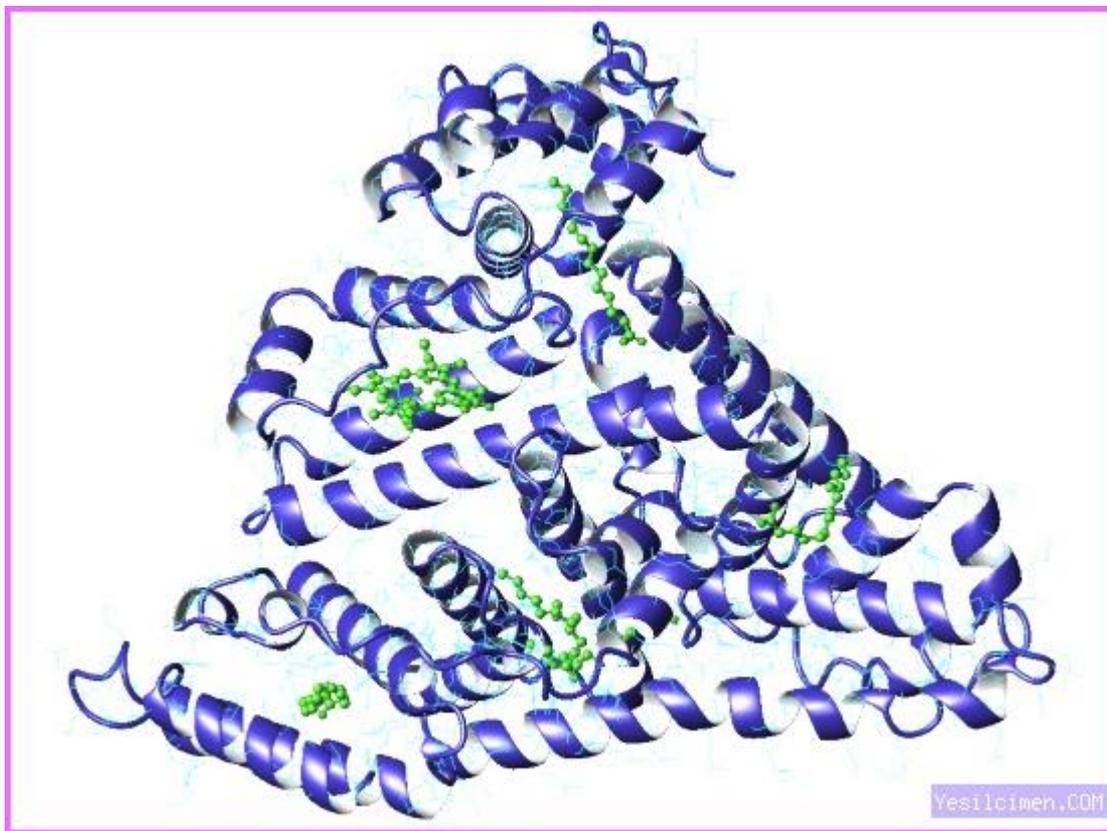
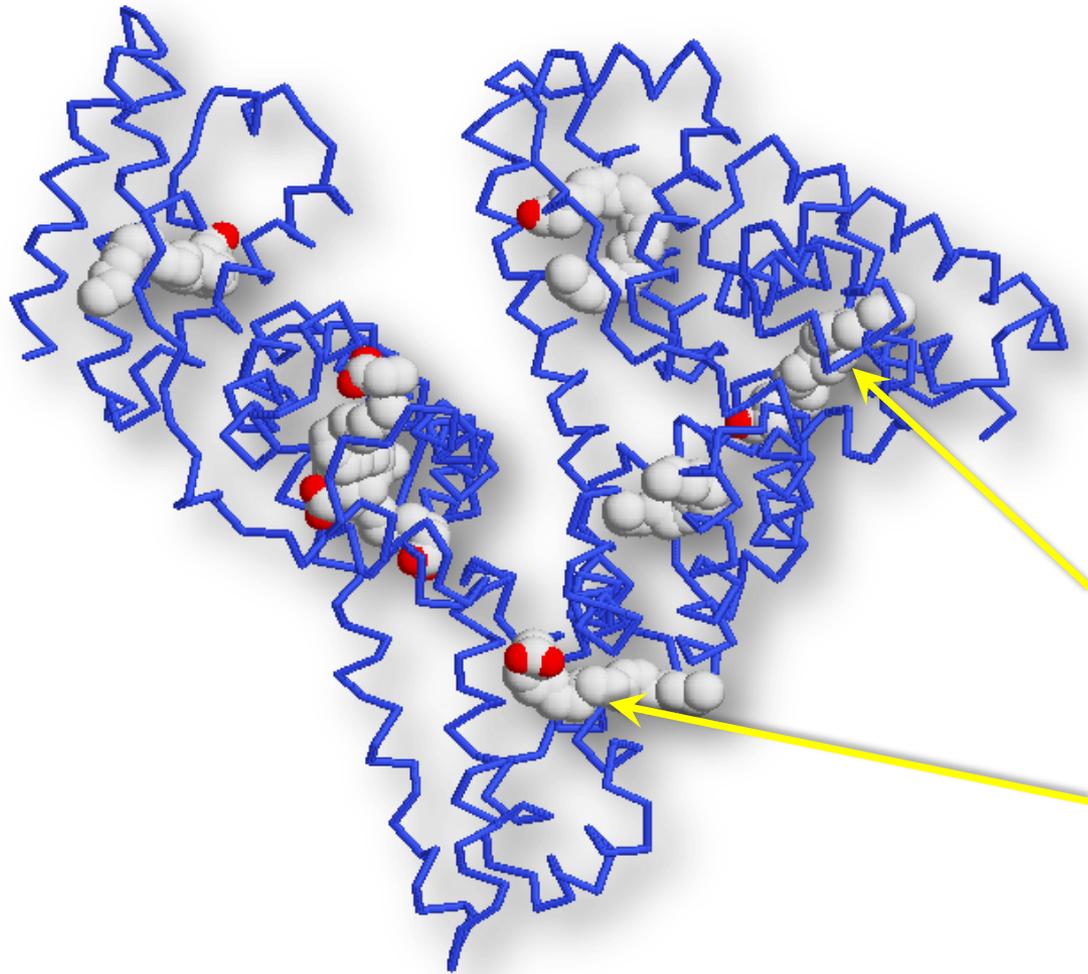


ЭПР-спектроскопическое определения изменений транспортных свойств альбумина

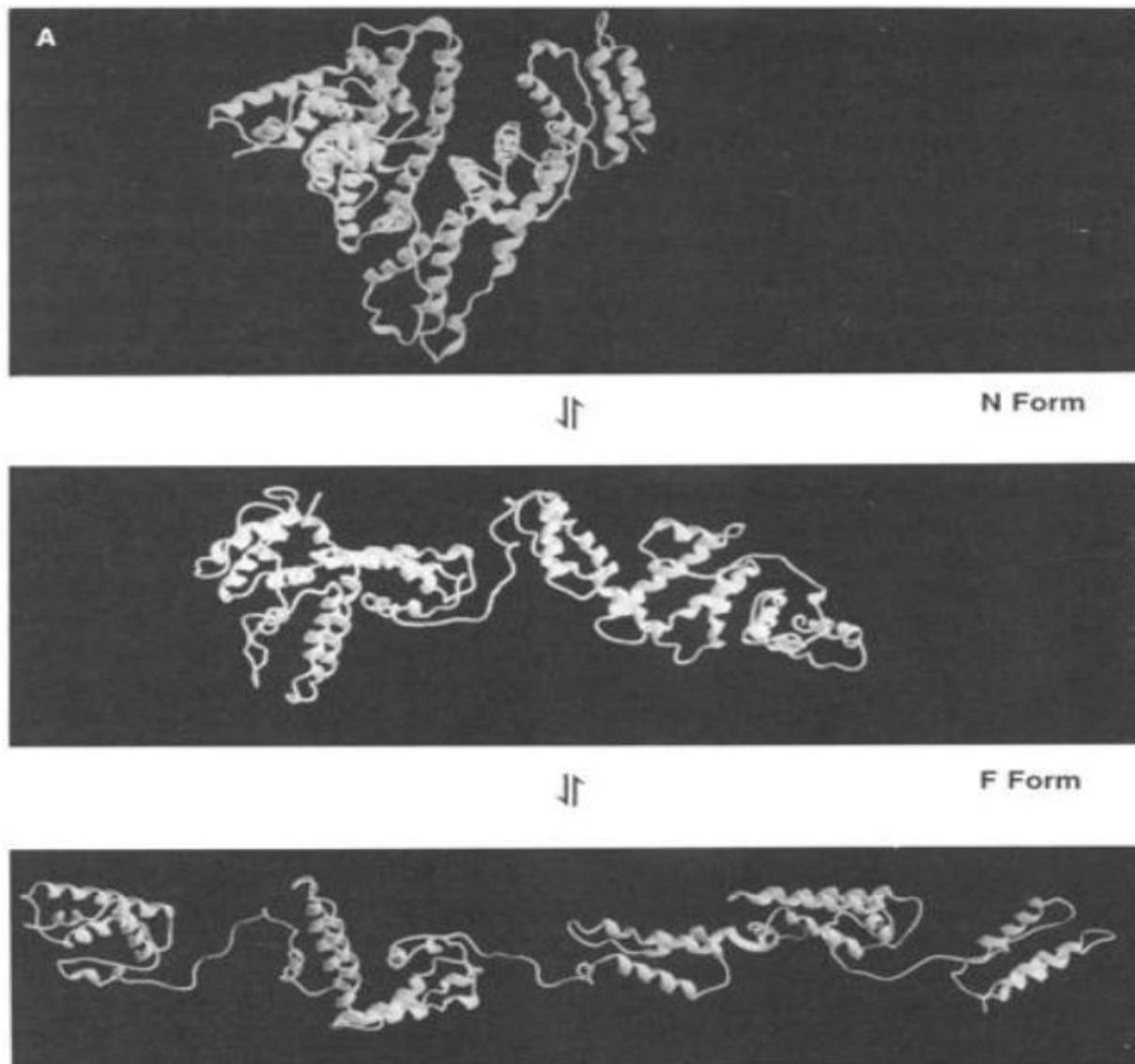


Структура и функции альбумина

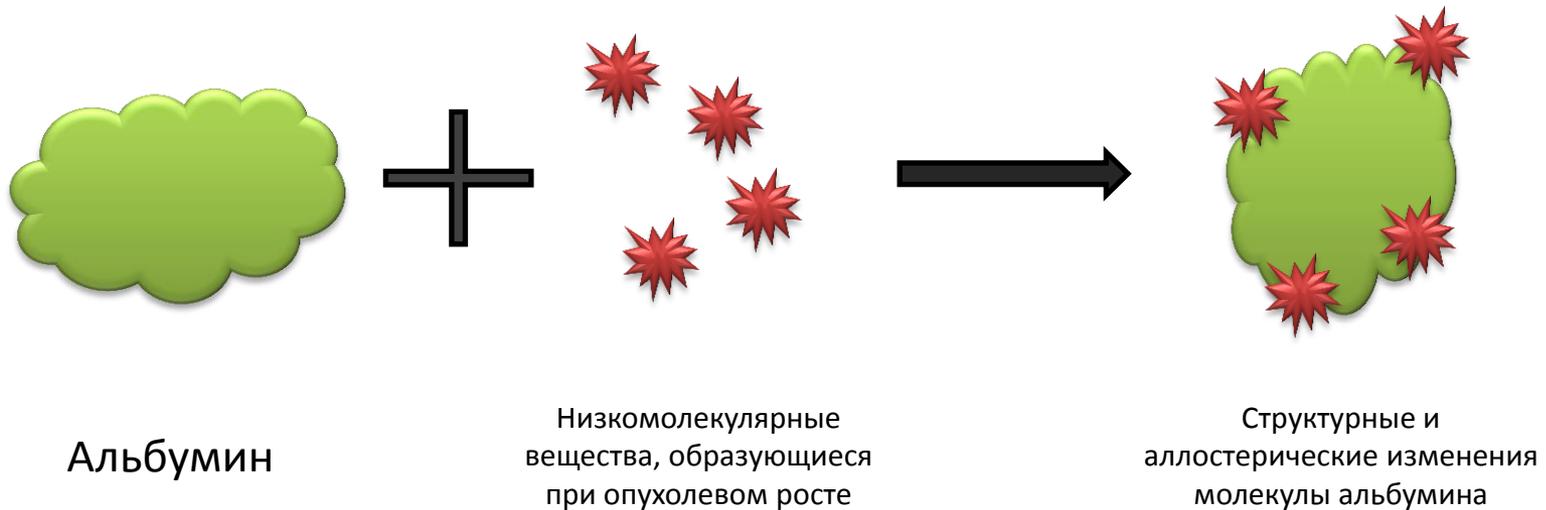


Сайты связывания лигандов —
жирных кислот, триптофана,
билирубина, стероидных
гормонов, токсинов,
металлов, медикаментов

Функциональная
активность
альбумина
способностью его
молекулы менять
конформацию при
связывании с
метаболитами



Изменение транспортных свойств альбумина



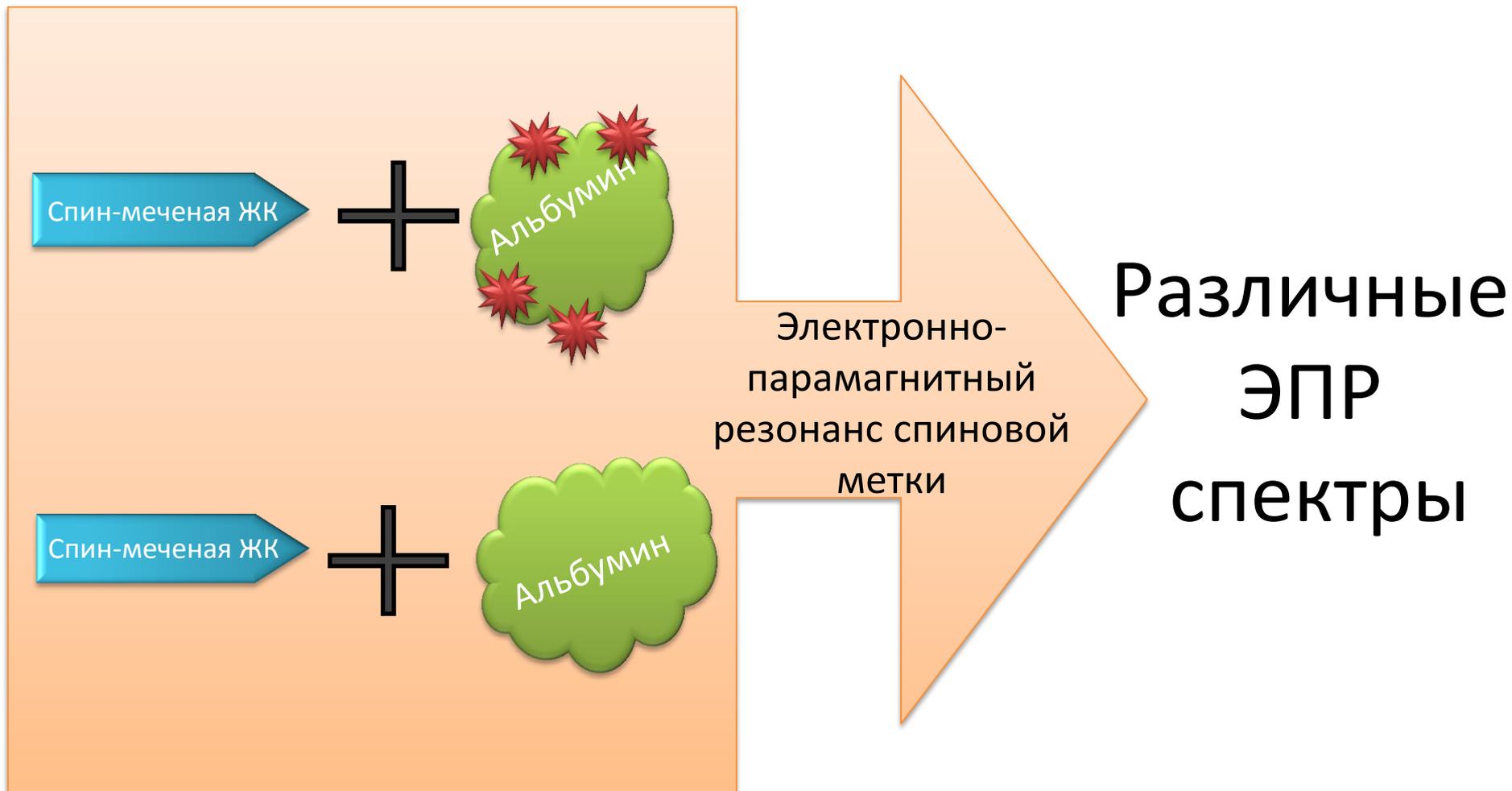
Изменение связывания и переноса жирных кислот

Livshits VA, Marsh D. Fatty acid binding sites of serum albumin probed by non-linear spin-label EPR. Biochim Biophys Acta 2000;1466:350–60.

Lowenthal MS, Mehta AI, Frogale K, Bandle RW, Araujo RP, Hood BL, et al. Analysis of albumin-associated peptides and proteins from ovarian cancer patients. Clin Chem 2005;51:1933–45.



Принцип метода



Магнитное поле

Принцип метода

Электронный парамагнитный резонанс - резонансное поглощение электромагнитной энергии в сантиметровом или миллиметровом диапазоне длин волн веществами, содержащими **парамагнитные** частицы

Три концентрации спин-меченой жирной кислоты. Имитация:

- физиологического состояния альбумина при связывании гидрофобных субстратов, как например, жирные кислоты;
- физиологического состояния во время транспорта гидрофобных субстратов по кровеносной системе;
- физиологического состояния при отдаче гидрофобных субстратов клеткам-мишеням

Принцип метода

Спин-меченая жирная кислота (16-доксил-стеариновая кислота) в трех различных концентрациях полярного растворителя – этанола



Спиновая метка соединяется с альбумином в специфических центрах связывания и между доменами внутри глобулы



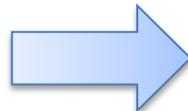
3 конформационные модификации альбумина



3 ЭПР-спектра



Аппроксимация спектров



- Связывающая эффективность (BE)
- Транспортная эффективность (RTQ)
- Детоксикационная эффективность (DTE)
- Показатель нативности конформации альбумина (DR)



Референтные интервалы

- 2000-2004 гг. – обследовалась группа здоровых доноров-добровольцев (321 человек), в возрасте от 9-и до 78-и лет.
- 2005-2007 гг. – обследовалась группа здоровых доноров-добровольцев (83 человека), в возрасте от 17-и до 78-и лет.

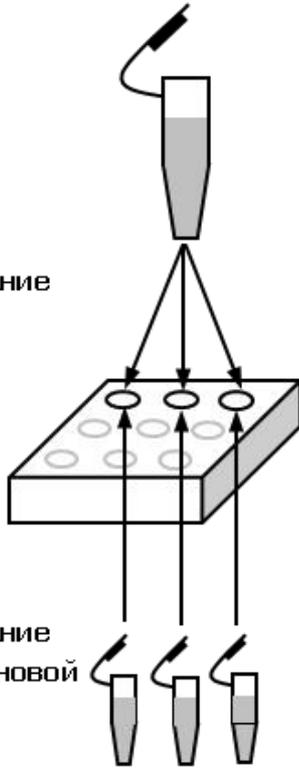
Показатель	Референтный интервал
DR	1,2 – 5 у.е.
BE	65 – 135 %
RTQ	60 – 100 %
DTE	50 – 175 %

Пробоподготовка

- Сыворотка 0,2 мл
- Забор крови обычной венепункцией (3-5 мл)
- Центрифугирование при 1000-1500 g в течение 10 минут
- Супернатант переносится в отдельную пробирку
- Хранение образцов при t 4-8 C (не более 5 дней) или -20 °C (6 месяцев)
- Сыворотка может быть заморожена только один раз

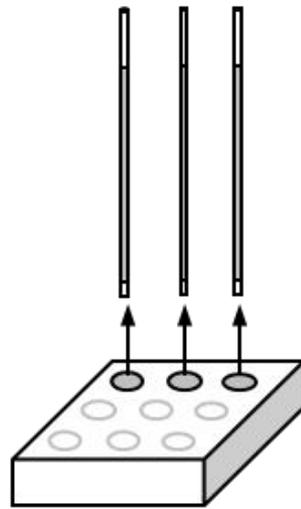
Схема методики

1. Дозирование сыворотки



2. Дозирование реагента спиновой метки ЭПР

4. Заполнение капилляров



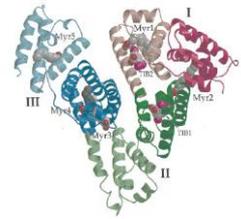
3. Инкубация

5. Измерения образцов в капиллярах



6. Обработка спектров ЭПР и вывод результатов





Области применения метода

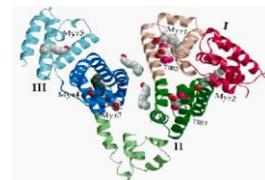
Раннее **определение нарушений транспортной системы крови** при интоксикации (например, сепсис - SIRS) в отделениях интенсивной терапии;

Мониторинг нарушений транспортной системы крови при интоксикации в отделениях интенсивной терапии;

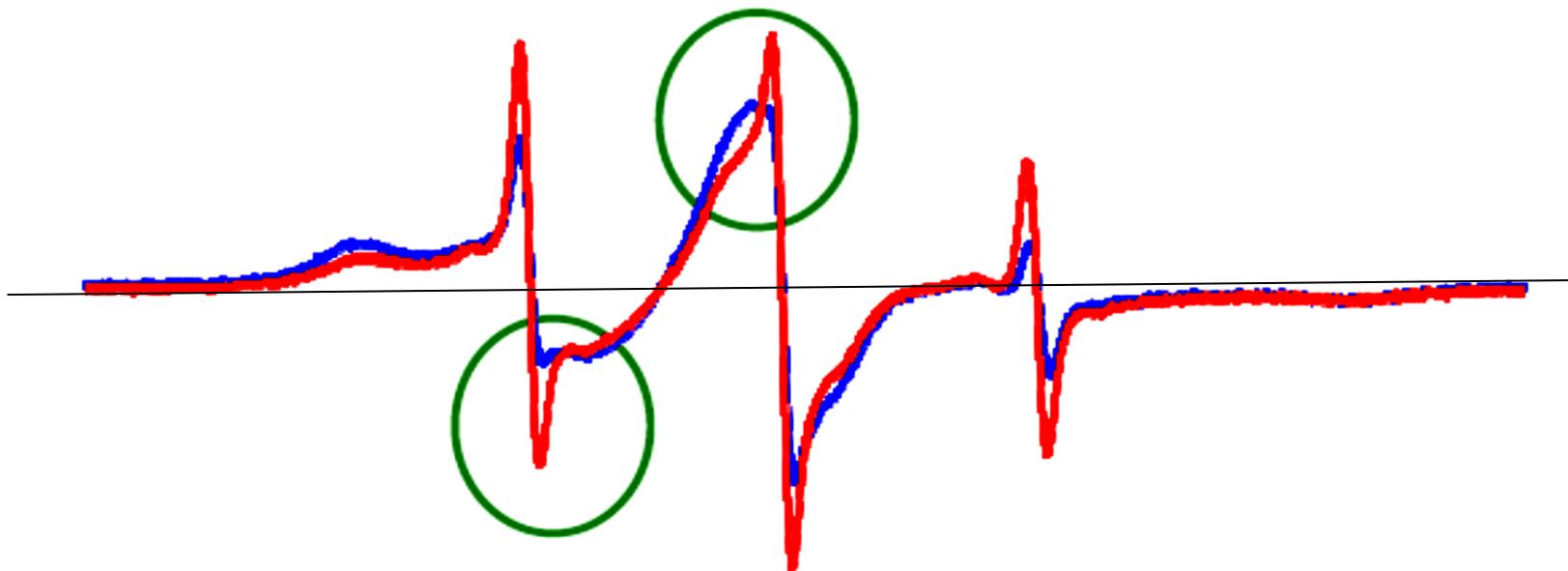
Скрининговое обследование широкого круга лиц, относящихся к группе с повышенным риском возникновения онкологического заболевания, в целях **ранней диагностики злокачественных образований** различных видов и локализаций;

Выявление и мониторинг онкологического процесса для корректировки проводимой терапии онкологического заболевания, а также предотвращения рецидивов;

Оценка качества транспортных свойств коммерческих растворов альбумина



Визуальные различия в ЭПР-спектрах



Спектры от:

— 95 здоровых доноров

— 102 пациентов с подтвержденными онкологическими заболеваниями

Состояния, снижающие точность измерения при диагностике онкологического процесса

Ложноположительные результаты

- печёночная недостаточность;
- острое вирусное, либо воспалительное заболевание;
- ожоги тела высокой степени;
- тяжелая травма при высокой потере крови;
- тяжелая медикаментозная интоксикация;
- послеоперационный (до 14 суток) период;
- нахождение под воздействием алкоголя и наркотических средств;
- пониженное содержание в крови альбумина – гипоальбуминемия (< 35 г/л);
- период беременности

Ложноотрицательные результаты

- повышенное содержание в анализируемой сыворотке триглицеридов и липопротеинов по сравнению с нормальными значениями (осуществляется автоматический контроль во время измерения);
- повышенное содержание в крови альбумина – гиперальбуминемия (> 55 г/л).

Интерпретация результатов

DR	BE	RTQ	DTE	Интерпретация результатов анализа
Показатель нативности конформации альбумина	Связывающая способность альбумина	Транспортная эффективность альбумина	Детоксикационная эффективность альбумина	
+	+	+	+	активного роста злокачественного образования не установлено
+	+	+	-	активного роста злокачественного образования не установлено (при наличии одного или нескольких противопоказаний к использованию метода)
+	+	-	+	-//- (см. предыдущее)
+	+	-	-	-//-
+	-	+	+	-//-
+	-	+	-	-//-
+	-	-	+	-//-
+	-	-	-	-//-
-	+	+	+	наличие активного роста злокачественного образования
-	+	+	-	наличие активного роста злокачественного образования (при наличии одного или нескольких противопоказаний к использованию метода). Для подтверждения результата рекомендовано контрольное измерение в течении месяца при желательном исключении противопоказаний к использованию метода
-	+	-	+	-//- (см. предыдущее)
-	+	-	-	-//-
-	-	+	+	-//-
-	-	+	-	-//-
-	-	-	+	-//-
-	-	-	-	-//-

Показатель нативности конформации альбумина (DR)

- Пороговое значение – 1,0
 - Серая зона 0,8-1,2

Пример интерпретации результатов



Клинические исследования

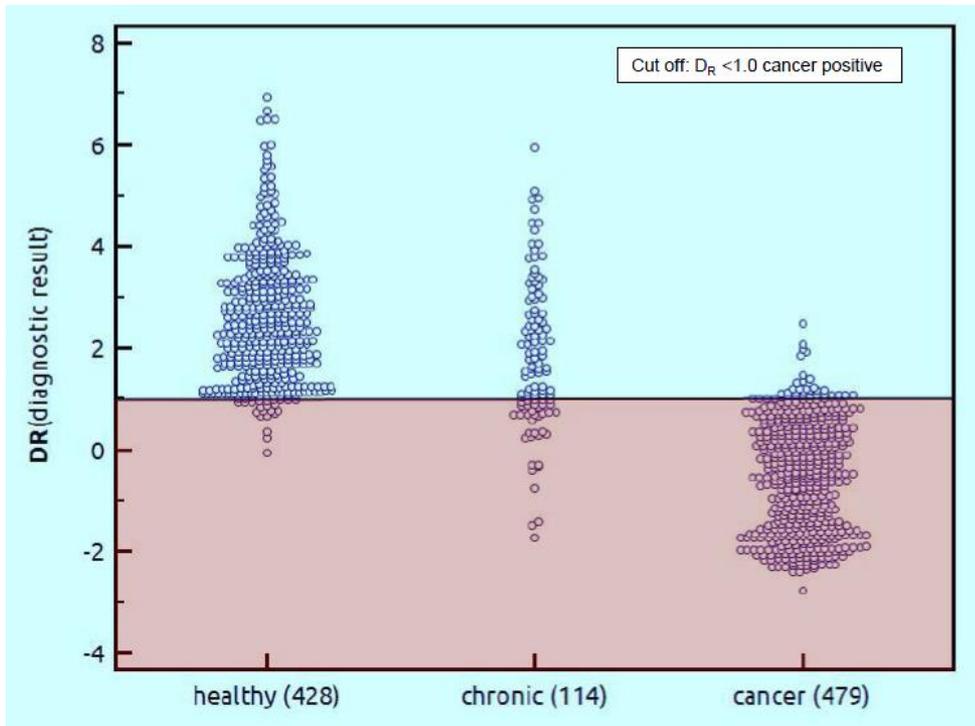
Год	Автор и место проведения	N	n	Группы	ДЧ, %	ДС, %	Комментарий	Рейтинг
2002	MedInnovation, Берлин	575	349	здоровые	87	96	Опухоль – здоровые	2+
			135	опухоль		94	Опухоль – (здоровые+с хрон.заб.)	
			91	с хронич. заболеваниями		86	Опухоль – с хрон.заб.	
2008-2010	Д-р Трофименко, д-р Маландин / ФМБЦ, Москва	222	115	онкология	90	100	Мол.железа, простата, почки, мочевого пузыря, легкие, ЖКТ	2+
			107	Контрольная группа				
2009-2011	Проект разработки теста ранней диагностики рака кишечника совместно с клиникой St.Elizabeth-Krankenhaus, Берлин	650	250	контрольная группа	90	95	Раковые - здоровые	2+
			200	рак кишечника		80	Раковые – здоровые и доброкачественные опухоли	
			100	доброкачественные заболевания		90	Раковые – доброкачественные опухоли, а также злокачественные опухоли иной локализации	
			100	иные локализации				
2010-	Dr. Hakån Olsson et al / Лунд, Швеция	400	200	контрольная группа	Задача – улучшение неинвазивной диагностики рака простаты путем комбинации с тестом ПСА Результат – комбинация ЭПР-ТСА с ПСА увеличивает диагностическую эффективность	2+		
200	рак простаты							
2014-	Dr. P. Reichardt / Берлин	100	100	Мониторинг терапии	Сравнение теста со стандартными методами при наличии опухоли, в процессе лечения и после лечения		2++	
2014	G. Matthes / Берлин	341	57	онкология	93	98	Ранняя диагностика рака	2+
			284	здоровые				

Σ2288 Онко - 907

Чувствительность метода в сравнении с традиционными онкомаркерами

Локализация	Маркер	Чувств.,%
Рак простаты	PSA, fPSA, fPSA/tPSA	24-71%
	ЭПР	28-79%
Рак молочной железы	CEA, CA 15-3, AFP, CA 19-9, CA 72-4, CA 125	19-91%
	ЭПР	48-90%
Рак кишечника	CEA, AFP, CA 19-9	24-78%
	ЭПР	88%
Рак легких	NSE, SCC, CYFRA 21-1, CEA, AFP	24-66%
	ЭПР	100%
Рак шейки матки	SCC, CEA	24-69%
	ЭПР	100%

Онкология, хронические заболевания, здоровые



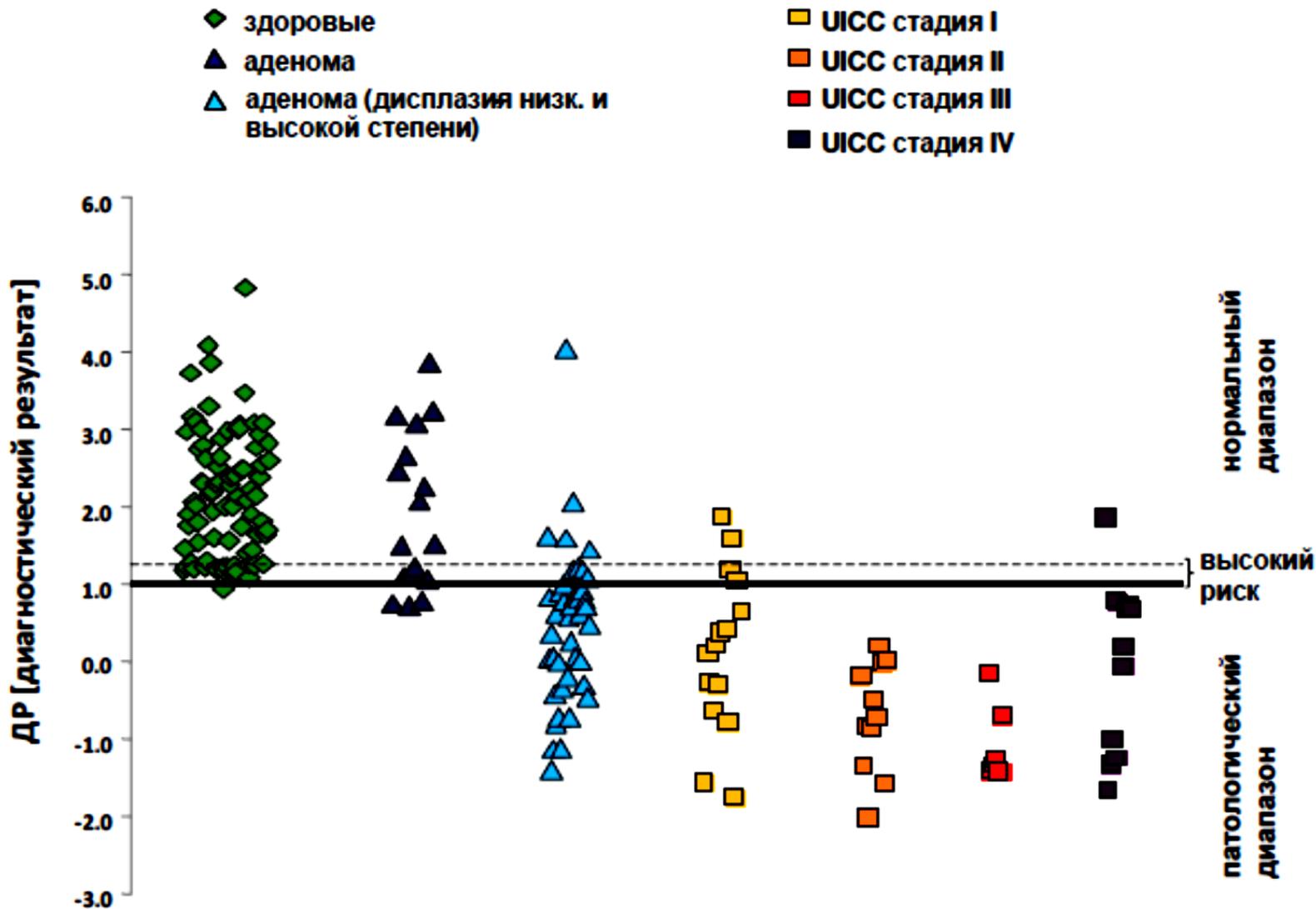
1021 образец

428 здоровых добровольцев
479 онкологических больных
114 пациентов с
хроническими
заболеваниями различной
природы

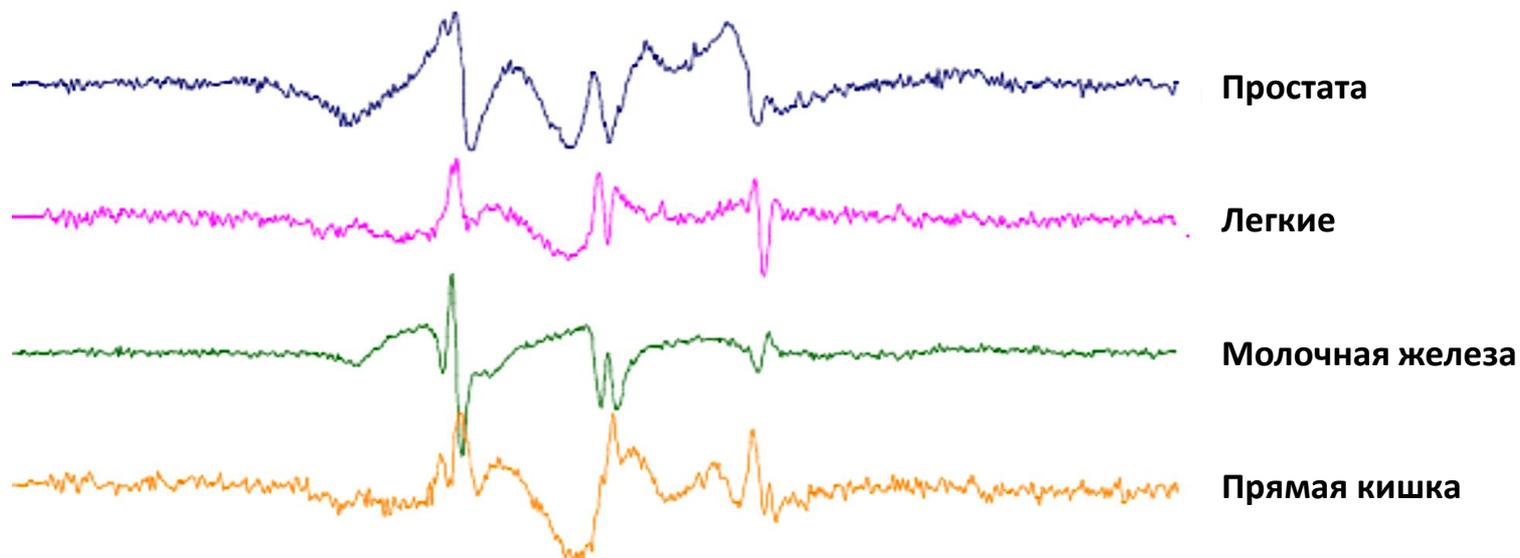
Здоровые – онкология
Чув **93%**
Спец **95%**

Онкология – хрон.заболевания
Чув **93%**
Спец **68%**

Рак толстого кишечника, аденома, здоровые



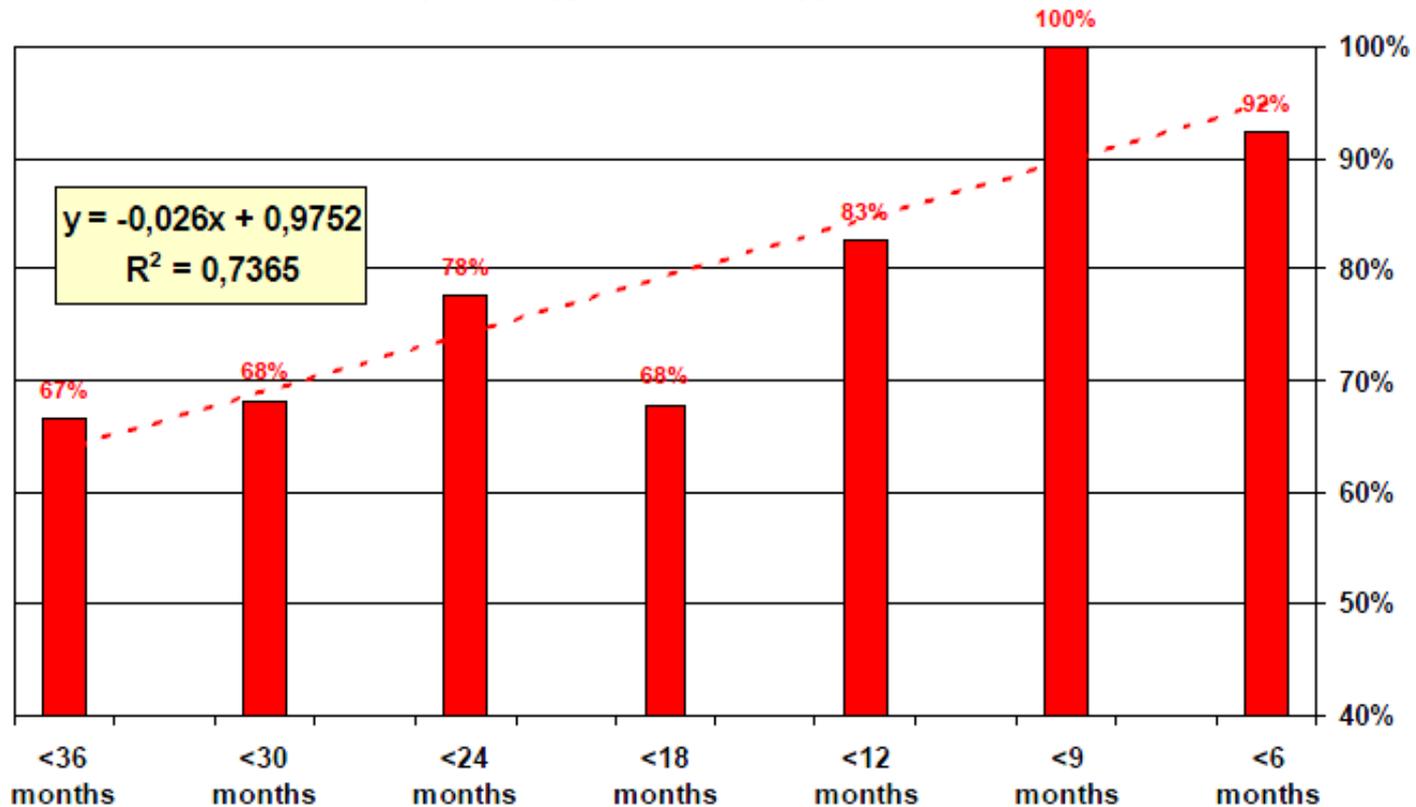
Вид ЭПР-спектра и локализация опухоли



Ранняя диагностика активного злокачественного роста

Количество ЭПР-положительных результатов в зависимости от времени до постановки диагноза

57 доноров, у которых затем был диагностирован рак



Другие заболевания Атеросклероз?

По мере развития атеросклеротического процесса повышается содержание модифицированного фибриногена, из которого в местах повреждения сосудистой стенки образуется нелизируемый фибрин

Модифицированный фибриноген:
комплекс из фибриногена

+

метаболиты воспалительного процесса

+

микроэлементы

+

АЛЬБУМИН



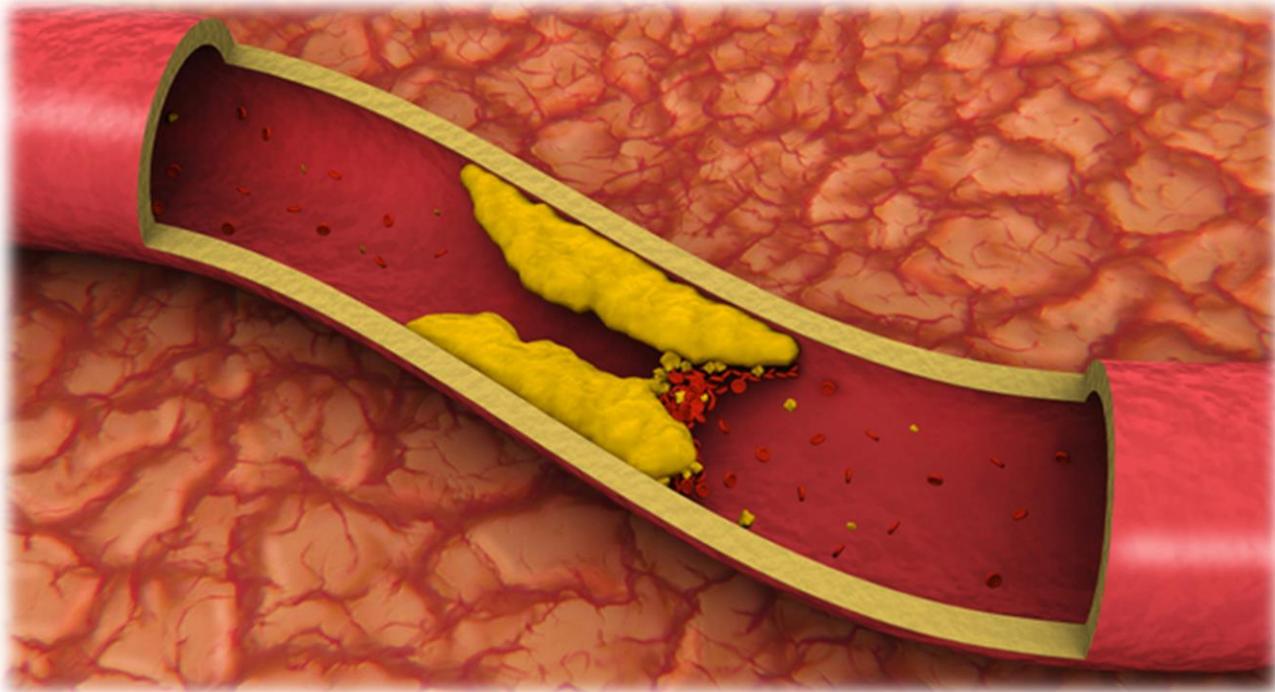
Изменение ЭПР-спектра

Перспективы....

Измерить атеросклероз?

Количественное определение:

- степень атеросклеротического процесса
- в динамике - скорость развития атеросклеротического процесса



А также

- Методика зарегистрирована и разрешена к применению на территории Российской Федерации в надлежащем порядке
- Тест включен в обновленный проект приказа МЗ РФ №1664н о номенклатуре медицинских услуг

A12.05.117.001	Исследование транспортных свойств альбумина методом электронного парамагнитного резонанса
----------------	---

- Клинические рекомендации – перерабатываются в соответствии с новыми требованиями МЗ



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!