

УДК 602.68:57.083

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАРКЕРОВ ХРОНИЧЕСКОГО ЗЛОУПОТРЕБЛЕНИЯ  
АЛКОГОЛЕМ МЕТОДОМ КАПИЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА****Мягкова М.,А., Пушкина В.В., Петроченко С.Н., Морозова В.С.***Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, e-mail: m.a.myagkova@gmail.com*

Распространение хронического злоупотребления алкоголем и заболевания алкоголизмом в России актуализирует задачу по разработке комплекса мер, направленных на реализацию новой государственной анти-алкогольной политики. Современные методики обследования позволяют с высокой степенью достоверности определять лиц, склонных к хроническому злоупотреблению алкоголем, не способных выполнять свои служебные обязанности в стрессовых ситуациях, а также при их последствиях, связанных со специфическими условиями профессиональной деятельности. Среди них важное место занимают методы диагностического обследования населения различных социальных и возрастных групп, позволяющие своевременно, на ранней стадии выявлять лиц с хронической алкогольной нагрузкой.

**Ключевые слова:** алкоголизм, маркеры тестирования, диагностика зависимости от алкоголя, карбон-дефицитный трансферрин

**DETERMINATION MARKER OF CHRONIC ALCOHOL ABUSE  
BY CAPILARY ELEKTROFORESIS****Myagkova M.A., Pushkina V.V., Petrochenko S.N., Morozova V.S.***Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka,  
e-mail: mamyagkova@gmail.com*

Prevalence of chronic alcohol abuse and of alcoholism in Russia are updated by the task of developing a set of measures aimed at implementing the new state alcohol policy. Modern methods of examination allow a high degree of confidence to identify persons who are prone to chronic alcohol abuse and unable to perform their duties in stressful situations and their consequences related to the specific conditions of professional activity. Among them are important are the methods of diagnostic examination of the population of different social and age groups to allow a timely and early identification of persons with chronic alcohol load.

**Keywords:** alcoholism, markers test, diagnosis of alcohol dependence, carbon-deficient transferrin

Злоупотребление алкоголем является одной из основных причин низкой продолжительности жизни в РФ. От трети до более половины смертей мужчин трудоспособного возраста составляют прямые и не прямые алкогольные потери [1, 2]. Помимо анализа социально-экономических и психологических факторов большое значение имеет исследование алкоголизма, позволяющее выявить молекулярные механизмы развития заболевания и нарушений, связанных с злоупотреблением алкоголем. В настоящее время во всем мире проводится исследование диагностических маркеров потребления алкоголя. Их используют при профессиональной диспансеризации, при возврате водительского удостоверения, изъятого по причине вождения в состоянии алкогольного опьянения, при наблюдении за ходом лечения больных алкоголизмом, при подготовке к хирургическому вмешательству. Наиболее специфичным и перспективным из таких маркеров для клинической практики является карбон-дефицитный трансферрин (CDT) [3]. Среди существующих методик выявления граждан, страдающих хроническим алкоголизмом, наиболее распространенными являются способы позволяющие проводить анкетирование. К ним

относятся тесты: CAGE, AUDIT, Сетка LeGo. Они просты для заполнения больными, легко и быстро оцениваются врачом, и в наибольшей мере учитывают национальные особенности «российского менталитета» и отношение к алкоголю [4, 5, 6].

Мировой опыт свидетельствует, что краткое анкетирование и элементарный врачебный осмотр являются качественным диагностическим инструментарием. Необходимо дополнительное использование тестов, которые повышают вероятность распознавания хронической алкогольной интоксикации (ХАИ). В первую очередь к ним относятся биохимические анализы, определяющие повышение активности гамма-глутамилтранспептидазы (GGT), аминотрансферазы [7]. В последние годы для объективной лабораторной диагностики хронической алкогольной интоксикации применяют качественное и количественное определение маркера карбогидрат-дефицитного трансферрина (CDT) в сыворотке крови больного [8].

Среди маркеров потребления алкоголя наиболее специфичным является карбон-дефицитный трансферрин. Трансферрин-белок, переносящий в клетки всех тканей тела ионы железа при их абсорбции в ки-

печенке или высвобождении из эритроцитов. Различие изоформ трансферрина определяется гликозилированием. Основная фракция трансферрина представлена изоформной с 4 остатками сиаловой кислоты. При потреблении значительных количеств алкоголя (40-60 г в день на протяжении нескольких дней, или больших разовых доз) возрастает доля карбонгидрат-дефицитного трансферрина (CDT) – изоформ с двумя, одним остатком или полностью десиализированный трансферрин (0-форма). В норме фракция CDT не превышает 1.3% – 1.7%, тогда как при потреблении указанных количеств алкоголя уровень CDT превышает эти границы и может возрасти до 10-15 раз. Выбор данного маркера основан на его диагностической возможности отражать как раннее и скрытое злоупотребление алкоголем, так и обеспечивать мониторинг эффективности проводимой терапии посредством объективного отражения ремиссии или возникновения рецидива.

Цель работы заключалась в установлении диагностической значимости сравнительного определения маркеров хронического употребления алкоголя, методами капиллярного электрофореза и биохимического анализа при обследовании различных групп больных алкоголизмом.

#### Материалы и методы исследования

Исследование проведено на базе Московского научно-практического центра наркологии ДЗ города Москвы в группе мужчин, которое исключает влияние гендерных различий.

Клиническое исследование выполняли в группе больных состоящей из 250 пациентов в возрасте от 23 до 72 лет с установленным диагнозом хронический алкоголизм. Анализ сыворотки крови на содержание маркера карбонгидрат-дефицитного трансферрина проводили в динамике, осуществляя забор венозной крови на 1-ый, 7, 14 и 21-ый день лечения. Контрольную группу составили 1000 здоровых доноров. Комплексная оценка больных хроническим алкоголизмом включала данные, о возраст, поле и длительности заболевания. Анализируемые группы пациентов были однородны по всем перечисленным выше характеристикам.

Для установления диагностической значимости маркеров хронического употребления алкоголя проводили определение в сыворотке крови пациентов изоформ гликозилированного трансферрина (CDT) и биохимические показатели содержания печеночных ферментов аланинаминотрансфераза (ALT), аспаратаминотрансфераза (AST), глутаминаминотранспептидазой (GGT).

Кровь в количестве 5мл забирали в моноветы. Далее пробирки центрифугировали на центрифуге ELMi CM-6M (Латвия) 5 мин., при скорости 3 тыс. об. мин. После чего сыворотку делили на аликваты по 1,5 мл в пробирки erpendorf для определения содержания биохимических маркеров и трансферрина. Определение белка CDT проводили на приборе

Minicap (Франция). Для определения биохимических маркеров показания крови ALT, AST и GGT по 1 мл сыворотки закапывали в кюветы биохимического анализатора HORIBA ABX Pentra 400 (Франция). Статистический анализ проводили стандартными методами с помощью пакета WinSTAT 2003.1, интегрированного в Excel. При оценке отношения шансов (OR) и значимости отличий частот по точному тесту Фишера использовали свободно распространяемый пакет программ WinPepi: <http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>

#### Результаты исследования и их обсуждение

При хроническом злоупотреблении алкоголя гликозилирование трансферрина нарушается, что приводит к изменению процентного соотношения его изоформ в сторону повышения уровня низкосиазированных вариантов, называемых также карбогидрат-дефицитными, или CDT. Патомеханизм повышения уровня CDT в ответ на хроническое злоупотребление алкоголем заключается, главным образом, в том, что этанол и/ или его метаболит – ацетальдегид влияют на синтез цепей N-гликанов в аппарате Гольджи, ингибируя активность галактозилтрансферазы и N-ацетилглюкозаминилтрансферазы и одновременно с этим повышая активность сиалидазы в плазматических мембранах печени. Этанол также вызывает дестабилизацию и снижение концентрации м-РНК  $\alpha$ -2,6-сиалилтрансферазы и снижение синтеза  $\alpha$ -2,6-сиалилтрансферазы, обусловленное снижением активности сиалилтрансферазы, и, как следствие, уменьшение сиалирования молекул трансферрина [3,8,9]. Нами были выполнены исследования, направленные на определение диагностической значимости результатов, полученные двумя независимыми методами при обследовании группы лиц с хронической алкогольной зависимостью. Определения маркера CDT проводили в образцах крови в 1-й, 7, 14 и 21-й дни лечения. Для анализа на биохимические маркеры ALT, AST и GGT использовали образцы 1-й и 21-й дни. При анализе полученных усредненных результатов были выявлены зависимости, представленные на рис. 1, 2.

Как видно из рис. 1, концентрации CDT составляет в среднем 4,31% при поступлении пациента, на 7 день лечения она уменьшается до 2,27%. К 14 дню составляла 1,48%, к 21 дню лечения 1,14%. Полученные данные свидетельствуют о том, что при полном отказе от алкоголя у пациента происходит снижение концентрации белка и значение CDT приходит в норму за 2-3 недели.

### Зависимость значений CDT от времени

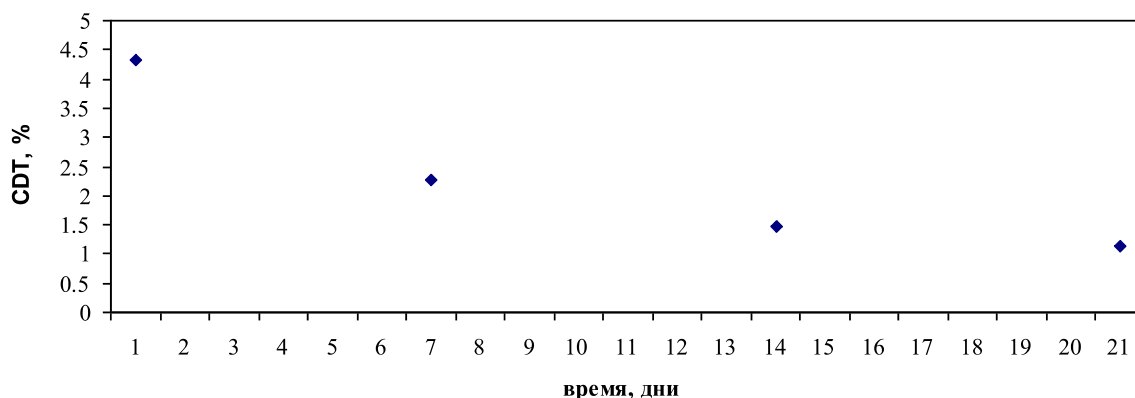


Рис. 1. Зависимость значений CDT от времени

### Зависимость биохимических показателей от времени

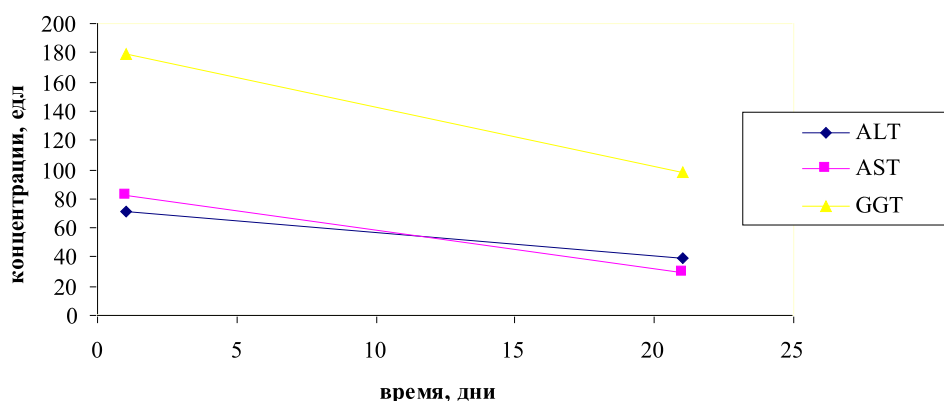


Рис. 2. Зависимость биохимических показателей от времени

На рис. 2 представлена динамика изменения биохимических маркеров. Концентрация ферментов с течением времени так же уменьшается. Однако, даже через 2-3 недели эти значения не нормализуются и остаются высокими. Полученные данные и их значения не позволяют в эти сроки подтвердить полный отказ пациента от алкоголя. Таким образом, сравнивая в динамике уменьшение числового ряда значений CDT и биохимических показателей, характеризующих содержание ферментов, можно заметить, что данные CDT являются более информативными по сравнению с такими маркерами, как ALT, AST и GGT. В отличие от содержания ферментов повышение гликозилированного трансферрина в наи-

меньшей степени ассоциировано с органическим поражением печени или других органов (как алкогольного, так и неалкогольного генеза) или повышенным синтезом микросомальных ферментов. В отличие от других гликопротеинов, недостаток сиалирования изоформ трансферрина никак не связан с клиренсом печени или почек.

#### Заключение

Проведены сравнительные исследования маркеров хронического злоупотребления алкоголем характеризующих изменения в содержании ферментов и гликозилированного трансферрина. При этом использовали методы биохимического анализа и капиллярного электрофореза. Установлено, что

наиболее важными для диагностики ранних состояний алкоголизма являются данные определения CDT.

Таким образом, маркер CDT является универсальным диагностическим инструментом для реализации профилактической и медико-реабилитационной стратегии при заболеваниях зависимости от алкоголь-содержащих веществ. Ключевой составляющей при использовании маркера CDT является объективизация факта злоупотребления алкоголем методами лабораторной диагностики. Представленный маркер CDT на сегодняшний день является единственным маркером оценки хронической алкогольной нагрузки, имеющий опыт практического использования.

Результаты, полученные на основе анализа данных о пациентах с алкоголизмом, послужат основой для разработки стратегий мониторинга рисков, оптимальных терапевтических и профилактических стратегий, а также поиска новых фармакологических мишеней с применением новых методов диагностики такого социально значимого заболевания, как алкоголизм.

#### Список литературы

1. Немцов А.В., Терехин А.Т. Размеры и диагностический состав алкогольной смертности в России // Наркология. – 2007. – № 12. – С. 72–80.
2. Огурцов П.П., Покровский А.Б., Успенский А.Е. Алкоголь и здоровье населения России 1900–2000 // Материалы Всерос. Форума. – М., 1998. – С. 167–73.
3. Jenkins M.A. Clinical applications of Capillary electrophoresis // Molecular biotechnology. 2000. – № 15. – P.201–209.
4. Rao R. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease // Hepatology. 2009. – Vol. 50, № 2. – P.638–44.
5. Rogaev E.I. Small RNAs in human brain development and disorders // Biochemistry (Mosc). 2005. – Vol. 70, № 12. – P. 1404–7.
6. Петров Д.В. Диагностика, лечение и профилактика расстройств, вызванных употреблением алкоголя – Ярославль: ЯГМА, 2003. – С. 86–87.
7. Jung M.H., Park B.L., Lee B.C., Association of CHRM2 polymorphisms with severity of alcohol dependence // Genes Brain Behav. – 2011. – Vol. 10, № 2. – P. 253–6.
8. Landers J.P. Clinical Capillary Electrophoresis // Clin. Chem. – 1995. – № 41. – P. 495–509.
9. Hack L.M., Kalsi G., Aliev F. Limited associations of dopamine system genes with alcohol dependence and related traits in the Irish Affected Sib Pair Study of Alcohol Dependence (IASPSAD) // Alcohol Clin. Exp. Res. 2011. – Vol. 35, № 2. – P. 376–85.