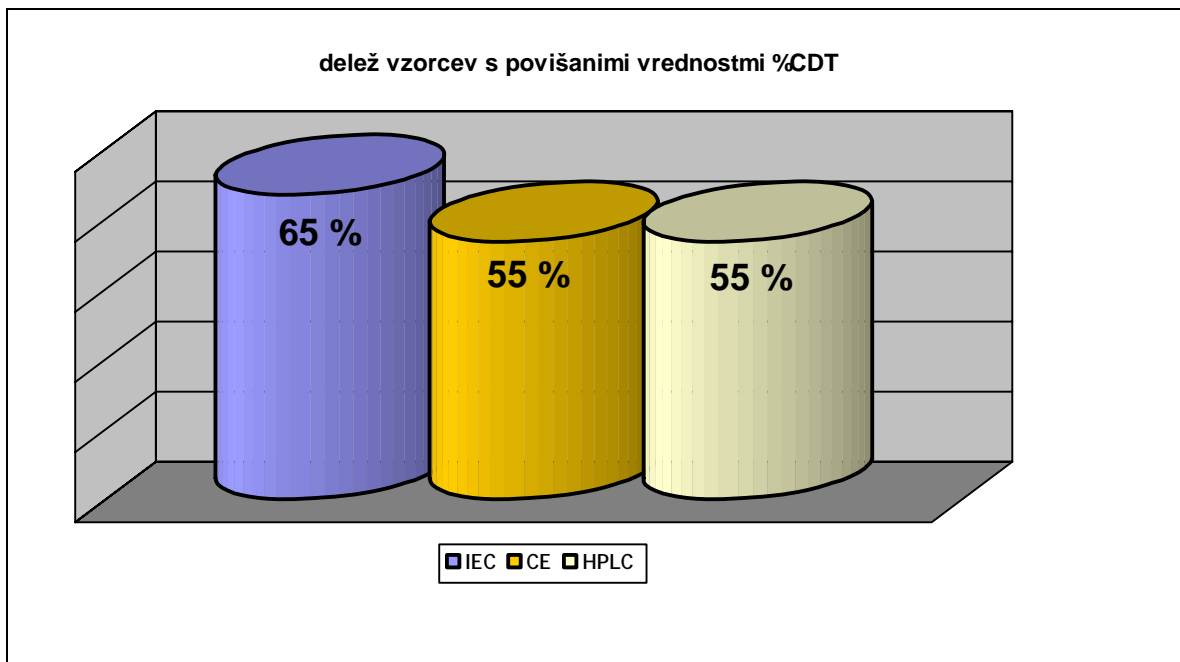


Slika 23: Graf korelacije z enačbo regresijske premice in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom za vrednosti asialo-Tf izmerjene s CE in HPLC.

Metoda najmanjših kvadratov je pokazala dobro korelacijo rezultatov pri primerjavi asialo-, disialo-, trisialo- in tetrasialo-Tf izmerjenih s HPLC in CE. Pri primerjavi pentasialotransferina je bila korelacija rezultatov slaba. Ker je CDT definiran kot delež disialo-, monosialo- in asialotransferina glede na celokupno količino transferina, so za določitev CDT najpomembnejše samo izooblike disialo-, asialo- ter tetrasialo-Tf (ki predstavlja ~80% celokupne koncentracije transferina). Med prvima izooblikama je bila korelacija najboljša. Kot pričakovano, smo v primerjavi disialotransferina in asialotransferina določili enak Pearsonov korelacijski koeficient kot pri primerjavi skupne vrednosti %CDT (Slika 12). Po razvoju imunometričnih metod za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov je bil v CDT vključen tudi trisialo-Tf, ki pa se od leta 2000 ne prišteva več med CDT izooblike, ker se koncentracija le-tega ne spreminja pod vplivom etanola. Trisialo-Tf se pojavlja v enakih koncentracijah pri povišanih in

znižanih vrednostih CDT in nima diagnostične vrednosti pri škodljivi rabi alkoholnih pijač (19, 34). Njegova vključitev v CDT bi lahko celo zmanjšala diagnostično točnost biokemičnega označevalca škodljive rabe alkoholnih pijač (10). Metodi HPLC in CE temeljita na različnih principih ločevanja transferinskih izooblik, vendar sta kljub temu med seboj primerljivi.

Sama analiza CDT je zahtevna, ker je Tf izredno mikroheterogena molekula. Poleg tega so CDT izooblike normalno prisotne v telesu v zelo nizkih koncentracijah, ter so strukturno zelo podobne ostalim prisotnim izooblikam. Vpliv na sam izid analize pa lahko imajo tudi preanalitski faktorji. Najpomembnejša med njimi sta čas in temperatura shranjevanja vzorcev, zato so za analizo CDT najbolj primerni sveže odvzeti vzorci (4, 19, 33). Stabilnost Tf v vzorcih je izrednega pomena za analizo CDT in je zagotovljena s shranjevanjem vzorcev seruma 48 ur pri 20-25 °C, 7 dni pri 2-8 °C ali 1 leto pri -20 °C (41). Vzorcem, ki so shranjeni predolgo časa na neustrezni temperaturi, ne moremo določiti verodostojnih rezultatov. Vrednosti %CDT v takšnih vzorcih bi bile lažno povišane zaradi razgradnje stranske ogljikohidratne verige in razgradnje proteinov (19, 33).



Slika 24: S stolpčnim grafikonom so predstavljeni deleži vzorcev s povišanimi vrednostmi %CDT v skupini A (N=105) določenimi z IEC, CE in HPLC.

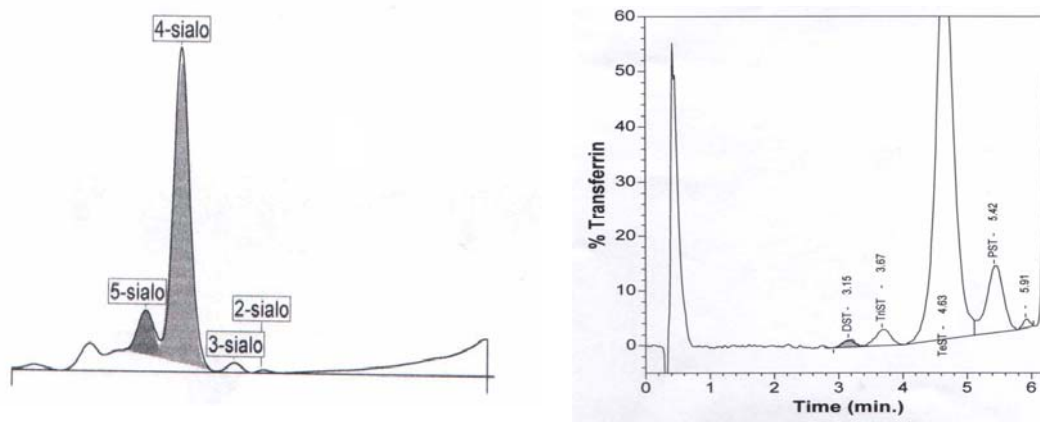
Pri vrednotenju rezultatov smo bili pozorni na vzorce s povišanimi vrednostmi %CDT. Nabor vzorcev s povišano vrednostjo %CDT med 105 testiranimi vzorci je predstavljen na sliki 24. Z IEC smo določili 10 % več povišanih vrednosti nad priporočeno referenčno vrednostjo kot z ostalima dvema metodama. Če bi poznali klinično ozadje teh 10 % primerov, bi verjetno lahko sklepali, da smo z IEC dobili lažno pozitivne rezultate. Vzrok za določitev lažno pozitivnih rezultatov bi lahko bila v neznani specifičnosti reakcije antigen-protitelo, v samem postopku kromatografske ločbe in vplivih okolja ter v obsežnem ročnem delu. Vzrok bi lahko bila sočasna določitev izooblik transferina, ki jih ne prištevamo med CDT (trisialo- in ali tetrasialo-Tf), zaradi neustrezne elucije izooblik transferina. Te izooblike se lahko eluirajo sočasno s CDT izooblikami, vendar med samim postopkom IEC nimamo vpogleda ter nadzora katere izooblike smo eluirali s pomočjo anionsko izmenjevalnih kolon (4, 53). Vendar so nekatere študije z IEF in HPLC metodama pokazale, da sta ločba in elucija ustrezni, tako da se med imunoturbidimetrično reakcijo detektirajo le CDT specifične izooblike (39, 52).

4.2 Grafični prikaz izooblik transferina

Velika prednost HPLC in CE metod, ki ju obe nudita v nasprotju z IEC, je nedvomno grafični prikaz ločenih izooblik transferina. To omogoča ogled in neposredno dokumentiranje vsake analize posebej.

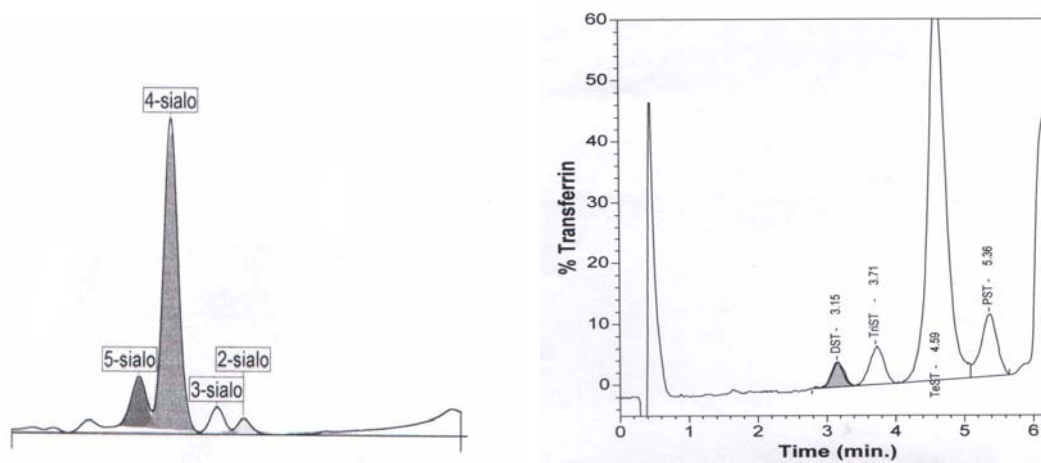
Z analizo %CDT s HPLC in CE metodama lahko torej določimo delež posameznih izooblik transferina, ki so se med analizo ločile ter jih tudi grafično prikažemo v kromatogramu in elektroferogramu. Grafični prikaz nam omogoča, da lahko preverimo kakovost same ločbe, pridobimo podatke o prisotnosti različnih izooblik transferina in genetskih variant (sliki 30, 31), ter lahko graf tudi shranimo za nadaljnjo obravnavo in arhiviranje (slike od 25-27 in 30-34). Pri postopku z IEC nimamo vpogleda kako je separacija izooblik transferina potekala, ker se z antitransferinskimi protitelesi detektirajo eluirane izooblike transferina v isti reakcijski zmesi. Poleg tega, je specifičnost reakcije protitelo-Tf neznana, posledica česar so lahko lažni rezultati (lažno pozitivni oziroma lažno negativni). Lažne rezultate lahko dobimo v primerih, ko so v vzorcu prisotne snovi, ki se nespecifično vežejo na protitelesa proti transferinu. Specifičnost celotnega postopka je torej odvisna od učinkovitosti ločbe na anionsko izmenjevalnih kolonah in specifičnosti uporabljenih protiteles.

Na slikah od 25-27 in 30-34 so predstavljeni nekateri primeri elektroferogramov in kromatogramov vzorcev, ki smo jih testirali pri našem delu.



Slika 25: Elektroferogram (levo) in kromatogram (desno) vzorca z vrednostmi %CDT znotraj priporočenih referenčnih vrednosti. Izmerjene vrednosti %CDT z vsemi tremi testiranimi metodami so bile znotraj referenčnih vrednosti ($CE \%_{CDT} = 0,5 \%$, $HPLC \%_{CDT} = 1,0 \%$, $IEC \%_{CDT} = 1,9 \%$).

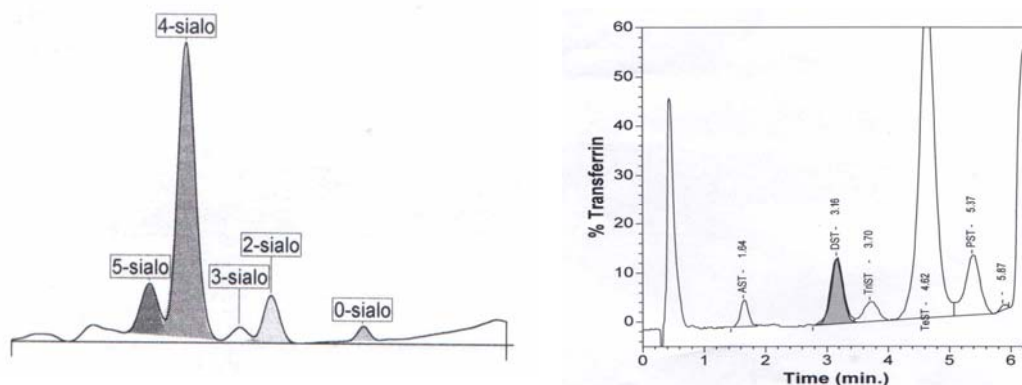
Na sliki 25 je predstavljena referenčna razporeditev izooblik transferina pri vzorcu z vrednostjo %CDT znotraj priporočenih referenčnih vrednosti.



Slika 26: Elektroferogram (levo) in kromatogram (desno) vzorca s povišanimi vrednostmi %CDT določenimi z vsemi tremi testiranimi metodami ($CE \%_{CDT} = 3,1 \%$, $HPLC \%_{CDT} = 3,3 \%$, $IEC \%_{CDT} = 6,1 \%$).

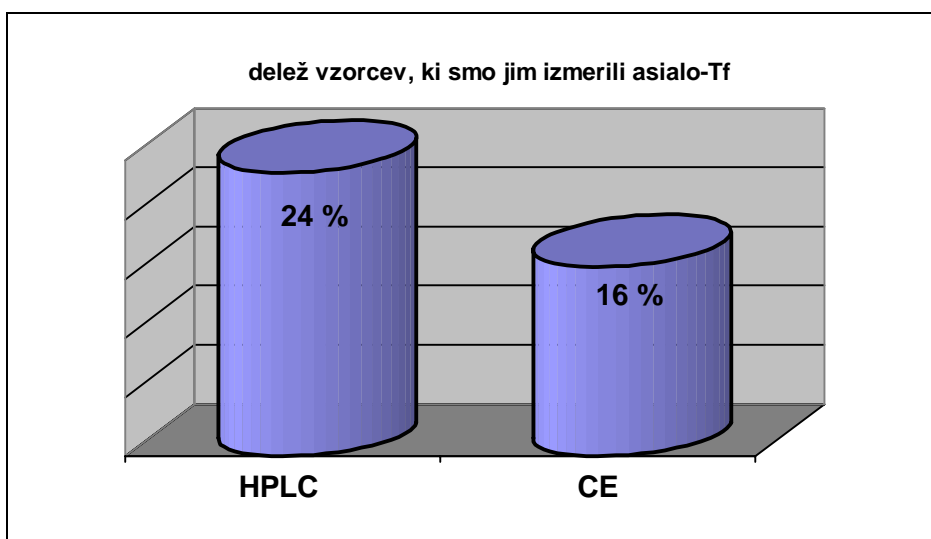
V primeru povečanega vnosa etanola, 60 do 80 g vsaj 14 dni zaporedoma, se vrednost CDT poviša (3, 4, 16). Na sliki 26 je prikazana razporeditev izooblik Tf v primeru

povišanih vrednosti CDT na račun povišanega deleža disialotransferina. Na sliki 27 pa je vrednost %CDT povišana na račun povišanega deleža disialo- in asialotransferina. Asialo-Tf je prisoten le redko in v nizkih koncentracijah. Prisotnost asialotransferina je povezana s kroničnim alkoholizmom, zato je pomembno v laboratorijski izvid vključiti ob vrednost %CDT tudi podatek o detektiranem asialotransferinu (4, 54).

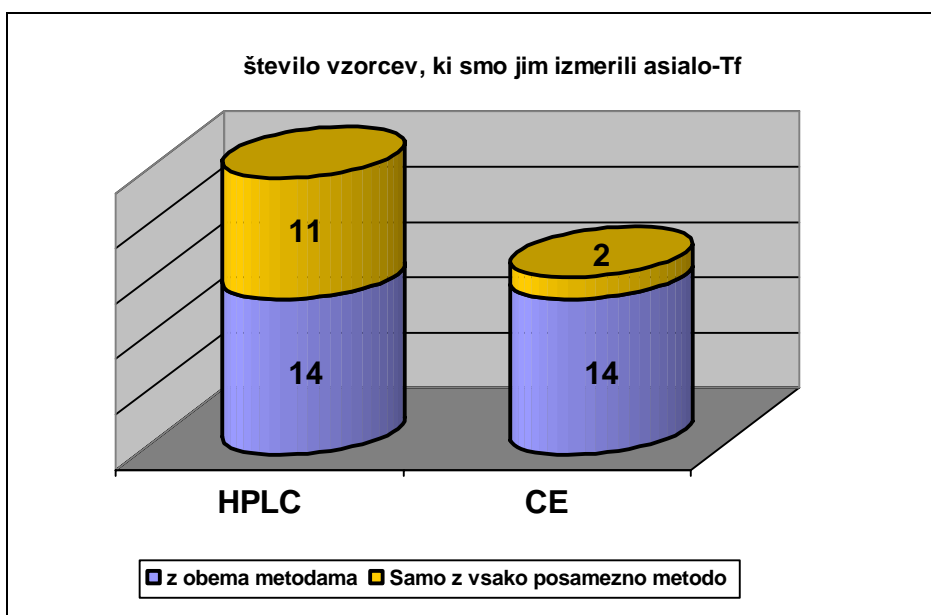


Slika 27: Elektroferogram (levo) in kromatogram (desno) vzorca s povišanimi vrednostmi %CDT in s prisotnim asialo-Tf (**CE %_{CDT} = 12,6 %**, **HPLC %_{CDT} = 13,7 %**). Z metodo IEC ne moremo določiti, da je v vzorcu prisoten asialo-Tf, vrednost %CDT pa je bila v tem primeru povišana (**IEC %_{CDT} = 13,0 %**).

Pri našem delu smo znotraj skupine A določili asialo-Tf z metodo HPLC 24 % vzorcem in z metodo CE 16 % vzorcem (slika 28). HPLC je bolj občutljiva metoda za določanje asialotransferina kot CE (53). Vzrok temu je lahko tudi nižja meja kvantifikacije metode HPLC (do 0,3 %) v primerjavi s CE (do 0,4 %).



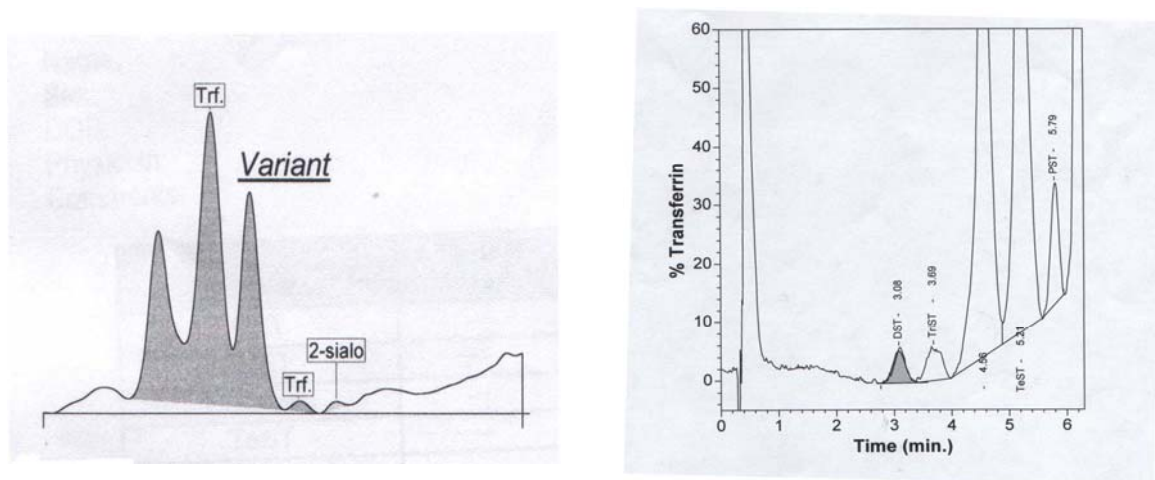
Slika 28: S stolpčnim grafikonom sta predstavljena deleža vzorcev, katerim smo izmerili asialo-Tf s HPLC in CE.



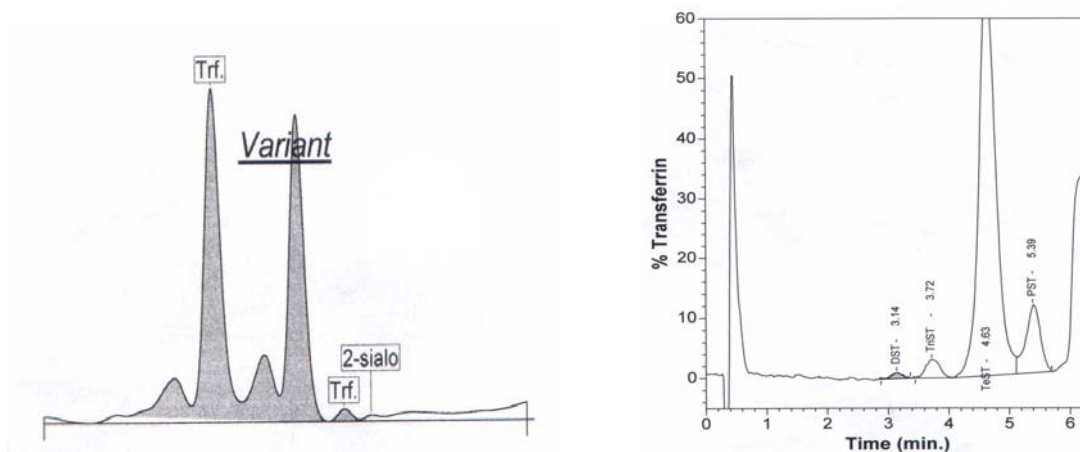
Slika 29: S stolpčnim grafikonom so predstavljena števila vzorcev, katerim smo izmerili asialo-Tf z obema metodama, samo s HPLC ali samo s CE.

Pri 14 vzorcih sta prisotnost asialotransferina zaznali obe metodi HPLC in CE. V 11 primerih smo prisotnost asialotransferina detektirali samo s HPLC in ne hkrati s CE. Samo v 2 primerih pa je bil asialo-Tf viden na elektroferogramu, medtem ko na kromatogramu ni bil viden (slika 29). Majhne razlike v rezultatih pri teh vzorcih, kjer smo

detektirali asialo-Tf niso imele velikega vpliva na klinično interpretacijo izvida in podajanje rezultata %CDT, saj je bil %CDT v vseh primerih povišan in primerljiv.



Slika 30: Elektroferogram (levo) in kromatogram (desno) vzorca z BC genetsko varianto transferina. S CE in HPLC izmerjene vrednosti %CDT so bile **CE %CDT = 0,9 %**, **HPLC %CDT = 4,2 %**. Vrednost %CDT izmerjena z IEC je bila **IEC %CDT = 2,6 %**.



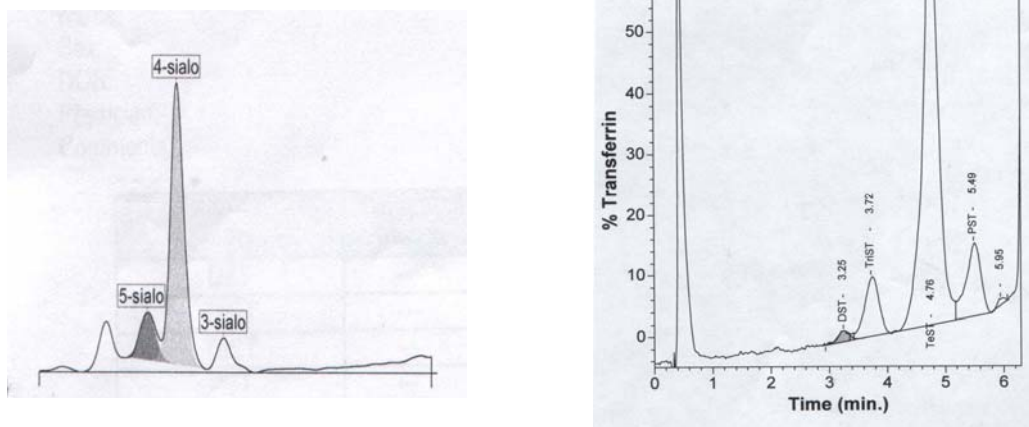
Slika 31: Elektroferogram (levo) in kromatogram (desno) vzorca z do danes še nedefinirano genetsko varianto transferina. Z metodama CE in HPLC smo določili %CDT znotraj referenčnih mej (**CE %CDT = 0,3 %**, **HPLC %CDT = 0,8 %**), medtem ko z IEC %CDT nismo določili (**IEC %CDT = /**).

Prednost metod, ki nudijo grafični prikaz izooblik je tudi v tem, da lahko z njimi detektiramo in določimo prisotnost genetskih variant transferina. Tudi pri našem delu smo se srečali z vzorcem z genetsko varianto molekule transferina in le-to smo tudi potrdili z grafičnim prikazom (slika 30). Analiza z eno izmed metod, ki omogoča grafični prikaz

ločenih transferinskih izooblik (HPLC ali CE), je pri določanju genetskih variant nenadomestljiva. Sami rezultati %CDT določeni z IEC niso dovolj natančni, da bi z njimi lahko potrdili genetsko varianto. V primeru, ko je rezultat %CDT, določen z IEC metodo izredno visok, jetrni encimi pa ne kažejo patofizioloških poškodb jeter, lahko posumimo na genetsko varianto, vendar je za njeno potrditev potrebna grafična analiza izooblik transferina. Genetska varianta je lahko prisotna tudi pri vzorcih, pri katerih so vrednosti %CDT, določene z IEC nizke, povišane pa so vrednosti določene z ostalima dvema metodama (HPLC in CE). Leta 1957 so z izoelektričnim fokusiranjem prvič zasledili genetske variante transferina. V serumu so odkrili najmanj 38 različnih genetskih variant transferina. Najpogostejša skupina so TfC (common) variante. Poleg njih so bile odkrite še anodne TfB (izjemno nizki pI v primerjavi s TfC) in zelo redke katodne TfD variante (višji pI kot pri TfC) (30, 54, 55). Variante nastanejo lahko kot posledica sprememb v polipeptidni verigi (prave genetske variante), razlik v vsebnosti železa in razlik v sestavi N-glikanskih verig (izooblike). Samo 4 genetske variante pa se pojavljajo pri več kot 1 % ljudi. Najpogostejša pri kavkazijski populaciji je TfC, znotraj katere je bilo določenih 16 podtipov (19). V naravi so najpogostejše mešane (heterozigotne) genetske variante, ki lahko motijo analizo CDT. Izelektrične točke izooblik Tf-D, ki jih ne prištevamo med CDT imajo podobne izoelektrične točke, kot CDT izooblike TfC, kar lahko vodi do koelucije s CDT izooblikami in posledično do lažno pozitivnih rezultatov pri posameznikih, ki so TfCD heterozigoti in ne uživajo škodljivih količin alkoholnih pijač. Težava lažno pozitivnih rezultatov zaradi TfD variant je bila še večja, ko so k CDT prištevali še trisialo-Tf. V primeru koelucije CDT izooblik TfB variante z izooblikami TfC, ki jih ne prištevamo k CDT, lahko analiza pokaže lažno negativne rezultate pri posameznikih, ki so TfCB heterozigoti in kronično uživajo škodljive količine alkoholnih pijač (19, 52).

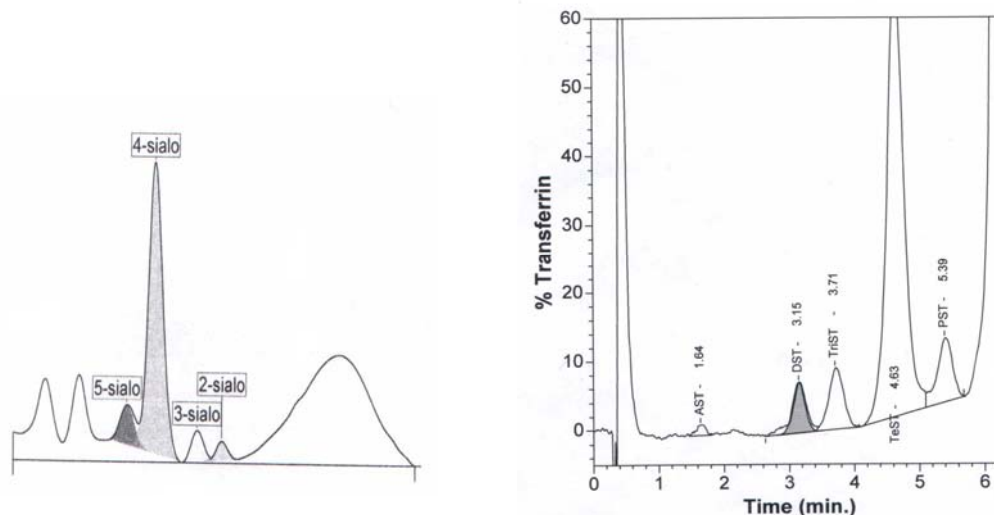
Na grafih so transferinske variante prepoznavne kot kombinacija dveh homozigotnih variant, kjer se posamezne frakcije izooblik Tf med seboj prekrivajo. Pri BC genetski varianti se disialo-TfB koeluirata na približno istem mestu kot trisialo-TfC ter trisialo-TfB s tetrasialo-TfC (52). Določitev genetskih variant z metodami, kjer so na voljo grafični prikazi izooblik, ni zahtevna, ker imajo BC in CD genetske variante zanje značilne kromatograme, z značilnimi retencijskimi časi in višinami pikov C, B ali D. Pri BC genetski varianti so vrednosti CDT izmerjene z IEC metodo nižje v primerjavi z

določitvijo CDT z metodama HPLC in CE. Pri CD genetski varianti so vrednosti CDT izmerjene z IEC metodo povišane, s HPLC in CE pa so v mejah referenčnih vrednosti (52).



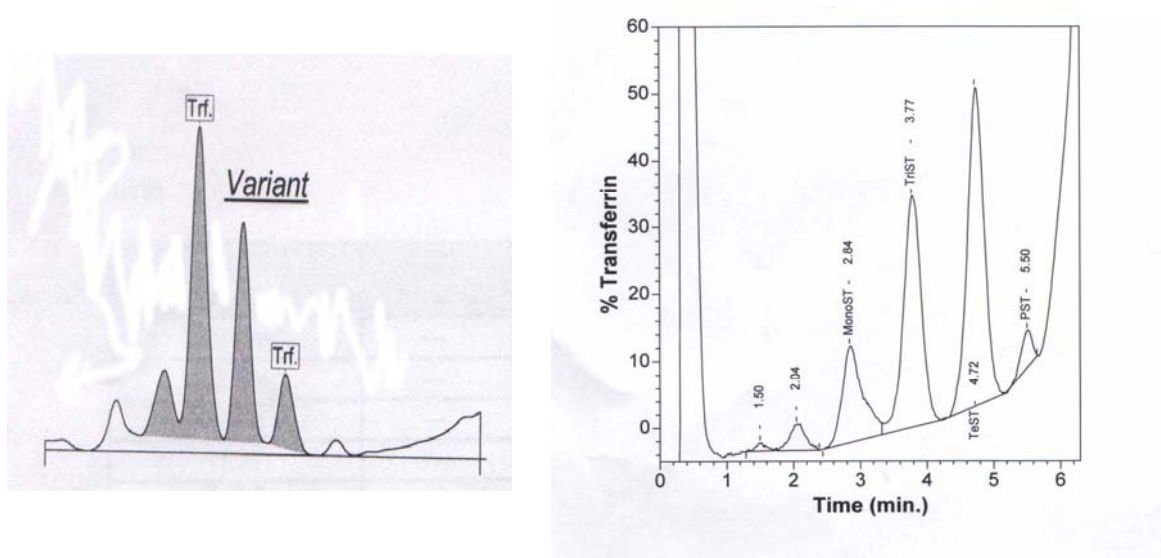
Slika 32: Elektroferogram (levo) in kromatogram (desno) vzorca pri katerem sta združena trisialo- in disialo-Tf; primer preiskovanja s cirozo jeter. Vrednosti %CDT ni bilo moč določiti s CE, medtem ko je bila vrednost določena s HPLC znotraj referenčnih mej (CE %CDT = / , HPLC %CDT = 1,5 %); z IEC smo določili povišano vrednost %CDT (IEC %CDT = 4,2 %).

Na sliki 32 je primer analize, pri kateri ni prišlo do ločitve med disialotransferinom in trisialotransferinom. To je značilno za redko genetsko varianto C2C3, ki je definirana z nizko vrednostjo CDT določeno s HPLC in CE in hkrati z visokimi vrednostmi CDT z IEC (52, 55). Vendar pa je v tem primeru pri interpretaciji in izdajanju rezultata potrebna previdnost. Pri vzorcu smo določili tudi povišane koncentracije katalitičnih aktivnosti jetrnih encimov, ki so skupaj s kliničnim ozadjem preiskovanja potrdili sum na cirozo jeter. Torej je pri izdajanju rezultata za vzorce, pri katerih ne pride do ločitve med disialotransferinom in trisialotransferinom, poleg vrednosti %CDT in grafičnega prikaza, potrebno upoštevati tudi vrednosti jetrnih encimov in če je le mogoče, tudi klinično ozadje preiskovanja.



Slika 33: Elektroferogram (levo) in kromatogram (desno) vzorca pri katerem monoklonski imunoglobulini zakrivajo asialo-Tf. Vrednosti %CDT nismo določili z IEC metodo ($\text{IEC } \%_{\text{CDT}} = /$); medtem ko smo z obema metodama, ki omogočata grafični izpis ločenih izooblik transferina, določili povišane vrednosti %CDT ($\text{CE } \%_{\text{CDT}} = 3,7 \%$ **HPLC** $\%_{\text{CDT}} = 7,0 \%$).

Kljub temu, da je pri obeh metodah (HPLC in CE) omogočen grafični izpis izooblik, sama detekcija transferina poteka pri različnih valovnih dolžinah. Detekcija pri HPLC poteka pri 460 nm, kjer selektivno absorbira kompleks Tf-železo (44). Detekcija pri CE pa poteka pri valovni dolžini 200 nm, pri absorpcijskem maksimumu peptidne vezi in zato lahko pri tem postopku detektiramo vse beljakovine (42). To je vzrok za večjo selektivnost metode HPLC v primerjavi s CE. Mnogo več snovi lahko moti detekcijo in tudi kvantifikacijo izooblik transferina pri določanju %CDT s CE. Transferin se nahaja v β -globulinski frakciji serumskih beljakovin in zato je treba upoštevati predvsem elektroforezno gibljivost tudi drugih beljakovin (kot npr. monoklonska protitelesa, visoko poliklonsko ozadje), ki se gibljejo v območju β -2 proteinov, tako kot Tf (slika 33). Torej je v takih primerih potrebna dodatna previdnost pri interpretaciji in določitvi %CDT.



Slika 34: Elektroferogram (levo) in kromatogram (desno) vzorca s CDG sindromom tipa II. Vrednost %CDT ni bilo mogoče izmeriti ne z metodo CE in ne s HPLC; z IEC smo dobili znatno povišane vrednosti (**IEC %_{CDT} = 18,9 %**).

Pri našem delu smo pri enem vzorcu določili razpored izooblik transferina, ki je značilen za izredno redek CDG sindrom (congenital disorder of glycosilation), prirojena motnja glikozilacije. Elektroferogram in kromatogram na sliki 34 bi lahko na prvi pogled interpretirali kot genetsko varianto, vendar je bil v tem primeru dokazan CDG sindrom. Gre za redko dedno motnjo glikozilacije, ki je posledica mutacij v genskem zapisu za encime, ki sodelujejo v biosintezi glikoproteinov in drugih glikokonjugatov. Pri tej motnji ne gre za spremembe v proteinski strukturi transferina, ampak je motena glikozilacija vseh beljakovin, ki se tvorijo in glikozilirajo v jetrih. Ločimo dva tipa CDG sindroma; pri tipu I gre za moteno vezavo ali prenos glikozidov na peptidno molekulo, pri tipu II pa za moteno procesiranje glikozidnih verig, katerih posledica je popolna odsotnost ogljikohidratnih verig (tip I) ali prisotnost nenormalnih ogljikohidratnih verig (tip II). Klinični znaki CDG sindroma so prisotni že v zgodnjem otroštvu in se kažejo s hudo zaostalostjo v rasti z manjšo duševno razvitostjo.

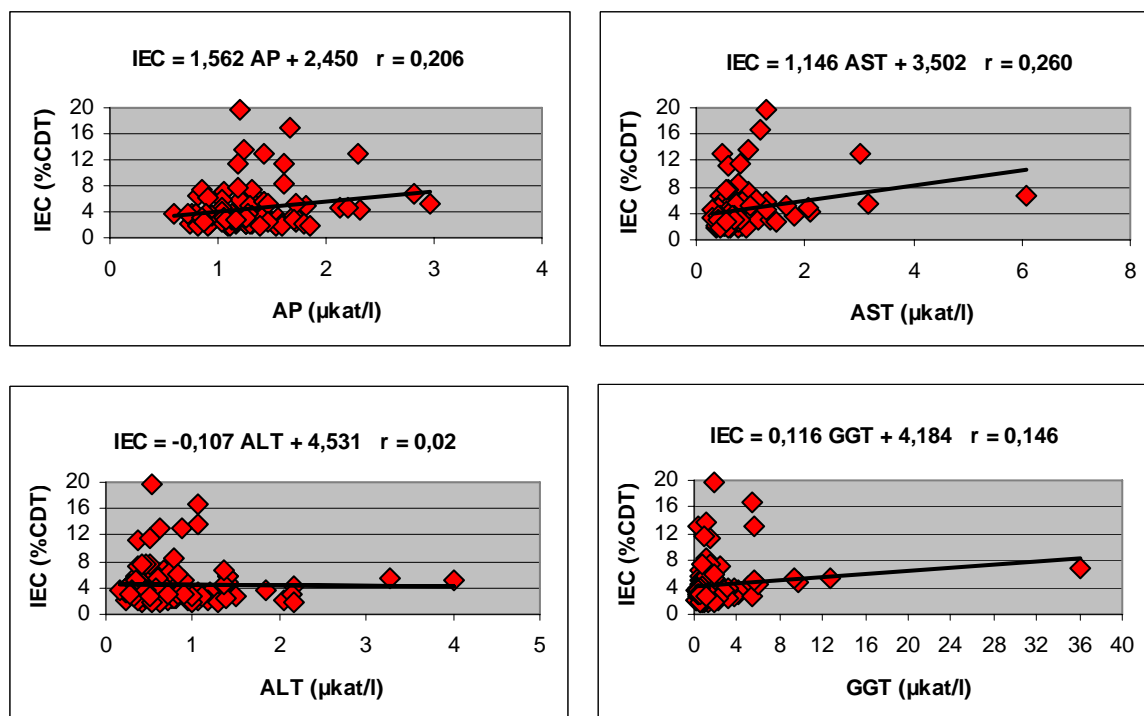
V našem primeru (CDG sindrom tipa II) gre za moteno procesiranje glikozidnih verig, zato je vrednost tetrasialotransferina zmanjšana na račun povečanega deleža trisialotransferina in tudi ostalih niskosialiniziranih izooblik transferina. Če bi imeli vzorec, kjer bi bil prisoten CDG sindrom tipa I, bi bila frakcija tetrasialotransferina odsotna ali prisotna v

zelo nizkem deležu, medtem ko bi bil prisoten izredno visok delež asialotransferina (30, 56).

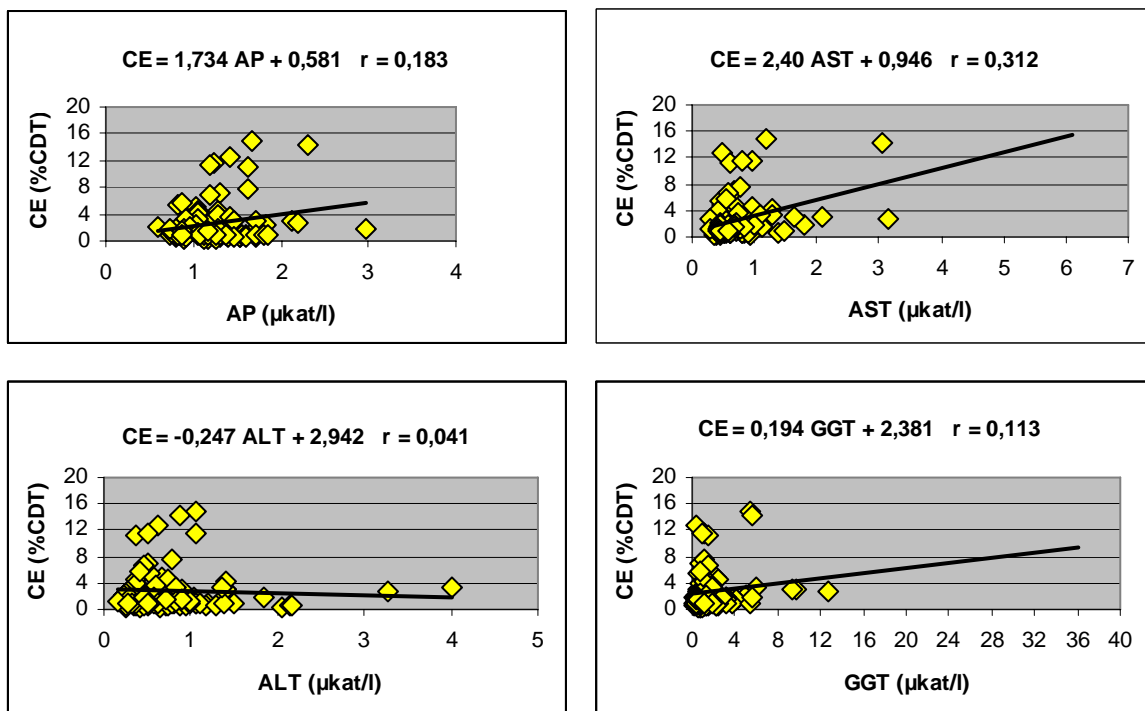
4.3 Primerjave aktivnosti encimov in vrednosti %CDT

Poleg določitve %CDT s tremi različnimi metodami, smo v vzorcih izmerili še koncentracijo katalitične aktivnosti encimov aspartat aminotransferaze, alanin aminotransferaze, gama-glutamilttransferaze in alkalne fosfataze.

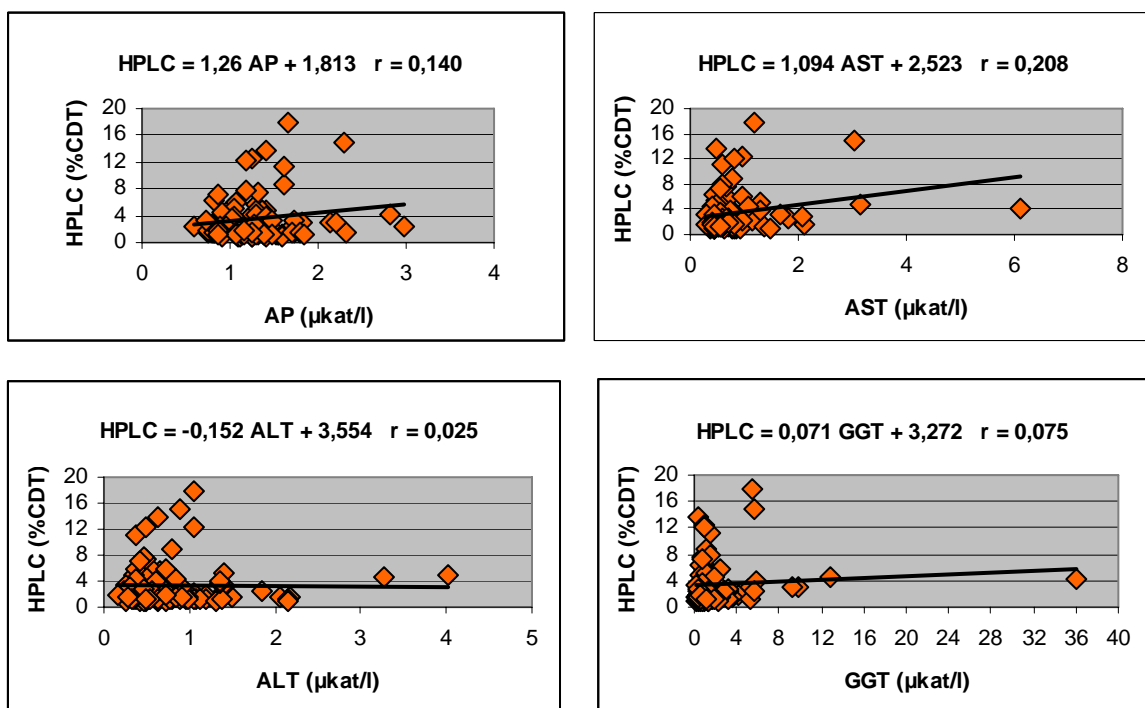
Koncentracije katalitičnih aktivnosti encimov smo primerjali z vrednostmi %CDT določenimi z vsemi tremi metodami. Za vse pare kombinacij (IEC-AP, IEC-AST, IEC-ALT, IEC-GGT, CE-AP, CE-AST, CE-ALT, CE-GGT, HPLC-AP, HPLC-AST, HPLC-ALT in HPLC-GGT) rezultatov v skupini A smo izračunali enačbo regresijske premice in Pearsonov korelacijski koeficient. Rezultati so prikazani na slikah 35-37.



Slika 35: Grafi korelacije z enačbami regresijskih premic in Pearsonovimi korelacijskimi koeficienti za vrednosti %CDT izmerjene z IEC v primerjavi z vrednostmi katalitičnih aktivnosti AP, AST, ALT in GGT.



Slika 36: Grafi korelacije z enačbami regresijskih premic in Pearsonovimi korelacijskimi koeficienti za vrednosti %CDT izmerjene s CE v primerjavi z vrednostmi katalitičnih aktivnosti AP, AST, ALT in GGT.



Slika 37: Grafi korelacije z enačbami regresijskih premic in Pearsonovimi korelacijskimi koeficienti za vrednosti %CDT izmerjene s HPLC v primerjavi z vrednostmi katalitičnih aktivnosti AP, AST, ALT in GGT.

Med %CDT določenimi z različnimi metodami in aktivnostmi jetrnih encimov ni nobene statistično značilne povezave. To je bilo pričakovano in o tem so poročali ter tudi dokazali že v mnogih raziskavah, kjer so primerjali vrednosti %CDT z vrednostmi katalitičnih aktivnosti jetrnih encimov (3, 4, 19, 57).

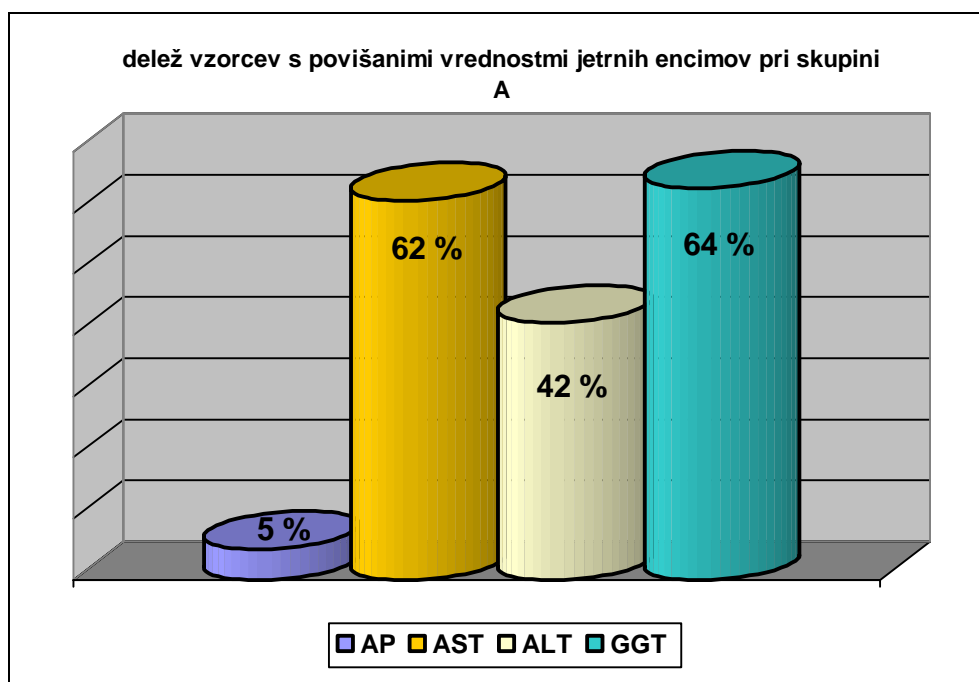
V preglednici VI so zbrani opazovani parametri za encime v skupini vzorcev 105 naključno izbranih preiskovancev (skupina A) in skupini 20 gastroenteroloških bolnikov (skupina B) skupaj z referenčnimi vrednostmi za posamezne parametre.

Za vse encime smo izračunali aritmetično sredino in standardni odklon v skupini A in jih primerjali z aritmetično sredino in standardnimi odkloni pri skupini B. Iz rezultatov je razvidno, da so vrednosti katalitičnih aktivnosti jetrnih encimov bolj povišane v skupini B. V preglednici so prikazane tudi najnižje in najvišje vrednosti, ki smo jih določili posameznim encimom.

Preglednica VI: Priporočene referenčne vrednosti, aritmetične sredine (\bar{x}), standardni odkloni (sd), najnižje vrednosti (min), najvišje vrednosti (max) in najpogostejše vrednosti (modus) za vrednosti %CDT določene s tremi testiranimi metodami (IEC, CE in HPLC) in za izmerjene katalitične aktivnosti jetrnih encimov (GGT, ALT, AST, AP) v skupini A in v skupini B.

	ref. vred.	skupina A (N=105)				skupina B (N=20)			
		$\bar{x} \pm sd$	min	max	mod.	$\bar{x} \pm sd$	min	max	mod.
IEC [%]	3,0	4,4 ± 3,1	1,8	19,6	3,0	3,9 ± 1,7	1,4	7,8	5,7
CE [%]	1,3	2,7 ± 3,5	0,3	21,5	0,8	1,0 ± 0,7	0,4	2,7	0,6
HPLC [%]	1,9	3,4 ± 3,7	0,8	23,4	1,4	1,8 ± 0,8	0,7	3,0	1,3
GGT[μ kat/l]	<0,92	2,2 ± 4,0	0,2	36,1	1,0	5,0 ± 5,2	0,5	15,6	1,6
ALT[μ kat/l]	<0,74	0,8 ± 0,6	0,2	4,0	0,5	0,8 ± 0,6	0,2	2,6	0,4
AST[μ kat/l]	<0,58	0,8 ± 0,7	0,3	6,1	0,5	1,7 ± 1,4	0,2	6,1	1,8
AP[μ kat/l]	<2,15	1,3 ± 0,4	0,6	3,0	1,3	2,1 ± 0,8	1,0	3,6	1,2

Aritmetične sredine katalitičnih aktivnosti encimov GGT, ALT in AST so bile v skupini A nad priporočenimi referenčnimi vrednostmi. Samo aritmetična sredina za AP je bila znotraj priporočenih referenčnih vrednosti.



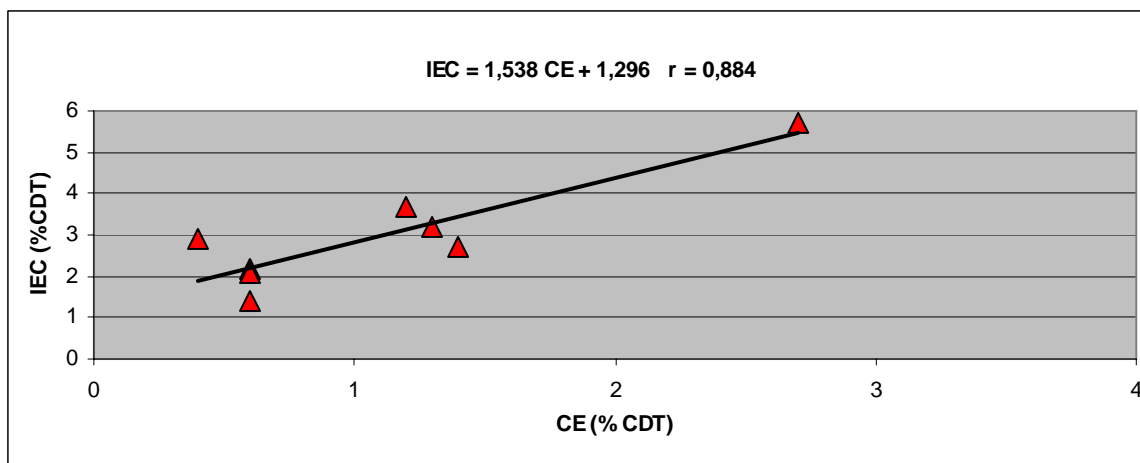
Slika 38: S stolpčnim grafikonom so predstavljeni deleži vzorcev v skupini A (N=105) s povišanimi vrednostmi katalitičnih aktivnosti encimov AP, AST, ALT in GGT.

Katalitična aktivnost GGT je bila povišana nad referenčno vrednostjo pri največjem številu vzorcev (slika 38). Pred uvedbo preiskave CDT, je GGT veljal za najbolj zanesljiv pokazatelj kroničnega alkoholizma. Od odkritja CDT leta 1976 je bilo objavljenih mnogo primerjalnih študij med GGT in CDT. Nekateri avtorji so predlagali kombinacijo obeh, s čimer bi se povečala zanesljivost samega diagnosticiranja kroničnega uživanja alkoholnih pijač (4, 10). Pri našem delu nismo med vrednostmi %CDT izmerjenimi s katerokoli izmed treh metod in vrednostmi GGT dokazali statistično značilne povezave.

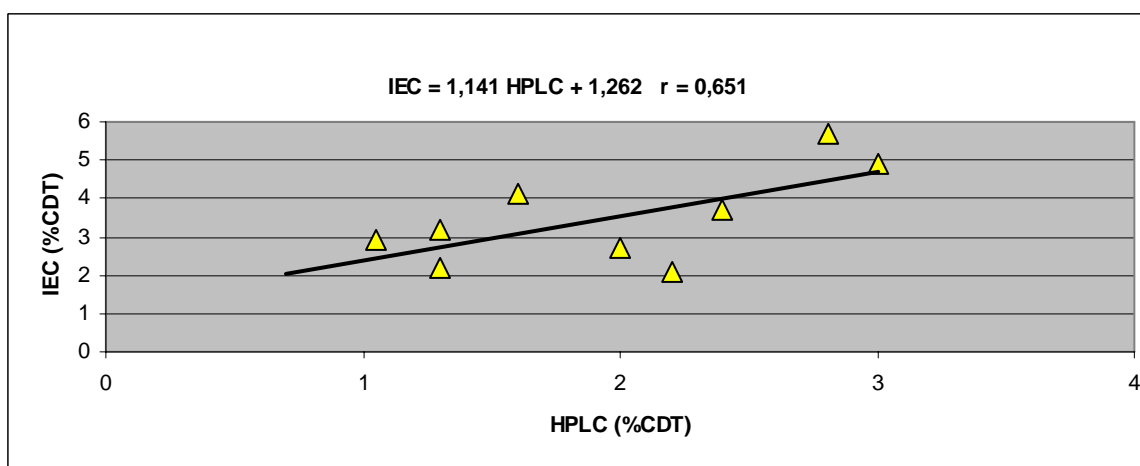
4.4 Skupina gastroenteroloških bolnikov

Ločeno smo statistično ovrednotili tudi skupino vzorcev 20 gastroenteroloških bolnikov (skupina B), znotraj katere se je pokazala večja variabilnost rezultatov %CDT.

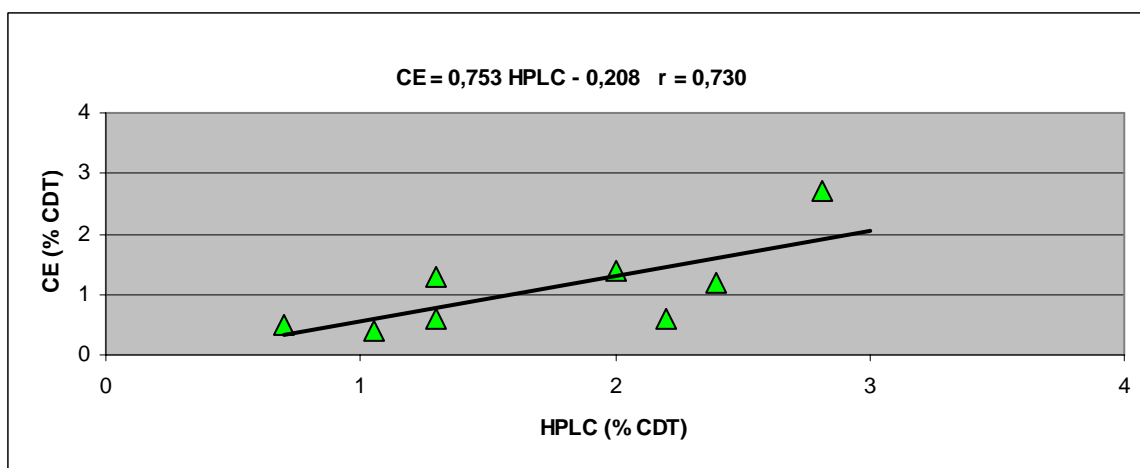
Primerjali smo vrednosti %CDT izmerjene s tremi opazovanimi metodami za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov in za vse tri pare kombinacij (CE-IEC, HPLC-IEC in HPLC-CE) izračunali enačbo regresijske premice in Pearsonov korelacijski koeficient. Rezultati so prikazani na slikah 39, 40 in 41.



Slika 39: Graf korelacije z enačbo regresijske premice in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom za vrednosti %CDT izmerjene s CE in IEC pri skupini B, (N=20).



Slika 40: Graf korelacije z enačbo regresijske premice in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom za vrednosti %CDT izmerjene s HPLC in IEC pri skupini B, (N=20).



Slika 41: Graf korelacije z enačbo regresijske premice in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom za vrednosti %CDT izmerjene s HPLC in CE pri skupini B (N=20).

Metoda najmanjših kvadratov ni pokazala tako dobre korelacije rezultatov med vsemi tremi metodami, kot znotraj skupine A. Najboljša korelacija v skupini B je bila med IEC in CE, kar nam dokazuje najvišji Pearsonov korelacijski koeficient. Vzrok za večjo variabilnost rezultatov bi lahko pripisali premajhnemu številu vzorcev za primerjavo. Če bi želeli dokazati, da vse tri opazovane metode za določanje %CDT med seboj korelirajo tudi v skupini B, bi morali vrednotiti večje število vzorcev. Ker pa smo vrednotili samo 20 vzorcev bolnikov iz gastroenterološke klinike, pri katerih vrednosti %CDT zaradi prisotnih bolezni oziroma motečih snovi nismo mogli določiti z vsemi tremi metodami, ne moremo trditi, da metode med seboj korelirajo tudi pri obravnavanju skupine gastroenteroloških bolnikov.

Statistična analiza 20 vzorcev s t-testom je pokazala značilno razliko med vsemi tremi primerjanimi pari IEC in CE ($P < 0,01$), med parom IEC in HPLC ($P < 0,01$) ter med parom CE in HPLC ($P < 0,01$).

Za preiskovance iz skupine B smo dobili podatke o kliničnem stanju posameznikov, ki je prikazano v preglednici VII.

Preglednica VII: Pregled kliničnega stanja posameznikov v skupini B.

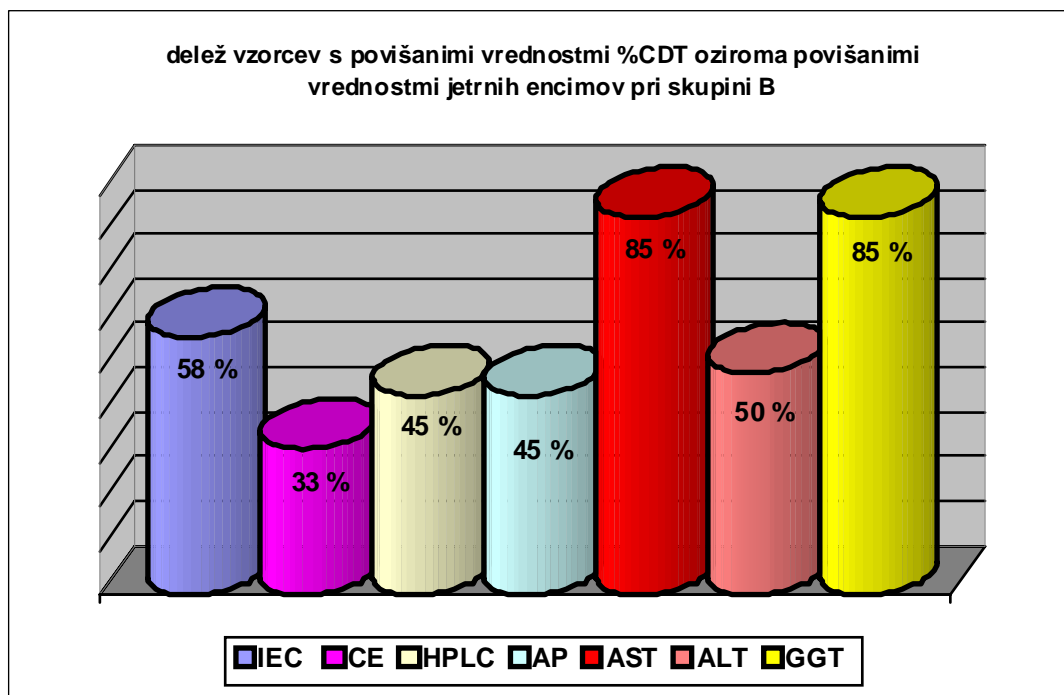
klinična slika	število primerov
steatoza jeter (maščobna infiltracija jeter)	2
alkoholni hepatitis	4
akutni pankreatitis (bolezen pankreasa z nenadno hudo bolečino v trebuhu, s siljenjem na bruhanje in bruhanjem, ki jo povzročajo zloraba alkohola, žolčni kamni, virusi)	3
hepatopatija (katerakoli bolezen jeter)	3
jetrna ciroza	4
alkoholna jetrna ciroza	4
alkoholna odpoved jeter	1
patološki jetrni testi	1
nenormalna izguba telesne teže	1
sindrom odvisnosti zaradi uživanja alkohola	2
duodenalni ulkus (razjeda dvanajstnika)	1
akutna anemija po krvavitvi	1
arterijska hipertenzija	1
putika	1
sepsa	1
akutni peritonitis (vnetje peritoneja s hudo bolečino v trebuhu)	2
kronični alkoholni pankreatitis	1
mikrocitna anemija	1

Pri nekaterih posameznikih je bilo diagnosticiranih več različnih stanj in ne samo eno. Pri vzorcih bolnikov z jetrno cirozo (alkoholno/nealkoholno) vrednosti %CDT nismo mogli določiti z vsemi tremi metodami. V primerih, ko smo %CDT lahko določili z IEC metodo, smo dobili povišane vrednosti %CDT, pri drugih dveh metodah (CE in HPLC) pa smo dobili značilno sliko izooblik transferina; v elektroferogramu in kromatogramu se pika disialotransferina in trisialotransferina nista ločila (slika 32). Pri teh vzorcih smo hkrati določili povišane vrednosti katalitičnih aktivnosti opazovanih jetrnih encimov. Iz našega

dela sledi, da lahko že iz same analize CDT z eno izmed metod z grafičnim prikazom rezultatov, sklepamo na prisotnost jetrne ciroze.

Aritmetične sredine katalitičnih aktivnosti encimov GGT, ALT in AST so bile prav tako kot v skupini A tudi v skupini B nad priporočenimi referenčnimi vrednostmi (preglednica VI). Samo aritmetična sredina za AP je bila nekoliko pod priporočenimi referenčnimi vrednostmi.

Iz primerjave povišanih vrednosti %CDT in povišanih katalitičnih aktivnosti encimov pri skupini B je razvidno, da so vrednosti jetrnih encimov povišane v večjem številu primerov kot vrednosti %CDT (slika 42). Vrednosti jetrnih encimov se spremenijo ob vsaki spremembi v delovanju jeter, ne glede na vzrok. To je tudi razlog, da so jetrni encimi manj specifični pri dokazovanju škodljive rabe alkoholnih pijač od vrednosti CDT.



Slika 42: S stolpčnim grafikonom so predstavljeni deleži vzorcev s povišanimi vrednostmi %CDT določenimi z IEC, CE in HPLC ter deleži vzorcev s povišanimi katalitičnimi aktivnostmi jetrnih encimov AP, AST, ALT in GGT pri skupini B (N=20).

Iz preglednice VIII je razvidno, da so pri skupini A katalitične aktivnosti opazovanih encimov nad priporočenimi referenčnimi vrednostmi manj pogoste kot pri skupini B. Iz

klinične slike gastroenteroloških preiskovancev je razvidno, da so vrednosti %CDT povišane le pri boleznih jeter povezanih z uživanjem alkoholnih pijač.

Preglednica VIII: Primerjava deleža vzorcev s povišanimi vrednostmi %CDT in povišanimi vrednostmi jetrnih encimov v skupini A in v skupini B.

		skupina A (N=105)	skupina B (N=20)
	ref. vred.	Delež povišanih vrednosti	
IEC [%]	3,0	65 %	58 %
CE [%]	1,3	55 %	33 %
HPLC [%]	1,9	55 %	45 %
GGT[μ kat/l]	<0,92	64 %	85 %
ALT[μ kat/l]	<0,74	42 %	50 %
AST[μ kat/l]	<0,58	62 %	85 %
AP [μ kat/l]	<2,15	5 %	45 %

CDT velja za izredno dober pokazatelj škodljive rabe alkoholnih pijač. Povpraševanje in potreba po določanju le-tega sta vedno večja, zato morajo biti metode hitre, zanesljive, omogočiti analizo čim večjega števila vzorcev v čim krajšem času ter hkrati omogočiti sledenje in dokumentacijo vseh rezultatov. Vse tri opazovane metode za določanje CDT so primerne za rutinsko uporabo v kliničnih laboratorijih in so bolj ali manj avtomatizirane. Pri metodi HPLC s sistemom Variant je sicer potrebna ročna predpriprava vzorcev seruma, ki je nezahtevna in standardizirana. Določanje CDT s CE na Capillarys 2 pa je popolnoma avtomatiziran postopek; ročna predpriprava vzorcev seruma (nasičenje transferina z železom) ni potrebna, ker poteka v samem analizatorju. Pri postopku IEC je potrebnega več ročnega dela. Vzorce je potrebno inkubirati (nasiti molekule transferina z železom), nato sledi elucija na anionsko izmenjevalnih kolonah, redčenje vzorca, merjenje koncentracije izooblik transferina v eluatu ter tudi končno računanje vrednosti %CDT.

Slabost IEC metode je prav tako analiza omejenega števila vzorcev; zaradi večje količine ročnega dela z vzorci je analiza 8 vzorcev končana najprej v 2,5 urah. Z metodo HPLC lahko analiziramo 6 vzorcev na uro, medtem ko lahko s testirano metodo CE analiziramo 38 vzorcev na uro. Najbolj učinkovita metoda s stališča števila analiz opravljenih v določenem času je torej CE, kar nedvomno predstavlja veliko prednost pred ostalima metodama za uporabnost v kliničnem laboratoriju.

Glavna prednost HPLC in CE v primerjavi z IEC je grafični izpis ločenih izooblik transferina, kjer lahko poleg same vrednosti %CDT dobimo tudi vpogled na prisotne izooblike Tf v vzorcu in njihovo razporeditev. Samo s pomočjo metod, ki omogočajo grafičen prikaz (CE in HPLC) izooblik transferina, lahko dobimo podatke o genetskih variantah in CDG sindromu. Tega z metodo IEC, kjer je rezultat samo številčna vrednost, ne moremo določiti.

Z metodo IEC smo določili več pozitivnih rezultatov %CDT, kot s CE in HPLC. Verjetno smo z IEC dobili določen delež lažno pozitivnih rezultatov. Nedvomno je potrebno vsak povišan rezultat %CDT določen z IEC metodo, ki ni skladen s klinično sliko preiskovanca, preveriti z eno izmed ustreznih metod, ki omogoča grafični izpis ločenih izooblik transferina (HPLC ali CE).

Metodi HPLC in CE sta, kot smo pri našem delu dokazali, med seboj enakovredni. Metoda HPLC trenutno velja za prehodno referenčno metodo, ki jo bo zamenjala ustrezna referenčna masna spektroskopija, ko bo le-ta na voljo. Vzrok temu je valovna dolžina, pri kateri poteka detekcija transferinskih izooblik. Pri metodi CE le-ta poteka pri valovni

dolžini 200 nm, kjer lahko detekcijo motijo vse beljakovine z elektroforezno gibljivostjo v območju β -proteinov. Pri HPLC metodi pa poteka detekcija pri valovni dolžini 460 nm, kjer selektivno absorbira samo kompleks Tf-železo. Zaradi detekcije pri kateri je verjetnost za lažno pozitivne vrednosti manjša je bila za prehodno referenčno metodo izbrana metoda HPLC. Po priporočilih s strani IFCC bi morala biti referenčna metoda za določanje CDT takšna, da bi jo lahko uporabljali v vseh laboratorijih, da bi z njo lahko določali tudi vzorce z genetskimi variantami transferina oziroma da bi lahko z njo prepoznali takšne vzorce. Najbolj primerna za referenčno metodo je masna spektrometrija. Dokler pa le-ta ne bo na voljo, je najbližja referenčni metodi metoda HPLC, ki velja za prehodno referenčno metodo.

5. Sklep

Pri našem delu smo primerjali tri najpogosteje uporabljane metode za določanje CDT: ionsko izmenjevalno kromatografijo z imunoturbidimetrično detekcijo (IEC), kapilarno elektroforezo (CE) in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Pri primerjavi vrednosti CDT določenimi s tremi različnimi metodami smo ugotovili, da so vse metode zanesljive in med seboj korelirajo ter so ustrezne za uporabo v kliničnih laboratorijih. Metode med seboj korelirajo tako znotraj kot tudi izven območja vrednosti CDT, v katerem je proizvajalec testiral linearnost.

Nedvomno je velika prednost metod HPLC in CE grafični prikaz ločenih izooblik transferina, ki pri IEC ni mogoč. Pri obeh metodah (HPLC in CE) lahko spremljamo ločevanje izooblik transferina, kar nam je omogočilo vpogled na prisotnost različnih izooblik transferina, genetskih variant in CDG sindroma. Rezultat pri metodi IEC je samo številčna vrednost, pri kateri je v primeru povišanih vrednosti CDT potrebna previdnost pri interpretaciji. Pri našem delu smo določili z metodo IEC večji delež vzorcev s povišanimi vrednostmi CDT, kot smo jih določili s HPLC in CE. S poznavanjem kliničnega ozadja preiskovancev testiranih vzorcev bi lahko sklepali ali so ti rezultati lažno pozitivni. Vrednosti CDT, določene z IEC, so lahko lažno povišane zaradi vpliva motečih snovi, genetskih variant, hudih poškodb jeter, vzrok katerih pa ni škodljivo uživanje alkoholnih pijač. Zato priporočamo, da se vsak povišan rezultat %CDT, ki je bil določen z metodo, s katero dobimo kot rezultat samo številčno vrednost in ni v skladu s klinično sliko preiskovanca, preveri z eno izmed ustreznih metod, pri kateri so rezultati prikazani z grafičnim izpisom ločenih izooblik transferina (HPLC ali CE).

Prav tako smo ugotovili, da sta metodi HPLC in CE med seboj enakovredni. Testirana CE metoda je bolj primerna za vsakdanjo rabo v kliničnih laboratorijih zaradi večje kapacitete opravljenih analiz v časovni enoti, kot HPLC. Vendar slednja trenutno velja za prehodno referenčno metodo in je lahko v določenih primerih uporabna za razjasnitev dvomljivih rezultatov določenih s CE. Metodo HPLC bo zamenjala ustrezna referenčna masna spektroskopija, ko bo le-ta na voljo.

Značilne povezave med vrednostmi CDT, določenimi s tremi različnimi metodami in katalitičnimi aktivnostmi encimov aspartat aminotransferaza, alanin aminotransferaza, gama-glutamilttransferaza in alkalna fosfataza nismo ugotovili.

V skupini gastroenteroloških bolnikov nismo uspeli dokazati, da metode med seboj korelirajo. Vzrok temu bi lahko pripisali premajhnemu številu vzorcev za primerjavo. Pri vzorcih bolnikov z jetrno cirozo vrednosti CDT nismo mogli določiti v vseh primerih z vsemi tremi metodami. Vendar pa smo ugotovili, da lahko nanjo sklepamo že iz same analize CDT z eno izmed metod, ki omogoča grafični prikaz ločenih transferinskih izooblik; pri preiskovancih z jetrno cirozo se v kromatogramu in elektroferogramu izoobliki disialo- in trisialotransferina ne ločita. V skupini gastroenteroloških bolnikov smo ugotovili, da so bile vrednosti jetrnih encimov pogosteje in bolj povišane kot vrednosti CDT. Vrednosti CDT so bile povišane le pri boleznih jeter, povezanimi z uživanjem alkoholnih pijač. Prav tako sta bila pri bolnikih z jetrno cirozo vedno prisotna značilen elektroferogram in kromatogram.

6. Literatura

1. Šešok J, et al: Poraba alkohola in kazalci škodljive rabe alkohola v Sloveniji v letu 2005, Inštitut za varovanje zdravja RS 2006.
2. Možina M, Jamšek M, Zastrupitve. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, tretja izdaja, Založba Littera Picta, Ljubljana, 2005: 1444-1469.
3. Stibler H: Carbohydrate-Deficient Transferrin in Serum: a New Marker of Potentially Harmful Alcohol Consumption Reviewed. Clin Chem 1991; 37(12): 2029-2037.
4. Bortolotti F, De Paoli G, Tagliaro F: Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: A critical review of the literature 2001-2005. J Chromatogr B. 2006; 841: 96-109.
5. European Pharmacopoeia 6th Edition. Edqm – European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care Council of Europe 2007; Vol 2: 1831-1833.
6. The complete drug reference: Martindale 35th Edition, Pharmaceutical Press, London, 2007; Vol 1: 1462-1465.
7. Ramovš J: Alkoholno omamljen, 2 izdaja, Mohorjeva družba Celje 1986: 46-82.
8. Štepec S, Alkoholna jetrna bolezen. V: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, tretja izdaja, Založba Littera Picta, Ljubljana, 2005: 589-592.
9. Zakhari S: Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body? Alcohol research & Health 2006; Vol. 29, No. 4: 245-254.
10. Niemelä O: Biomarkers in alcoholism. Clinica Chimica Acta 2007; 377: 39-49.
11. Mendenhall CL, Weesner RE, Alcoholism. V: Kaplan LA, Pesce AJ: Theory, analysis and correlation. Clinical chemistry, 3.izdaja, Mosby, ZDA 1996; 682-695.
12. Helander A, Beck O, Jones AW: Laboratory testing for recent alcohol consumption: comparison of ethanol, methanol, and 5-hydroxytryptophol. Clin Chem 1996; 42(4): 618-624.
13. Das SK, Nayak P, Vasudevan DM: Biochemical markers for alcohol consumption. Indian J Clin Biochem 2003; 18(2): 111-118.
14. Conigrave KM, Saunders JB, Reznik RB, Whitfield JB: Prediction of Alcohol-related harm by laboratory test results. Clin Chem 1993; 39(11): 2266-2270.
15. Rosman AS, Lieber CS: Diagnostic utility of laboratory tests in alcoholic liver disease. Clin Chem 1994; 40(8): 1641-1651.

16. Prezelj M, Zorec-Karlovšek M: Transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov v diagnostiki škodljive rabe alkohola. *Farm Vestn* 2002; 53: 41-49.
17. Bendtsen P, Wayne Jones A, Helander A: Urinary excretion of methanol and 5-hydroxytryptophol as biochemical markers of recent drinking in the hangover state. *Alcohol & Alcoholism* 1998; 33(4): 431-438.
18. Wurst FM, Alexson S, Wolfersdorf M, Bechtel G, Forster S, Alling C, Aradottir S, Jachau K, Huber P, Allen JP, Auwärter V, Pragst F: Concentration of fatty acid ethyl esters in hair of alcoholics: comparison to other biological state markers and self reported ethanol intake. *Alcohol & Alcoholism* 2004; 39(1): 33-38.
19. Arndt T: Carbohydrate-deficient Transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: A critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin Chem* 2001; 47(1): 13-27.
20. Helander A, Olsson I, Dahl H: Postcollection Synthesis of Ethyl Glucuronide by Bacteria in Urine May Cause False Identification of Alcohol Consumption. *Clin Chem* 2007; 53(10): 1855-1863.
21. Helander A, Dahl H: Urinary Tract Infection: A Risk Factor for False-Negative Urinary Ethyl Glucuronide but Not Ethyl Sulfate in the Detection of Recent Alcohol Consumption. *Clin Chem* 2005; 51(9): 1728-1730.
22. Wu C, Kenny MA: Circulating total and ionized magnesium after ethanol ingestion. *Clin Chem* 1996; 42(4): 625-629.
23. Harasymiw J, Bean P: The combined use of the early detection of alcohol consumption (EDAC) test and carbohydrate-deficient transferrin to identify heavy drinking behaviours in males. *Alcohol & Alcoholism* 2001; 36(4): 349-353.
24. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB: Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests. *Clin Chem* 2000; 46(12): 2027-2049.
25. Štepec S, Bolezni jeter. V: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: *Interna medicina, tretja izdaja*, Založba Littera Picta, Ljubljana, 2005: 565-573.
26. Sherwin JE, Sobenes JR, Liver function. V: Kaplan LA, Pesce AJ: *Theory, analysis and correlation. Clinical chemistry, 3. izdaja*, Mosby, ZDA 1996; 505-527.
27. Sillanaukee P, Olsson U: Improved diagnostic classification of alcohol abusers by combining carbohydrate-deficient transferrin and γ -Glutamyltransferase. *Clin Chem* 2001; 47(4): 681-685.

28. First MR, Renal function. V: Kaplan LA, Pesce AJ: Theory, analysis and correlation. Clinical chemistry, 3.izdaja, Mosby, ZDA 1996; 484-504.
29. Das SK, Vasudevan DM: Biochemical diagnosis of alcoholism. Indian J Clin Biochem 2005; 20(1): 35-42.
30. Das SK, Vasudevan DM: Should we use carbohydrate deficient transferrin as a marker for alcohol abusers? Indian J Clin Biochem 2004; 19(1): 36-44.
31. Schreiber WE, Iron, porphyrin, and bilirubin metabolism. V: Kaplan LA, Pesce AJ: Theory, analysis and correlation. Clinical chemistry, 3.izdaja, Mosby, ZDA 1996; 696-715.
32. Stibler H, Kjellin KG: Isoelectric focusing and electrophoresis of the CSF proteins in tremor of different origins. J Neurol Sci, 1976; 30: 269-285.
33. Musshoff F: Chromatographic methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption. J of Chromatography B 2002; 781: 457-480.
34. Dibbelt L: Does Trisialo-Transferrin Provide Valuable Information for the Laboratory Diagnosis of Chronically Increased Alcohol Consumption by Determination of Carbohydrate-deficient Transferrin? Clin Chem 2000; 46: 1203-1205.
35. Storey EL, Mack U, Powell LW, Halliday JW: Use of Chromatofocusing to Detect a Transferrin Variant in Serum of Alcoholic Subjects. Clin Chem 1985; 31(9): 1543-1545.
36. Whitfield JB, Fletcher LM, Murphy TL, Powell LW, Halliday J, Heath AC, Martin NG: Smoking, obesity, and hypertension alter the dose-response curve and test sensitivity of carbohydrate-deficient transferrin as a marker of alcohol intake. Clin Chem 1998; 44(12): 2480-2489.
37. Hackler R, Arndt T, Helwig-Rolig A, Kropf J, Steinmetz A, Schaefer JR: Investigation by Isoelectric Focusing of the Initial Carbohydrate-deficient Transferrin (CDT) and non-CDT Transferrin Isoform Fractionation Step Involved in Determination of CDT by the ChronAlcol.D. Assay. Clin Chem 2000; 46(4): 483-492.
38. Schwarz MJ, Domke I, Helander A, Janssens PMW, van Pelt J, Springer B, Ackenheil M, Bernhardt K, Weigl G, Soyka M: Multicentre evaluation of a new assay for determination of carbohydrate-deficient transferrin. Alcohol Alcohol 2003; 38(3): 270-275.

39. Delanghe JR, Helander A, Wielders JPM, Pekelharing JM, Roth HJ, Schellenberg F, Born C, Yagmur E, Gentzer W, Althaus H: Development and Multicenter Evaluation of the N Latex CDT Direct Immunonephelometric Assay for Serum Carbohydrate-Deficient Transferrin. *Clin Chem* 2007; 53(6): 1115-1121.
40. Jeppsson JO, Arndt T, Schellenberg F, Wielders JPM, Anton RF, Whitfield JB, Helander A, IFCC: Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45(4): 558-562.
41. Navodila proizvajalca iz originalnega pakiranja reagentov %CDT 2nd generation Tina-quant %CDT. Roche Diagnostics, 2002-02.
42. Navodila proizvajalca Capillarys CDT. Sebia, Ref. 2008, 2005.
43. Landers JP: Clinical Capillary Electrophoresis. *Clin Chem* 1995; 41(4): 495-509.
44. Navodila proizvajalca iz originalnega pakiranja reagentov %CDT by HPLC. Bio-Rad, 2006.
45. Helander A, Husa A, Jeppsson JO: Improved HPLC Method for Carbohydrate-deficient Transferrin in Serum. *Clin Chem* 2003; 49(11): 1881-1890.
46. NCCLS approved guideline EP9-A2: Method comparison and bias estimation using patient samples. Clinical and laboratory standards institute, 2002; 22(19).
47. Navodila proizvajalca iz originalnega pakiranja reagentov AST (ASAT/GOT). Roche Diagnostics, 2005-04.
48. Navodila proizvajalca iz originalnega pakiranja reagentov ALT (ALAT/GPT). Roche Diagnostics, 2005-04.
49. Navodila proizvajalca iz originalnega pakiranja reagentov GGT. Roche Diagnostics, 2006-08.
50. Navodila proizvajalca iz originalnega pakiranja reagentov ALP. Roche Diagnostics, 2006-11.
51. Arndt T, Kropf J: Alcohol Abuse and Carbohydrate-deficient Transferrin Analysis: Are Screening and Confirmatory Analysis Required? *Clin Chem* 2002; 48(11): 2072-2074.
52. Helander A, Eriksson G, Stibler H, Jeppsson JO: Interference of Transferrin Isoform Types with Carbohydrate-deficient Transferrin Quantification in the Identification of Alcohol Abuse. *Clin Chem* 2001; 47(2):1225-1233.

53. Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, Trevisan MT, Floreani M, Tagliaro F: Analysis of Carbohydrate-Deficient Transferrin: Comparative Evaluation of Turbidimetric Immunoassay, Capillary Zone Electrophoresis, and HPLC. *Clin Chem* 2005; 51(12): 2368-2371.
54. Arndt T: Asialotransferrin-An Alternative to Carbohydrate-deficient Transferrin? *Clin Chem* 2003; 49(6): 1022-1023.
55. Wuyts B, Delanghe JR, Kasvosve I, Wauters A, Neels H, Janssens J: Determination of Carbohydrate-Deficient Transferrin Using Capillary Zone Electrophoresis. *Clin Chem* 2001; 47(2): 247-255.
56. Helander A, Bergström J, Freeze HH: Testing for Congenital Disorders of Glycosylation by HPLC Measurement of Serum Transferrin Glycoforms. *Clin Chem* 2004; 50(5): 954-958.
57. Anton RF, Dominick C, Bigelow M, Westby C, CDTECT Research Group: Comparison of Bio-Rad %CDT TIA and CDTECT as Laboratory Markers of Heavy Alcohol Use and Their Relationships with γ -Glutamyltransferase. *Clin Chem* 2001; 47(10): 1769-1775.