

Stanovení karbohydrát-deficientního transferinu kapilární elektroforézou

M. Vašatová, E. Ličbinská

Úvod

Karbohydrát-deficientní transferin (CDT) je v současnosti považován za nejspecifičtější biochemický marker chronického nadužívání alkoholu. Transferin je glykoprotein o molekulové hmotnosti 80 kDa, jehož hlavní funkcí je vazba a transport železa v organismu. Skládá se z jednoho polypeptidového řetězce se dvěma N-terminálními oligosacharidovými jednotkami. Transferin obsahuje ve své molekule obvykle čtyři až šest zbytků kyseliny sialové. Při chronickém užívání alkoholu se zvyšuje podíl transferinu, v jehož struktuře kyselina sialová chybí – tzv. karbohydrát-deficientní transferin (CDT). Podle stupně sializace N-terminálních oligosacharidových řetězců transferinu rozeznáváme různé izofomy transferinu a za CDT považujeme ty, které obsahují dvě (disialo-), jednu (monosialo-), nebo žádnou (asialo-) kyselinu sialovou (1). V současnosti stanovení CDT proniká do klinických laboratoří. Komerčně dostupné jsou hlavně soupravy pro metody imunochemické a separační techniky (kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza), přičemž analýzou CDT separačními postupy je možné odlišit a kvantifikovat všechny jednotlivé frakce transferinu (2-6). V naší laboratoři jsme zavedli vlastní aplikaci pro stanovení CDT kapilární elektroforézou.

Materiál a metody

Stanovení je prováděno na kapilární elektroforéze PrinCE 750 (Prince Technologies) s detektorem diodového pole. Detekční vlnová délka byla nastavena na 200 nm. Separace sérového transferinu po saturaci železem probíhá v 50 cm neupravené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 μm v borátovém pufru (pH=8,3) s přidavkem diaminobutanu (25 $\mu\text{mol/l}$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 800 $\mu\text{l/l}$ DAB). Napětí vkládané na elektrody je 20 kV (proud cca 60 μA) a separační teplota 30 $^\circ\text{C}$. Před použitím je nutné kapiláru promýt přibližně 10 min 1 mol/l NaOH, 10 min 0,1 mol/l NaOH, 20 min destilovanou vodou a 30 min separačním pufrům. Mezi jednotlivými vzorky se kapilára proplachuje 0,1 mol/l NaOH.

Ke stanovení se odebírají vzorky srážlivé krve, oddělí se sérum a uchovává se do analýzy zamražené na -20 $^\circ\text{C}$. Ke 100 μl rozmraženého séra se přidá 20 μl

směsi FeCl_3 (10 mmol/l) a NaHCO_3 (500 mmol/l) v poměru 2:3 pro saturaci transferinu železem. Vzorek se nechá 30 min inkubovat při laboratorní teplotě, poté se směs naředí přidáním 900 μl destilované vody a je připravena k analýze.

Vnitřní kontrola kvality je hodnocena na dvou hladinách pomocí kontrolních materiálů pro CDT (Recipe) s každou sérií vzorků.

Výsledky

Z elektroforeogamu se odečítá procentuální zastoupení až šesti jednotlivých frakcí transferinu - asialo, monosialo, disialo, trisialo, tetrasialo, pentasialo (obrázek 1). Z výsledků vnitřní kontroly kvality byly hodnoceny analytické parametry metody (Tabulka 1) a metoda byla zařazena také do cyklu EHK.

CDT bylo vyšetřeno u 30 dárců krve pro ověření referenčních mezí, průměrné procentuální zastoupení bylo $1,5 \pm 0,6\%$, přičemž u dárců krve nebyla detekovatelná asialo- frakce. Průměrná hodnota CDT u alkoholiků byla $9,1 \pm 7,1\%$ (asialo- $1,8 \pm 1,8\%$, disialo - $7,6 \pm 5,4\%$). Výsledky stanovení CDT u alkoholiků se pohybovaly v rozmezí 3,0 - 30,7% CDT (hodnoty asialo- byly nedetekovatelné až 7,9%, disialo - 2,4 až 22,8%) (obrázek 2). Frakce monosialo- byla detekovatelná jen výjimečně. Jako cut-off pro odlišení chronického příjmu alkoholu je používána hodnota 2,6% CDT.

Závěr

Karbohydrát-deficientní transferin (CDT) je v současnosti považován za velmi specifický marker dlouhodobého požívání alkoholu. Stanovení CDT přispívá k diferenciální diagnostice alkoholového poškození jater. Naše metoda na stanovení CDT je jednou z možných aplikací využití kapilární elektroforézy v laboratořích klinické biochemie a je jednoduchou a cenově výhodnou alternativou komerčně dostupných metod.

Literatura

1. Stejskal D.: Karbohydrát - deficientní transferin. FONS 4, 1998 p. 49-53.
2. Martello S. et al.: Determination of carbohydrate deficient transferrin (CDT) with capillary electrophoresis: an inter laboratory comparison. Forensic Science International, 141, 2004, p. 153-157.
3. Bortolotti F. et al.: Carbohydrate-deficient transferrin (CDT): A reliable indicator of the risk of driving under the influence of alcohol when determined by capillary electrophoresis. Forensic Science International, 170, 2007, p. 175-178
4. Crivellente F. et al.: Improved method for carbohydrate-deficient transferrin determination in

human serum by capillary zone electrophoresis. J. Chromatogr. B, 739, 2000, p. 81-93.

5. Lanz C. et al.: Evaluation and optimization of capillary zone electrophoresis with different dynamic capillary coatings for the determination

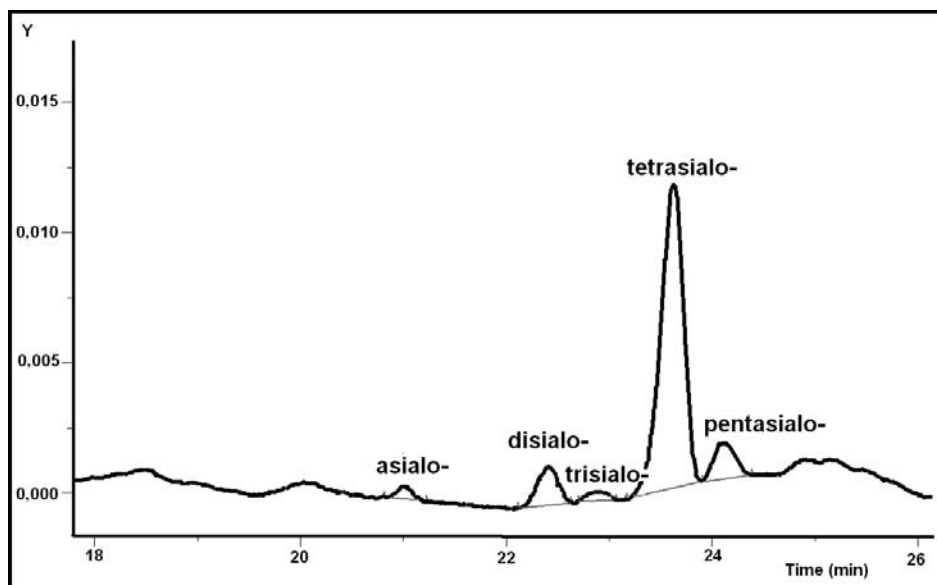
of carbohydrate-deficient transferrin in human serum, J Chromatogr. A, 97, 2002, p.43-57.

6. Helander A. et al.: Improved HPLC Method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. Clin. Chem. 49:11, 2003, p. 1881-1890.

Tabulka 1: Výsledky hodnocení interní kontroly kvality

	vzorek 1	vzorek 2
průměr %	2,1	8,1
SD	0,2	0,7
CV %	8,7	8,6
cílová hodnota %	1,92	7,85
BIAS %	10,8	3,4

Obrázek 1: Elektroforeogram analýzy CDT



Obrázek 2: Procentuální zastoupení CDT u dárců krve a alkoholiků – krabicový graf

