

АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В НАРКОЛОГИИ

doi: 10.47877/0234-0623_2021_04_14

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДОСТОВЕРНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ КАРБОГИДРАТ-ДЕФИЦИТНОГО ТРАНСФЕРРИНА (CDT) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХРОМАТОГРАФА ЖИДКОСТНОГО И СИСТЕМЫ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Клименко Т.В.^{1,2}, Аркус М.Л.¹, Ерощенко Н.Н.¹, Сеньшинов И.В.¹, Еганов А.А.¹
arkus.m@serbsky.ru

- ¹ Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского
Национальный научный центр наркологии
г. Москва, Россия
- ² Всероссийской государственной академии правосудия
г. Москва, Россия

Статья поступила 15.02.2021

Представлены результаты сравнительного исследования двух различных технических подходов определения карбогидрат-дефицитного трансферрина (CDT) в аспекте их сопоставимой эффективности по установлению уровня CDT в биологическом материале лиц с различным объемом потребления алкоголя: автоматической системы капиллярного электрофореза и технологии хроматографии. В ходе проведенного исследования определена степень совпадения измеряемых величин для исследуемых приборов и показано, что исследованные технологии имеют высокую корреляцию при определении уровня CDT у пациентов с алкогольной зависимостью.

Ключевые слова: трансферрин, углевод-дефицитный трансферрин, карбогидрат-дефицитный трансферрин, капиллярный электрофорез, жидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, алкоголь, алкоголизм.

Об авторах:

Клименко Татьяна Валентиновна – д-р мед. наук, профессор, и.о. директора ННЦ наркологии, филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России; профессор кафедры уголовно-процессуального права и криминалистики Всероссийского государственного университета юстиции (РПА Минюста России).

Аркус Максим Леонидович – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. ННЦ наркологии, филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России.

Ерощенко Николай Николаевич – науч. сотр. ННЦ наркологии, филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России.

ВВЕДЕНИЕ

Трансферрин – гликопротеин β 1-глобулиновой фракции, участвующий в транспорте железа в организме. Трансферрин присутствует в крови в виде различных изоформ, отличающихся составом углеводных цепей. Состав углеводных цепей трансферрина различается в зависимости от количества присоединенных остатков сиаловых кислот в его молекуле, которое может достигать до восьми. В норме трансферрин представлен преимущественно пента-, тетра-, три- и дисиалотрансферрином [1; 2]. Процентное содержание этих изоформ в сыворотке крови строго упорядочено и у здорового человека составляет: <1,5% для гептасиалотрансферрина; 1–3% для гексасиалотрансферрина; 12–18% для пентасиалотрансферрина; 64–80% для тетрасиалотрансферрина; 4,5–9% для трисиалотрансферрина и <2,5% для дисиалотрансферрина. Асиало-, моносиало- и октасиалотрансферрин в норме не детектируются или обнаруживаются в незначительных концентрациях: <0,5% для асиалотрансферрина, <0,9% для моносиалотрансферрина [10].

Хроническое употребление алкоголя в объеме более 40 г этанола в сутки приводит к угнетению гликозилирования трансферрина, в результате чего возрастает содержание изоформ со сниженным количеством остатков сиаловых кислот, которые оценивают суммарно как углевод-дефицитный трансферрин или карбогидрат-дефицитный трансферрин (CDT). При хроническом употреблении алкоголя механизм повышения уровня CDT сформирован множеством патогенетических звеньев [11; 12; 13]. Биохимические процессы в организме подвергаются следующему влиянию этанола и его главного метаболита – ацетальдегида:

- повышение активности сиалидазы (нейраминидазы) гепатоцитов и усиление гидролиза связей между остатком N-ацетилнейраминаовой кислоты и сиаловой кислотой;
- подавление активности галактозилтрансферразы и N-ацетилглюкозаминилтрансферазы в аппарате Гольджи;
- подавление экспрессии генов, кодирующих сиалилтрансферразу.

Как результат, при синтезе гликопротеинов происходит нарушение гликозилирования (галактозилтрансферраза не присоединяет к гликопротеинам галактозу, а сиалилтрансферраза не присоединяет остатки сиаловых кислот) и образование их мало- и асиалированных форм.

Для мониторинга хронического злоупотребления алкоголем в клинической практике определяют фракцию трансферрина CDT [10]. Основную часть CDT составляет дисиалотрансферрин. При прекращении употребления алкоголя повы-

Сеньшинов Игорь

Владиславович – специалист
ННЦ наркологии, филиала ФГБУ
«Национальный медицинский
исследовательский центр
психиатрии и наркологии им.
В.П. Сербского» Минздрава Рос-
сии.

Еганов Александр

Анатольевич – специалист
ННЦ наркологии, филиала ФГБУ
«Национальный медицинский
исследовательский центр
психиатрии и наркологии им. В.П.
Сербского» Минздрава России.

шенное содержание CDT сохраняется до 2 недель в течение периода полувыведения трансферрина, после чего результаты теста нормализуются [10]. Когда количество CDT превышает 1,6% по отношению к другим изоформам, это расценивают как показатель хронического злоупотребления алкоголем [13].

Согласно выводам рабочей группы, созданной под эгидой Международной федерации клинической химии и лабораторной медицины (IFCC), для стандартизации анализа и повышения специфичности показателя CDT рекомендуется использовать методы ВЭЖХ и капиллярного электрофореза для проведения качественного и количественного анализа CDT [11].

Последние годы Минздравом России исследование CDT было включено в перечень обязательных методов обследования при проведении различных профилактических медицинских осмотров, медицинских освидетельствований и в порядке диспансерного наблюдения за лицами с психическими и поведенческими расстройствами вследствие употребления алкоголя у врача психиатра-нарколога [4; 5; 6; 7]. Для проведения данного исследования медицинские наркологические организации практически во всех субъектах страны закупили автоматическую систему капиллярного электрофореза "Minicap" (Sebia, Франция) и используют импортные реактивы для производства данного исследования.

В соответствии с государственной программой импортозамещения [1], реализация которой становится все более актуальной в условиях санкционной политики по отношению к Российской Федерации, актуальной задачей является совершенствование лабораторных методов контроля уровня CDT, в том числе создание отечественных аналитических приборов, обладающих характеристиками, сравнимыми с зарубежными аналогами.

Целью настоящего исследования стало сравнительное исследование двух различных технических подходов определения CDT – автоматической системы капиллярного электрофореза и технологии хроматографии – в аспекте их сопоставимой эффективности по установлению уровня CDT в биологическом материале лиц с различным объемом потребления алкоголя. Для этой цели сравнивались результаты, полученные с использованием двух приборов: 1) "Minicap" (Sebia, Франция) и 2) хроматографа жидкостного портативного «Близар CDT» (ООО «НПО Близар», Россия).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения испытаний использовалось 210 образцов свежееотобранной в пробирки сыворотки крови, которые в зависимости от клинической характеристики обследованных лиц были разделены на следующие группы:

- образцы группы А были получены от условно здоровых лиц из числа сотрудников клиники ННЦ наркологии, филиала ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России (далее – Центр) (N = 32);

- образцы группы Б были получены от пациентов с диагнозом F10.3 «Алкогольная зависимость. Синдром отмены алкоголя» или F10.0 «Алкогольная зависимость. Острая интоксикация алкоголем» в день их госпитализации в клинику ННЦ наркологии для лечения в стационарных условиях (N = 96);
- образцы группы В были получены от пациентов с диагнозом F10.3 «Алкогольная зависимость. Синдром отмены алкоголя» или F10.0 «Алкогольная зависимость. Острая интоксикация алкоголем», которые находились на стационарном лечении в клинике Центра не менее 14 дней (N = 82).

Диагностика, лечение и оценка эффективности лечения пациентов проводились в соответствии с утвержденными Министерством здравоохранения Российской Федерации клиническими рекомендациями соответствующих нозологий [3; 8].

Диагностика психических и поведенческих расстройств вследствие употребления алкоголя проводилась в соответствии с МКБ-10 [9]. Использовались клинико-психопатологический, психометрический, лабораторный методы исследования.

Все образцы были промаркированы цифровым кодом. Затем каждый образец был разделен на 2 аликвоты (аликвота А и Б) объемом не менее 1,5 мл в пробирки типа Eppendorf, каждая из которых была промаркирована соответствующим образом: код аликвоты А или Б и номер образца в виде цифр. Образцы аликвоты А предназначались для анализа методом капиллярного электрофореза, образцы аликвоты Б – для анализа на «Близар CDT».

Процедура отбора и подготовки проб сыворотки крови была выполнена в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53079.4-2008. Все полученные образцы были заморожены (-20 °С) и направлены в Государственное учреждение здравоохранения «Тульский областной наркологический диспансер №1» (ГУЗ «ТОНД №1», г. Тула, ул. Мосина, д. 21), где они анализировались в лабораторных условиях. Образцы аликвоты А были анализированы с помощью метода капиллярного электрофореза в случайном порядке, а образцы аликвоты Б были анализированы на исследуемом медицинском изделии в случайном порядке.

Все поступившие для анализа образцы отвечали заранее установленным требованиям:

- промаркированы четким и хорошо читаемым кодом;
- достаточный для проведения исследования объем;
- хранение и транспортировка в соответствии с требованиями, установленными для данного типа биологического материала;
- сохранность целостности и/или герметичности пробирок.

Обработка и визуализация полученных данных осуществлялась в интегрированной среде R-Studio.

После получения результатов, полученных в ГУЗ «ТОНД №1», было проведено статистическое сравнение по следующим параметрам: средняя величина относительной ошибки (математическое ожидание); диапазон изменения ошибки; характер распределения.

Информация о соответствии аликвот образцам проб раскрывалась после проведения статистической обработки данных для обеспечения прозрачности исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В процессе сопоставления результатов ($n = 210$) были выявлены образцы, содержание CDT в которых различалось более чем на 50% (табл. 1).

Таблица 1. Результаты анализа проб биологического материала, различающиеся более чем на 50%.

№	Аликвота 1, кодировка	Аликвота 2, кодировка	Группа	“Minicap”, %	«Близар CDT», %
1	A398	B446	Б	0,8	1,56
2	A239	B22	Б	2,4	1,38
3	A482	B311	Б	1,4	1,98
4	A432	B229	В	1,5	0,94
5	A13	B400	В	13,5	0,82
6	A178	B135	В	4,8	0,84
7	A230	B401	Б	0,8	1,37
8	A369	B439	Б	0,6	13,6
9	A418	B206	Б	0,8	1,68
10	A139	B442	Б	0,7	3,74
11	A76	B414	Б	3,8	2,31
12	A405	B386	Б	0,3	1,81
13	A272	B113	Б	0,5	1,49
14	A24	B8	Б	1,9	3

Как видно из таблицы 1, в 14 образцах содержание CDT, установленное по “Minicap” и по «Близар CDT», различалось более чем на 50%. Различия в уровнях CDT в одном и том же образце на двух приборах могут быть связаны с влиянием гамма-глобулина сыворотки крови. Вследствие хронической алкогольной интоксикации развиваются патологические изменения печени и нарушение белкового обмена. При данном нарушении метод капиллярного электрофореза может показывать завышенный результат CDT. Такие образцы требуется подготовить в соответствии со специальной методикой, но данная процедура при проведении исследования не проводилась.

Важно отметить, что метод капиллярного электрофореза показывает аномально большие результаты в образцах пациентов после лечения, в то время как результаты содержания CDT на «Близар CDT» в тех же образцах были ниже 1,6%, что может говорить о воздержании от потребления алкоголя пациентами и результативности лечения в клинике.

Напротив, большие значения концентрации CDT на «Близар CDT» в сравнении с результатами «Minicap» также могут быть связаны с ошибкой в подготовке проб к анализу либо с физиологическими факторами. Данный факт в основном наблюдался в образцах пациентов, только поступивших на лечение. Количество таких образцов составило 7% (14 штук) от выборки, поэтому было принято решение не использовать данные результаты в статистическом анализе, тем не менее каждый случай расхождения результатов в будущих исследованиях должен тщательно изучаться и интерпретироваться.

На *рис. 1* представлены распределения значений CDT, измеренных при помощи «Minicap» и «Близар CDT», в группах лиц с алкогольной зависимостью (группа Б + группа В). Распределения изображены в виде «boxplot» («ящик с усами»). Центральные горизонтальные линии представляют собой медианы распределений, «усы» – диапазон изменения значений CDT, тела «ящичков» – 1 и 3 квартили распределения (в этом диапазоне находится 50% значений). Как видно из *рис. 1*, распределения практически тождественны: медианы, диапазоны сигналов практически равны.

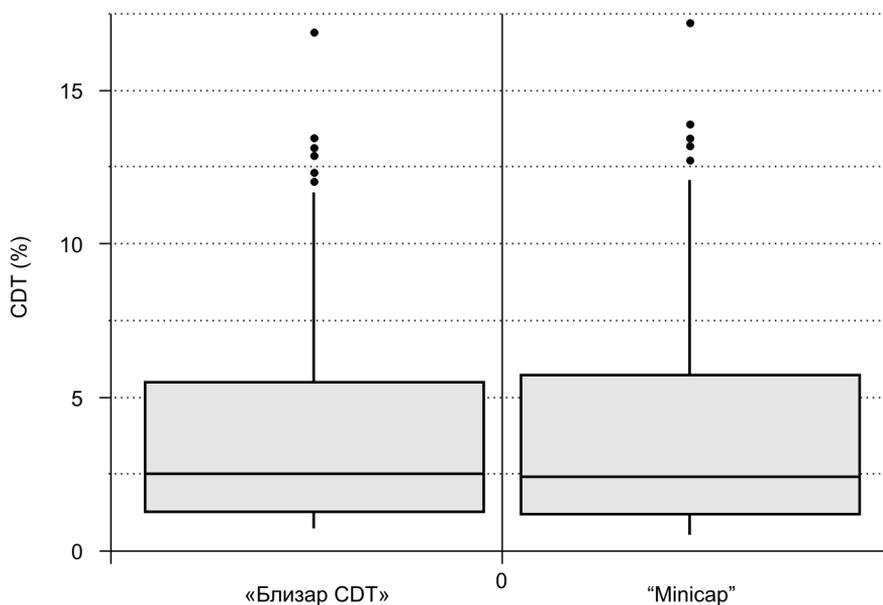


Рис. 1. Распределения значений CDT, измеренных при помощи «Minicap» и «Близар CDT» в группах лиц с алкогольной зависимостью.

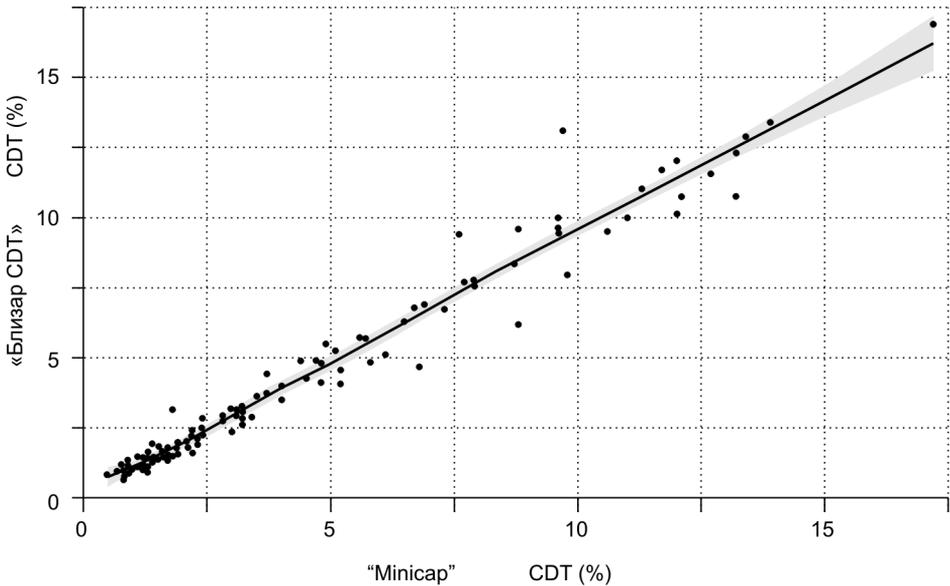


Рис. 2. Зависимость между измерениями уровня CDT в плазме крови, произведенными на «Minicap» и на «Близар CDT». По оси X – измерения уровня CDT (%) «Minicap», по оси Y – «Близар CDT».

Между измерениями уровня CDT в плазме крови двумя испытуемыми приборами установлена хорошая взаимосвязь. Коэффициент корреляции, рассчитанный по критерию Пирсона, составил 0,98 с уровнем значимости $P < 0,05$. Взаимосвязь между измерениями приборов представлена на рис. 2. Зависимость сглажена при помощи полиномиальной регрессии.

Относительная ошибка рассчитывалась по формуле: $Err = |X_{\text{фор}} - X_{\text{близ}}| / X_{\text{фор}}$, где $X_{\text{фор}}$ и $X_{\text{близ}}$ – значения измерений на приборах «Minicap» и «Близар CDT» соответственно. Модуль разности в числителе был применен для исследования величины ошибки без учета знака.

Функция распределения относительной ошибки измерений неравномерная. Среднее значение ошибки по представленному массиву данных равно 12,1%. Стандартное отклонение равно 10,4%. Диапазон изменения ошибки: 0–45%.

На рис. 3 представлен график зависимости вероятности появления ошибки от ее величины.

Это означает, что вероятность возникновения ошибки менее 5% составляет 35%, менее 10% – 52%, менее 15% – 67% и т.д.

Таким образом, установлено, что коэффициент корреляции между показаниями приборов при исследовании образцов в группах пациентов с алкогольной зависимостью равен 0,98 с уровнем значимости $P < 0,05$. Корреляция сильная. Функция распределения относительной ошибки измерений неравномерная.

Среднее значение ошибки по представленному массиву данных равно 12,1%. Стандартное отклонение равно 10,4%. Диапазон изменения ошибки: 0–45%.

Распределение значений CDT в группе условно здоровых лиц представлено на *рис. 4*.

По *рис. 4* видно, что медиана распределений, а также диапазоны 1–3 квартилей разные. Показания приборов слабо связаны друг с другом. Коэффициент корреляции равен 0,38 при уровне значимости $p < 0,05$. Слабая взаимосвязь показаний может быть связана с разными шкалами и калибровкой приборов в данном диапазоне сигналов. При этом все результаты в данной группе были ниже 1,6%.

Анализ ошибок не проводился вследствие разных шкал и калибровки приборов в данном диапазоне сигналов. Для точного анализа данных необходим значительно больший (>60 образцов) объем выборки. Также необходимо проведение измерений эталонных образцов по всему диапазону изменения сигнала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования определена степень совпадения уровня карбогидрат-дефицитного трансферрина, измеряемого с помощью автоматической системы капиллярного электрофореза и технологии хроматографии для диагностики *in vitro*.

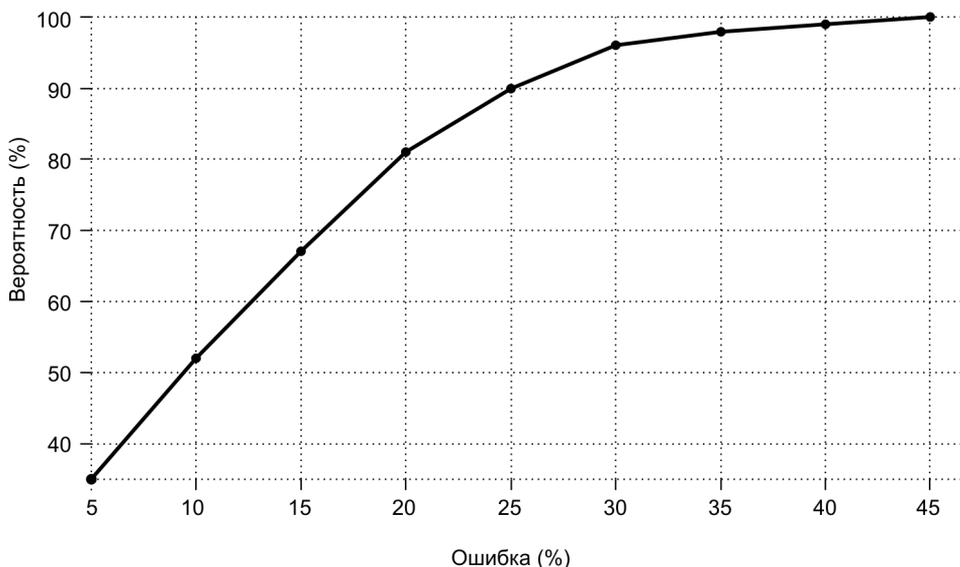


Рис. 3. Функция распределения относительной ошибки измерений. По оси X – величина ошибки (%); по оси Y – вероятность возникновения ошибки (%).

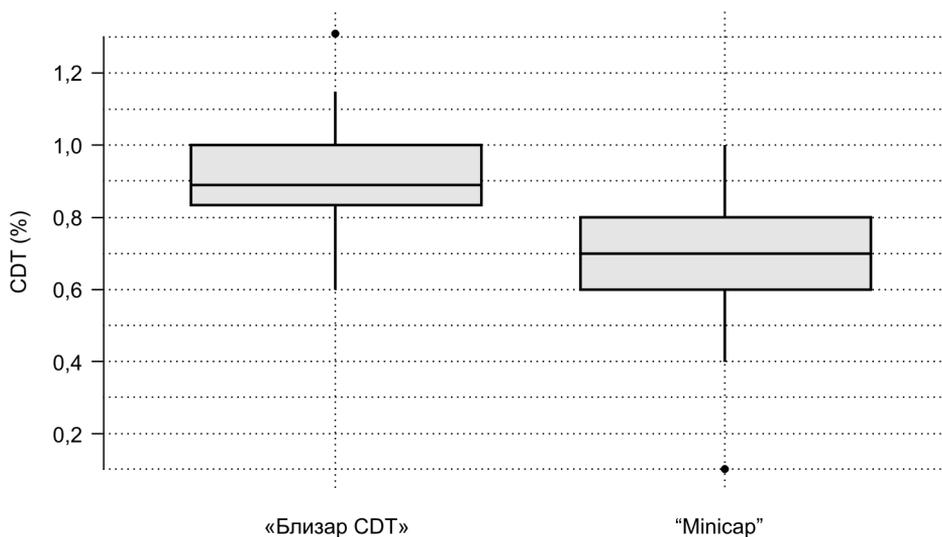


Рис. 4. Распределение значений CDT, измеренных при помощи «Minicap» и «Близар CDT», в группе условно здоровых лиц.

Проведено статистическое сравнение результатов анализа образцов: средняя величина относительной ошибки (математическое ожидание); диапазон изменения ошибки; характер распределения.

При исследовании группы пациентов с алкогольной зависимостью исследованные приборы показали близкие результаты с коэффициентом корреляции 0,98 с уровнем значимости $P < 0,05$. Между измерениями уровня карбогидрат-дефицитного трансферрина в сыворотке крови на автоматической системе капиллярного электрофореза и технологии хроматографии установлена хорошая взаимосвязь. Функция распределения относительной ошибки измерений неравномерная. Среднее значение ошибки по представленному массиву данных равно 12,1%. Стандартное отклонение равно 10,4%. Диапазон изменения ошибки: 0–45%.

Все результаты содержания CDT в группе условно здоровых лиц были ниже 1,6% у обоих приборов, однако показания приборов слабо связаны друг с другом. Коэффициент корреляции равен 0,38, при уровне значимости $p < 0,05$. Слабая взаимосвязь показаний может обуславливаться разными шкалами и калибровкой приборов в данном диапазоне сигналов.

Данные исследования говорят о том, что технология хроматографии имеет высокую корреляцию с методом капиллярного электрофореза при определении уровня карбогидрат-дефицитного трансферрина в группе пациентов с алкогольной зависимостью.

Несмотря на низкую корреляцию результатов приборов в группе условно здоровых лиц, все результаты измерения уровня карбогидрат-дефицитного трансферрина в образцах были ниже 1,6% как на испытуемом приборе, так и на приборе сравнения, что является положительным результатом.

В целом исследование показало достоверность и эффективность выявления злоупотребления алкоголем хроматографом жидкостным портативным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная программа Российской Федерации «Развитие промышленности и повышение ее конкурентоспособности», утв. Правительством Российской Федерации 15 апреля 2014 г. №328 [Электронный ресурс]: справочно-правовая система «КонсультантПлюс».
2. Диагностика, мониторинг хронического злоупотребления алкоголем и скрининг наиболее распространенных патологических состояний, обусловленных злоупотреблением : методические рекомендации // С-D-T.RU. – МНПЦ Наркологии Департамента здравоохранения г. Москвы [Электронный ресурс]. – <http://c-d-t.ru/wp-content/uploads/2016/05/metodrecomend.pdf>.
3. Острая интоксикация психоактивными веществами : клинические рекомендации // Рубрикатор клинических рекомендаций [Электронный ресурс]. – http://cr.rosminzdrav.ru/recomend/591_1.
4. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 30 декабря 2015 г. №1034н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «психиатрия-наркология» и Порядка диспансерного наблюдения за лицами с психическими расстройствами и (или) расстройствами поведения, связанными с употреблением психоактивных веществ» с изм. и доп. [Электронный ресурс]: справочно-правовая система «КонсультантПлюс».
5. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 22.12.2016 №988н «О Порядке выдачи справки об отсутствии у работников, которые в соответствии со своими трудовыми обязанностями должны иметь доступ к наркотическим средствам, психотропным веществам, внесенным в список I и таблицу I списка IV перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации, прекурсорам или культивируемым наркосодержащим растениям, заболеваний наркоманией, токсикоманией, хроническим алкоголизмом» [Электронный ресурс] : справочно-правовая система «КонсультантПлюс».
6. Приказ Минздрава России от 15.06.2015 №344н (ред. от 25.12.2020) «О проведении обязательного медицинского освидетельствования водителей транспортных средств (кандидатов в водители транспортных средств)» (вместе с «Порядком проведения обязательного медицинского освидетельствования водителей транспортных средств (кандидатов в водители транспортных средств)», «Порядком выдачи медицинского заключения о наличии (об отсутствии) у водителей транспортных средств (кандидатов в водители транспортных средств) медицинских противопоказаний, медицинских показаний или медицинских ограничений к управлению транспортными средствами») [Электронный ресурс] : справочно-правовая система «КонсультантПлюс».
7. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 30 июня 2016 г. №441н «О порядке проведения медицинского освидетельствования на наличие медицинских противопоказаний к владению оружием и химико-токсикологических исследований наличия в организме человека наркотических средств, психотропных веществ и их метаболитов» [Электронный ресурс] : справочно-правовая система «КонсультантПлюс».

8. Психические и поведенческие расстройства, вызванные употреблением алкоголя. Синдром отмены алкоголя (алкогольное абстинентное состояние) : клинические рекомендации // Рубрикатор клинических рекомендаций [Электронный ресурс]. – http://cr.rosminzdrav.ru/recomend/611_1.
9. Психические расстройства и расстройства поведения (F00-F99) (Класс V МКБ-10, адаптированный для использования в Российской Федерации) / под ред. Б.А. Казаковцева, В.Б. Голланда. – 2-е изд. – М.: Прометей, 2020. – 584 с.
10. Тарасова О.И., Огуцов П.П., Мазурчик Н.В., Моисеев В.С. Современные лабораторные маркеры употребления алкоголя // Клиническая фармакология и терапия. – 2013 – Т.16. – №1. – С. 1–5.
11. Helander A. et al. Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: II. Performance of a laboratory network running the HPLC candidate reference measurement procedure and evaluation of a candidate reference material // Clin Chem Lab Med. – 2010 – Vol. 48. – N11. – P. 1585–1592.
12. Helander A. Chromatographic measurement of transferring glycoforms for detecting alcohol abuse and congenital disorders of glycosylation // Chromatographic methods in clinical chemistry and toxicology. – USA: N.J.: John Wiley & Sons Ltd, Hoboken, 2007. – 310 p. – P. 87–97.
13. Tavakoli H.R., Hull M., Okasinski Lt.M. Review of current clinical biomarkers for the detection of alcohol dependence // Innov.Clin.Neurosci. – 2011 – Vol. 8. – N9. – P. 26–33.

COMPARATIVE ANALYSIS OF RELIABILITY AND EFFICIENCY OF DETERMINING CARBOHYDRATE-DEFICIENT TRANSFERRIN (CDT) LEVELS IN HUMAN SERUM BY USING LIQUID CHROMATOGRAPHY AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS SYSTEM

Klimenko T.V.^{1,2}, Arkus M.L.¹, Eroshchenko N.N.¹, Senshinov I.V.¹, Eganov A.A.¹

¹ V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology
National Scientific Research Centre on Addictions
Moscow, Russia

² All-Russian State University of Justice
Moscow, Russia

The paper presents the results of a comparative study of two different technical approaches to determining carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in terms of their comparable effectiveness in establishing the CDT level in biological materials of individuals with different volumes of alcohol consumption: an automatic capillary electrophoresis system and chromatography technology. In the course of the study, the degree of coincidence of the measured values for both investigated devices was determined and it was shown that both technologies have a high correlation in determining CDT levels in patients with alcohol dependence.

Keywords: *transferrin, carbohydrate-deficient transferrin, capillary electrophoresis, liquid chromatography, high performance liquid chromatography, alcohol, alcoholism.*