

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení karbohydrát-deficientního transferinu v klinických vzorcích

Barbora Hudcová

Bakalářská práce

2024

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	<b>Barbora Hudcová</b>
Osobní číslo:	<b>C21178</b>
Studijní program:	<b>B3912 Speciální chemicko-biologické obory</b>
Studijní obor:	<b>Zdravotní laborant</b>
Téma práce:	<b>Stanovení karbohydrát-deficientního transferinu v klinických vzorcích</b>
Téma práce anglicky:	<b>Determination of Carbohydrate-deficient Transferrin in Clinical Samples</b>
Zadávací katedra:	<b>Katedra biologických a biochemických věd</b>

## Zásady pro vypracování

1. Na základě informací z literatury uspořádejte současné poznatky o klinickém významu karbohydrát-deficientního transferinu.
2. Pozornost věnujte také možnostem jeho stanovení, včetně nároků kladených na preanalytickou fázi.
3. Změřte hodnoty karbohydrát-deficientního transferinu u vzorku pacientů s vybranou onkologickou diagnózou pro potřeby pilotní studie.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce:

**prof. MUDr. Marta Kalousová, Ph.D.**

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky,  
Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské  
fakulty Univerzity Karlovy

Datum zadání bakalářské práce:

**22. prosince 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.  
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení karbohydrát-deficientního transferinu v klinických vzorcích jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 01.07. 2024

Barbora Hudcová

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Mgr. Pavle Žákové, Ph.D. za vedení této práce, cenné rady a vstřícný přístup. Moje poděkování dále patří prof. MUDr. Martě Kalousové, Ph.D. a Ing. Miroslavě Zelenkové za pomoc, ochotu a konzultaci při zpracování informací. Velké díky patří Všeobecné fakulní nemocnici v Praze a Bance biologického materiálu 1. lékařské fakulty (projekt číslo BBMRI\_CZ LM2023033), která mi poskytla vzorky a prostor pro zpracování experimentální části, i jejím pracovníkům na oddělení Centrálních výzkumných laboratořích – Imunochemie. Práce byla podpořena také výzkumnými záměry pracoviště – RVO VFN64165 a Cooperatio DIAG. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá metodami stanovení karbohydrát-deficientního transferinu (CDT), který má své hlavní využití jako biomarker při chronickém abúzu alkoholu. Hladiny CDT však mohou stoupat i při různých onemocněních, a proto bylo metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie stanoveno CDT u nemocných s karcinomem močového měchýře a u dobrovolných dárců.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Karbohydrát-deficientní transferin; transferin; biomarker; izoelektrická fokusace; vysokoúčinná kapalinová chromatografie

## **TITLE**

Determination of carbohydrate-deficient transferrin in clinical samples.

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with methods of the determination of carbohydrate-deficient transferrin (CDT), which has its main use as a biomarker in chronic alcohol abuse. However, CDT levels can also rise in various diseases and therefore CDT was determined by high-performance liquid chromatography in bladder cancer patients and in voluntary donors.

## **KEYWORDS**

Carbohydrate-deficient transferrin; transferrin; biomarker; isoelectric focusing; high-performance liquid chromatography

# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ .....	10
SEZNAM TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK.....	12
ÚVOD.....	14
TEORETICKÁ ČÁST .....	15
1 Karbohydrát-deficientní transferin .....	15
1.1 Charakteristika transferinu.....	15
1.2 Charakteristika a využití karbohydrát-deficientního transferinu .....	16
2 Potenciální využití karbohydrát-deficientního transferinu v diagnostice.....	17
2.1 Vrozené poruchy glykosylace .....	17
2.1.1 Typy vrozených poruch glykosylace .....	17
2.1.2 Metody stanovení.....	18
2.2 Jaterní onemocnění .....	18
2.3 Nádorová onemocnění .....	19
2.4 Autoimunitní onemocnění .....	19
3 Rakovina močového měchýře .....	20
3.1 Vliv kouření .....	20
3.1.1 Vliv elektronických cigaret.....	21
3.2 Vliv alkoholu .....	21
4 Preanalytická fáze vyšetření .....	21
4.1 Interference ve vzorku .....	22
4.2 Stabilita vzorku .....	22
4.3 Faktory ovlivňující výsledek .....	22
5 Metody stanovení karbohydrát-deficientního transferinu .....	23
5.1 Obecný postup analýzy .....	23
5.2 Vyjádření výsledku .....	23

5.3	Ovlivnění výsledku .....	24
6	Elektroforetické metody .....	24
6.1	Izoelektrická fokusace .....	24
6.1.1	Princip .....	24
6.1.2	Provedení metody .....	24
6.2	Kapilární zónová elektroforéza .....	25
6.2.1	Provedení metody .....	26
6.2.2	Výhody a nevýhody metody .....	27
7	Chromatografické metody .....	27
7.1	System vysokoúčinné kapalinové chromatografie .....	28
7.2	Princip .....	28
7.3	Provedení metody .....	28
7.4	Výhody a nevýhody .....	29
8	Imunochemické metody .....	29
8.1	Turbidimetrická imunoanalýza .....	30
8.2	Nefelometrická imunoanalýza .....	30
8.3	Imunoenzymatická analýza .....	31
9	Další markery chronického alkoholismu .....	31
9.1	Ethylglukuronid .....	32
9.2	Fosfatidylethanol .....	32
9.3	Jaterní enzymy .....	33
9.4	Střední korpuskulární objem erytrocytů .....	34
10	Vyšetření karbohydrát-deficientního transferinu v těhotenství .....	34
11	Genetické varianty transferinu .....	35
11.1	Heterozygotní varianta transferin-BC .....	35
11.2	Heterozygotní varianta transferin-CD .....	36
	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	38



12	Vzorky použité ke stanovení a jejich charakteristika .....	38
13	Použité pomůcky a reagentie .....	38
13.1	Spotřební materiál.....	38
13.2	Přístrojová technika .....	39
14	Pracovní postup.....	40
14.1	Příprava kontrol ClinChek (Level I, Level II) .....	40
14.2	Příprava vzorků.....	40
14.3	Postup měření na přístroji .....	41
15	Výsledky .....	43
	DISKUZE .....	49
	ZÁVĚR .....	51
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	52

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Struktura transferinu. ....	15
<b>Obrázek 2:</b> Strukturní znázornění glykoforem lidského transferinu, bez znázornění glykoforem heptasialotransferinu a oktasialotransferinu. ....	16
<b>Obrázek 3:</b> Chromatogram pacienta s vrozenou poruchou glykosylace typu Ia, získaný pomocí metody HPLC. ....	18
<b>Obrázek 4:</b> Pásy Fe <sub>2</sub> -isotransferinu (Fe <sub>2</sub> -Tf) v séru a mozkomíšním moku (CSF) získané pomocí izoelektrické fokusace. ....	25
<b>Obrázek 5:</b> Typický elektroferogram glykoforem transferinu abstinujícího pacienta. .	27
<b>Obrázek 6:</b> Chromatogram pacienta s prokázaným chronickým alkoholismem. Uvedena je také separace pomocí izoelektrické fokusace. ....	29
<b>Obrázek 7:</b> Chromatogram heterozygotní varianty transferinu-BC v patologickém rozmezí (nahore) a homozygotní varianty transferinu-C v referenčních mezích (dole) metodou HPLC. ....	36
<b>Obrázek 8:</b> Chromatogram heterozygotní varianty transferinu-CD v patologickém rozmezí (nahore) a homozygotní varianty transferinu-C v referenčních mezích (dole) metodou HPLC. ....	37
<b>Obrázek 9:</b> Obsah kitů ClinRep a ClinCheck. ....	39
<b>Obrázek 10:</b> Přístroj HPLC 1260 Infinity Agilent Technologies .....	40
<b>Obrázek 11:</b> Chromatogram pacienta s pozitivním výsledkem CDT .....	47
<b>Obrázek 12:</b> Chromatogram pacienta s negativním výsledkem CDT .....	47
<b>Obrázek 13:</b> Chromatogram Serum control Level I – negativní kontrola. ....	48
<b>Obrázek 14:</b> Chromatogram Serum control Level II – pozitivní kontrola. ....	48

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Hraniční hodnoty CDT v séru pacienta pomocí různých metod izoelektrické fokusace. ....	25
<b>Tabulka 2:</b> Hraniční hodnoty CDT v séru pacienta pomocí kapilární zónové elektroforézy. ....	27
<b>Tabulka 3:</b> Referenční hodnoty CDT v séru pacienta pomocí turbidimetrické imunanalýzy. ....	30
<b>Tabulka 4:</b> Směšovací poměr precipitantů P1 a P2 .....	41
<b>Tabulka 5:</b> Parametry HPLC .....	42
<b>Tabulka 6:</b> Tabulka gradientu .....	43
<b>Tabulka 7:</b> Klinické údaje o pacientech a jejich diagnóza. ....	44
<b>Tabulka 8:</b> Hodnoty průměru a směrodatné odchylky u disialotransferinu, trisialotransferinu, tetrasialotransferinu a pentasialotransferinu v procentech u stanovovaných vzorků. ....	45
<b>Tabulka 9:</b> Serum control Level I – negativní kontrola.....	45
<b>Tabulka 10:</b> Serum control Level II – pozitivní kontrola.....	46
<b>Tabulka 11:</b> Retenční časy jednotlivých naměřených glykoforem transferinu v minutách. ....	46

## **SEZNAM ZKRATEK**

**AIH** – autoimunitní hepatitida

**ALT** – alaninaminotransamináza

**AST** – aspartátaminotransamináza

**BMI** – body mass index

**CA 19-9** – karbohydrátový antigen 19-9 (carbohydrate antigen 19-9)

**cAST** – cytoplazmatická aspartátaminotransferáza

**CCP** – cyklické citrulinované peptidy

**CDG** – vrozená porucha glykosylace

**CDT** – karbohydrát-deficientní transferin

**CZE** – kapilární elektroforéza

**EDTA** – kyselina ethylendiamintetraoctová

**EIA** – enzymová imunoanalýza

**EtG** - ethylglukuronid

**FAS** – fetální alkoholový syndrom

**Fe<sub>0</sub>-Tf** – apo-transferin

**Fe<sub>1C</sub>-Tf** – monoferrický transferin vázaný na C-konec

**Fe<sub>1N</sub>-Tf** – monoferrický transferin vázaný na N-konec

**Fe<sub>2</sub>-Tf** – diferrický transferin

**FeNTA** – kyselina železito-nitrilotrioctová

**FLD** – fluorescenční detektor

**GC-MS** – plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

**GGT** – gama-glutamyltransferáza

**HBV** – virová hepatitida typu B

**HCV** – virová hepatitida typu C

**HPLC** – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

**IE** – imunofixace

**IEF** – izoelektrická fokusace

**IgG** – imunoglobulin typu G

**kDa** – kilodalton

**LC-MS** – kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

**mAST** – mitochondriální aspartátaminotransferáza

**MCV** – střední korpuskulární objem erytrocytů

**MF** – mobilní fáze

**MS** – hmotnostní detektor

**NIA** – nefelometrická imunoanalýza

**PAD** – peptidylarginin deimináza

**PEth** – fosfatidylethanol

**pI** – izoelektrický bod

**RA** – revmatoidní artritida

**RIA** – radioimunoanalýza

**SLE** – systémový lupus erythematoses

**SSc** – systémová skleróza

**Tf** – transferin

**Tf-B** – varianta transferinu typu B

**Tf-BC** – varianta transferinu typu BC

**Tf-C** – varianta transferinu typu C

**Tf-CD** – varianta transferinu typu CD

**Tf-D** – varianta transferinu typu D

**TIA** – turbidimetrická imunoanalýza (imunoturbidimetrie)

**UV** – ultrafialové záření

**UV/UV-VIS** – spektrofotometrický detektor

**UV/VIS** – ultrafialové-viditelné záření

**VFN** – Všeobecná fakultní nemocnice

**WB** – Western blotting

## ÚVOD

Karbohydrát-deficientní transferin (CDT) je transferin, který vznikl porušením glykosylace uvnitř buňky. V těle se zvyšuje se při nadměrném užívání alkoholu, a tak hraje ve zdravotnictví významnou roli jako biomarker při chronickém abúzu alkoholu [5]. CDT se však zvyšuje i u dědičných poruch glykosylace, některých jaterních, nádorových či autoimunitních onemocnění nebo fyziologicky v těhotenství [6, 9, 11, 12].

CDT můžeme v laboratořích stanovovat různými technikami, mezi které patří elektroforetické, chromatografické a imunochemické metody. Elektroforetické metody využívají elektrického pole, ve kterém se transferin rozděluje na jednotlivé izoformy, které můžeme následně vyhodnotit. Nejčastějšími elektroforetickými metodami jsou izoelektrická fokusace a kapilární zónová elektroforéza. Chromatografické metody slouží k separaci jednotlivých izoform a využívají rozdělení složek mezi dvě fáze podle jejich afinity. Do těchto metod patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Poslední imunochemické metody využívají pro separaci protilátky, které tvoří s CDT imunokomplexy [26, 32].

Ve zdravotnictví se však ke zjištění alkoholismu mohou využít i jiné biomarkery, jako například ethylglukuronid, fosfatidylethanol, jaterní enzymy nebo střední korpuskulární objem erytrocytů, ty však vykazují oproti CDT určité nevýhody [6, 23, 25].

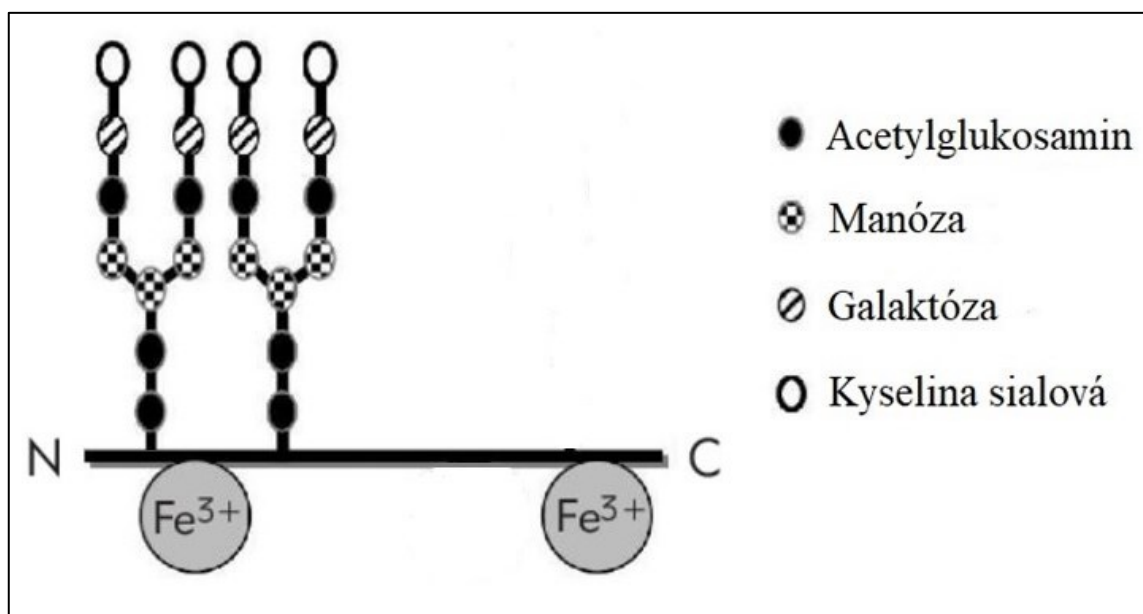
Cílem této práce bylo charakterizovat CDT, metody jeho stanovení a provést analýzu metodou HPLC v séru pacientů s karcinomem močového měchýře a dobrovolných dárců. Dále bylo cílem zjistit možný vliv karcinomu močového měchýře na hodnoty CDT v těle pacientů, a zda nemocní pacienti dodrželi abstinenci alkoholu v období před operačním zákrokem.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 Karbohydrát-deficientní transferin

### 1.1 Charakteristika transferinu

Transferin (Tf) je glykoprotein o molekulové hmotnosti přibližně 80 kDa, který se syntetizuje v hepatocytech a slouží k transportu železa. Skládá se z jednoho polypeptidového řetězce o 679 aminokyselinách se dvěma vazebnými místy. Na vazebné místo u N-konce se váže trojmocné železo a dva N-terminální oligosacharidové řetězce, které mají negativně nabitě konce tvořené ze zbytků kyseliny sialové. Na druhé vazebné místo polypeptidového řetězce se u C-konce váže pouze trojmocné železo. (Obrázek 1) [1].



Obrázek 1: Struktura transferinu. Upraveno dle [2]

Dle počtu navázaných iontů železa, substituce aminokyselin v polypeptidovém řetězci a stupně větvení oligosacharidových řetězců, se Tf dělí do různých izoform. Podle struktury oligosacharidového řetězce se může navázat až osm molekul kyseliny sialové, pomocí které rozlišujeme Tf na asialotransferin, monosialotransferin, diasialotransferin, až oktasialotransferin (Obrázek 2) [3].

U zdravých jedinců se formy asialo-, monosialo- a oktasialo- téměř nevyskytují, nejvyšší procentuální zastoupení má potom izoforma tetrasialotransferinu, která představuje 64-80 % z celkového Tf [4]. Hned po ní následuje forma pentasialo-, která

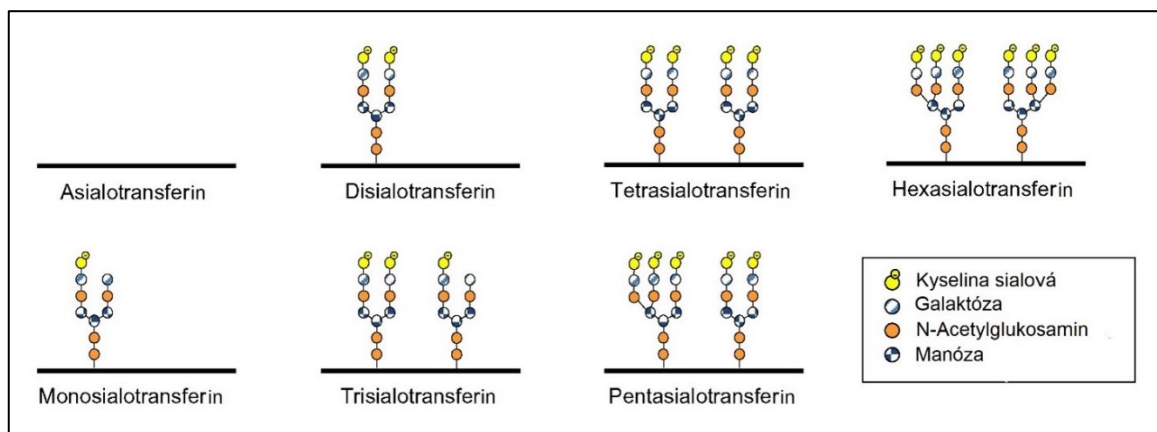
dosahuje 12-18 %. Nižší procentuální zastoupení mají potom izoformy trisialotransferinu (4,5-9 %), hexasialotransferinu (1-3 %) a heptasialotransferinu (pod 1,5 %). Disialotransferin potom u zdravého člověka představuje hodnotu do 2,5 % [5].

## 1.2 Charakteristika a využití karbohydrát-deficientního transferinu

Karbohydrát-deficientní transferin je dnes již obecně považován za jeden z objektivních markerů chronického nadměrného užívání alkoholu [3]. Jedná se o modifikovanou formu transferinu, která vznikla narušením procesu glykosylace [4].

Za izoformy CDT jsou považovány formy monosialotransferinu, diasialotransferinu nebo asialotransferinu, přičemž jako primární cílová molekula karbohydrát deficientního transferinu byla určena forma diasialotransferinu [3]. Dle výzkumů se ukázalo, že monosialotransferin nesouvisí s příjmem alkoholu a asialotransferin je v séru téměř nedetekovatelný, a tak se CDT týká pouze izoformy diasialotransferinu. Jak již bylo řečeno, disialo- forma má navázané pouze 2 sialové kyseliny, což je způsobeno důsledkem změn v glykosylaci vyvolané chronickým pitím alkoholu. Z toho důvodu se disialo- forma považuje za CDT [5].

Izoformy CDT mají vyšší izoelektrický bod (pI) než 5,7. Tento bod je ovlivněn především množstvím navázaných sialových kyselin. Další vliv na pI mají geneticky podmíněné strukturální změny proteinového řetězce nebo saturace CDT železem, která se provádí před samotnou analýzou [4].



Obrázek 2: Strukturální znázornění glykoforem lidského transferinu, bez znázornění glykoforem heptasialotransferinu a oktasialotransferinu. Upraveno dle [6]

Glykosylace je navázání oligosacharidových řetězců na bílkovinný řetězec glykoproteinů, které probíhá uvnitř buňky v Golgiho aparátu [7]. Pokud je ale denní



příjem etanolu v rozmezí přibližně 50-80 g a trvá po dobu minimálně týden, dochází k poškození syntézy N-oligosacharidových komplexů v Golgiho aparátu, což má za následek porušení glykosylace [4]. Tím dochází ke zvýšení koncentrace izoforem Tf s jednou, dvěma nebo žádnou navázanou kyselinou sialovou a dojde tak ke zvýšení tvorby CDT. Při abstinenci, která trvá minimálně 2-3 týdny, se naopak sialyzace znormalizuje a hladina CDT se tak snižuje. Z toho důvodu se karbohydrát deficientní transferin dnes obecně využívá jako jeden z objektivních markerů chronického nadměrného užívání alkoholu [3].

## **2 Potenciální využití karbohydrát-deficientního transferinu v diagnostice**

Kromě svého využití při diagnostice pro abúzus alkoholu, které se pokládá za hlavní, se stanovení CDT využívá také k odhalení různých onemocnění, u kterých se hladina tohoto biomarkeru zvyšuje.

### **2.1 Vrozené poruchy glykosylace**

Jedním z těchto onemocnění jsou dědičné metabolické poruchy nazývané CDG syndromy (zkrácený výraz CDG je odvozen od anglického “ Congenital disorder of glycosylation “ – vrozená porucha glykosylace) [5]. Tyto CDG syndromy se řadí mezi genetická onemocnění a zahrnují asi 130 různých typů. Díky této různorodosti a obrovské klinické heterogenitě v rámci řady CDG je ale diagnostika poměrně složitá [8].

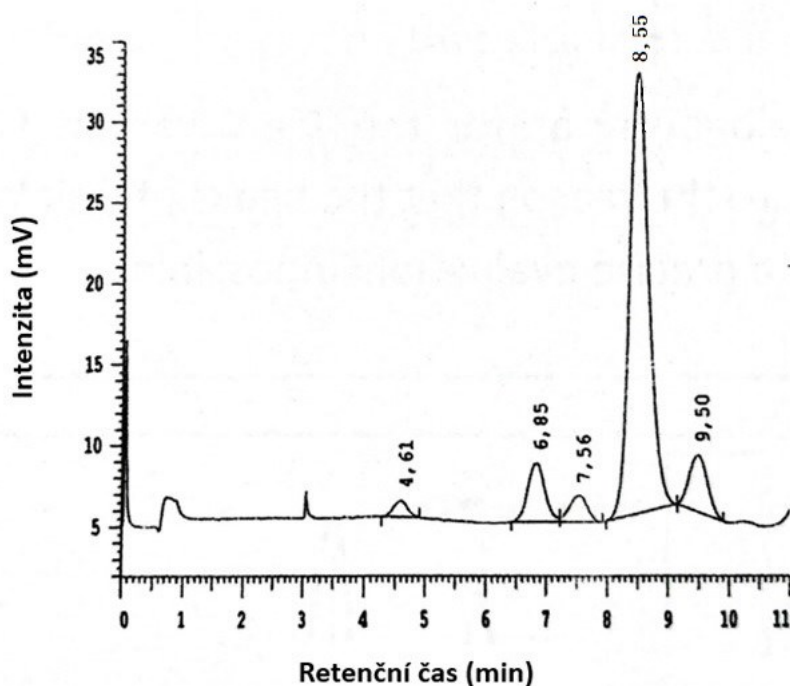
#### **2.1.1 Typy vrozených poruch glykosylace**

U většiny těchto typů se nacházejí atypické transferinové glykoformy, které jsou buď charakteristické úplným nedostatkem sacharidových postranních řetězců – CDG I nebo přítomností defektovaných glykanových řetězců – CDG II. Tyto poruchy jsou způsobené defektem enzymů nebo transportérů v rámci biosyntézy glykanu, která se skládá z mnoha kroků. Podle typu defektu jsou pozorovány různé druhy CDG s různými příznaky a průběhem onemocnění. Nejčastějším typem je CDG Ia, který je způsoben defektem enzymu fosfomanomutázy 2, který souvisí s metabolismem manózy. Vzhledem k tomu, že se 9 ze 14 monosacharidů počátečního sacharidového postranního řetězce skládá z manózy, vede nedostatek aktivované manózy k poruchám při syntéze těchto řetězců, které se potom nemohou přenést na Tf. Poruchou těchto řetězců ztrácí molekula tetrasialotransferinu 2 nebo 4 koncové sialové kyseliny. V důsledku toho se zvyšuje

množství di- a asialotransferinu, které obvykle nabývá hodnot CDT vyšších než jaké jsou pozorované při abúzu alkoholu [5].

### 2.1.2 Metody stanovení

Standardně je diagnostika prováděna izoelektrickou fokusací (IEF) transferinu s následnou imunofixací v gelu. Dalšími metodami může být vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) (Obrázek 3) nebo kapilární zónová elektroforéza (CZE), které jsou na rozdíl od izoelektrofokusu rychlejší a méně náročné na práci [8]. Další nevýhodou IEF je fakt, že umožňuje pouze semikvantitativní hodnocení [5].



Obrázek 3: Chromatogram pacienta s vrozenou poruchou glykosylace typu Ia, získaný pomocí metody HPLC. (legenda píků: asialotransferin (4,61 min) disialotransferin (6,85 min), trisialotransferin (7,56 min), tetrasialotransferin (8,55 min), pentasialotransferin (9,50 min)) [5]

## 2.2 Jaterní onemocnění

Dalším důvodem zvýšených hladin CDT mohou být různá jaterní onemocnění, která nesouvisí s alkoholismem. Těmito stavy jsou nejčastěji chronická virová hepatitida typu B (HBV) nebo typu C (HCV), autoimunitní hepatitida (AIH) nebo jaterní malignity [9]. U pacientů s virovou hepatitidou, kteří konzumují alkohol, dochází často k delšímu průběhu infekce a závažnějším projevům nemoci, což zhoršuje poškození jater [10].

Hladiny CDT v séru se zvyšují se zvyšující se závažností onemocnění jater [9]. Jak již bylo řečeno, Tf je syntetizován, glykosylován a vylučován játry, a tak se při nealkoholickém poškození jater zvyšuje společně s celkovým Tf i izoforma disialo-Tf, tedy CDT [10].

### **2.3 Nádorová onemocnění**

Je známo, že u pacientů s nádorovým onemocněním dochází ke změnám v glykosylaci proteinů. Tyto změny zahrnují například zánik nebo vznik nových sacharidových zbytků v nádorových buňkách, neúplnou tvorbu glykoforem (v důsledku předčasného ukončení syntézy) nebo syntézu vysoce rozvětvených a vysoce sialyzovaných glykanů. Dochází tak ke změnám koncentrace celkového Tf a jeho izoform [11].

Obecně platí, že sialyzace glykoproteinů se zvyšuje s pokročilostí nádoru. Tuto hypotézu zřejmě potvrzuje i fakt, že u pacientů s nádorovým onemocněním se zvyšuje sérová koncentrace kyseliny sialové [11].

Studie Gruszewské et al se zabývala stanovením izoform Tf u nádorů pankreatu, který je čtvrtou nejčastější příčinou smrti v USA a Evropě. Jako biomarker u rakoviny slinivky břišní se v současné době běžně využívá karbohydrátový antigen 19-9 (CA19 - 9), který však není úplně spolehlivý a u některých případů vykazuje falešně pozitivní výsledky. Dle jejich výzkumu se ukázalo, že u pacientů s nádorovým onemocněním došlo ke zvýšení tetrasialotransferinu a snížení pentasialotransferinu. Tyto změny nejspíše souvisejí se zvýšením aktivity enzymů, které se podílejí na větvení glykanů. U pacientů bez vzdálených metastáz se potom zvyšovala hladina trisialotransferinu. Snížení pentasialotransferinu je v rozporu s výše uvedenými informacemi, ze kterých vyplývá, že u mnoha nádorů jsou vysoce sialylované izoformy glykoproteinu častější. Je tedy možné, že se tyto aspekty u karcinomu slinivky liší od jiných nádorů. V závěru má však stanovení izoform Tf menší diagnostickou účinnost než CA19-9 [11].

### **2.4 Autoimunitní onemocnění**

Některé autoimunitní onemocnění mohou také způsobovat zvýšení CDT a to z důvodu změn v glykosylaci a sialyzaci plazmatických proteinů. Mezi taková onemocnění patří například revmatoidní artritida (RA), systémová skleróza (SSc) nebo systémový lupus erythematosus (SLE) [12].

U RA se vyskytují cyklické citrulinované peptidy (CCP), které vznikají při enzymatické přeměně argininu na citrulin pomocí peptidylarginin deiminázy (PAD). U autoimunitních chorob, především u RA, organismus mylně považuje citrulinové peptidy za tělu cizí látky a tvoří proti nim autoprotilátky anti-CCP, které se následně při tomto onemocnění diagnostikují [13].

Dle výzkumů závisí hladina CDT na reakci akutní fáze. Při akutní fázi zánětu se totiž hladina celkového Tf snižuje, ale koncentrace %CDT se zvyšuje. Jelikož hodnota %CDT koreluje i s dalšími markery aktivity onemocnění RA, může mít CDT jistou souvislost s aktivitou RA [12].

### **3 Rakovina močového měchýře**

Karcinom močového měchýře je celosvětově desátým nejčastějším typem rakoviny a představuje významnou příčinu mortality. Tento typ rakoviny je přibližně čtyřikrát častější u mužů než u žen [14]. Pacienti s karcinomem močového měchýře mají obecně v pokročilých stádiích onemocnění špatnou prognózu [15].

Klinické spektrum karcinomu lze rozdělit do tří kategorií, lišící se prognózou, léčbou a terapeutickými cíli [16].

První kategorii tvoří neinvazivní karcinom močového měchýře, jehož léčba je zaměřena na snížení počtu recidiv a prevenci progresu do pokročilejšího stadia. Druhá skupina zahrnuje svalově invazivní onemocnění, u kterého je zvýšené riziko progresu do metastatického onemocnění, a proto je nutná definitivní lokální léčba, která zahrnuje chirurgické odstranění močového měchýře nebo ozařování. Třetí a poslední skupinu tvoří metastatické onemocnění, u kterého je rozhodující prodloužení délky a zachování kvality života [16].

#### **3.1 Vliv kouření**

Hlavním rizikovým faktorem karcinomu močového měchýře je kouření tabáku, který představuje přibližně 50 % případů. Tabák obsahuje četné karcinogeny jako jsou například polycyklické aromatické uhlovodíky nebo aromatické aminy [14]. Tyto karcinogeny jsou v těle metabolizovány a vylučovány močí, která se následně hromadí v močovém měchýři a způsobují poškození DNA buněk výstelky močového měchýře [17]. Odvykání kouření tak představuje jedno z nejdůležitějších opatření pro snížení rizika rakoviny a úmrtí.

Několik studií odhalilo, že současní kuřáci mají ve srovnání s nekuřáky trojnásobně vyšší riziko rakoviny močového měchýře. Po ukončení kouření se riziko v průběhu času pomalu snižuje, ale i po 20 letech mají bývalí kuřáci o 50 % vyšší riziko vzniku onemocnění než nekuřáci [14].

### **3.1.1 Vliv elektronických cigaret**

Navzdory nejasným dlouhodobým zdravotním následkům používání elektronických cigaret rychle vzrostlo. Bylo zjištěno, že uživatelé těchto cigaret mají v moči vyšší koncentrace biomarkerů několika karcinogenních sloučenin spojených s rakovinou močového měchýře. Dále bylo prokázáno, že myši vystavené elektronickým cigaretám jsou náchylnější k rozvoji rakoviny [14].

### **3.2 Vliv alkoholu**

Etanol je dalším známým rizikovým faktorem pro vznik několika typů zhoubných nádorů. Rozsáhlá evropská studie sledovala 476 160 osob a nezaznamenala žádnou významnou souvislost mezi konzumací alkoholu a rakovinou močového měchýře. V nedávné studii Masaoka et al se diskutovalo o různé produkci acetaldehydu, který je považován za hlavní karcinogenní vedlejší produkt etanolu, jenž může způsobit poškození DNA. Japonská studie, kterou provedli Zaitso et al. zjistila vyšší riziko rakoviny močového měchýře u osob, které dlouhodobě užívají alkohol. Autoři se domnívají, že japonská populace může mít slabou genetickou toleranci vůči acetaldehydu [18].

Metaanalýza dalších devíti prospektivních studií z roku 2021 zahrnujících 1 971 396 osob však prokázala vyšší riziko rakoviny močového měchýře u mužů dlouhodobě užívajících alkohol, které bylo nezávislé na dávce alkoholu [14].

## **4 Preanalytická fáze vyšetření**

Preanalytická fáze zahrnuje veškeré procesy před analytickým stanovením, které se provádějí jak mimolaboratorně, tak laboratorně, a je důležitá pro spolehlivost a správnost laboratorního vyšetření. Mimolaboratorní fáze zahrnuje přípravu a poučení pacienta před odběrem, samotný odběr a transport vzorku do laboratoře. U laboratorní fáze je důležitá centrifugace vzorku a jeho skladování. Všechny tyto kroky hrají významnou roli při ovlivnění výsledku stanovení [19].

#### 4.1 Interference ve vzorku

Nejčastějším biologickým materiálem je krevní sérum, které se odebírá pacientovi nalačno do vakuových zkumavek. Tyto zkumavky mohou obsahovat separační gely, které jsou určeny k oddělení séra od ostatních krevních elementů [20]. Při vyšetření z krevní plazmy mohou interferenci ve vzorku způsobovat antikoagulační činidla EDTA a heparin, které se přidávají do zkumavek a mohou tak narušit saturaci  $\text{Fe}^{3+}$  [21].

Dalším rušivým efektem je hemolýza nebo vysoká koncentrace bilirubinu u stanovovaného vzorku [22]. U vysoce ikterického vzorku se v chromatogramu, v oblasti mezi asialo- a disialotransferinem, může objevit široký pík, který následně komplikuje vyhodnocení. Pokud je u vzorku přítomna silná hemolýza, kdy je koncentrace hemoglobinu vyšší než 1,3 g/l [5], může u stanovení pomocí HPLC nebo kapilární elektroforézy způsobit rozšíření píků, které následně překryjí část píku disialotransferinu ve vyhodnoceném záznamu. U kapilární elektroforézy interferují kromě hemolýzy i vysoké koncentrace imunoglobulinů [6].

#### 4.2 Stabilita vzorku

Pokud jde o stabilitu vzorku, v plné krvi se hodnota CDT považuje za stabilní po dobu až 24 hodin před separací séra. Po separaci je sérum při pokojové teplotě (20 °C) stabilní až jeden den. Již po 3 dnech, kdy je vzorek skladován při této teplotě se koncentrace CDT může navýšit až o 25 % a způsobit tak falešně pozitivní výsledek [21]. Pokud by byl vzorek vystavený pokojové teplotě po dobu delší než týden, vedlo by to k degradaci Tf a zvýšení frakce hexasialo-Tf [6]. Při teplotě 4-8 °C je vzorek stabilní až 7 dní [20] a při - 20 °C se vzorek může uchovávat 3 měsíce až 2 roky [6]. Sérum se může také uchovávat při teplotě - 70 °C, a to po dobu několika let [22]. Dle studií se ukázalo, že opakované zmrazování a rozmrazování vzorku neovlivňuje výslednou hodnotu CDT [6].

#### 4.3 Faktory ovlivňující výsledek

Dalším faktorem, který může narušit správnost preanalytické fáze, je prodloužený časový interval mezi odběrem krve a centrifugací, který způsobuje zvýšení CDT v séru, takže delší přeprava vzorků plné krve může posunout původně referenční hodnoty CDT k hraničním nebo patologickým výsledkům [23].

Další preanalytické kroky, které mohou bránit kvantifikaci Tf glykoforem, jsou neúplné nasycení železem před samotnou analýzou a hyperlipémie u metody HPLC.

Odstranění lipidů ze vzorku se docílí pomocí roztoku dextran-sulfátu-CaCl<sub>2</sub>, který se přidá ke směsi sérum-železo a inkubuje se při 4 °C po dobu alespoň 4 hodin nebo přes noc. Po odstředění se supernatant zředí vodou [6].

## 5 Metody stanovení karbohydrát-deficientního transferinu

Ke stanovení tohoto biomarkeru se v klinických laboratořích využívají různé metody, které zahrnují elektroforetické, chromatografické a imunochemické techniky.

### 5.1 Obecný postup analýzy

Obecně se analýza CDT provádí ve třech základních krocích, kdy se nejprve saturuje Fe<sup>3+</sup> pro dosažení plné saturace všech molekul Tf ve vzorku [21] a to pomocí železito-nitrioltrioctové kyseliny (FeNTA), která poskytuje téměř okamžité a úplné nasycení [6]. Tf můžeme rozdělit na 3 druhy, dle jeho schopnosti vázat železo. Pokud na Tf není navázané žádné železo, nazývá se apo-transferin (Fe<sub>0</sub>-Tf). Další možností je navázání železa na C- nebo N-koncové vazebné místo, tedy monoferrický transferin (Fe<sub>1C</sub>- nebo Fe<sub>1N</sub>-Tf). Poslední možností je navázání železa na obě vazebná místa – diferrický transferin (Fe<sub>2</sub>-Tf). Po saturaci trojmocným železem tedy získáme formu Fe<sub>2</sub>-Tf [24]. Tento krok je důležitý, protože pokud by proběhla neúplná saturace, došlo by během frakcionace k přeměně Fe<sub>1</sub>- nebo Fe<sub>0</sub>-Tf, což by mohlo vést k vylučování CDT společně s non-CDT izoformami majícími stejný izoelektrický bod (pI), ale jiný obsah kyseliny sialové a železa [23]. Saturace se provádí před každým stanovením bez ohledu na separační postup a způsob analýzy [21].

Po saturaci následuje separace CDT elektroforetickou nebo chromatografickou metodou, která umožní izolaci od non-CDT izoform a dalších komponent v séru. Nejspolehlivější metodou je izoelektrická fokusace, méně senzitivní jsou potom chromatografické metody – nejčastěji aniontová chromatografie nebo HPLC [4].

Následuje detekce a kvantifikace CDT izoform pomocí imunochemických metod, kdy se nejčastěji používají komerční kity pro radioimunoanalýzu (RIA) nebo turbidimetrickou imunoanalýzu (TIA) [4].

### 5.2 Vyjádření výsledku

Výsledek CDT můžeme vyjádřit buď jako absolutní, tedy mg/l případně U/l, anebo jako relativní tzn. jako procentuální podíl CDT izoform z celkového Tf [25]. Diagnostická validita se v různých studiích liší, ale obecně je v naprosté většině uváděno

rozmezí specifity okolo 80 – 90 % [23], zatímco senzitivita kolísá mezi 0 % až téměř 100 % [4].

### **5.3 Ovlivnění výsledku**

Falešně pozitivní výsledek CDT může způsobit těžké selhání jater (primární biliární cirhóza, chronická virová hepatitida nebo hepatocelulární karcinom), vrozené poruchy glykosylace, genetické varianty Tf, těhotenství (zejména 3. trimestr), anémie z nedostatku železa (dochází ke změně celkového množství Tf v séru), nízký feritin, vysoký celkový Tf nebo kombinovaná transplantace pankreatu a jater [23].

Vliv na hladiny CDT v těle má také pohlaví, BMI, kouření, věk a v neposlední řadě samozřejmě příjem alkoholu nad 60 g/den [4].

## **6 Elektroforetické metody**

Mezi nejčastěji používané elektroforetické metody pro stanovení CDT patří izoelektrická fokusace a kapilární zónová elektroforéza.

### **6.1 Izoelektrická fokusace**

IEF je první metodou, která byla použita pro stanovení CDT a její využití přetrvalo až do poloviny 80. let [26]. Tato metoda je považována za velmi přesnou, avšak vysoce technicky náročnou a vzhledem k její vysoké selektivitě je užívána jako referenční metoda [4]. Zpočátku byla aplikovaná samostatně a sloužila tak ke kvalitativnímu hodnocení. Později byla pro získání kvantifikačního výsledku propojena s imunochemickými metodami, avšak tento přístup vykazoval příslušné limity z hlediska přesné kvantifikace, což vedlo k falešně pozitivním a falešně negativním výsledkům [26].

#### **6.1.1 Princip**

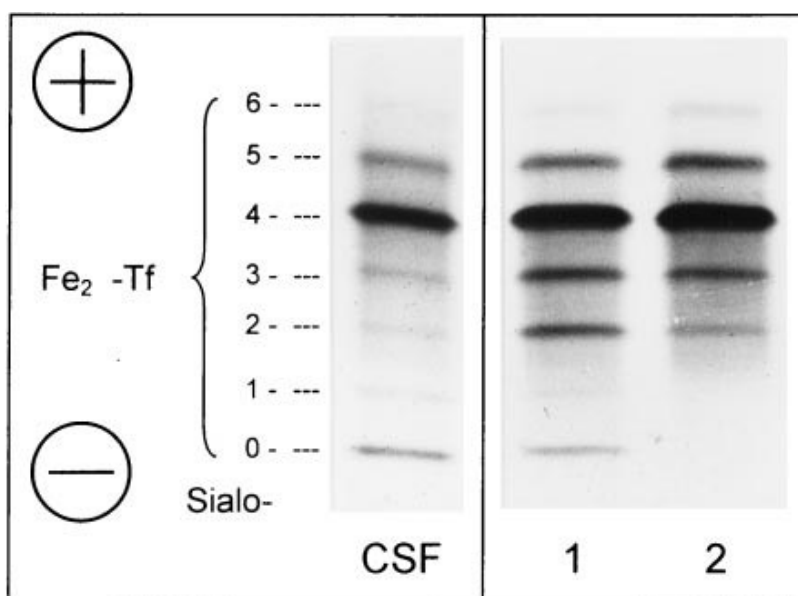
Mezi elektrodami se vytváří gradient pH, který pozvolna stoupá směrem od anody ke katodě [27]. Po nasycení  $\text{Fe}^{3+}$  se v gelu, který obsahuje gradient pH, následně oddělí izoformy Tf podle jejich charakteristických pI [23]. Vlivem napětí tedy dělené látky migrují až do místa separace, kde je hodnota pH rovna izoelektrickému bodu. Dochází tak k rozdělení vzorku na zóny, které vykazují stejnou hodnotu pH [2].

#### **6.1.2 Provedení metody**

Tato metoda využívá jako nosič polyakrylamidový nebo agarózový gel o pH 5 – 6. Součástí těchto gelů jsou amfoliny, které v elektrickém poli poskytují kontinuální rozsah pH [27].



Pásky Tf jsou vizualizovány imunofixací pomocí králičí IgG protilátky působící proti lidskému Tf, která se nanáší přímo na gel, aby došlo k precipitaci izoform Tf uvnitř gelu. Následuje vymytí nenavázané protilátky a obarvení zón. Následně je absorbance pásů měřena pomocí laserové denzitometrie a CDT je stanoveno v poměru k Tf [28].



Obrázek 4: Pásky Fe<sub>2</sub>-isotransferinu (Fe<sub>2</sub>-Tf) v séru a mozkomíšním moku (CSF) získané pomocí izoelektrické fokusace. Mozkomíšní mok slouží jako reference pro lokalizaci izotransferinových pásů. Pruh 1 – sérum pacienta; pruh 2 - kontrolní sérum. Převzato z [29]

Výhodou této metody je malý objem materiálu, který je k diagnostice zapotřebí (jedná se o cca 1 µl vzorku), což je ve srovnání s chromatografickými metodami, které obvykle vyžadují 100-500 µl vzorku, velkým benefitem [23].

Tabulka 1: Hraniční hodnoty CDT v séru pacienta pomocí různých metod izoelektrické fokusace. IEF - izoelektrická fokusace; IF - imunofixace; WB - western blotting [23]

Metoda	Ženy	Muži	Analytická specifčnost
IEF s IF	4,4 %	4,4 %	Asialo-, mono- a disialo-Tf
IEF bez IF	8,4 %	8,4 %	Asialo-, mono- a disialo-Tf
IEF – WB	100 mg/l	100 mg/l	Asialo-, mono- a disialo-Tf

## 6.2 Kapilární zónová elektroforéza

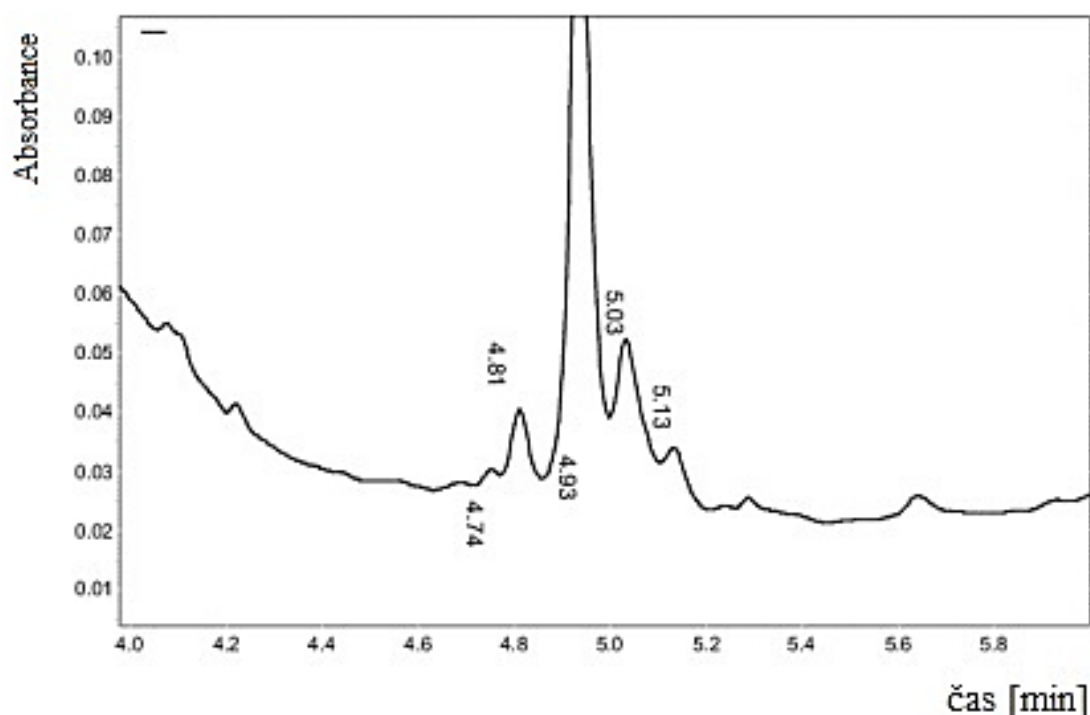
V roce 1998 byla navržena první metoda s použitím kapilární elektroforézy. Stanovení CDT bylo dosaženo separací Tf glykoforem v pufru tetraboritanu sodného o pH 8,3 s následnou přímou UV detekcí při 200 nm. Metoda byla v následujících letech zdokonalována až k úplnému rozlišení glykoforem CDT [26].

CZE je účinná separační metoda, která je schopna poskytnout úplnou separaci, kvantifikaci a vizuální obraz hlavních Tf glykoforem [6]. Je zároveň nejjednodušší elektromigrační technikou, při které k separaci dochází v základním elektrolytu. Díky odlišnosti pohyblivosti složek ve vzorku dochází k jejich rozdělení [2].

### **6.2.1 Provedení metody**

Používají se křemenné kapiláry [21] a pro dosažení absorpčního maxima peptidových vazeb probíhá detekce při vlnové délce 200 - 214 nm. Vlnová délka absorpčního maxima komplexu železo-Tf je nedostatečná pro dosažení přijatelné analytické citlivosti, a tak se pro stanovení nepoužívá. Důsledkem však je, že v místě detekce mohou imunoglobuliny a jejich lehké řetězce, C-reaktivní protein atd. v zásadě interferovat s CDT. Proto je důležitá kvalita elektroforetické separace, která udává analytickou selektivitu. Ta je však v moderních přístrojích dostatečně účinná [28].

Hlavním problémem této techniky je zabránění adsorpce bílkovin na vnitřním povrchu kapiláry. Toho lze lépe dosáhnout při dynamickém potahování než při permanentním potahování. Byla vytvořena metoda CZE pro stanovení CDT, která kombinuje účinky vysoké iontové síly pufru, použití vysoké hodnoty pH a dynamického dvojitého povlaku. Dvojitá vrstva polymerů, která je po každém elektroforetickém běhu odstraněna a před dalším během regenerována, zvyšuje počet záporných nábojů na stěně kapiláry. Adsorpce proteinů je minimalizována, což vede ke konstantnímu elektroosmotickému toku a získání vysokého počtu teoretických pater a dobré symetrie píků [23].



Obrázek 5: Typický elektroferogram glykoform transferinu abstinujícího pacienta (disialotransferin = 0,80 %; legenda píků: disialotransferin (4,74 min), trisialotransferin (4,81 min), tetrakisialotransferin (4,93 min), pentakisialotransferin (5,03 min), hexakisialotransferin (5,13 min)). Upraveno dle [30].

### 6.2.2 Výhody a nevýhody metody

Specifická a senzitivita je u CZE ve srovnání s IEF nižší [21]. Pokud bychom tuto metodu srovnávali s chromatografickou metodou HPLC, je metoda CZE účinnější pro poskytnutí ostřejších píků, které jsou detekovatelné i v případě, že jsou jejich plochy minimální, jako tomu je u píku asialo- izoformy [1].

Tabulka 2: Hraniční hodnoty CDT v séru pacienta pomocí kapilární zónové elektroforézy. CZE – kapilární zónová elektroforéza [23]

Metoda	Ženy	Muži	Analytická specifčnost
CZE	3 %	3 %	Asialo-, mono- a disialo-Tf
CZE	4,5 %	4,5 %	Asialo-, mono-, di a trisialo-Tf

## 7 Chromatografické metody

Nejběžnější chromatografickou metodou pro stanovení CDT je HPLC neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Ta byla poprvé publikována v roce 1993, kdy byly glykoformy CDT separovány pomocí anexové kolony s elucí solného gradientu a poté kvantifikovány přímou detekcí při vlnové délce 460 nm [26].

## 7.1 Systém vysokoúčinné kapalinové chromatografie

HPLC systém se ve většině případů skládá z kvartérního čerpadla s degasserem (odplynění mobilní fáze), autosampleru, kolony umístěné v termostatu, detektoru a chromatografického softwaru [31]. Druhy detekce spojené s HPLC jsou nejčastěji spektrofotometrický detektor (UV/UV-VIS), fluorescenční detektor (FLD) nebo hmotnostní detektor (MS) [32].

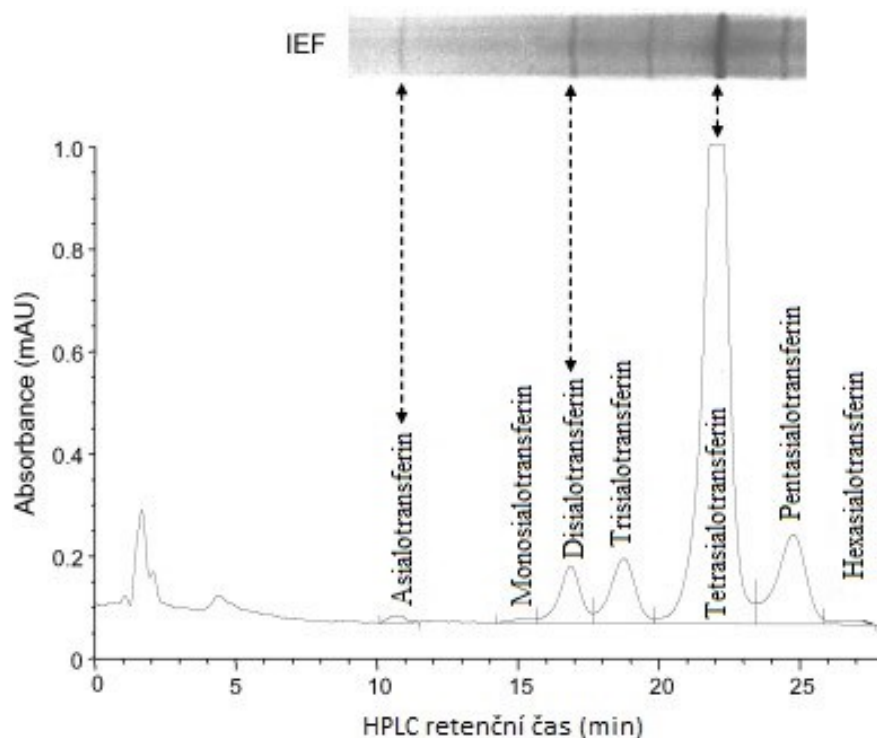
## 7.2 Princip

Metoda HPLC je stejně jako metoda CZE účinná separační technika schopna poskytnout úplnou separaci, kvantifikaci a vizualizaci hlavních Tf glykoforem [6]. K separaci se využívá mobilní fáze (MF), jejíž složení se může v čase měnit. Ta unáší vzorek do kolony naplněné stacionární fází, v níž se analyty zdržují po určitou dobu a eluují MF v závislosti na své afinitě ke stacionární fázi. Průměrná doba, za kterou analyt projde kolonou a je detekována, se nazývá retenční čas [32].

Izoformy Tf mají izoelektrický bod mezi 5,7 - 5,9, takže při konkrétní hodnotě pH je čistý náboj molekuly nulový. Například tetrasialotransferrin má pI 5,4, což znamená, že při pH 5,4 je čistý náboj této izoformy nulový [6]. V souladu s tím se izoformy liší v čistém náboji pouze na základě rozdílů obsahu kyseliny sialové [31]. Při použití mobilní fáze, jejíž pH je vyšší než pI, se molekula nabije záporně. V kombinaci s kolonou, jejíž stacionární fáze je kladně nabitá, jsou záporné molekuly Tf elektrostaticky přitahovány ke stacionární fázi [6].

## 7.3 Provedení metody

První krok spočívá v saturaci séra železem, následuje vysrážení lipoproteinů pomocí dextransulfátu a jejich odstranění centrifugací. Odebraný supernatant se následně ředí vodou a převádí se do automatického nastřikovacího zařízení. Izoformy s pI 5,7 - 5,9 jsou následně rozděleny na iontoměničové koloně v solném gradientu. Jednotlivé Tf se detekují pomocí spektrofotometrického detektoru při 460 nm a jejich výsledná hodnota je vyhodnocena příslušným ovládacím softwarem jako pík o určité ploše [21]. Na základě ploch píků se stanoví podíl disialotransferinu k celkovému Tf a výsledek je udáván v procentech [25].



Obrázek 6: Chromatogram pacienta s prokázaným chronickým alkoholismem. Uvedena je také separace pomocí izoelektrické fokuse (IEF). Upraveno dle [25].

#### 7.4 Výhody a nevýhody

HPLC je ve srovnání s CZE považována za lepší metodu z důvodu vyšší analytické specifity, neboť je založena na selektivním měření absorbance komplexu transferin - železo při vlnové délce 460 nm [6]. Na rozdíl od CZE je také metoda HPLC díky odlišné vlnové délce méně náchylná k interferencím [33].

Její nevýhodou je však náročnější příprava vzorku a časově náročná regenerace kolony. Kromě toho jsou chromatografické kolony drahé. Teplota kolony může také ovlivňovat výsledný retenční čas. Pokud je v koloně zvýšená teplota, retenční čas se zkracuje, snížená teplota naopak vede k prodloužení retenčního času [32].

### 8 Imunochemické metody

Nejčastější imunochemické metody, které se ke stanovení CDT v klinických laboratořích využívají, jsou turbidimetrické (TIA) a nefelometrické (NIA) imunoanalýzy nebo imunoenzymatická analýza (ELISA) [26].

Pro zavedení kvantitativní metody byla vyvinuta technika, při které byly glykoformy příbuzné CDT extrahovány ze séra pomocí mikrokolonové iontové výměnné

chromatografie s následnou imunochemickou kvantifikací Tf přítomného v extrahovaném materiálu pomocí antisér proti lidskému Tf. Později byly vyvinuty diagnostické soupravy, které využívaly podobnou extrakci CDT na aniontově výměnných jednorázových kazetách, ale lišily se technikou imunochemické detekce (RIA, EIA, TIA atd.) [26].

Tento analytický přístup se pro svou jednoduchost stal vhodný pro rutinní analýzu, avšak slabou stránkou byla specifická jednorázových extrakčních kazet, která byla nízká a silně závislá na podmínkách prostředí a manuální obsluze [26].

### 8.1 Turbidimetrická imunoanalýza

Pomocí iontově výměnné mikrokolony získáme eluované CDT izoformy Tf, které následně vytváří imunitní komplexy s transferinovými protilátkami, které se kvantifikují turbidimetricky. Koncentrace celkového Tf se měří odděleně za použití stejných protilátek [34]. TIA měří součet asialo-, monosialo-, disialo- a část (~ 50 %) trisialo- jako relativní množství k celkovému Tf [35].

*Tabulka 3: Referenční hodnoty CDT v séru pacienta pomocí turbidimetrické imunoanalýzy. TIA – turbidimetrická imunoanalýza [23]*

Metoda	Ženy	Muži	Analytická specifčnost
TIA	2,5 - 2,7 %	2,5 - 2,7 %	Asialo-, mono- a disialo-Tf
TIA	5 - 6 %	5 - 6 %	Asialo-, mono-, di a 50 % trisialo-Tf

Nevýhodou této metody je, že velmi nízké nebo naopak vysoké hodnoty trisialotransferinu mohou ovlivnit výsledek CDT a poskytnout tak falešně pozitivní nebo negativní vyhodnocení [35]. Další nevýhodou jsou možné interference non-CDT Tf izoform, které mohou eluovat z extrakční kolony společně s CDT glykoformami [34].

### 8.2 Nefelometrická imunoanalýza

NIA využívá monoklonální protilátky, které se přidávají k eluátu a tato imunoreakce následně probíhá na polystyrenových částicích [21]. Monoklonální protilátka rozpoznává strukturu Tf glykoform, které postrádají 1 nebo 2 kompletní N-glykany, tedy disialo-, monosialo- a asialotransferinů, a tak může tyto CDT glykoformy kvantifikovat. Hodnoty CDT se následně vyjadřují jako procento z celkového Tf (%CDT) [36].

Tento přímý imunotest se používá jako jednoduchý screeningový test k vyloučení nadměrného pití u zjevně nealkoholických onemocnění jater, nevýhodou však je, že nedokáže odhalit lehký až středně těžký alkoholismus [36].

### **8.3 Imunoenzymatická analýza**

Koncentrace CDT pomocí ELISA se stanovuje v biologických materiálech v mikrotitračních destičkách. Prvním krokem je aplikace vzorku do destičky, která obsahuje specifickou protilátku pro transferin. Následuje inkubace a promytí. Poté se přidá sekundární protilátka specifická pro CDT, která je značená enzymem, běžně křenovou peroxidázou. Následuje další inkubace, promytí a přidání substrátu, což je obvykle chromogenní látka. Enzymová substrátová reakce je následně zastavena kyselinou a změna barvy se měří při 450 nm [37].

Nejčastějším biologickým materiálem pro stanovení CDT metodou ELISA je sérum, ale různé studie zkoumaly i stanovení ve vzorcích slin. To se však ukázalo jako nevhodné pro diagnostiku závislosti na alkoholu, jelikož hladina CDT ve slinách s použitím této metody nebyla zvýšena. Důvodem, proč se CDT ve slinách nezvyšovalo, může být příliš velká molekulová hmotnost CDT, aby se mohlo přenést z krve do slin. Obecně totiž platí, že látky s vysokou rozpustností v lipidech a nízkou molekulovou hmotností mají větší šanci přejít z krve do slin [37].

## **9 Další markery chronického alkoholismu**

Vzhledem k tomu, že samotný etanol se rychle metabolizuje a vylučuje z těla, je posouzení konzumace alkoholu pomocí krevních testů založeno na jiných markerech než etanolu, které vypovídají o jeho konzumaci [38]. Kromě biomarkeru CDT máme i další ukazatele nadměrného užívání alkoholu. V ideálním případě by laboratorní markery měly detekovat jak chronický abúzus alkoholu (screeningové markery), tak akutní exces (markery relapsu) [23].

Obecně platí, že screeningový marker by měl vykazovat vysokou citlivost a specifčnost a měl by rozlišovat mezi bezpečnou společenskou konzumací alkoholu a těžkým pitím. Navíc by také neměl být zvýšen nealkoholovým poškozením orgánů. Marker používaný k odhalení recidivy by měl být citlivý na jakoukoli konzumaci alkoholu nad bezpečnou míru [23].

Chronickou nadměrnou konzumaci alkoholu lze hodnotit stanovením přímých a nepřímých biomarkerů. Přímé biomarkery alkoholu jsou metabolity etanolu, jako je ethylglukuronid (EtG) a fosfatidylethanol (PEth), zatímco nepřímé biomarkery jsou

laboratorní ukazatele spojené s poškozením orgánů a tkání v důsledku dlouhodobého nadměrného pití alkoholu [6].

Tradiční nepřímé biomarkery zahrnují testy jaterních enzymů (enzymy  $\gamma$ - glutamyltransferáza (GGT), aspartát- a alaninaminotransferáza (AST, ALT)) a střední korpuskulární objem erytrocytů (MCV) [25], které jsou založeny na sekundárních účincích alkoholismu souvisejících s poškozením orgánů nebo buněk [6]. Tyto nepřímé biomarkery se stanovují pomocí rutinních biochemických a hematologických metod na automatických analyzátoch [23] a jejich omezením je nedostatečná specifita pro účinky související s alkoholem [25].

## **9.1 Ethylglukuronid**

EtG je stabilní přímý metabolit ethanolu, který je netěkavý a ve vodě rozpustný. Lze ho detekovat v tělesných tekutinách a ve vzorcích vlasů, a to i po úplném vyloučení alkoholu z těla [23]. Obecně je EtG v moči detekovatelný do 1 hodiny po požití [39], pokud ale koncentrace ethanolu v krvi přesáhne 183 mg/dl (1,83 ‰) je možno ho v moči zachytit i po 80 hodinách abstinence. Bylo prokázáno, že jeho tvorba závisí na koncentraci ethanolu v séru a vrcholí o 2 až 3,5 h později než ethanol v krvi [23]. Co se týče obsahu EtG ve vlasech, ten může být ovlivněn úpravou vlasů, včetně častého šamponování, barvení, odbarvování nebo tepelnou úpravou [39]. Pro stanovení jsou popsány různé analytické metody, zejména s použitím kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) nebo plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) [23].

## **9.2 Fosfatidylethanol**

PEth je fosfolipid vznikající v buněčných membránách v přítomnosti ethanolu. Rychlost jeho degradace je ve srovnání s jeho tvorbou pomalá [23] a tak slouží jako přímý biomarker pro odhalení aktivního chronického nadměrného pití alkoholu. PEth vykazuje vysokou diagnostickou senzitivitu a specifitu [38]. K vytvoření detekovatelných koncentrací v krvi je zapotřebí asi třítýdenní zátěž 750-1000 g ethanolu (40-50 g denně) [23]. V průměru je potom detekovatelný téměř 28 dní v závislosti na požitém množství [38].



Původně bylo k měření PEth používáno HPLC. Použitím citlivější metody LC-MS/MS se ukázalo, že tvorba PEth začíná přibližně po 1 hodině od požití alkoholu, a dosahuje koncentrace přibližně 35-237 µg/l [38].

### **9.3 Jaterní enzymy**

#### Gama-glutamyltransferáza

GGT je důležitý a citlivý membránový enzym, využívaný ke zjištění jaterního onemocnění či onemocnění žlučových cest [40]. Neomezuje se však pouze na játra, ale lze jej nalézt také v ledvinách, slinivce břišní nebo prostatě. Fyziologické hodnoty GGT v séru jsou u mužů téměř o 50 % vyšší než u žen, a to především kvůli GGT nacházející se v prostatě [41].

Nevýhodou tohoto citlivého markeru však je, že nedokáže rozlišit jaterní onemocnění pocházející z alkoholu od jaterního onemocnění, které nemá alkoholový původ [42]. U jednorázového příjmu alkoholu se aktivita GGT nijak nemění, avšak při chronické konzumaci se zvyšuje. K fyziologickým hodnotám aktivity GGT dochází po 2 - 5 týdenní abstinenci alkoholu [43]. Falešně pozitivní výsledky jsou spojeny s obezitou, hypertenzí, diabetem 2. typu [42], kouřením či s některými typy léků [38].

#### Aspartátaminotransferáza

Dalším jaterním enzymem je AST, které má dva izoenzymy – mitochondriální aspartátaminotransferázu (mAST) a cytoplasmatickou aspartátaminotransferázu (cAST). Enzymová aktivita u zdravých osob zahrnuje převážně cAST, zatímco u osob, které konzumují příliš mnoho alkoholu, dochází k selektivnímu poškození jaterních mitochondrií, což má za následek zvýšenou aktivitu mAST [44]. Kromě jater je tento enzym přítomen v menším množství také ve tkáních, jako jsou svaly, srdce, ledviny, mozek nebo erytrocyty, kdy se hladina AST zvyšuje 6 hodin po poškození tkáně [40].

#### Alaninaminotransferáza

Posledním zmíněným jaterním enzymem je ALT, který se při poškození nebo zánětu jaterní tkáně uvolňuje do krevního oběhu a dochází ke zvýšení jeho hladiny v séru. ALT je považován za specifitější marker poškození jater alkoholem, protože se nachází hlavně v játrech, zatímco AST se nachází i v různých jiných orgánech [40]. Obecně však

platí, že kvůli změnám v jiných orgánech se hladiny AST a ALT zvyšují, což je pro diagnostiku alkoholismu poměrně nespecifické. Pro posouzení diagnostického významu se proto využívá poměr aktivit AST: ALT, tzv. de Ritisův index, který má u alkoholového poškození jater, hodnotu více než 2 [44].

#### **9.4 Střední korpuskulární objem erytrocytů**

Zvýšená hodnota MCV neboli makrocytóza může být způsobena nadměrnou konzumací alkoholu [40], avšak může také souviset s nedostatkem vitamínu B12 a kyseliny listové, onemocněním jater, některým hematologickým onemocněním nebo kouřením [45]. Referenční rozmezí u dospělých je 82-96 fl [46]. MCV je podobně jako GGT považován za účinný biomarker chronického alkoholismu, a to především díky poločas rozpadu erytrocytů, který je přibližně 120 dní, a tak zvýšená hladina MCV přetrvává v krevním oběhu několik měsíců i poté, co člověk přestane alkohol pít [40]. MCV se tedy vrací k fyziologickým hodnotám obvykle po 3-6 měsících abstinence alkoholu [45].

### **10 Vyšetření karbohydrát-deficientního transferinu v těhotenství**

Těhotenství má za následek významné změny, které ovlivňují metabolismus v těle matky. V průběhu těhotenství se koncentrace řady biochemických parametrů významně liší od hodnot u netěhotných žen, a proto je pro přesnou interpretaci laboratorních výsledků třeba upravit některé referenční intervaly [47]. To se týká i CDT, u kterého je pro těhotné navržena vyšší hraniční hodnota. V těhotenství totiž dochází k fyziologickému zvýšení CDT, jehož hodnota závisí na gestačním věku [6]. Důvodem tohoto zvýšení je rostoucí hladina celkového Tf, kdy dochází i ke zvýšení jeho jednotlivých izoforem, tedy i disialotransferinu [48]. K poklesu hodnot CDT potom dochází zhruba během 8-15 týdnů po porodu, kdy se normalizuje i Tf celkový [49].

Dle studií se %CDT zvyšuje z hodnot přibližně 1,07 %, které byly získány během 9. – 16. týdne, na hodnoty přibližně 1,61 % získané během 1 týdne před porodem [49]. Ze studie Vincenza Bianchi však žádná z těhotných žen nevykazovala hodnotu CDT vyšší než 2 %. To naznačuje, že významný příjem etanolu (> 20 g/den) pravděpodobně zvýší CDT ve větší míře, než jsou odchylky pozorované v průběhu pozdního těhotenství [48].

Včasný screening a prevence nadměrného pití u matek během těhotenství jsou vzhledem k vrozeným vadám a poruchám plodu velmi důležité [47]. Při konzumaci alkoholu během těhotenství může u plodu nastat fetální alkoholový syndrom (FAS), který pokud je u dítěte diagnostikován až po narození, je trvalý a nevratný [48].

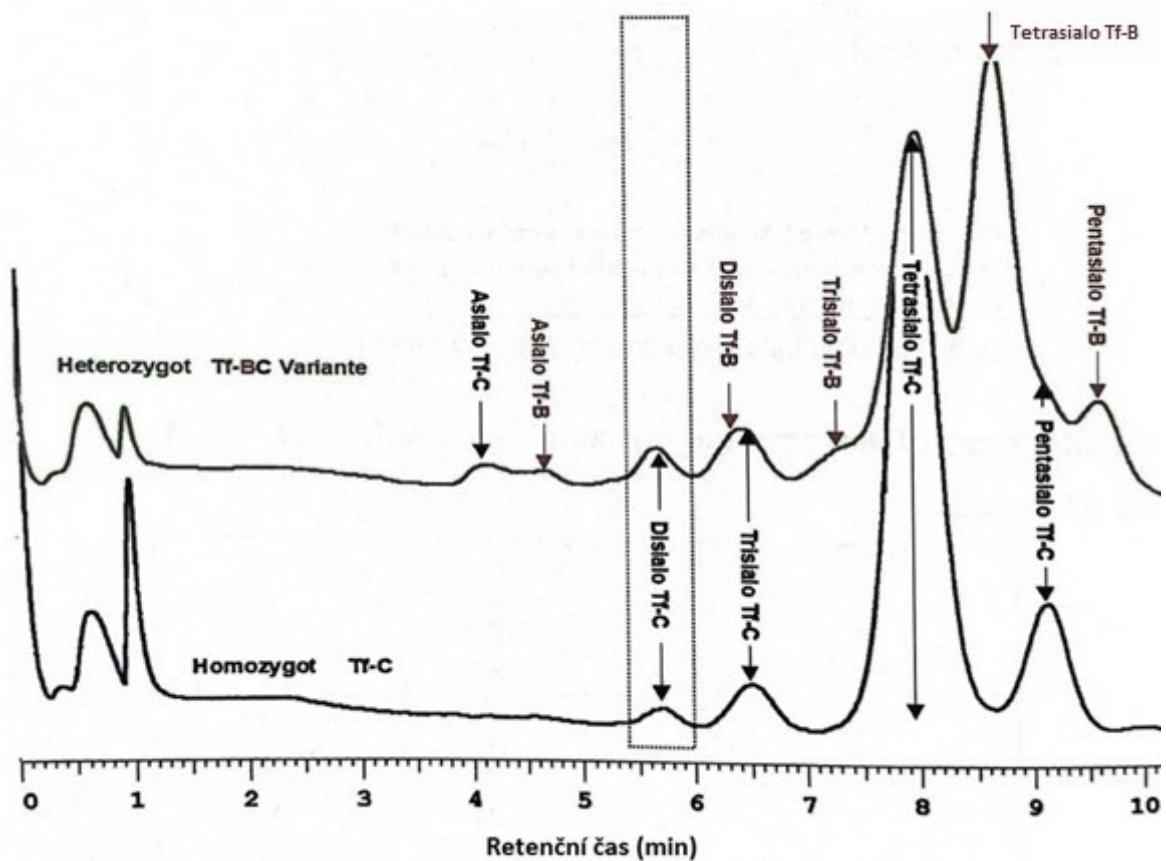
Kromě FAS je i mírná konzumace alkoholu a nárazové pití spojeno se zvýšeným rizikem spontánního potratu, narození mrtvého dítěte a úmrtí novorozence. %CDT však bohužel nemá dostatečnou citlivost pro odhalení středně těžké konzumace alkoholu, kdy již může být přítomno riziko nebo dokonce poškození [48].

## **11 Genetické varianty transferinu**

Genetické varianty transferinu jsou způsobené především substitucemi aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Jedná se o mutace genu, které se vyskytují na různých alelách Tf. V současné době je známo asi 38 různých variant [5], přičemž nejčastější formou je transferin C (Tf-C) [50], který je považován za normální homozygotní typ. Další, ale méně časté typy jsou transferin B (Tf-B) a transferin D (Tf-D), které mohou interferovat s analýzou CDT. Tyto varianty se v evropské populaci objevují jako heterozygotní transferin BC (Tf-BC) a transferin CD (Tf-CD) [5]. Vysoké hladiny CDT mohou být mimo chronického abúzu alkoholu způsobeny také mutací v genu Tf, která ovlivní glykosylační místo, což vede ke ztrátě N-glykanu. V důsledku toho chybí molekule Tf jeden sacharidový řetězec, tedy i dvě kyseliny sialové, což vede ke stejnému množství tetrasialo-Tf a disialo-Tf [51].

### **11.1 Heterozygotní varianta transferin-BC**

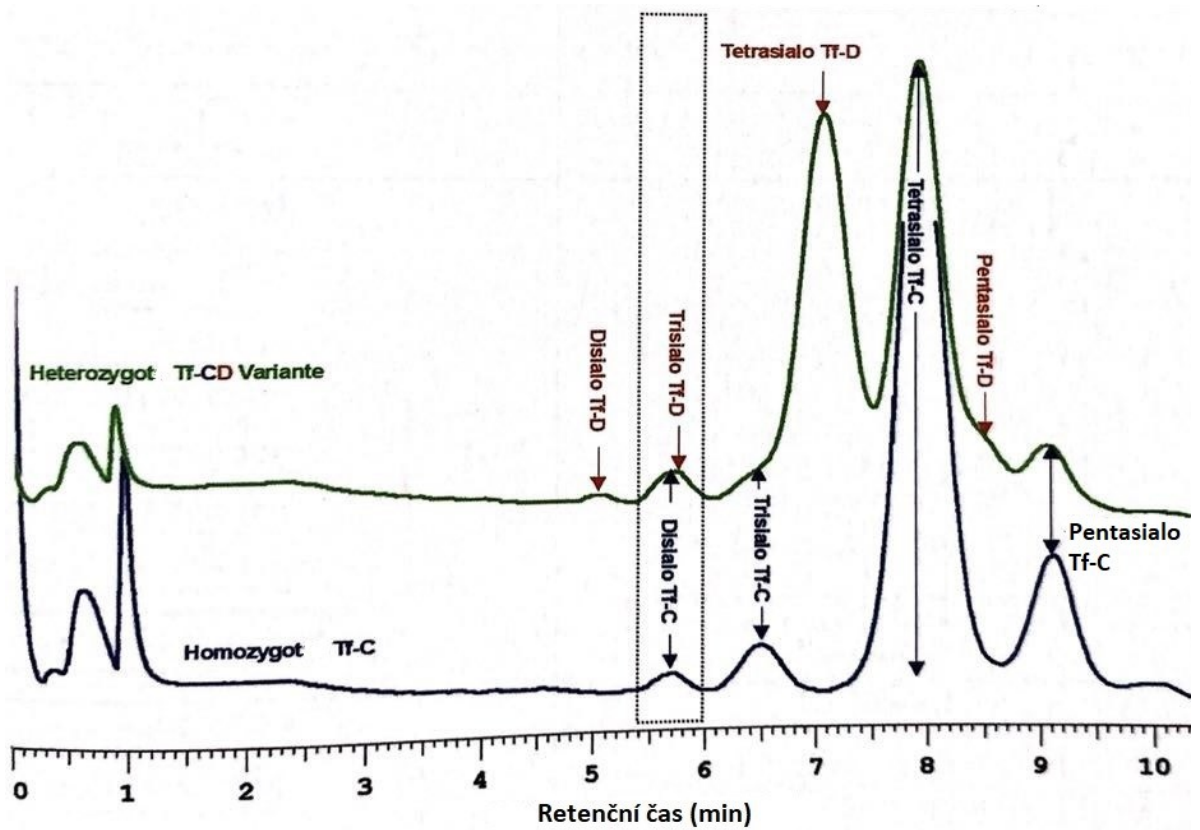
V případě této varianty obsahuje chromatogram všechny píky glykoform Tf-C a Tf-B. Jelikož se glykoformy Tf-B eluují s vyšší retencí než glykoformy Tf-C, vykazuje tento chromatogram, oproti homozygotní variantě Tf-C, další píky. Nejvíce patrné jsou dva hlavní píky přibližně stejné velikosti, které představují tetrasialo-Tf-B a tetrasialo-Tf-C. V případě této heterozygotní varianty se píky disialo-Tf-B a trisialo-Tf-C vzájemně překrývají, a tak vyhodnocení není možné [5].



Obrázek 7: Chromatogram heterozygotní varianty transferinu-BC v patologickém rozmezí (nahore) a homozygotní varianty transferinu-C v referenčních mezích (dole) metodou HPLC. Upraveno dle [5].

## 11.2 Heterozygotní varianta transferin-CD

V případě heterozygotní varianty Tf-CD obsahuje chromatogram všechny píky glykoforem Tf-C a Tf-D. Na rozdíl od varianty Tf-BC se glykoformy Tf-D eluují s nižší retencí než glykoformy Tf-C. Chromatogram tedy opět vykazuje další píky ve srovnání s chromatogramem homozygotní varianty Tf-C. V záznamu jsou opět dva hlavní píky přibližně stejné velikosti, které představují tetrasialo-Tf-D a tetrasialo-Tf-C. Stejně jako u varianty Tf-BC se vzájemně překrývají píky disialo-Tf-C a trisialo-Tf-D, což znemožňuje přesné vyhodnocení [5].



Obrázek 8: Chromatogram heterozygotní varianty transferinu-CD v patologickém rozmezí (nahore) a homozygotní varianty transferinu-C v referenčních mezích (dole) metodou HPLC. Upraveno dle [5].

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 12 Vzorky použité ke stanovení a jejich charakteristika

Ke stanovení karbohydrát-deficientního transferinu (CDT) metodou HPLC bylo použito krevní sérum. Vzorky séra byly poskytnuty z Banky biologického materiálu (BBM) 1. lékařské fakulty (projekt číslo BBMRI\_CZ LM2023033). Sběr vzorků do BBM byl schválen Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a všichni probandi podepsali informovaný souhlas.

Jednalo se o 10 patientských vzorků od nemocných s karcinomem močového měchýře (čísla vzorků 6-10; 16-20) a 10 patientských vzorků od dobrovolných dárců (čísla vzorků 1-5; 11-15). Vzorky s karcinomem močového měchýře zahrnovaly 5 mužů (průměrný věk 59,6 let) a 5 žen (průměrný věk 65,6 let). Vzorky dobrovolných dárců zahrnovaly 5 mužů (průměrný věk 55 let) a 5 žen (průměrný věk 54,6 let). Všichni pacienti s karcinomem močového měchýře byli indikováni k operačnímu výkonu. Odběr krve z periferní žíly proběhl před operačním výkonem.

### 13 Použité pomůcky a reagensie

Použity byly reagensie součástí kitu ClinRep HPLC (Recipe, Německo)

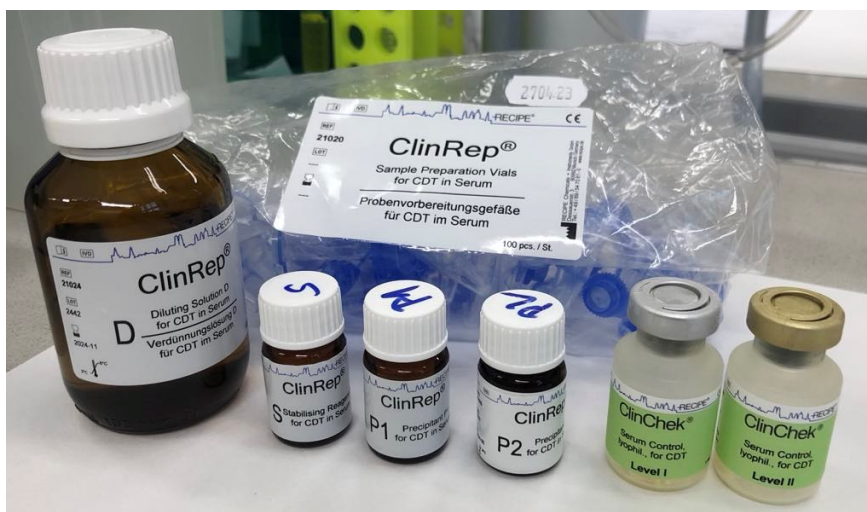
- Stabilising Reagent S
- Precipitant P1
- Precipitant P2
- Diluting Solution D

Dále byla použita kontrolní séra z kitu ClinCheck (Recipe, Německo) a standardní roztok ClinTest (Recipe, Německo)

- Serum Control lyophilised – Level I – negativní kontrola
- Serum Control lyophilised – Level II – pozitivní kontrola
- Test solution – standardní roztok

#### 13.1 Spotřební materiál

- Špičky potřebné k automatickým pipetám
- Mikrozkuhavky ClinRep o objemu 1,5 ml
- Stojánky
- Skleněné vialky s víčky



Obrázek 9: Obsah kitů ClinRep a ClinCheck (zdroj: vlastní zpracování).

### 13.2 Přístrojová technika

- Automatické pipety (50 – 300  $\mu\text{l}$ , 5 – 50  $\mu\text{l}$ , 100 – 1 000  $\mu\text{l}$ , 1 – 10  $\mu\text{l}$ ) (Finnpipette, Finsko)
- Přístroj HPLC 1260 Infinity Agilent Technologies (Agilent Technologies, USA)
- Termoblok Biosan TS-100C (Biosan, Lotyšsko)
- Centrifuga Hettich MIKRO 185 (Hettich, Německo)
- Vortex VELP ZXClassic (VELP, Itálie)
- Stopky



Obrázek 10: : Přístroj HPLC 1260 Infinity Agilent Technologies (zdroj: vlastní zpracování)

## 14 Pracovní postup

### 14.1 Příprava kontrol ClinChek (Level I, Level II)

Součástí kitu ClinChek byla dvě kontrolní séra v lyofilizovaném stavu ClinChek level I a level II. Do takto připravených lahviček byl přidán 1 ml destilované vody, obsah lahvičky byl promíchán a nechán 15 minut rozpouštět.

### 14.2 Příprava vzorků

Nejprve byly při laboratorní teplotě rozmrazeny vzorky sér pacientů. Séra se za účelem výzkumu uchovávají v kryozkumavkách při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Po samovolném rozmrazení byly vzorky promíchány na vortexu.

Byly připraveny plastové reakční vialky, které jsou součástí kitu ClinRep a očíslovány lihovým popisovačem. Do mikrozukmavky Eppendorf byla připravena směs precipitantů P1 a P2 v poměru 1:5. Dále bylo postupováno dle následující orientační tabulky, která udává potřebné objemy precipitantů k počtu stanovovaných vzorků včetně dvou kontrol.



Tabulka 4: Směšovací poměr precipitantů P1 a P2

Počet vzorků v sérii	Objem P1	Objem P2	Mix P1+P2 do reakce
5	10 µl	50 µl	10 µl
10	20 µl	100 µl	10 µl
15	30 µl	150 µl	10 µl
20	40 µl	200 µl	10 µl
25	50 µl	250 µl	10 µl

Do reakčních vialek bylo napipetováno 150 µl séra nebo kontroly, 30 µl Stabilising Reagent S a 10 µl směsi precipitantů P1 a P2. Vialky byly promíchány po dobu 30 sekund na vortexu a nechány 1 hodinu inkubovat v termobloku při 4 °C ve tmě (pro zajištění temného prostředí byly mikrozkušavky přikryty hliníkovou folií).

Po skončení inkubace byly reakční vialky přemístěny do centrifugy a centrifugovány 5 minut při 10 000 x g. Do označených skleněných vialek bylo napipetováno 1 ml Diluting Solution D a přidáno 100 µl čistého supernatantu z reakčních vialek. Poté byly vialky uzavřeny perforovanými víčky a promíchány na vortexu po dobu asi 5 sekund.

Vzorky nyní byly připraveny k samotnému měření na přístroji HPLC 1260 Infinity Agilent Technologies.

### 14.3 Postup měření na přístroji

1. V programu OpenLAB – ovládací software, byly nastaveny podmínky analýzy dle kitu výrobce viz tab. 5

Tabulka 5: Parametry HPLC

<b>Pumpa</b>	Průtok: 1 ml/min
<b>Mobilní fáze A, B, C</b>	Lahve musí být dobře uzavřené, aby nedošlo k odpařování Gradient viz tab. 6
<b>Kolona</b>	Tlak kolony <50 barů
<b>Termostat kolony</b>	40 °C
<b>UV/VIS detektor</b>	460 nm
<b>Autosampler</b>	Objem nástřiku: 400 µl Doba analýzy: 20 min Oplach jehly po nástřiku (promývací roztok je voda)

2. Kolona byla ekvilibrována 20 minutovým proplachem mobilní fází B a následným 15 minutovým proplachem fází A
3. Jako první vzorek by měřen standartní roztok ClinTest, který sloužil k určení retenčních časů příslušných standardů
4. Poté byly proměřeny vnitřní kontroly kvality (Serum Control lyophilised – Level I a II) a pacientské vzorky – jedna kontrola byla proměřena na začátku a druhá na konci měření
5. Vyhodnocení bylo provedeno na základě chromatografického záznamu v programu OpenLAB

Principem vyhodnocení je výpočet dle vzorce:

$$\% CDT = \frac{\text{Plocha disialotransferinu}}{\text{Plocha celkového transferinu} *} \times 100$$

\* Celkový transferin se skládá ze všech izoform transferinu (a-, mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-, hepta- a oktasio-transferin), které se mohou v daném vzorku nacházet

Tabulka 6: Tabulka gradientu

Čas [min]	Mobilní fáze [%]			Průtok [ml/min]
	A	B	C	
0.0	100	0	0	1.0
0.5	100	0	0	1.0
10.0	60	40	0	1.0
10.1	0	0	100	2.0
14.0	0	0	100	2.0
14.1	100	0	0	2.0
19.0	100	0	0	2.0
19.1	100	0	0	1.0
19.2	100	0	0	1.0

Vnitřní kontroly kvality mají dle návodu příslušné rozmezí hodnot, které musí splňovat (viz. Tab. 9 a 10).

K ověření správnosti metody se dvakrát ročně měří dva vzorky externí kontroly kvality. Na základě jejich výsledků je poté laboratoři udělen certifikát pro danou metodu. Tyto kontroly nebyly součástí mého stanovení.

## 15 Výsledky

Výsledky měření jsou uspořádány do tabulek a záznamy chromatogramů jsou na obrázcích 11 (pozitivní záznam séra pacienta); 12 (negativní záznam séra pacienta); 13 (negativní kontrolní materiál); 14 (pozitivní kontrolní materiál).

Tabulka 7: Klinické údaje o pacientech a jejich diagnóza. MM – močový měchýř.

Číslo vzorku	Pohlaví	Věk	Diagnóza	Popis diagnózy	CDT [%]
1	muž	55	Z520	dobrovolný dárce	0,95
2	muž	54	Z017	dobrovolný dárce	0,8
3	muž	56	Z520	dobrovolný dárce	0,76
4	muž	55	Z520	dobrovolný dárce	0,97
5	muž	55	Z017	dobrovolný dárce	1,33
6	muž	57	C670	karcinom MM	1,24
7	muž	62	C672	karcinom MM	0,97
8	muž	61	C672	karcinom MM	3,84
9	muž	56	C674	karcinom MM	1,16
10	muž	62	C672	karcinom MM	0,99
11	žena	54	Z017	dobrovolný dárce	0,82
12	žena	56	Z017	dobrovolný dárce	0,85
13	žena	54	Z017	dobrovolný dárce	1,0
14	žena	54	Z017	dobrovolný dárce	1,08
15	žena	55	Z017	dobrovolný dárce	0,96
16	žena	65	C672	karcinom MM	<0,5
17	žena	65	C674	karcinom MM	0,72
18	žena	64	C674	karcinom MM	0,98
19	žena	67	C674	karcinom MM	0,64
20	žena	67	C674	karcinom MM	0,82

Vysvětlivky kódů diagnóz:

C670 – zhoubný novotvar močového měchýře – Trigonum močového měchýře

C672 – zhoubný novotvar močového měchýře – boční stěna močového měchýře

C674 – zhoubný novotvar močového měchýře – zadní stěna močového měchýře

Z017 – Jiné speciální prohlídky a vyšetření osob bez obtíží – Laboratorní vyšetření

Z520 – dárce orgánů a tkání

Průměrná hodnota výsledků CDT u mužů je 1,22 % a u žen 0,83 %. Průměrná hodnota výsledků u dobrovolných dárců (muži i ženy) je 0,95 % a u nemocných (muži i ženy) je 1,19 %.

*Tabulka 8: Hodnoty průměru a směrodatné odchylky u disialotransferinu, trisialotransferinu, tetrasialotransferinu a pentasialotransferinu v procentech u stanovovaných vzorků. Disialo-Tf – disialotransferin; Trisialo-Tf – trisialotransferin; Tetrasialo-Tf – tetrasialotransferin; Pentasialo-Tf – pentasialotransferin.*

Skupina pacientů	Parametry	Disialo-Tf [%]	Trisialo-Tf [%]	Tetrasialo-Tf [%]	Pentasialo-Tf [%]
Dobrovolní dárči	Průměr	0,96	4,01	86,62	8,41
	Směrodatná odchylka	0,20	1,37	0,68	1,09
Nemocní muži	Průměr	1,64	3,24	85,89	9,23
	Směrodatná odchylka	1,10	0,74	1,78	0,69
Dobrovolné dárkyně	Průměr	0,94	5,47	85,18	8,42
	Směrodatná odchylka	0,1	1,28	1,12	1,29
Nemocné ženy	Průměr	0,73	4,67	85,53	9,16
	Směrodatná odchylka	0,16	0,24	0,88	0,54

*Tabulka 9: Serum control Level I – negativní kontrola*

Analyt	Rozmezí kontroly [%]	Výsledek měření [%]
Asialotransferin	-	-
Monosialotransferin	-	-
Disialotransferin	1,16 – 1,94	1,21
Trisialotransferin	3,16 – 5,26	3,82
Tetrasialotransferin	73,6 – 89,9	83,5
Pentasialotransferin	8,71 – 16,2	11,47
Hexasialotransferin	< 1,0	-

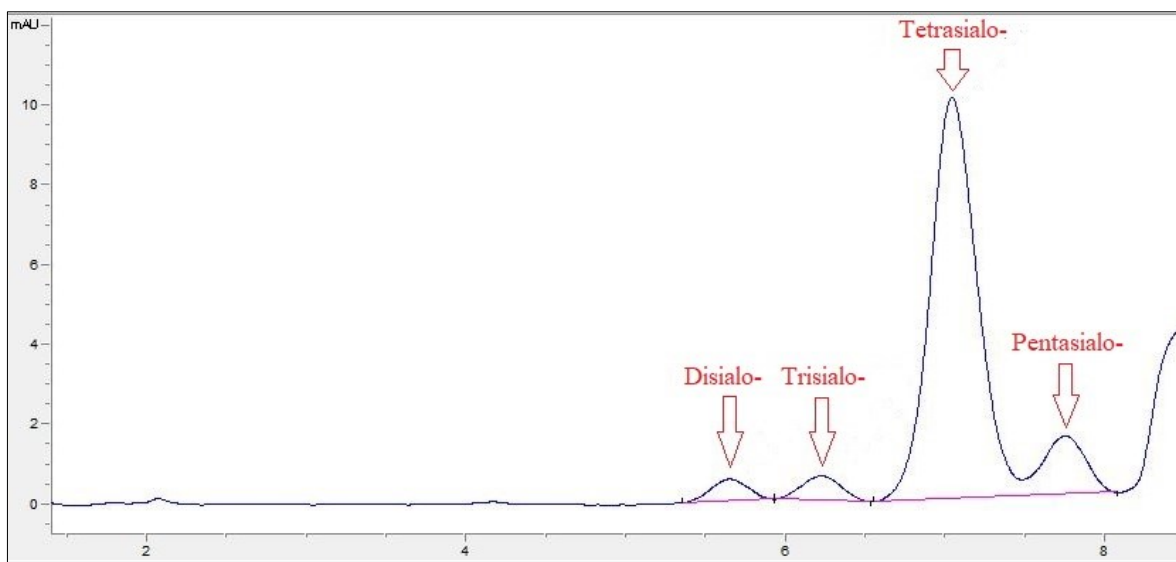
Tabulka 10: Serum control Level II – pozitivní kontrola

Analyt	Rozmezí kontroly [%]	Výsledek měření [%]
Asialotransferin	< 0,8	-
Monosialotransferin	-	-
Disialotransferin	3,20 – 4,79	3,45
Trisialotransferin	3,26 – 4,90	3,51
Tetrasialotransferin	71,5 – 87,4	81,35
Pentasialotransferin	8,48 – 15,7	11,69
Hexasialotransferin	< 1,0	-

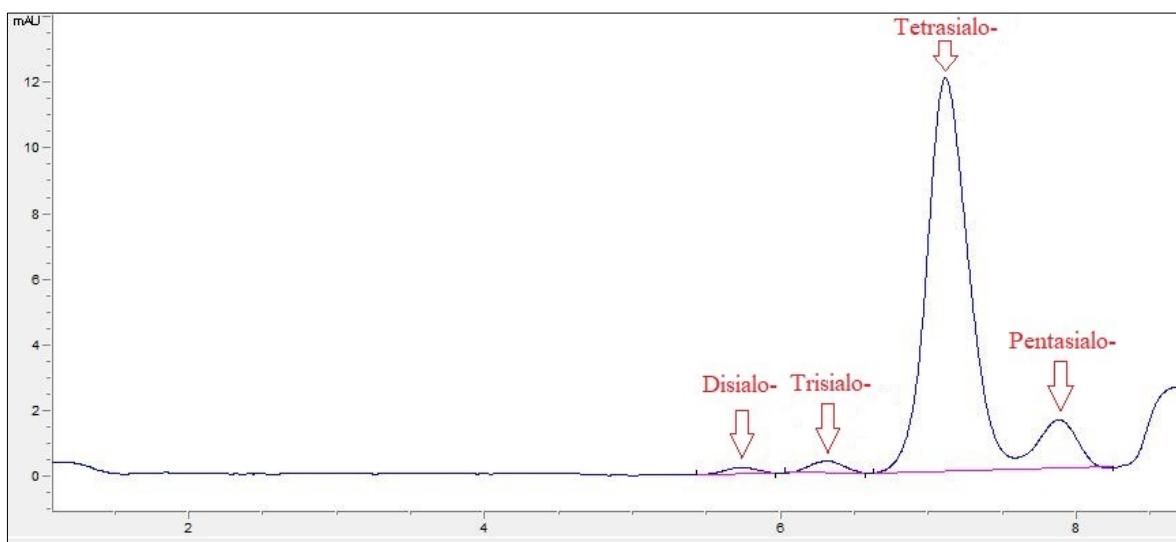
Tabulka 11: Retenční časy jednotlivých naměřených glykoform transferinu v minutách.

Analyt	Retenční čas [min]
Disialotransferin	5,68 (± 0,04)
Trisialotransferin	6,25 (± 0,03)
Tetrasialotransferin	7,07 (± 0,04)
Pentasialotransferin	7,79 (± 0,06)

U patientského vzorku číslo 8 byl výsledek pozitivní – CDT 3,84 %. U ostatních pacientů byly výsledky negativní, a tak hodnota u žádného z nich nepřesáhla 2 %.

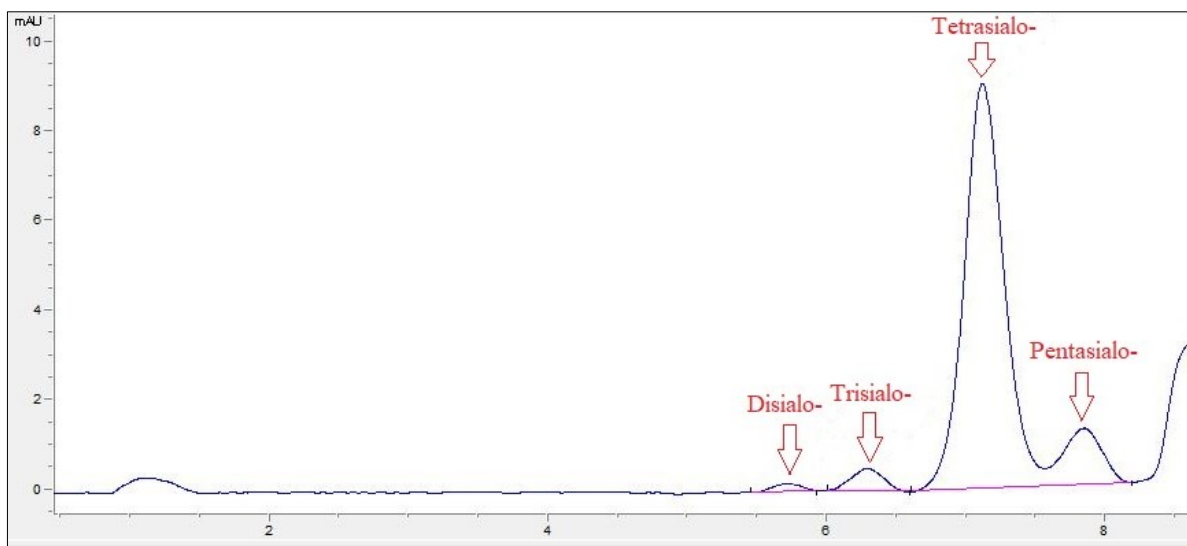


Obrázek 11: Chromatogram pacienta s pozitivním výsledkem CDT (zdroj: vlastní zpracování)

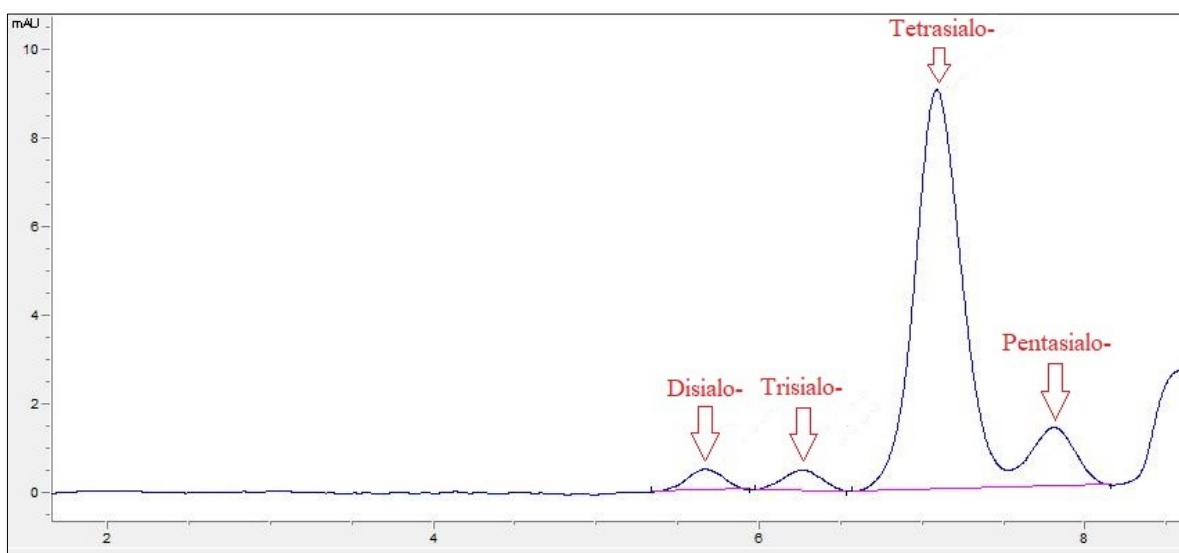


Obrázek 12: Chromatogram pacienta s negativním výsledkem CDT (zdroj: vlastní zpracování)

Výsledky u obou vnitřních kontrol kvality vyšly v rozmezí udaném výrobcem (dle tabulek 9 a 10).



Obrázek 13: Chromatogram Serum control Level I – negativní kontrola (zdroj: vlastní zpracování)



Obrázek 14: Chromatogram Serum control Level II – pozitivní kontrola (zdroj: vlastní zpracování)



## DISKUZE

Tato práce se zabývala měřením hladiny karbohydrát-deficientního transferinu (CDT) v séru u 20 pacientů, z nichž 10 byli muži a 10 ženy. Vzorky mužských pacientů zahrnovaly 5 dobrovolných dárců a 5 pacientů s karcinomem močového měchýře. Vzorky ženských pacientů potom zahrnovaly 5 dobrovolných dárek a 5 pacientů s karcinomem močového měchýře.

Rakovina močového měchýře je celosvětově desátým nejčastějším typem rakoviny [14]. Příčinou vzniku je poškození DNA v buňkách výstelky močového měchýře, které je způsobené karcinogenními látkami vznikajícími například jako vedlejší produkt alkoholu či kouření tabáku [17]. Je obecně známo, že u pacientů s nádorovým onemocněním dochází ke změnám v glykosylaci proteinů [11].

CDT se ve zdravotnictví využívá především jako biomarker pro chronické pití alkoholu. Již při týdenním požívání 50 – 80 g etanolu denně jeho hladina v krvi stoupá a normalizuje se přibližně za 2-3 týdny abstinence [3,4]. Za CDT je považována izoforma disialotransferinu, což je jedna z hlavních forem transferinu, která má hraniční hodnotu do 2,0 – 2,5 % v závislosti na zvolené metodě stanovení [5].

Do metod, které můžeme ke stanovení využít spadají elektroforetické, chromatografické a imunochemické techniky [26]. Při tomto pilotním testování byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), která rozděluje složky dle jejich afinity mezi dvě fáze – mobilní a stacionární. Výhodou HPLC je, že má oproti jiným metodám vyšší analytickou specifitu, nevýhodou je však náročnější příprava vzorků a časově delší regenerace kolony [32].

Dle průměrných hodnot naměřených výsledků je mezi dobrovolnými dárci a pacienty s karcinomem močového měchýře rozdíl hodnot CDT. Pacienti s karcinomem močového měchýře mají nepatrně vyšší hodnotu CDT než dobrovolní dárci. Dále se zdají rozdíly mezi nemocnými muži a nemocnými ženami, kdy je průměrná hodnota CDT u mužů podstatně vyšší než u žen. Kde se však hodnoty nijak neliší je u rozdílu mezi dobrovolnými dárci a dárkyněmi.

Pokud bychom porovnávali skupinu dobrovolných dárek a nemocných žen, můžeme v hodnotách vidět minimální rozdíly, kdy je CDT nepatrně zvýšeno u dobrovolných dárek. Co se týče srovnání dobrovolných dárců a nemocných mužů,

hodnoty CDT se příliš neliší, avšak při porovnání průměrných hodnot, je zde viditelný rozdíl, kdy je CDT zvýšeno u nemocných mužů. Tento rozdíl je zřejmě způsoben významně pozitivním vzorkem jednoho z pacientů vedle zbylých negativních.

Tento pohled je však z důvodu malého počtu pacientů v pilotní studii a nedostatečných diagnostických parametrů pouze orientační a nelze tak uvádět jasné závěry, dále by bylo také nutné statistické vyhodnocení.

Zvýšená hodnota CDT v krevním séru je ze všech dvaceti vzorků pouze u jednoho pacienta (vzorek 8). Tento pacient měl diagnózu C672 – zhoubný nádor boční stěny močového měchýře a hodnota CDT byla 3,57 %. Jelikož byly všechny ostatní hodnoty CDT v referenčních mezích, je pravděpodobné, že měl tento pacient zřejmě zvýšený příjem alkoholu v nedávném období před operačním výkonem. Tím tedy nedodržel abstinenci před operačním výkonem, což mohlo mít negativní dopad na průběh operace i rekonvalescenci.

Dle studií se obecně u rakoviny zvyšují více sialyzované glykoformy transferinu. Pokud tedy srovnáme hodnoty tetrasialotransferinu a pentasialotransferinu u nemocných pacientů a dobrovolných dárců a dárkyň, je vidět rozdíl hodnot u pentasialotransferinu, který je zvýšený u pacientů s karcinomem močového měchýře, což se slučuje s výše uvedeným tvrzením ze studií. Hodnota tetrasialotransferinu se však mezi dobrovolnými dárci a nemocnými pacienty nijak nelišila. Při srovnání těchto hodnot s karcinomem slinivky břišní, kdy se naopak zvyšoval tetrasialotransferin a snižoval pentasialotransferin, je možné, že se v tomto aspektu rakovina pankreatu liší od jiných nádorů [11].

## ZÁVĚR

Tato bakalářská práce shrnuje a představuje poznatky o karbohydrát-deficientním transferinu (CDT), jeho využití ve zdravotnictví a porovnat techniky, kterými lze CDT stanovit. CDT se v těle zvyšuje při chronickém užívání alkoholu, a tak ve zdravotnictví slouží jako biomarker abúzu alkoholu.

Bylo stanoveno CDT metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) u 10 pacientů s karcinomem močového měchýře a 10 dobrovolných dárců. U všech dobrovolných pacientů a 9 pacientů byly výsledky v referenčním rozmezí. Zvýšená hodnota CDT se prokázala pouze u jednoho pacienta a to nejspíše z důvodů nedodržení abstinence alkoholu před operačním zákrokem.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PORPIGLIA N., SAVCHUK S., APPOLONOVA S., BORTOLOTTI F., et al.: Capillary Electrophoresis (CE) vs. HPLC in the determination of asialo-Tf, a crucial marker for the reliable interpretation of questioned CDT increases. *Clinica Chimica Acta*, 2018. 49-53. ISSN 0009-8981 Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2018.07.031.
- [2] BUREŠOVÁ K.: Stanovení CDT metodou kapilární zónové elektroforézy, 2019. Dostupné z: [https://theses.cz/id/4xmmm/BP\\_Kristna\\_Bureov\\_ZSF\\_1.pdf](https://theses.cz/id/4xmmm/BP_Kristna_Bureov_ZSF_1.pdf)
- [3] KUŠNIEROVÁ P., BARTOŠ V., VAVŘINA Z., POLOK RAJSKA M.: Stanovení karbohydrát-deficientního transferinu (CDT) různými analytickými technikami. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2018. 35-40. ISSN 1210-7921.
- [4] MORAVCOVÁ E., BEDNAŘÍK J., DASTYCH M., NOVOTNÁ H., et al.: Srovnání diagnostické validity karbohydrát deficientního transferinu a dalších laboratorních markerů chronického abúzu etanolu. *Časopis lékařů českých*, 2004. 39-43. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/njy42/Moravcova\\_CDT\\_CLC2004.pdf](https://is.muni.cz/th/njy42/Moravcova_CDT_CLC2004.pdf)
- [5] Instruction manual, ClinRep HPLC Complete Kit, CDT in Serum. 2020. Firemní literatura.
- [6] WIELDERS J.P.M., PORPIGLIA N.M., SCHELLENBERG F., DEENMAMODE J., et al.: Recommendations on the measurement and use of the alcohol consumption biomarker CDT. A position paper from the IFCC Working Group on CDT standardisation. *Clinica Chimica Acta*, 2024. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2024.117800.
- [7] EICHLER J.: Protein glycosylation. *Current Biology*, 2019. R229-R231. ISSN 0960-9822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2019.01.003.
- [8] FRANCISCO R., MARQUES-DA-SILVA D., BRASIL S., PASCOAL C., et al.: The challenge of CDG diagnosis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2019. 1-5. ISSN 1096-7192. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgme.2018.11.003.
- [9] CHROSTEK L., CYLWIK B., GRUSZEWSKA E., PANASIUK A., et al.: N-Latex CDT Results in Liver Diseases. *Alcohol and Alcoholism*, 2012. 428–432. Dostupné z: doi: org/10.1093/alcalc/ags053.
- [10] SOLOMONS H. D.: Carbohydrate deficient transferrin and alcoholism. *GERMS*, 2012. 75-78. Dostupné z: ISSN 2248 – 2997.
- [11] GRUSZEWSKA E., CYLWIK B., GUDOWSKA M., KEDRA B., et al.: Changes in Transferrin Isoforms in Pancreatic Cancer. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2016. 286-290.
- [12] GRUSZEWSKA E., CHLUDZINSKA A., CHROSTEK L., CYLWIK B., et al.: Carbohydrate-deficient transferrin depends on disease activity in rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 2013. 203-206. Dostupné z: doi: 10.3109/03009742.2012.747623
- [13] GUDOWSKA M., GINDZIENSKA-SIESKIEWICZ E., GRUSZEWSKA E., CYLWIK B., et al.: Independence of carbohydrate-deficient isoforms of transferrin and cyclic citrullinated peptides in rheumatoid arthritis Independência de isoformas de transferrina deficiente em carboidrato e peptídeos citrulinados cíclicos na artrite

reumatoide. *Revista Brasileira de Reumatologia* (English Edition), 2017. 185-189. Dostupné z: doi: org/10.1016/j.rbre.2016.01.005.

[14] LOBO N., AFFERI L., MOSCHINI M., MOSTAFID H., et al.: Epidemiology, Screening, and Prevention of Bladder Cancer. *European Urology Oncology*, 2022. 628-639. Dostupné z: doi: org/10.1016/j.euo.2022.10.003.

[15] TAARNHØJ G. A., JOHANSEN CH., CARUS A., DAHLROT R. H., et al.: The iBLAD study: patient-reported outcomes in bladder cancer during oncological treatment: a multicenter national randomized controlled trial. *Journal of Patient Reported Outcomes*, 2023. Dostupné z: doi: org/10.1186/s41687-023-00640-5.

[16] FLAIG T. W., SPIESS P. E., ABERN M., AGARWAL N., et al.: Bladder Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2022. 866-878. Dostupné z: doi: 10.6004/jnccn.2022.0041.

[17] CUMBERBATCH M. G., ROTA M., CATTO J. W. F., LA VECCHIA C.: The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *European Urology*, 2016. 458-466. Dostupné z: doi: org/10.1016/j.eururo.2015.06.042.

[18] FANKHAUSERA CH. D., Mostafid H.: Prevention of bladder cancer incidence and recurrence: nutrition and lifestyle. *Prevention in urology*, 2018. 88-92. Dostupné z: doi: org/10.1097/MOU.0000000000000452.

[19] Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK, 2022. Preanalytická příručka [cit. 2024-05-23]. Dostupné z: <https://ulbld.lfl.cuni.cz/preanalyticka-prirucka-verze-6>

[20] Nemocnice Prachatic, Laboratorní příručka [cit. 2024-05-12]. Dostupné z: [https://www.nempt.cz/lab\\_prirucka/LP\\_03017.htm](https://www.nempt.cz/lab_prirucka/LP_03017.htm)

[21] FONS – příručka laboratorních vyšetření [cit. 2024-05-10]. Dostupné z: <https://stara.cskb.cz/plv/Produkty/D43D9188-AF13-48DA-9AE1-F6B1721D43F7.html>

[22] Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Databáze laboratorních vyšetření, 2022 [cit. 2024-05-10]. Dostupné z: <https://laboratore.vfn.cz/vysetreni/detail.php?pre=1>

[23] MUSSHOF F.: Chromatographic methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption. *Journal of Chromatography B*, 2002. 457-480. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/S1570-0232(02)00691-8.

[24] GUERRA A., PARROW N.L., MCVEIGH, P., FLEMING, R.E, et al.: S102: Obligate N-terminal but not C-terminal monoferric transferrin ameliorates anemia in  $\beta$ -thalassemic mice. *HemaSphere*, 2022. Dostupné z: doi: 10.1097/01.HS9.0000821376.90120.9a.

[25] HELANDER A., WIELDERS J., ANTON R., ARNDT T., et al.: Reprint of Standardisation and use of the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT). *Clinica Chimica Acta* 2017. 15-20. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2017.03.018.

[26] BORTOLOTTI F., SORIO D., BERTASO A., TAGLIARO F.: Analytical and diagnostic aspects of carbohydrate deficient transferrin (CDT): A critical review over years 2007-2017. *J Pharm Biomed Anal*, 2018. 2-12. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jpba.2017.09.006.

- [27] FARMERIE L., RUSTANDI R. R. , LOUGHNEY J. W. , DAWOD M.: Recent advances in isoelectric focusing of proteins and peptides. *Journal of Chromatography A*, 2021. ISSN 0021-9673 . Dostupné z: doi: org/10.1016/j.chroma.2021.462274.
- [28] PORPIGLIA N., FRANCO DE PALO E., SAVCHUK S., APPOLONOVA S., et al.: A new sample treatment for asialo-Tf determination with capillary electrophoresis: an added value to the analysis of CDT. *Clinica Chimica Acta*, 2018. 256-262. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi.:10.1016/j.cca.2018.05.019.
- [29] ASSMANN B., HACKLER R., PETERS V., SCHAEFER J. R.: Increased Carbohydrate-deficient Transferrin Concentration and Abnormal Protein Glycosylation of Unknown Etiology in a Patient with Achondroplasia. *Clinical Chemistry*, 2000. Dostupné z: doi: 10.1093/clinchem/46.4.582.
- [30] MARTELLO S., TRETTENE M., CITTADINI F., BORTOLOTTI F., et al.: Determination of carbohydrate deficient transferrin (CDT) with capillary electrophoresis: an inter laboratory comparison. *Forensic Science International*, 2004. 153-157. ISSN 0379-0738. Dostupné z: doi: 10.1016/j.forsciint.2004.02.003.
- [31] SCHELLENBERG F., WIELDERS J., ANTON R., BIANCHI V., et al.: IFCC approved HPLC reference measurement procedure for the alcohol consumption biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT): Its validation and use. *Clinica Chimica Acta*, 2017. 91-100. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi.:10.1016/j.cca.2016.12.022.
- [32] ENGSTROM I.: Comparison of two HPLC columns: An attempt to improve analysis of carbohydrate-deficient transferrin. *Institutionen för kvinnors och barns hälsa*, 2018.
- [33] VERONESI A., CARIANI E., TRENTI T., ROTA C.: Carbohydrate-deficient transferrin: utility of HPLC in handling atypical samples uninterpretable by capillary electrophoresis. *Alcohol and Alcoholism*, 2019. 510–515. Dostupné z: org/10.1093/alcalc/azg059.
- [34] ARNDT T., GRESSNER A., HERWIG J., MEIER U., et al.: Argininosuccinate lyase deficiency (ASL) and carbohydrate-deficient transferrin (CDT): Experience with four independent CDT analysis methods — misleading results given by the %CDT TIA assay. *Clinica Chimica Acta*, 2006. 117-120. Dostupné z: doi: org/10.1016/j.cca.2006.05.015.
- [35] SCHELLENBERG F., MENNETREY L., GIRRE C., NALPAS B., et al.: Automated Measurement of Carbohydrate-Deficient Transferrin Using the Bio-Rad %CDT by the HPLC Test on a Variant<sup>TM</sup> HPLC System: Evaluation and Comparison with Other Routine Procedures. *Alcohol & Alcoholism*, 2008. 569-576. Dostupné z: doi: 10.1093/alcalc/agn058.
- [36] NOMURA F. , KANDA T. , SEIMIYA M. , SATOH M. , et al.: Determination of serum carbohydrate-deficient transferrin by a nephelometric immunoassay for differential diagnosis of alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *Clinica Chimica Acta*, 2018. 181-186. Dostupné z: doi: org/10.1016/j.cca.2018.06.040.
- [37] WASZKIEWICZ N., PAWŁOWICZ K., OKUNIEWSKA N., KWIATKOWSKI M., et al.: Salivary Carbohydrate-Deficient Transferrin in Alcohol- and Nicotine-

Dependent Males. *Journal of Clinical Medicine*, 2020. 1-8. Dostupné z: doi: 10.3390/jcm9124054.

[38] BREIDI S. E.: Phosphatidylethanol (PEth); the Superior Direct Alcohol Biomarker against Mean Corpuscular Volume (MCV), Aspartate Amino Transferase (AST), Alanine Aminotransferase (ALT), Gamma-Glutamyl Transferase (GGT) and Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT). *Am J Biomed Sci & Res*, 2019. Dostupné z: doi: 10.34297/AJBSR.2019.03.000623.

[39] BIANCHI V., PREMASCHI S., RASPAGNI A., SECCO S., et al.: A comparison between serum carbohydrate-deficient transferrin and hair ethyl glucuronide in detecting chronic alcohol consumption in routine. *Alcohol Alcohol*, 2015. 266-270. Dostupné z: doi: 10.1093/alcalc/agt005.

[40] LIJI J. M., VARGHESE P. R., JACOBINNAH S., KUTTICHIRA P.: Biomarker Signatures to Monitor Alcohol Consumption and Induced Organ Damage. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2021. LE01-LE05. Dostupné z: doi:10.7860/JCDR/2021/45729.14526.

[41] DILLON J. F., MILLER M. H.: Gamma glutamyl transferase 'To be or not to be' a liver function test? *Annals of Clinical Biochemistry*, 2016. 629–631. Dostupné z: doi: 10.1177/0004563216659887.

[42] WOLFF K., GROSS S., MARSHALL E. J., WALSHAM N. E., et al.: Carbohydrate Deficient Transferrin (CDT) as a Biomarker to Assess Drinking in High-Risk Drink Drivers. *Advances in Clinical Toxicology*, 2019. Dostupné z: doi: 10.23880/act-16000160.

[43] BRENNAN P. N., DILLON J. F., TAPPER E. B.: Gamma-Glutamyl Transferase ( $\gamma$ -GT) –an old dog with new tricks? *Liver International*, 2021. 9 – 15. Dostupné z: doi: 10.1111/liv.15099.

[44] XU Q., HIGGINS T., CEMBROWSKI G. S.: Limiting the Testing of AST: A Diagnostically Nonspecific Enzyme. *American Journal of Clinical Pathology*, 2015. 423–426. Dostupné z: doi: 10.1309/AJCPO47VAWYRIDHG

[45] PORPIGLIA N. M., BORTOLOTTI F., DORIZZI R. M., MICCIOLO R., et al.: Critical Evaluation of the Association Between Elevated Mean Corpuscular Volume and Alcohol-Related Traffic Accidents: A Retrospective Study on 6244 Car Crash Cases. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 2019. 1528–1532. Dostupné z: doi: 10.1111/acer.14046.

[46] MUKHERJEE S., GHOSH S.: A study on alcohol dependence and it's determinants among male patients attending a tertiary care hospital, Kolkata. *Asian Journal of Medical Sciences*, 2022. 136-142. Dostupné z: doi: 10.3126/ajms.v13i2.40719.

[47] KENAN N., LARSSON A., AXELSSON O., HELANDER A.: Changes in transferrin glycosylation during pregnancy may lead to false-positive carbohydrate-deficient transferrin (CDT) results in testing for riskful alcohol consumption. *Clinica Chimica Acta*, 2011. 129-133. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi.:10.1016/j.cca.2010.09.022.

[48] BIANCHI V., IVALDI A., RASPAGNI A., ARFINI C., et al.: Pregnancy and variations of carbohydrate-deficient transferrin levels measured by the candidate

reference HPLC method. *Alcohol Alcohol*, 2011. 123-127. Dostupné z: doi: 10.1093/alcalc/agg092.

[49] BAKHIREVA L. N., CANO S., RAYBURN W. F., SAVICH R. D., et al.: Advanced gestational age increases serum carbohydrate-deficient transferrin levels in abstinent pregnant women. *Alcohol Alcohol*, 2012. 683-687. Dostupné z: doi: 10.1093/alcalc/ags087.

[50] GUILLARD M., WADA Y., HANSIKOVA H., YUASA I., et al.: Transferrin mutations at the glycosylation site complicate diagnosis of congenital disorders of glycosylation type I. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2011. 901-906. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-011-9311-y.

[51] ZÜHLSDORF A., SAID M., SEGER CH., PARK J. H., et al.: It Is Not Always Alcohol Abuse—A Transferrin Variant Impairing the CDT Test. *Alcohol and alcoholism*, 2016. 148-153. Dostupné z: doi: 10.1093/alcalc/aggv099.