# ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННАЯ TECT-CИСТЕМА НА ОСНОВЕ FRET:

## БЫСТРЫЙ И ДЕШЕВЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОГО АЛКОГОЛИЗМА

УДК 543.865/.867 BAK 02.00.02 Музиле Дж. (Musile G.), giacomo.musile@univr.it, Де Пало Э.Ф. (De Palo E.P.), Бортолотти Ф. (Bortolotti F.), Тальяро Ф. (Tagliaro F.), Университет Вероны, Савчук С.А., д.х.н., Шестакова К.М., Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России

Определение уровня углевод-дефицитного трансферрина (CDT) используется в клинической практике для подтверждения интенсивного потребления алкоголя в течение по крайней мере двух недель. Несмотря на то что первый коммерческий метод на основе этого биомаркера появился около 30 лет назад, доступные аналитические процедуры остаются дорогостоящими, а анализ может быть выполнен только в специально оборудованных лабораториях. В настоящей статье предложен новый подход, основанный на специфической дериватизации трансферрина солями тербия и последующем его обнаружении с использованием характерного явления резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Благодаря низкой стоимости, простоте исполнения, минимальной потребности в оборудовании, метод идеально подходит для скрининга в клинической диагностике, в частности для применения в отдаленных районах, где отсутствуют специализированные лаборатории.

#### УГЛЕВОД-ДЕФИЦИТНЫЙ ТРАНСФЕРРИН - МАРКЕР ХРОНИЧЕСКОГО УПОТРЕБЛЕНИЯ АЛКОГОЛЯ

Человеческий трансферрин (Tf) — сывороточный гликопротеин с молекулярной массой около 80 кДа, осуществляющий транспорт ионов железа (III). Белок содержит два высокоаффинных сайта связывания железа (10<sup>23</sup> М<sup>-1</sup> при рН 7,4), однако прочность связывания в значительной степени зависит от рН среды. Человеческий трансферрин существует в нескольких изоформах, различающихся как аминокислотной последовательностью, так и схемой гликозилирования. Углеводные цепи трансферрина могут содержать на своих невосстанавливающих концах отрицательно заряженные остатки сиаловой кислоты, число которых варьируется от 0 до 8, что обусловливает существование нескольких гликоформ с различной изоэлектрической точкой. Наиболее часто встречается гликоформа (около 80%), содержащая 4 концевых остатка сиаловой кислоты [1, 2].

В 1976 году Stibler и Kiellin впервые обнаружили [3], что чрезмерное употребление алкоголя (>50–80 г этанола в день) в течение двух или более недель приводит к увеличению гликоформ с уменьшенным гликозилированием, и особенно асиало- и дисиалотрансферрина [4–6]. Эти компоненты называются углевод-дефицитным трансферрином (CDT), их содержание высчитывается по формуле:

 $CDT = \frac{Asialo - Tf + Disialo - Tf}{All isoforms}.$ 

Указанный показатель широко используется в диагностике злоупотребления алкоголем в клинических, профессиональных и судебных исследованиях [1, 2]. Значение <1,6% говорит об отсутствии употребления алкоголя в течение двух недель перед анализом, уровень >1,6% расценивается как показатель хронического злоупотребления алкоголем [7].

В настоящее время анализ CDT проводят методами иммуноферментного анализа [8], капиллярного электрофореза (КЭ) или ВЭЖХ с детектированием оптической плотности при 200 нм и 460 нм соответственно [9, 10]. Существующие методы имеют ряд ограничений. Достоверность иммуноферментного анализа невелика, а метод КЭ имеет ограниченную специфичность [11], особенно в присутствии аномальных сывороточных белков, таких как моноклональные иммуноглобулины. Более того, КЭ и ВЭЖХ практически непригодны для анализа трупной крови при судебно-медицинской экспертизе, поскольку в этих условиях происходит гемолиз и анализу мешает гемоглобин.

#### ОБРАЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АДДУКТА ТРАНСФЕРРИНА С ТЕРБИЕМ

В 2015 году мы запатентовали [12], а в 2017 году опубликовали работу [6], где описали новый метод обнаружения трансферрина, основанный на образовании флуоресцентного аддукта с ионом тербия. Для его получения Аро-Тf (трансферрин, не содержащий железо) или Holo-Tf (трансферрин, насыщенный железом) обрабатывали раствором TbCl<sub>3</sub>.

DOI: 10.32757/2619-0923.2019.5.9.94.99

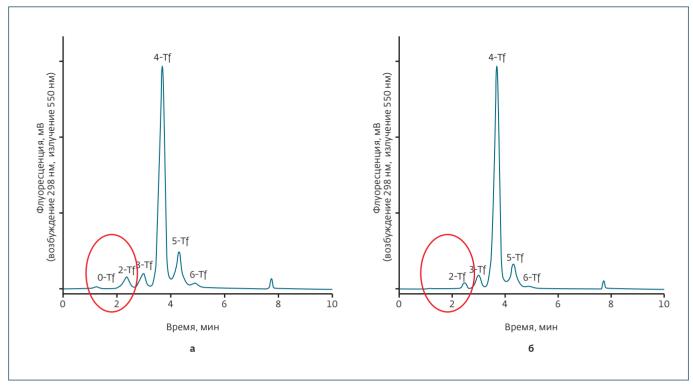


Рис.1. Изоформы трансферрина: а – изредка выпивающего человека; б – человека, злоупотребляющего алкоголем

Было обнаружено, что полученный комплекс демонстрирует характерные пики излучения на длинах волн 492, 550 и 586 нм, причем самое сильное излучение наблюдается при 550 нм (рис.1). Именно эту длину волны использовали для обнаружения присутствия комплексов Tf-Tb и анализа CDT методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием в сыворотке человека и других критических биологических матрицах, таких как спинномозговая жидкость, трупная кровь, цельная кровь и сухие пятна крови.

Мы продемонстрировали, что использование предложенного метода позволяет достоверно различить образцы, взятые у изредка выпивающего человека (%CDT 1,3), и образцы, взятые у человека, страдающего алкоголизмом (%CDT 4,9, см. рис.1). Сравнение результатов анализа 78 образцов, проанализированных методами ВЭЖХ с традиционным абсорбционным и флуоресцентным детектированием, продемонстрировало значительную корреляцию (p<0,001 Pearson).

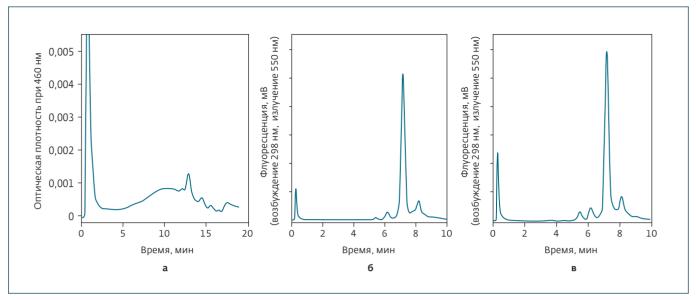
Метод, основанный на резонансном переносе энергии флуоресценции, обеспечивает существенное улучшение аналитических показателей, позволяя анализировать CDT в сложных биологических матрицах, например цельной крови, трупной крови, цереброспинальной жидкости и пятнах высохшей крови (рис.2). Его чувствительность и отсутствие помех позволяют определять CDT в биологических жидкостях, обычно не подходящих для исследований с оптическим детектированием.

Вместе с тем анализ методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием требует значительных операционных затрат, хорошо оборудованных лабораторий и специально обученного персонала. Больницы и лаборатории, расположенные в периферийных регионах или в развивающихся странах, а также центры детоксикации и кабинеты частных врачей далеко не всегда могут проводить анализ CDT.

В настоящей работе мы предлагаем новый простой и недорогой флуоресцентный метод анализа CDT, предназначенный для целей скрининга и не требующий сложного инструментария и/или дорогих реагентов.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ Реагенты

Все реагенты имели аналитическую степень чистоты. Человеческий апо-трансферрин (Apo-Tf), трис-гидроксиметиламинометан (TRIS), бис-(2-гидроксиэтил)амино-трис-(гидроксиметил)метан (BIS-TRIS), гексагидрат хлорида тербия (TbCl<sub>3</sub>·6H<sub>3</sub>O), соляная кислота, гидроксид натрия, гидрокарбонат натрия и хлорид натрия были приобретены в компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США), слабая анионообменная смола DEAE Sepharose Fast Flow и сильная анионообменная смола Q Sepharose Fast Flow – в компании GE Healthcare (Чикаго, Иллинойс, США), десфероксамин (Desferal) – в компании Novartis Farma SpA (Базель, Швейцария). Для получения сверхчистой воды использовалась



**Рис.2.** Возможность анализа образцов гемолизированной крови: а – трупной крови методом ВЭЖХ-Vis; б – трупной крови методом ВЭЖХ-FI; в – пятен засохшей крови методом ВЭЖХ-FI

система очистки Purelabl Chorus 3 (Elga Veolia, Хай Уиком, Великобритания). Пустые картриджи SPE (1 мл) и инертные фильтры были приобретены в компании Agilent Technologies (Санта-Клара, Калифорния, США).

#### Образцы крови

Образцы крови собирали венепункцией в пробирки с сывороткой Vacutainer. После свертывания при комнатной температуре образцы центрифугировали при 1730 g, супернатант отделяли и хранили при –20°С до анализа. Для настоящего исследования были отобраны образцы с диапазоном концентраций CDT от 1 до 9%.

#### Анионные картриджи

Перед анализом готовили картриджи для разделения CDT, наливая 200 мкл Q Sepharose или DEAE Sepharose в картриджи SPE объемом 1 мл с инертными фильтрами. Картриджи промывали 1,5 мл 24% смеси вода—этанол, а затем кондиционировали с 1,5 мл буфера, содержащего 20 ммоль/л BIS-TRIS, pH 5,90. После вытекания избытка жидкости (около 3 минут) картридж был готов к работе.

#### Пробоподготовка

К1 мкл раствора 10 ммоль/л соли тербия (III) в воде добавляли 20 мкл сыворотки, содержащей 480 мкл буфера 20 ммоль/л BIS-TRIS, рН 5,9. Полученный образец разбавляли в соотношении 1:25 и пропускали через картридж под действием силы тяжести. Капли собирали в пробирку, содержащую 20 мкл NaOH 1 М (конечное значе-

ния pH элюата около 8–9). Собранную жидкость затем анализировали с помощью кюветного флуориметра или анионообменной ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием [6].

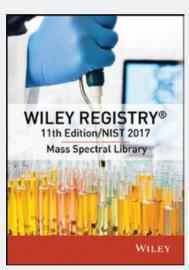
#### Флуоресцентный анализ

Флуоресцентный анализ идентифицировал комплекс тербий (III)-трансферрин. Принцип, на котором основана эта процедура, описан в [6]. После возбуждения при 298 нм происходит межмолекулярный процесс передачи энергии, вызывающий интенсивное и идентифицируемое излучение в областях 492, 550 и 586 нм. Для настоящего исследования был выбран наиболее сильный сигнал 550 нм.

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре RF 6000 (Shimadzu Europe, Дуйсбург, Германия). Длина волны возбуждения была установлена на длине волны 298 нм, а излучение – на 550 нм или сканировалось в диапазоне 450–700 нм. Результаты были выражены в абсолютных произвольных единицах.

В технико-экономическом обосновании устройства для исследования на месте (Point-of-Care device) возбуждение осуществлялось с помощью ксеноновой лампы (150 Вт) от старого флуориметра, снабженного оптическим фильтром при 300 нм (ширина полосы 10 нм). Излучение регистрировалось камерой смартфона (OnePlus модель 5 Т – OnePlus, Шэньчжэнь, Китай) после удаления флуоресценции нативного белка с помощью фильтра верхних частот (460 нм), прикрепленного перед объективом.





	Wiley Registry 11th Edition	NIST 2017	Wiley 11th + NIST 2017	
Спектры	775.500	306.622	>1.007.924	
Химические структуры	741.000	306.622	>973.366	
Уникальные компоненты	599.700	262.157	>730.000	

### Самая полная комбинированная библиотека, содержащая более 1.6 млн спектров.

Последняя 11-я редакция содержит более 1 миллиона масс-спектров электронного удара, 740.000 уникальных соединений и более 973.000 идентифицируемых химических структур.

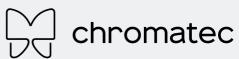
Повторяющиеся спектры и более 3 миллионов химических названий и синонимов обеспечивают правильную идентификацию и гарантируют, что библиотека может быть использована в режиме электронной ионизации, при идентификации по точным массам, а также в других случаях при проведении качественного анализа методом ГХ/МС.

## Новое в 11й версии:

- Расширенный перечень метаболитов и дизайнерских наркотиков
- Новый «гибридный поиск» по всем типам спектров
- Улучшенные алгоритмы для точного поиска высоких масс в спектре

www.sciencesolutions.wiley.com

WILEY-VCH



WILEY



Газовый хроматограф - масс-спектрометр «Хроматэк-Кристалл»

Проверенный экспертами и временем прибор с параметрами на уровне мировых производителей

#### Ключевые особенности

Новый источник ионов с технологией ADVIS в несколько раз устойчивее к загрязнениям

Квадруполь из высококачественного металла с длительным сроком службы

Двойной катод с программным переключением

Превосходная чувствительность

Широкий выбор библиотек масс-спектров

Удобное и понятное программное обеспечение на русском языке

Простота в обращении и удобство в обслуживании



# WILEY **NIST**

Хроматэк - официальный партнер и дистрибьютор библиотек NIST™ и Wiley™ на территории России.

#### ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием

Хроматографическая система, используемая для изучения гликоформ CDT, присутствующих в элюате, состояла из хроматографа Shimadzu LC-10 CE, оснащенного флуориметром с двойным монохроматором RF-10AXL. Колонка представляла собой сильный анионообменник ProPac (внутренние размеры 50 мм × 4 мм), размер частиц 5 мкм (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Использовали бинарную подвижную фазу с градиентным элюированием. Буфер А – раствор TRIS 20 ммоль/л, pH 8, содержащий хлорид тербия (III) 50 ммоль/л и десфероксамин 0.04 ммоль/л. Буфер В – раствор TRIS 20 ммоль/л, рН 8, содержащий NaCl 0,5 M. Скорость потока – 2 мл/мин, температура колонки 50 °C. Линейный градиент элюирования: 0% В – 18% В в течение 5 минут. После разделения колонку очищали и регенерировали, промывая в течение 3 минут NaCl 1,0 моль/л и затем кондиционируя в течение 3 минут буфером А. Объем инъекции составлял 10 мкл. Флуориметр устанавливали на длинах волн возбуждения и испускания 298 и 550 нм соответственно.

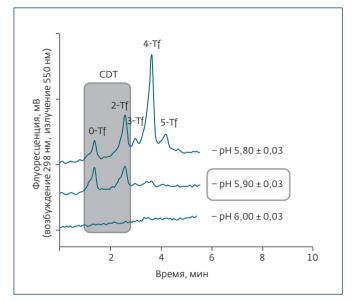
#### РАЗРАБОТКА ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ЭКСПРЕСС-МЕТОДА

Использование принципа FRET позволяет повысить как аналитическую чувствительность, так и специфичность определения CDT [6]. Явление переноса энергии происходит из-за селективного хелатирования ионов тербия (III) в связывающих карманах трансферрина, обычно занятых ионом трехвалентного железа, с образованием комплекса, демонстрирующего уникальные флуоресцентные характеристики [13-15]. Высокая специфичность индуцированной тербием (III) флуоресценции трансферрина, на которую минимально влияют другие белки и компоненты сыворотки и плазмы, дает возможность анализировать CDT без дорогостоящего и инструментального хроматографического разделения.

Предлагаемый нами метод анализа CDT, основанный на использовании FRET-системы, включает в себя три основных этапа:

- функционализация трансферриновых гликоформ тербием (III):
- выделение функционализированных гликоформ CDT на основе их заряда на ионообменных картриджах;
- флуоресцентное обнаружение CDT с помощью камеры смартфона.

Первый этап состоял в инкубации сыворотки крови с раствором хлорида тербия и был выполнен в соответствии с процедурой, предложенной для анализа CDT с ВЭЖX-FL [6].



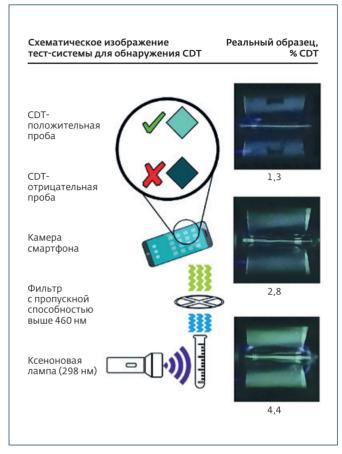
**Рис.3.** Исследование оптимального рН для выделения CDT

Для выбора оптимальных условий выделения асиалои дисиало-Tf из смеси изоформ Tf в образцах сыворотки с использованием картриджа было проведено испытание слабой и сильной анионообменных смол, в частности DEAE и O Sepharose соответственно. Содержание элюатов из экстракционных картриджей анализировали с помощью ВЭЖХ-FL.

Наилучшие результаты с точки зрения селективного выделения основных компонентов CDT были достигнуты с использованием сильного анионита Q Sepharose, который был использован для дальнейших экспериментов.

Выделение фракций трансферрина с анионообменного картриджа проводили при разных рН в интервале от 5,5 до 6,5, используя буферные растворы BIS-TRIS. Наилучшее разделение изоформ и эффективное выделение CDT было достигнуто при pH 5,9 и концентрации BIS-TRIS 20 ммоль / л (рис.3). В описанных условиях среднее общее извлечение (n = 6) асиало-Tf и дисиало-Tf, измеренное с помощью ВЭЖХ-FL, составило 26,2% (CO ± 1,1) и 27,4% (CO ± 1,5) для уровней CDT 1,5% и 4,6% соответственно.

Поскольку целью нашей работы было создание аналитического метода, не требующего сложного оборудования и позволяющего проводить анализ на месте взятия пробы, мы изучили возможность замены двойного монохроматорного флуориметра непрофессиональным детектором на базе камеры смартфона. Одновременно источник монохроматического излучения был заменен ксеноновой лампой от старого флуориметра мощностью 150 Вт с оптическим фильтром на 300 нм с шириной полосы 10 нм. Эмиссионное излучение пропускали через фильтр с пропускной способ-



**Рис.4.** Схематическое изображение метода анализа CDT с использованием камеры смартфона

ностью свыше 460 нм для отсечения естественной флуоресценции белков, возникающей на длинах волн ниже 400 нм. Этот метод оказался пригодным для регистрации и различения флуоресценции CDT-положительной и CDT-отрицательной сыворотки. Схематическое изображение метода изображено на рис.4. Следует отметить, что полученные сигналы можно обрабатывать с помощью программного обеспечения для обработки изображений смартфона, которое позволяет оценивать интенсивность сигнала, что может быть полезным при сравнительном анализе данных.

Нижний предел обнаружения рассчитывали как наименьшее количество трансферрина, демонстрирующее сигнал флуоресценции с отношением сигнал/шум ≥3. В наших условиях оно составило 2,5 пмоль/мл.

Для оценки воспроизводимости мы повторяли анализ двух образцов сыворотки с нормальной и высокой концентрацией CDT (1,5% и 4,9%, измерено с помощью ВЭЖХ-Vis) пять раз в один и тот же день и в течение пяти непоследовательных дней. Используя интенсивность флуоресценции в качестве аналитического сигнала, мы нашли, что относительное стандартное отклонение (ОСО, %) в течение суток лежало в диапазоне от 6,6% до 14,2%, а между измерениями в течение 5 дней – не превышало 20% (табл.1).

Мы применили разработанный метод оценки содержания CDT для анализа 40 образцов сыворотки, а затем сравнили наши данные с результатами, полученными методом ВЭЖХ-Vis (длина волны детектирования 460 нм), который обычно используется в лабораториях [16]. Оказалось, что корреляция между двумя методами описывается уравнением у = 14,97х – 11,44, коэффициент корреляции R<sup>2</sup> = 0,8854 (рис.5).

Следует указать, что при интерпретации результатов анализа надо проявлять известную осторожность, поскольку в индивидуальных случаях возможна ошибка в определении CDT, связанная с существованием редких изоформ трансферрина, наличием высокого уровня асиалотрансферрина и высокого уровня общего трансферрина [15]. Кроме того, сообщалось о других возможных причинах изменения значения CDT, например, при тяжелой печеночной недостаточности, беременности, дефиците железа и комбинированной трансплантации поджелудочной железы и печени [15]. Хотя последние являются медицинскими состояниями, о которых врач должен знать из истории болезни пациента, риск ложноположительных результатов CDT не может быть исключен.

\* \* \* \*

Таким образом, была разработана простая и надежная методика, позволяющая полуколичественно оце-

Табл.1. Воспроизводимость в течение одного дня (intraday, n=5) и на протяжении 5 дней (interday, n=25)

	Intraday, день 1, n=5	Intraday, день 2, n=5	Intraday, день 3, n=5	Intraday, день 4, n=5	Intraday, день 5, n=5	Interday, n=25
Отрицательная проба (%CDT 1,5), OCO, %	6,6	10,7	10,4	9,6	8,9	19,4
Положительная проба (%CDT 4,9), OCO, %	11,2	9,2	9,4	10,0	14,2	18,6

нивать содержание CDT в широком диапазоне биологических матриц. Процедура основана на частичном разделении сывороточных углевод-дефицитных изотрансферринов, функционализированных тербием (III), с помощью анионообменных картриджей с последующим их прямым определением в собранном растворе с помощью кварцевой лампы с подходящим фильтром и смартфона. Оперативность, простота и возможность работы без дорогостоящего инструментария - основные преимущества нового подхода. Весь процесс занимает не более 10 мин.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 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. V. 147. P. 2-12. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.006.
- 2. Helander A., Wielders J., Anton R., Arndt T., Bianchi V., Deenmamode J., Jeppsson J., Whitfield J.B., Weykamp C., **Schellenberg F.** Standardisation and use of the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT) // Clin. Chim. Acta. 2016. V. 459. P. 19-24. https://doi.org/10.1016/J.CCA.2016.05.016.
- **Stibler H.**, **Kjellin K.G.** Isoelectric focusing and electrophoresis of the CSF proteins in tremor of different origins // J Neurol Sci. 1976. V. 30. No. 2-3. P. 269-85.
- 4. Landberg E., Påhlsson P., Lundblad A., Arnetorp A., **Jeppsson J.O.** Carbohydrate composition of serum transferrin isoforms from patients with high alcohol con-sumption // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. V. 210. P. 267–274. https:// doi.org/10.1006/bbrc. 1995.1656.
- 5. Henry H., Froehlich F., Perret R., Tissot J.D., Eilers-Messerli B., Lavanchy D., Dionisi-Vici C., Gonvers J.J., Bachmann C. Microheterogeneity of serum glycoproteins in patients with chronic alcohol abuse compared with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I // Clin. Chem. 1999. V. 45. No. 9. P. 1408-1413.
- Sorio D., De Palo E.F., Bertaso A., Bortolotti F., Tagliaro F. Fluorescent adduct formation with terbium: a novel strategy for transferrin glycoform identification in human body fluids and carbohydrate-deficient transferrin HPLC method validation // Anal. Bioanal. Chem. 2017. V. 409. P. 1369-1378. https://doi. org/10.1007/s00216-016-0069-9.
- Кекелидзе З.И. Информационные материалы по методологической валидности и экономической целесообразности применения метода качественного и количественного анализа CDT в сыворотке крови методами капиллярного электрофореза или высокоэффективной жидкостной хроматографии для контроля ремиссии больных алкоголизмом или диагностики потребления алкоголя. Национальный научный центр онкологии, 03.04.2018. http://nncn.serbsky.ru /2018/04/03/analiz-cdt.
- Delanghe J.R., Helander A., Wielders A., Pekelharing J.M., Roth H.J., Schellenberg F., Born C., Yagmur E., Gentzer W. Development and multicenter evaluation of the N latex CDT direct immunonephelometric assay for serum carbohydratedeficient transferrin // Clin. Chem. 2007. V. 53. P. 1115–1121. https:// doi.org/10.1373/ clinchem.2006.084459.

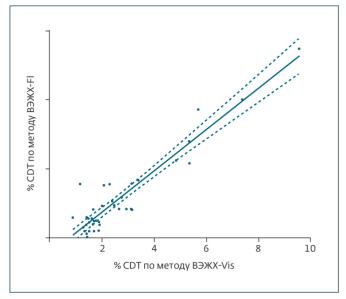


Рис.5. Корреляция между данными, полученными с помощью смартфона и референсным методом ВЭЖХ-Vis

- 9. Tagliaro F., Crivellente F., Manetto G., Puppi I., Devl Z., Marigo M. Optimized determination of carbohydratedeficient transferrin isoforms in serum by capillary zone electrophoresis // Electrophoresis. 1998. V. 19. P. 3033-3039. https://doi.org/10.1002/elps. 1150191640.
- 10. **Jeppsson J.O.**, **Kristensson H.**, **Fimiani C.** Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol // Clin. Chem. 1993. V. 39. No. 10. P. 2115-2120.
- 11. **JoneliJ.**, **LanzC.**, **ThormannW.** Capillaryzone electrophoresis de-termination of carbohydrate-deficient transferrin using the new CEofix reagents under high-resolution conditions // J Chromatogr A. 2006. V. 1130. No. 2. P. 272-80.
- 12. **De Palo E.F., Tagliaro F., Sorio D., Bortolotti F.** Analytical method for the identification of at least one glycoform of the transferrin protein. WO 2015/135900 A1
- 13. White G.F., Litvinenko K.L., Meech S.R., Andrews D.L., **Thomson A.J.**, Multiphotonexcited luminescence of a lanthanide ion in a protein complex: Tb3+ bound to transferrin // Photochem. Photobiol. Sci. 2004. V. 3. P. 47-55. https://doi.org/10.1039/b306760b.
- 14. Kataoka Y., Shinoda S., Tsukube H. Transferrin-terbium complexes as luminescent pH sensing devices // J. Nanosci. Nanotechnol. 2009. V. 9. P. 655-657. https://doi.org/10.1166/ jnn. 2009. j080.
- 15. Nicotra S., Sorio D., Filippi G., De Gioia L., Paterlini V., De Palo E.F., Grandori R., Tagliaro F. Terbium chelation, a specific fluorescent tagging of human transferrin. Optimization of conditions in view of its application to the HPLC analysis of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) // Anal. Bioanal. Chem. 2017. V. 409. P. 6605-6612. https://doi. org/10.1007/s00216-017-0616-z.
- 16. Bortolotti F., De Paoli G., Pascali J.P., Trevisan M.T., Floreani M., **Tagliaro F.** Analysis of carbohydrate-deficient transferrin: comparative evaluation of turbidimetric immunoassay, capillary zone electrophoresis, and HPLC // Clin. Chem. 2005. V. 51. P. 2368–2371. https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051805.