

Е. О. ДАНЧЕНКО¹, АЛЬ ТУРКИ АЛИ АЛИ², О. А. КУХНОВЕЦ¹, А. И. ГРИЦУК²

ИНТОКСИКАЦИЯ ЭТАНОЛОМ КАК ФАКТОР ХИМИЧЕСКОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ

¹Управление по Витебской области Государственной службы
медицинских судебных экспертиз, Беларусь,

²Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь

(Поступила в редакцию 18.03.2009)

Введение. Судебная биохимия как раздел судебной химии стала в последнее время предметом повышенного интереса специалистов, поскольку определение биохимических показателей биологических жидкостей, в частности сыворотки крови, может довольно полно характеризовать состояние клеточных мембран и метаболизма в целом, что является важным для выяснения причин и времени наступления смерти [1–4].

Алкогольная интоксикация вызывает целый комплекс метаболических нарушений, обусловленных влиянием этанола на функциональную активность эндокринной системы [5], изменение которой влечет за собой вторичное нарушение метаболизма, осложняющего и усугубляющего токсическое действие алкоголя. Поэтому определение уровня гормонов в крови при алкогольной интоксикации в сочетании с основными биохимическими показателями сыворотки крови имеет важное научно-практическое значение и может способствовать разработке критериев, позволяющих оценить степень тяжести алкогольной интоксикации.

Практика показывает, что на результаты лабораторных исследований оказывают влияние различные факторы, вызывающие явление технической или химической интерференции [6]. Этанол, содержащийся в крови людей, которые находятся в состоянии алкогольной интоксикации, может влиять на специфичность и выявляемость биохимических показателей. Однако, несмотря на очевидную актуальность этой проблемы, до настоящего времени не проводились систематические исследования по изучению интерференции этанола на результаты определения биохимических параметров в биологическом материале. Механизм негативного влияния этанола на определение гормонов или метаболитов в крови может обуславливаться нарушением лиганд-белковых взаимоотношений в таких системах, как – антиген–антитело, сигнальная молекула–рецептор, субстрат–фермент, что может привести к диагностическим ошибкам из-за искажения реальных концентраций гормонов, метаболитов или активности ферментов. В связи с этим было проведено исследование, которое включало введение экзогенного этанола в сыворотку крови с целью оценки его влияния на специфичность аналитических процедур.

Цель исследования – установить влияние различных концентраций этанола в сыворотке крови на результаты определения содержания инсулина, лептина, тиреоидных гормонов и кортизола, а также некоторых биохимических параметров (активность трансфераз, содержание глюкозы, мочевины, креатинина и др.).

Материалы и методы исследования. Исследования проведены с использованием сливной сыворотки, для получения которой остатки исследованных в лаборатории сывороток (за исключением гемолизированных, желтушных и липемических) собирали в течение недели в одну лабораторную посуду и хранили при –20 °С. После накопления сыворотки до объема 100 мл ее от-

таивали на водяной бане при 37 °С, тщательно перемешивали, фильтровали через стерильный фильтр и разливали во флаконы по 10 мл, которые хранили при –20 °С. Перед началом исследований сыворотку размораживали и добавляли 2%-ный раствор этанола до конечных концентраций 0,15; 0,53; 1,11; 2,5 и 4,29 мл и получения конечных концентраций этанола 0,3; 1,0; 2,0; 4,0 и 6,0 ‰ (г/л). Это приводило к разведению сыворотки крови соответственно в 1,01; 1,05; 1,11; 1,25 и 1,43 раза, не вызывая при этом денатурации содержащихся в ней белков. Сыворотки с разными концентрациями этанола, а также исходную сыворотку, принимаемую за контроль, использовали для исследования.

Исследуемые гормоны были разделены на две группы: первая группа – контринсулярные гормоны – кортизол и трийодтиронин (Т₃); вторая группа – лептин, инсулин, его предшественник – проинсулин и С-пептид.

Определение содержания указанных гормонов проводили с помощью наборов для иммуоферментного анализа фирмы DRG International Inc. (США). Для оценки уровня глюкозы в сыворотке крови использовали ферментативный глюкозооксидазный метод, для определения содержания мочевины – ферментативный уреазный метод по конечной точке. Уровень креатинина оценивали по конечной точке методом, основанным на реакции Яффе, альбумина – по реакции с бромкрезоловым зеленым по конечной точке, общего белка – биуретовым методом по конечной точке. Активность ферментов аланинаминотрансферазы (АлТ), аспаратаминотрансферазы (АсТ), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) определяли кинетическими методами с использованием биохимического анализатора «Флюорат 02-АБЛФ-Т». Каждое измерение повторяли 3 раза. Статистическую обработку проводили методом вариационной статистики. В таблицах приведены значения $M \pm \sigma$.

Результаты и их обсуждение. Исследования показали, что экзогенный этанол не оказывает влияния на специфичность определения кортизола и инсулина (табл. 1). Вместе с тем установлено, что иммуоферментное определение Т₃ и лептина при наличии этанола в сыворотке крови может давать ложные результаты, поскольку по мере увеличения содержания алкоголя в крови содержание Т₃ достоверно прогрессирующе уменьшалось, а уровень лептина при аналогичных условиях возрастал.

Таблица 1. Влияние экзогенного этанола на определение гормонов в крови (n = 10)

Гормон, нг/мл	Концентрация этилового алкоголя в сыворотке крови, г/л					
	Контроль	0,3	1,0	2,0	4,0	6,0
Кортизол	278,0±75,0	299,0±98,0	266,0±86,0	283,0±68,0	270,0±73,0	296,0±71,0
Т ₃	1,74±0,75	1,51±0,53	1,10±0,52*	0,78±0,47*	0,69±0,39*	0,37±0,21*
Инсулин	0,61±0,09	0,60±0,11	0,63±0,16	0,65±0,12	0,62±0,13	0,57±0,15
Проинсулин	0,13±0,02	0,13±0,05	0,11±0,02	0,15±0,03	0,18±0,02*	0,20±0,04*
С-пептид	0,28±0,09	0,26±0,08	0,22±0,09	0,21±0,12	0,18±0,04*	0,18±0,04*
Лептин	39,0±1,5	41,4±1,9	49,9±1,3*	47,9±2,3*	45,6±1,4*	48,3±1,7*

*Здесь и далее $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

При содержании этанола в сыворотке крови в концентрациях 4,0 и 6,0 г/л, несмотря на соответствующее ее 1,25- и 1,43-кратное разбавление, отмечается достоверно значимое завышение содержания проинсулина и снижение уровня С-пептида. Если снижение выявляемости С-пептида 64,3% при концентрации этанола в сыворотке крови 6,0 г/л можно объяснить разбавлением сыворотки крови, то определение всего лишь 21,3% Т₃, содержащегося в крови, объясняется не только разбавлением сыворотки, но и непосредственным влиянием этанола на процедуру иммуоферментного анализа.

Вместе с тем в этих условиях возрастает выявляемость проинсулина и лептина, составляющая соответственно 153,8 и 123,6%, с учетом разбавления сыворотки завышающее действие указанной концентрации этанола является еще более выраженным.

Резюмируя эту часть исследований, отметим, что при изучении влияния экзогенного этанола на процедуру иммуоферментного определения изучаемых гормонов в сыворотке крови можно выделить три группы гормонов: 1) лептин и проинсулин, определяемые уровни которых в присутствии экзогенного этанола возрастают; 2) Т₃ и С-пептид, для которых установлено снижение

определяемого уровня; 3) инсулин и кортизол – гормоны, на определение в сыворотке крови которых экзогенный этанол не оказывал заметного влияния. Полученные результаты можно объяснить различными принципами твердофазного иммуноферментного анализа, лежащего в основе количественного определения гормонов.

Так, при определении содержания С-пептида и Т₃ используются вторичные антитела, которыми покрываются лунки планшета. Этанол уменьшает «открываемость» этих гормонов, что, возможно, связано с нарушением белок-белкового взаимодействия между вторичными антителами, покрывающими лунку, и антителами против гормонов. Что касается С-пептида, ингибирующее действие этанола проявлялось только при его высокой концентрации. Учитывая амфифильность этанола, а также то, что Т₃ имеет гидрофобную природу, а С-пептид – гидрофильную, можно предположить, что эффект этанола проявляется на разных уровнях взаимодействия гормонов с антителами против них.

Определение содержания проинсулина и лептина основано на принципе «сэндвича» – антитело–гормон–конъюгат. Оба гормона имеют пептидную природу, поэтому этанол, за счет дополнительных водородных связей, может стабилизировать связи между белками и оптимизировать формирование «сэндвича», увеличивая тем самым «открываемость» этих гормонов.

Принцип «сэндвича» используется и при определении инсулина, однако в данном случае взаимодействие антител с гормоном опосредуется через высокоаффинные лиганд-лигандные отношения биотина и стрептавидина, на которые, возможно, этанол не влияет. Известно, что чем меньше этапов включает любая аналитическая процедура, тем меньше влияние различных физико-химических факторов, а соответственно, и погрешность метода. Это касается и процедуры определения концентрации кортизола, которая заключается в одноэтапной реакции гаптен-антитело, что, возможно, и обуславливает отсутствие влияния этанола на выявляемость кортизола в сыворотке крови.

В основе определения многих биохимических параметров сыворотки крови (активность ферментов, субстратов и конечных продуктов метаболизма) лежат ферментативные реакции, которые, как известно, требуют достаточно стабильных условий. Поэтому на следующем этапе выполнения данной работы проведена оценка влияния различных концентраций этанола на результаты определения некоторых биохимических параметров сыворотки крови.

Согласно данным, приведенным в табл. 2, этанол оказывает ингибирующее влияние на результаты определения активности аминотрансфераз (АлАТ и АсАТ) только в концентрации 6,0 г/л, вызывая достоверно значимое снижение их активности соответственно до 86,7 и 89,6% от контрольных значений. Вполне вероятно, что в этих условиях наблюдается эффект разбавления сыворотки крови в 1,43 раза, что проявляется снижением содержания в ней ферментов, а соответственно, и их активности. В то же время активность гамма-глутамилтрансферазы во всем диапазоне используемых концентраций экзогенного этанола не изменяется.

Таблица 2. Влияние этанола на определение активности ферментов в сыворотке крови (n = 10)

Активность фермента, Е/л	Концентрация этилового алкоголя в сыворотке крови, ‰					
	Контроль	0,3	1,0	2,0	4,0	6,0
АлАТ	36,51±0,09	38,59±2,01	40,10±2,61	37,72±2,20	37,32±0,71	31,66±1,37*
АсАТ	52,73±2,57	57,64±4,44	57,73±3,58	52,15±1,02	53,69±2,87	47,25±1,05*
ГГТ	58,44±0,15	58,24±1,02	60,48±0,36	60,61±1,23	61,44±1,85	56,45±5,94

Результаты исследования влияния экзогенного этанола на содержание метаболитов в сыворотке крови, определяемых ферментативными методами, представлены в табл. 3.

Таблица 3. Влияние этанола на определение содержания глюкозы и мочевины в сыворотке крови (n = 10)

Концентрация субстрата, ммоль/л	Концентрация этилового алкоголя в сыворотке крови, ‰					
	Контроль	0,3	1,0	2,0	4,0	6,0
Глюкоза	7,51±0,02	7,45±0,29	7,96±0,35	7,81±0,34	7,86±0,36	7,82±0,61
Мочевина	9,13±0,68	8,81±0,93	7,77±1,06	8,78±0,34	8,17±0,50	7,56±0,20*

Установлено, что этанол не модифицирует течение глюкозооксидазного метода определения концентрации глюкозы, в то время как при концентрации этанола 6,0 г/л уреазным методом определяется лишь 82,8% содержания мочевины. Вполне вероятно, что в последнем случае также наблюдается эффект почти 1,5-кратного разбавления сыворотки, приводящего к снижению содержания ферментов и их активности.

Различные концентрации экзогенного этанола не вызвали достоверно значимых изменений содержания в сыворотке крови биохимических показателей, определяемых неферментативными методами – общего белка, альбумина и креатинина (табл. 4).

Таблица 4. Влияние этанола на определение содержания в сыворотке крови белка и креатинина (n = 10)

Показатель	Концентрация этилового алкоголя в сыворотке крови, ‰					
	Контроль	0,3	1,0	2,0	4,0	6,0
Общий белок, г/л	70,2±0,15	74,7±3,86	74,4±8,04	75,6±1,28	70,4±5,18	71,8±6,44
Альбумин, г/л	31,4±3,83	36,3±1,53	35,8±1,72	32,4±1,24	32,8±0,31	33,9±2,63
Креатинин, мкмоль/л	297±2,14	336±53,6	261±47,5	321±19,3	293±5,9	280±13,2

Таким образом, проведенные исследования показали, что иммуноферментные аналитические процедуры наиболее чувствительны к действию различных концентраций экзогенного этанола. Это привело к искажению результатов исследования в виде завышения показателей содержания в сыворотке крови проинсулина и лептина и снижения выявляемости в ней T₃ и С-пептида. Аналитические процедуры определения активности ферментов оказались более устойчивыми к действию экзогенного этанола. В частности, при содержании в сыворотке крови 6,0 г/л этанола получено примерно одинаковое (менее 20%) снижение уровня определяемости активности аминотрансфераз, а также концентрации мочевины, что можно объяснить эффектом разбавления сыворотки крови.

Выводы

1. В процессе иммуноферментного определения гормонов в сыворотке крови установлено, что при наличии в ней этанола в дозе свыше 1,0 г/л может возникнуть явление химической интерференции. При этом по мере повышения концентрации этанола в сыворотке крови прогрессирующе снижается уровень определяемости T₃ и С-пептида, тогда как определение лептина и проинсулина при концентрации этанола соответственно более 1,9 и 4,0 г/л дает завышенные показатели их содержания.

2. Этанол не модифицирует течение глюкозооксидазного метода определения концентрации глюкозы, в то время как при наличии в крови экзогенного этанола в объеме 6,0 г/л определение концентрации мочевины уреазным методом выявило лишь 82,8% метаболита.

3. Экзогенный этанол не влияет на специфичность определения биохимических показателей, определяемых неферментативными методами (содержание общего белка, альбумина, креатинина).

Таким образом, проведенные исследования показали, что при биохимических и судебно-биохимических исследованиях сыворотки крови у лиц с алкогольной интоксикацией необходимо учитывать возможность получения ложных результатов при использовании иммуноферментных технологий и методов, в основе которых лежат ферментативные реакции.

Литература

1. Ушакова Л. И., Молин Ю. А., Самойлова Т. М. // Суд.-мед. экспертиза. 1991. № 2. С. 50–51.
2. Кузнецова И. Ю. // Суд.-мед. экспертиза. 2004. № 2. С. 27–28.
3. Пиголкин Ю. И., Богомолов Д. В., Должанский О. В. // Суд.-мед. экспертиза. 2004. № 1. С. 41–44.
4. Бадмасва Л. Н., Кинле А. Ф., Гужеедов В. Н. // Суд.-мед. экспертиза. 2004. № 1. С. 10–12.
5. Ramadoss J., Tress U., Chen W. J. A. et al. // Alcohol. 2008. Vol. 42, N 3. P. 199–205.
6. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. М., 2004.

E. O. DANCHENKO¹, AL TURKI ALI ALP², O. A. KUHNOVETS¹, A. I. GRITSUK²

**ETHANOL INTOXICATION AS A FACTOR OF CHEMICAL INTERFERENCE
IN THE BIOCHEMICAL ANALYSIS OF BLOOD SERUM**

¹State Service of Medical Court Expert Examinations in the Vitebsk Region, Belarus,

²Gomel State Medical University, Belarus

Summary

The influence of exogenous ethanol with an end concentration of 0.3, 1.0, 2.0, 4.0 and 6.0‰ (g/l) on the definition of hormones, the activity of enzymes and the content of some metabolites in human blood serum is investigated in the article. Immunoenzymatic analytical procedures are most sensitive to the action of exogenous ethanol, which has resulted in misrepresenting the research results – in overestimating the proinsulin and leptin content in blood serum and in decreasing the detectability of triiodothyronine and C-peptide in it. Analytical procedures of defining the enzyme activity appeared to be more stable to the action of exogenous ethanol.