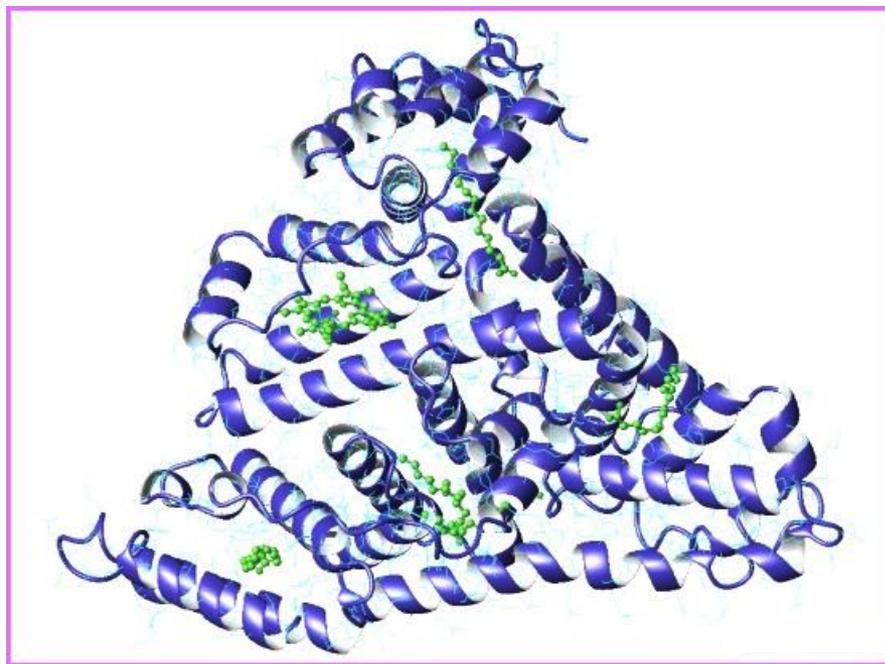


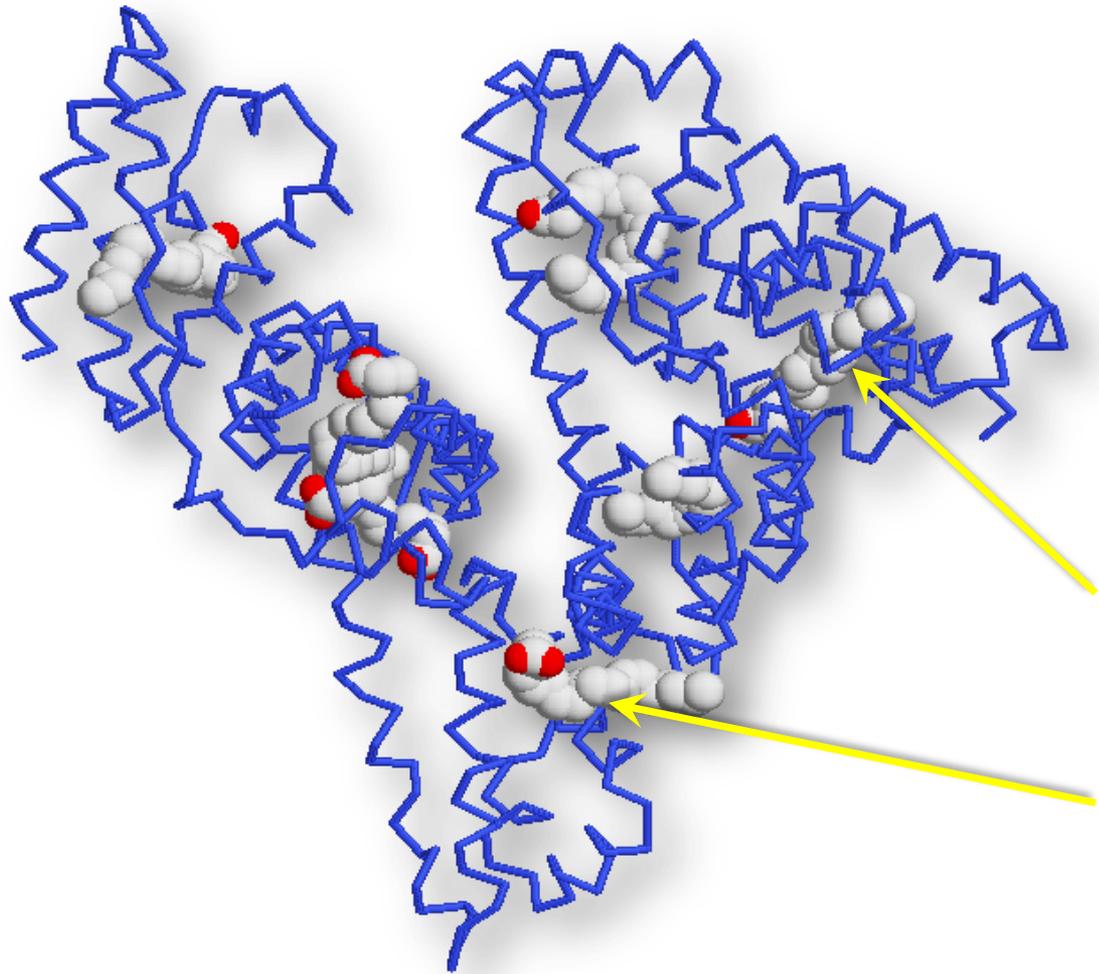
# ЭПР-альбумин-тест – новый лабораторный метод ранней диагностики онкологических заболеваний



**Лянг Ольга Викторовна**

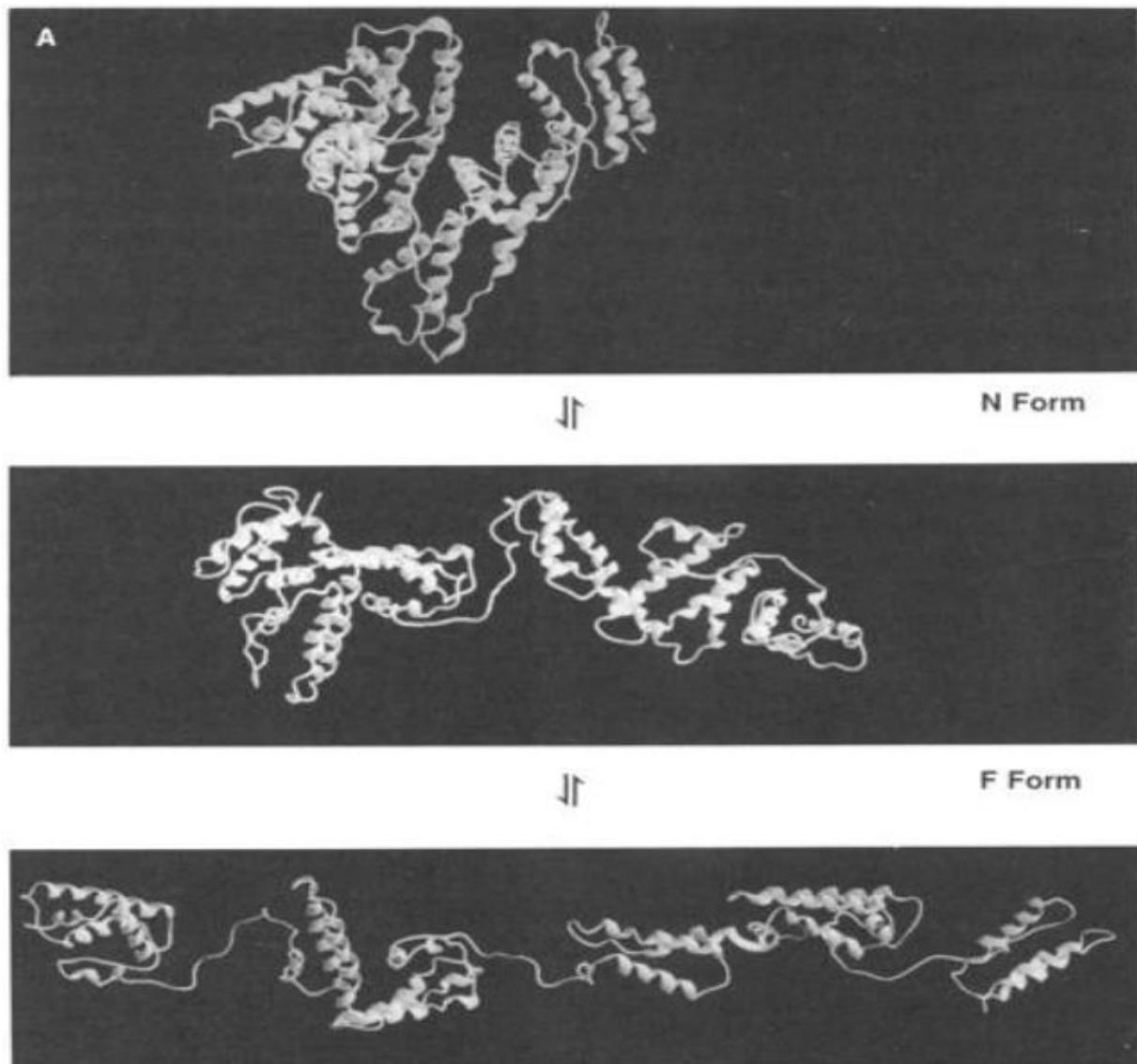
*к.б.н., доцент кафедры госпитальной терапии с курсом клинической лабораторной диагностики,  
Российский университет дружбы народов*

# Структура и функции альбумина

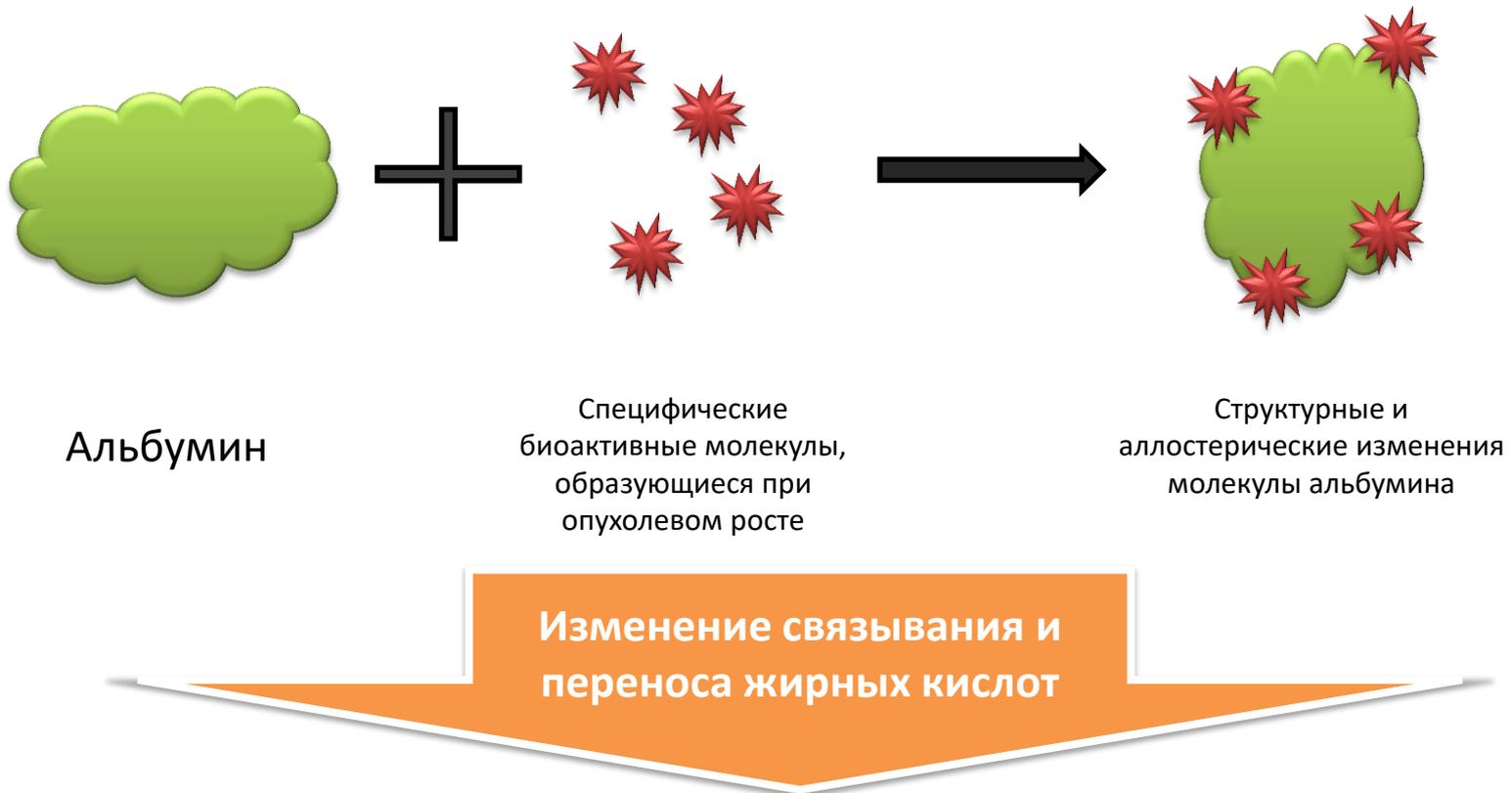


Сайты связывания лигандов — жирных кислот, триптофана, билирубина, стероидных гормонов, токсинов, металлов, медикаментов, пептидов

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



# Изменение транспортных свойств альбумина

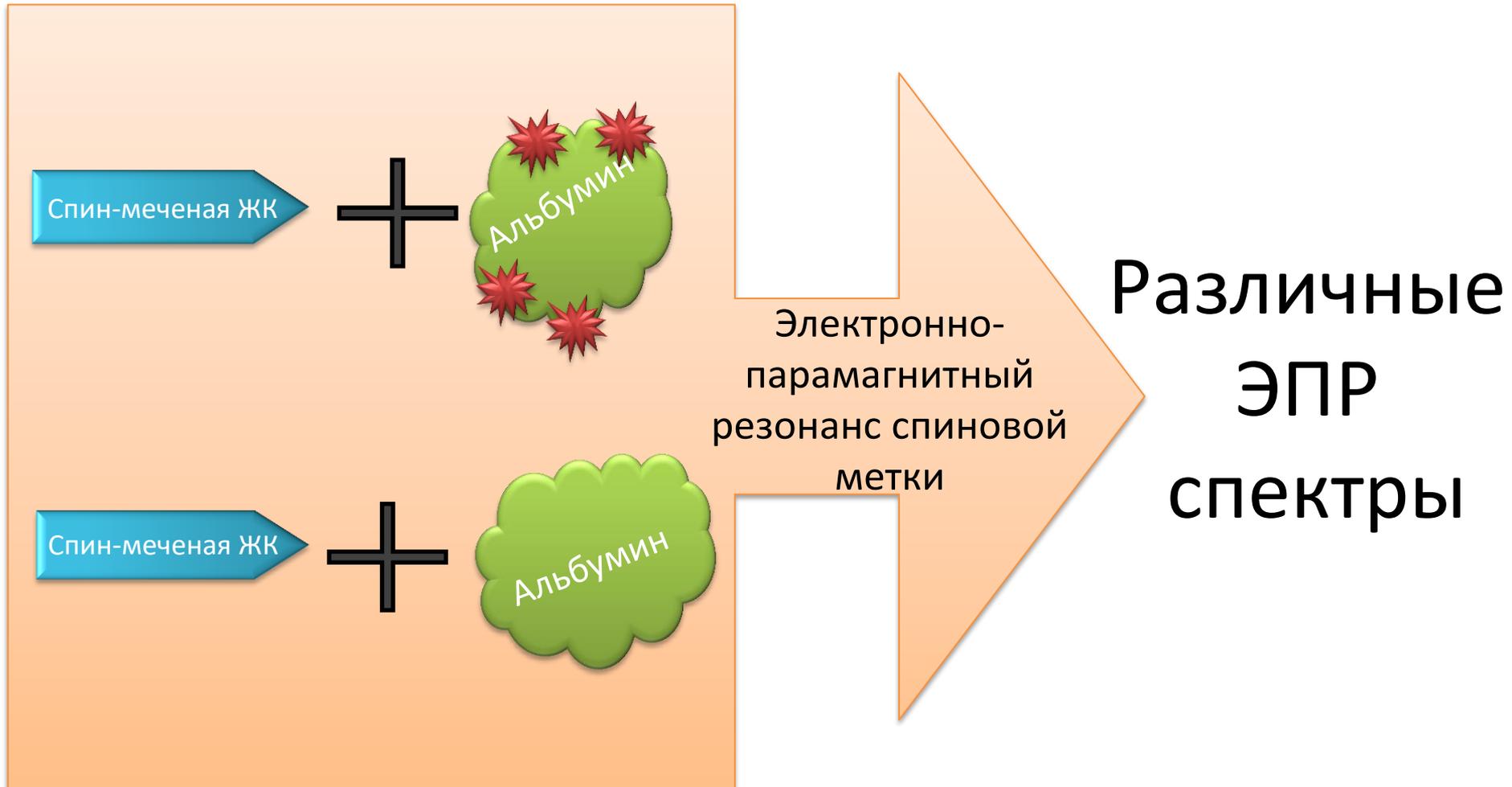


*Livshits VA, Marsh D. Fatty acid binding sites of serum albumin probed by non-linear spin-label EPR. Biochim Biophys Acta 2000;1466:350–60.*

*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 ЭПР



# Принцип метода ЭПР

Три концентрации спин-меченой жирной кислоты (0,8–2,3 mM).

## 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

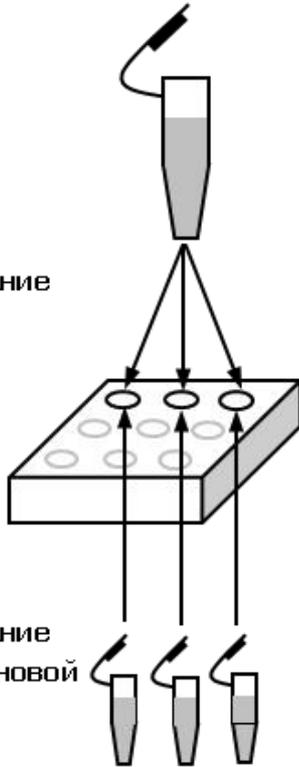


- Связывающая эффективность (BE)
- Транспортная эффективность (RTQ)
- Детоксикационная эффективность (DTE)
- Показатель нативности конформации альбумина (DR)



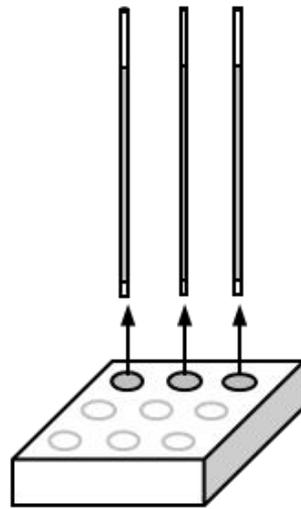
# Схема методики

1. Дозирование  
сыворотки  
50 мкл



2. Дозирование  
реагента спиновой  
метки ЭПР

4. Заполнение  
капилляров



3. Инкубация

5. Измерения  
образцов в  
капиллярах



6. Обработка  
спектров ЭПР и  
вывод результатов



# Пробоподготовка

- Взятие крови натошак обычной венепункцией в пробирку с активатором свертывания или ЭДТА
- Центрифугирование при 1000-1500 g в течение 10 минут
- Сыворотка/плазма переносится в отдельную пробирку
- Хранение образцов при t 4-8 C (не более 4 дней) или -20 °C (12 месяцев)
- Сыворотка/плазма может быть заморожена только один раз
- Сыворотка/плазма 0,2 мл

# Состояния, снижающие точность измерения при диагностике онкологического процесса

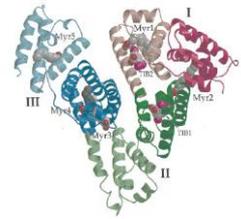
## Ложноположительные результаты

- печёночная недостаточность;
- острое вирусное либо воспалительное заболевание;
- обострения хронических воспалительных заболеваний (болезнь Крона, язвенный колит, ревматоидный артрит, гастрит, дуоденит, псориаз)
- 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;
- повышенное содержание в крови альбумина – гиперальбуминемия (> 55 г/л).

Для регенерации сывороточного альбумина необходимо соблюдать временную паузу 4 недели со дня прекращения обострения/купирования заболевания до взятия крови.



# Области применения метода

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

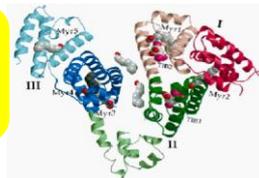
**Мониторинг нарушений транспортной системы крови** при интоксикации в отделениях интенсивной терапии;

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

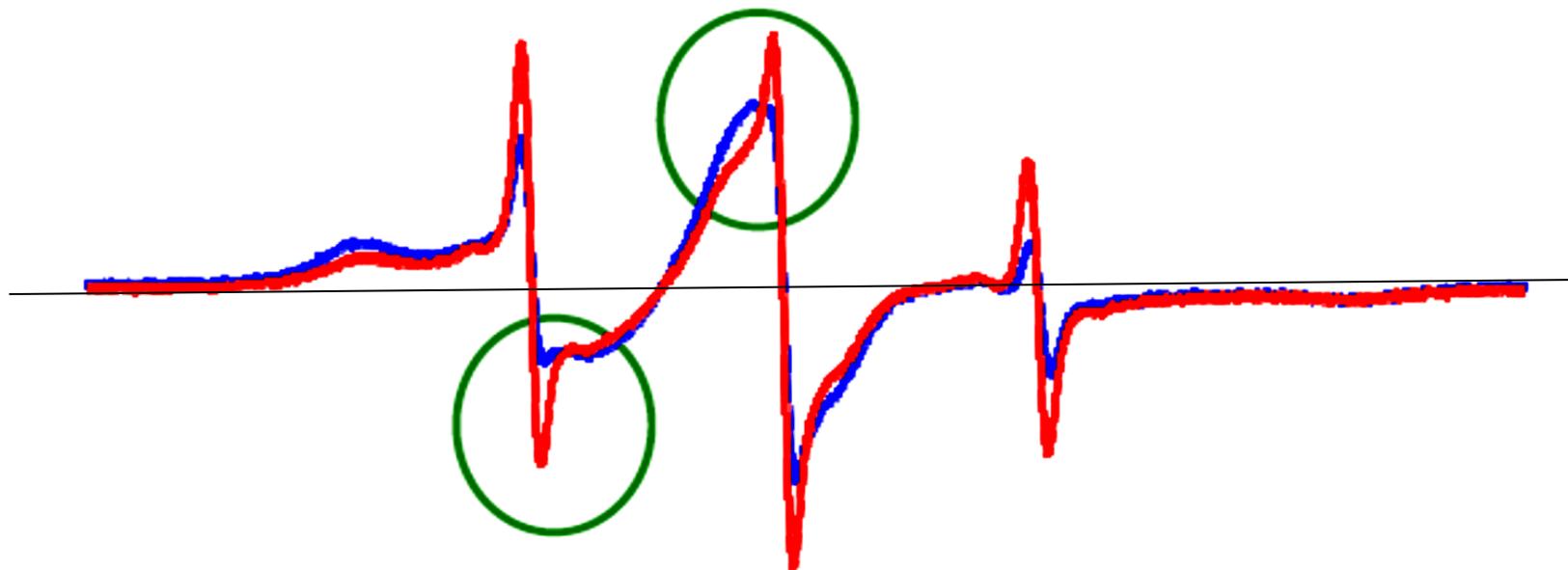
**Выявление и мониторинг онкологического процесса** для корректировки проводимой терапии онкологического заболевания, а также предотвращения рецидивов;

**Оценка качества транспортных свойств коммерческих растворов альбумина** (в системах диализа печени MARS® и Prometheus®)

**Результат ЭПР-теста не является окончательным и самостоятельным диагнозом!!!**



# Визуальные различия в ЭПР-спектрах



Спектры от:

— 95 здоровых доноров

— 102 пациентов с подтвержденными онкологическими заболеваниями

# Референтные интервалы

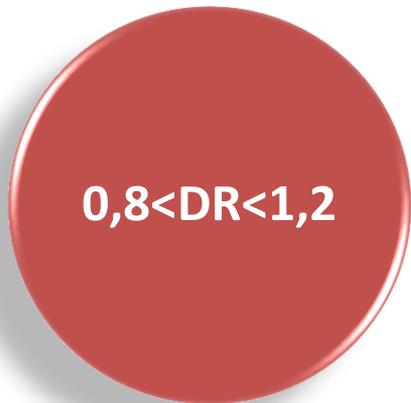
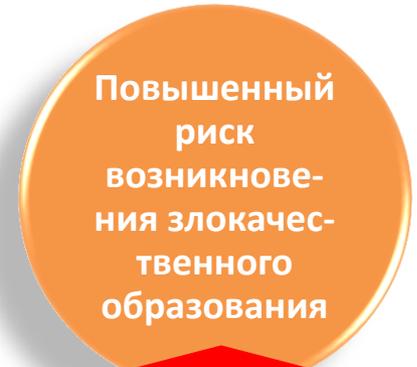
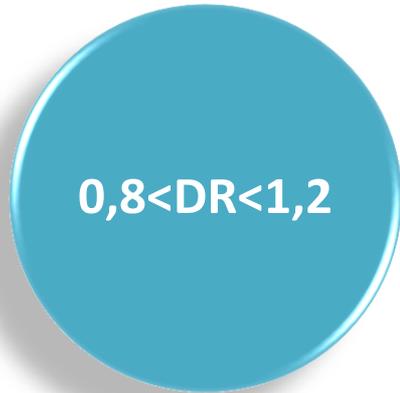
- 2000-2004 гг. – обследовалась группа здоровых доноров-добровольцев (321 человек), в возрасте от 9-и до 78-и лет.
- 2005-2007 гг. – обследовалась группа здоровых доноров-добровольцев (83 человека), в возрасте от 17-и до 78-и лет.

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

# Показатель нативности конформации альбумина (DR)

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

# «Серая зона»



# Интерпретация результатов

DR	BE	RTQ	DTE	Интерпретация результатов анализа
<b>N</b>				активного роста злокачественного образования не установлено
<b>N</b>	Отклонения			активного роста злокачественного образования не установлено (при наличии одного или нескольких противопоказаний к использованию метода)
<b>Отклонение</b>	N			наличие активного роста злокачественного образования
Отклонения				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

# Примеры интерпретации результатов

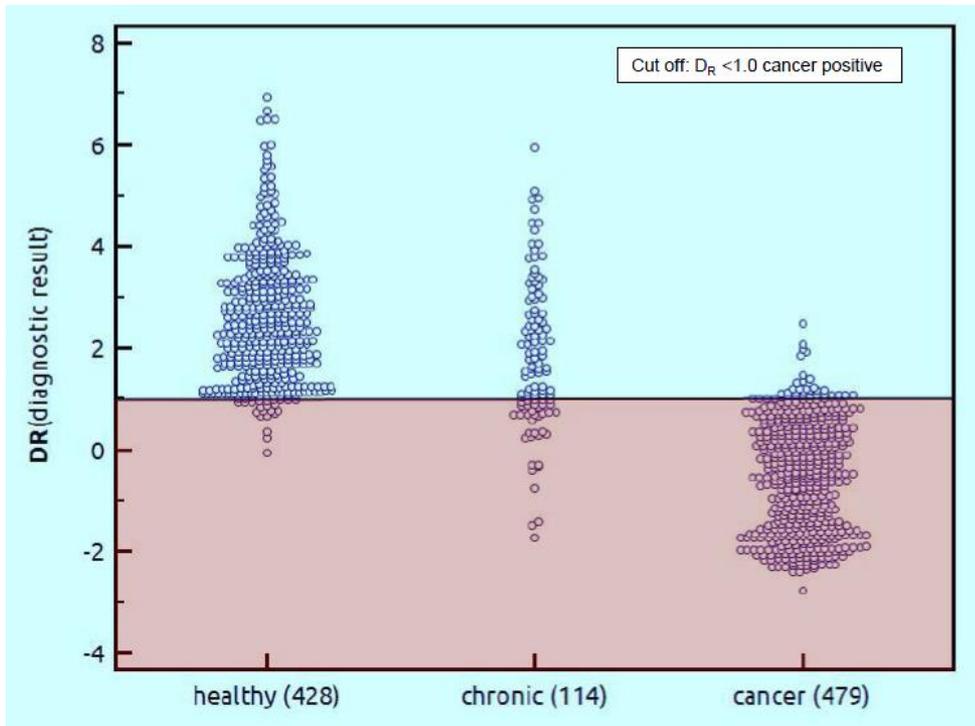
Показатель	РИ	№1	№2	№3	№4
DR	1,2 – 5 у.е.	2,05	<b>0,9</b>	<b>0,87</b>	<b>0,23</b>
BE	65 – 135 %	100	88	72	80
RTQ	60 – 100 %	98	78	73	81
DTE	50 – 175 %	103	101	<b>40</b>	84
<b>Интерпретация</b>			«Серая зона» Контрольное измерение через 4 недели	Высокий риск онкопатологии, но нельзя исключить влияние внешних факторов (терапия, воспаление) Контрольное измерение через 4 недели после исключения интерференции	Высокая вероятность наличия активной злокачественной пролиферации

# 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**

# Онкология, хронические заболевания, здоровые



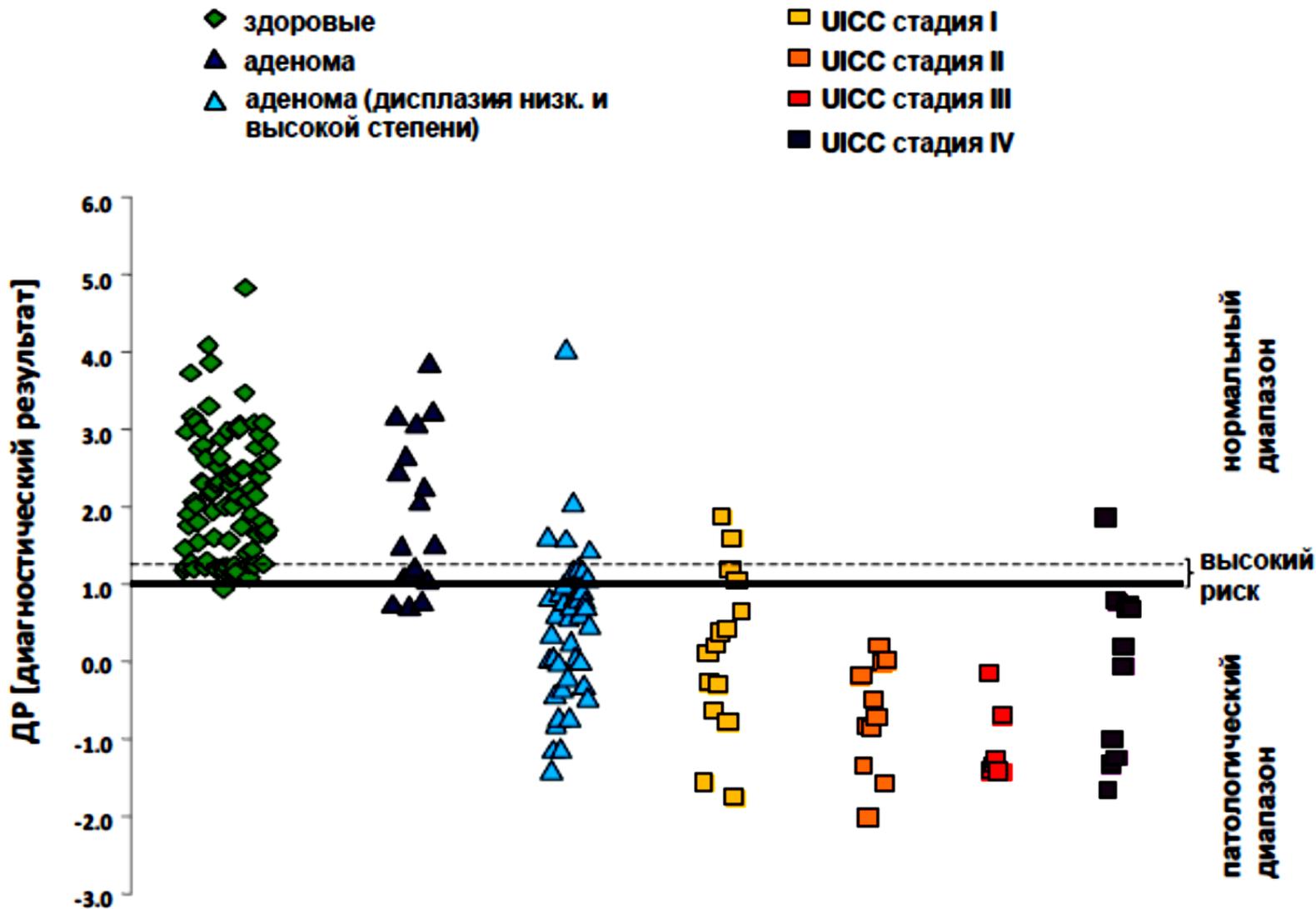
**1021 образец**

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



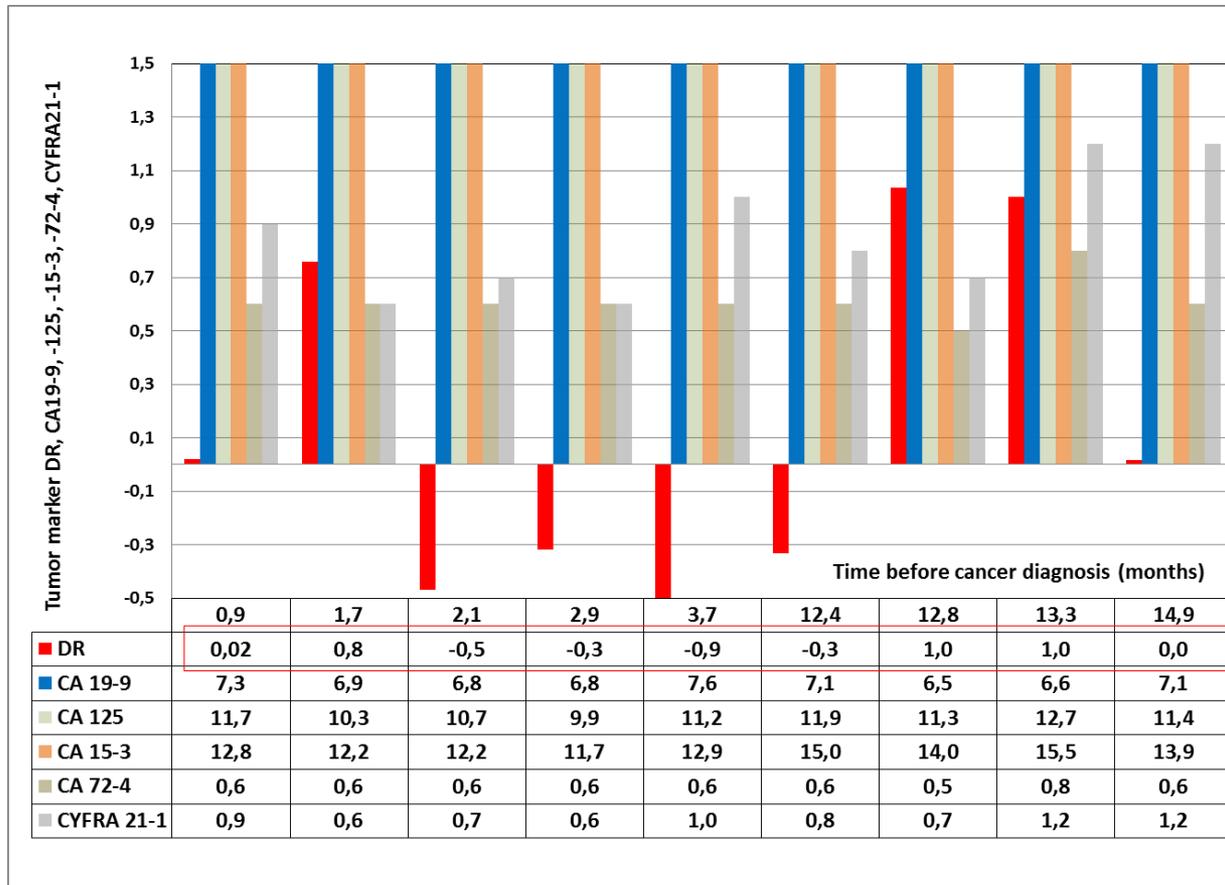
# Чувствительность метода в сравнении с традиционными онкомаркерами

Локализация	Маркер	Чувств.,%
Рак простаты	PSA, fPSA, fPSA/tPSA	24-71%
	<b>ЭПР</b>	<b>28-79%</b>
Рак молочной железы	CEA, CA 15-3, AFP, CA 19-9, CA 72-4, CA 125	19-91%
	<b>ЭПР</b>	<b>48-90%</b>
Рак кишечника	CEA, AFP, CA 19-9	24-78%
	<b>ЭПР</b>	<b>88%</b>
Рак легких	NSE, SCC, CYFRA 21-1, CEA, AFP	24-66%
	<b>ЭПР</b>	<b>99%</b>
Рак шейки матки	SCC, CEA	24-69%
	<b>ЭПР</b>	<b>99%</b>

# Ранняя диагностика. Ретроспективный анализ

- Были исследованы 60 контрольных образцов (от 1 до 23 месяцев при  $< -20$  °C) от 16 доноров крови с документированными случаями развития онкологии после донации.
- Рак: МЖ, простаты, почек, желудка, толстой кишки, прямой кишки, мочевого пузыря, легких, кожи, яичек, гипофиза, лимфома.
- С помощью ЭПР у всех 16 доноров рак выявлялся в каждом образце, начиная с 21 месяца до клинической симптоматики (16/16) - другими маркерами только 7/16 (РЭА, АФП, СА 19-9, СА 125, СА 15-3, СА 72-4, NSE, ПСА, ХГЧ, S100, CYFRA 21-1, ТТГ, ЛДГ, АКТГ).
- Ранее не определяемый злокачественный рост (активный или не активный) может быть обнаружен в контрольных образцах более чем за два года до постановки клинического диагноза.

# Ранняя диагностика. Ретроспективный анализ



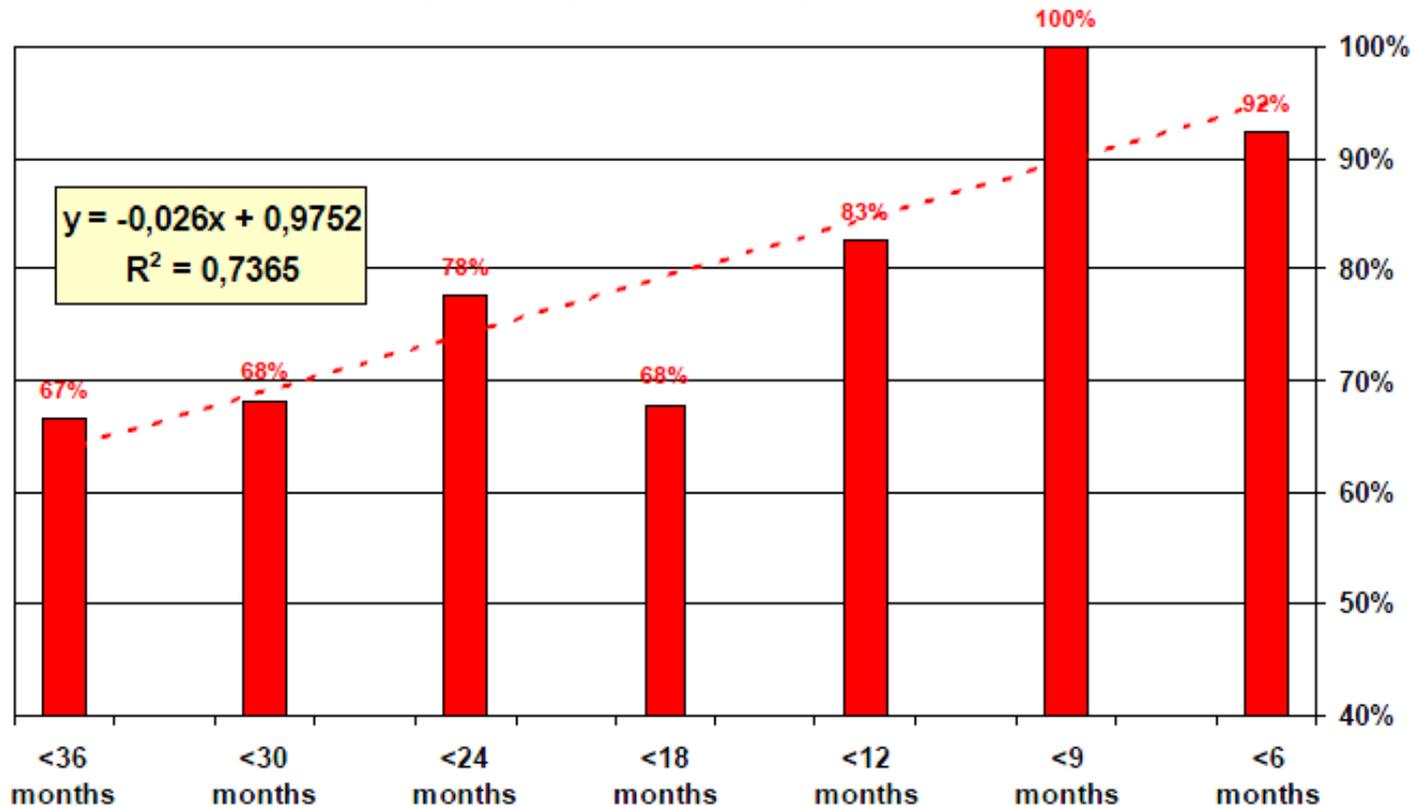
Ретроспективный анализ донора (женщина, 52 года) позже обнаружен рак МЖ:

- Значение  $D_R$  ЭПР-теста было ниже нормы с 15 по 1 месяц до диагноза «рак»
- Другие онкомаркеры CA-19, CA-125, CA15-3, CA 72-4, CYF-RA 21-1 в том же периоде давали негативный результат

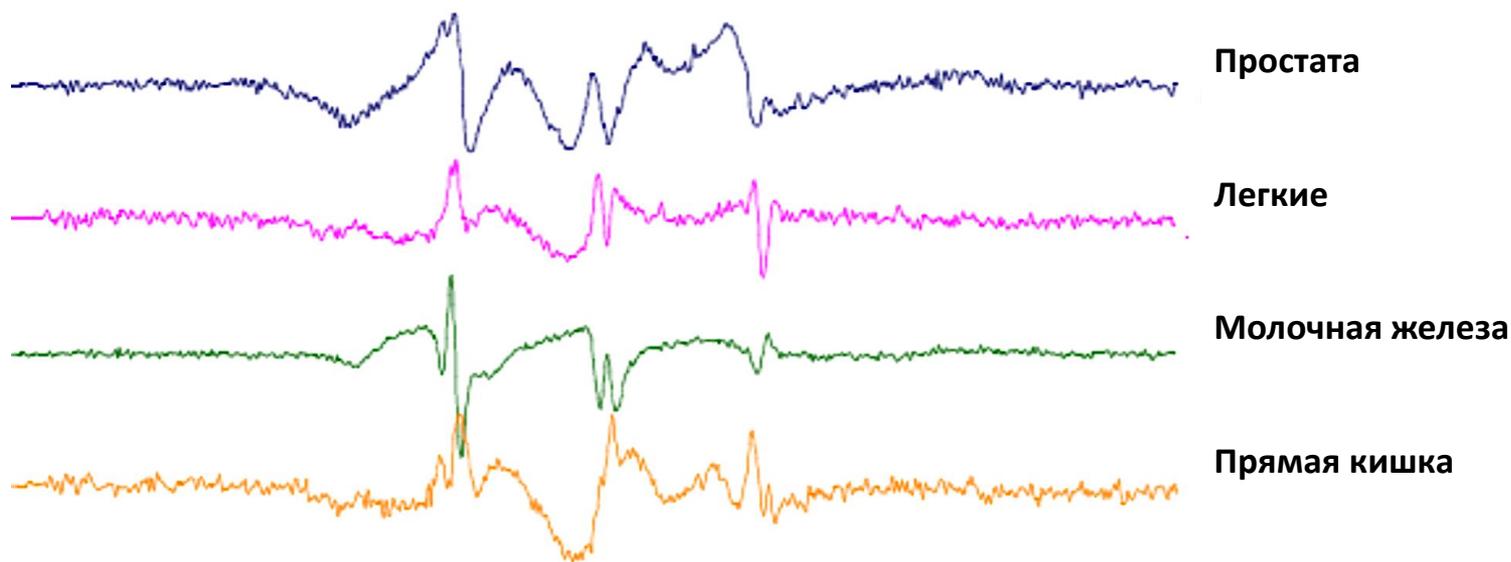
# Ранняя диагностика активного злокачественного роста

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

57 доноров, у которых затем был диагностирован рак



# Вид ЭПР-спектра и локализация опухоли



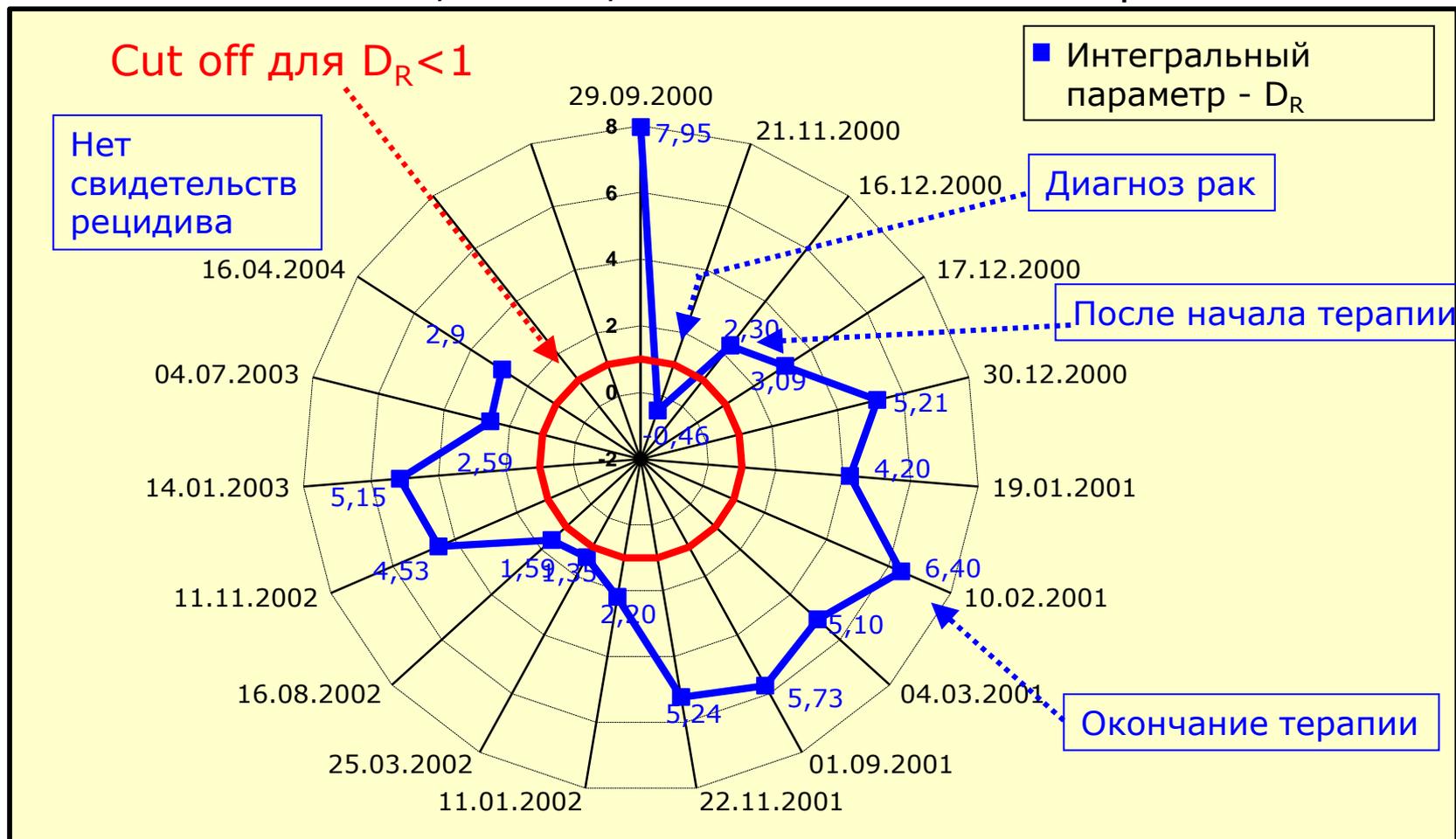
- ✓ Большинство онкомаркеров малоинформативны при постановке диагноза, особенно в случае неизвестной локализации.
- ✓ Спектры (каждый спектр имеет 4096 точек интерполяции) сгруппированы в библиотеки данных.
- ✓ Вновь получаемые спектры сравниваются с библиотеками данных
- ✓ Библиотека содержит около 2400 ЭПР-спектров

# Мониторинг терапии и контроль рецидивов

- После выявления рака/злокачественного процесса и его локализации :
  - Мониторинг терапевтического эффекта (до / после резекции опухоли; до / во время / после химиотерапии)
  - Индивидуализация терапии (эффективность лечения, резистентность, биодоступность лекарств, снижение токсичности лекарств).
- В течение периода ремиссии:
  - Наблюдение за пациентами с известным типом рака
  - Предсказание эффективности терапии
  - Раннее выявление рецидива
  - Долгосрочное наблюдение

# Мониторинг терапии – Клинический случай 1

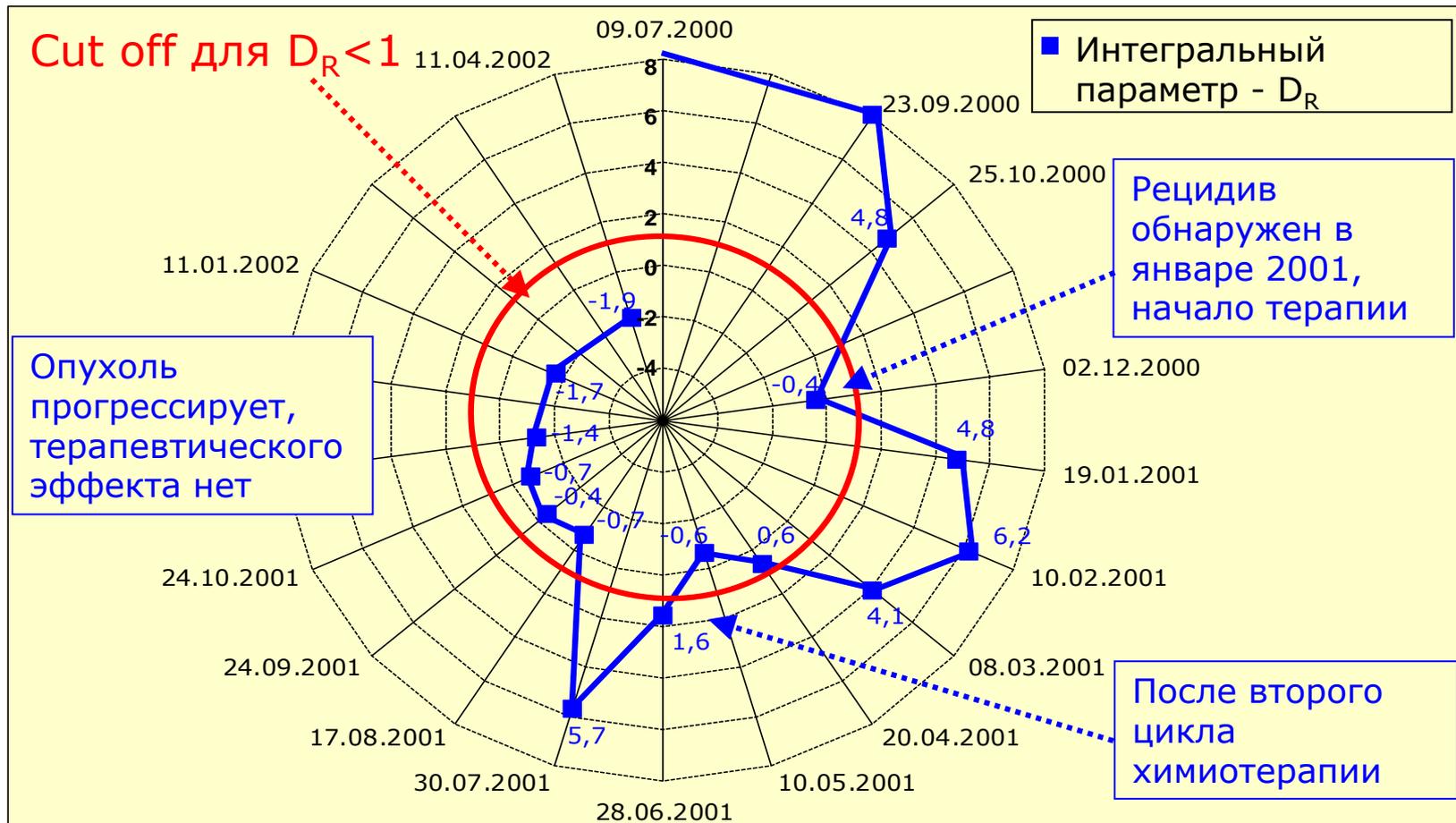
Пациент: женщина, 35 лет, злокачественная лимфома



Пример мониторинга терапии: ЭПР-тестом была обнаружена лимфома, позже подтверждена другими методами. Успешная химиотерапия,  $D_R > 1$ , есть подтверждение клиническими данными.

# Рецидив – Клинический случай 2

Пациент: женщина, 52 года, рецидив рака груди, терапия



Пример мониторинга терапии: Рецидив спустя 10 лет после первичного обнаружения рака был зафиксирован методом ЭПР и подтвержден другими методами. Первый цикл химиотерапии дал положительный результат, но  $D_R$  вернулось к  $< 1$ . Второй цикл имел более короткий эффект, ситуация ухудшалась,  $D_R < -1$ , пациентка умерла спустя два месяца.

# Применение в России

- Методика и оборудование зарегистрированы и разрешены к применению на территории Российской Федерации в надлежащем порядке
- Тест включен в обновленный приказ МЗ РФ №804н от 13.10.2017 о номенклатуре медицинских услуг

A12.05.116.001	Исследование транспортных свойств альбумина методом электронного парамагнитного резонанса
----------------	---

- Клинические рекомендации («Лабораторная служба», №3-2015)
- Методика применяется в клиниках Москвы, Казани, Нижнего Новгорода, Оренбурга

# Применение в России

- Выявляемость среди групп риска – 7-22%!!!
- Подтверждение 94% случаев в течение 6 месяцев
- Исследование применения метода у детей (РИ, диагностика, мониторинг) – 2018 г.

# Применение в России

- Выявляемость среди групп риска – 7-22%!!!
- Подтверждение 94% случаев в течение 6 месяцев
- Исследование применения метода у детей (РИ, диагностика, мониторинг) – 2018 г.
- Низкая осведомленность
- Отсутствие в стандартах



**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**