



Association of laboratory
specialists and organizations
«Federation of Laboratory Medicine»

Ассоциация специалистов
и организаций лабораторной службы
«Федерация лабораторной медицины»

КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Лабораторная диагностика активной злокачественной пролиферации методом ЭПР-спектроскопического определения изменений транспортных свойств альбумина в сыворотке крови

Тип клинических рекомендаций:
Правила проведения и интерпретации клинических лабораторных исследований

Москва, 2015

Разработчики

Лянг О.В. – доцент кафедры госпитальной терапии с курсом клинической лабораторной диагностики Российского университета дружбы народов, кандидат биологических наук

Керстин Шнурр – научный сотрудник MedInnovation GmbH (Германия), PhD

Катя Ватерштадт – научный сотрудник MedInnovation GmbH (Германия), PhD

Эксперты (рецензенты от Ассоциации ФЛМ)

Цвиренко С.В. – заведующий кафедрой клинической лабораторной и микробиологической диагностики Уральского Государственного Медицинского Университета, доктор медицинских наук, профессор.

Кочетов А.Г. – профессор кафедры госпитальной терапии с курсом клинической лабораторной диагностики Российского университета дружбы народов, доктор медицинских наук.

Ключевые слова: альбумин, электронный парамагнитный резонанс, активная злокачественная пролиферация

Настоящие клинические рекомендации представляют собой изложение алгоритмов исследования и интерпретации определения транспортных свойств альбумина в сыворотке крови методом электронного парамагнитного резонанса, который может применяться с целью диагностики и мониторинга нарушений транспортной системы крови при первичной диагностике и мониторинге активности злокачественных образований и интоксикации.

Оглавление

Список сокращений	4
Методология.....	4
ВВЕДЕНИЕ	6
Патофизиологический принцип метода	6
Аналитический принцип метода	7
Исследования по применению метода.....	8
ОПИСАНИЕ МЕТОДА	11
Материально-техническое обеспечение	11
Анализируемые образцы	12
Подготовка реагентов	12
Проведение исследования	12
Расчет результатов	15
ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА.....	15
ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА	17
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	18
Ранняя диагностика активной злокачественной пролиферации	18
Контроль противоопухолевой терапии, ранняя диагностика рецидивов.....	19
Заболевания печени и сепсис.....	19
Критерии для интерпретации результатов	20

Список сокращений

ДС – диагностическая специфичность

ДЧ – диагностическая чувствительность

РКИ – рандомизированные контролируемые испытания

ТСА – транспортные свойства альбумина

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ВЕ - связывающая эффективность альбумина

СЕА – раковый эмбриональный антиген

DR - показатель нативности конформации альбумина

DTE - детоксикационная эффективность альбумина

RTQ - транспортная эффективность альбумина

Методология

Методы, использованные для сбора/селекции доказательств

Доказательной базой для составления рекомендаций явился поиск в электронных базах данных PubMed и Medline. Данные клинические рекомендации подготовлены на основании международных и российских обзорных статей, рандомизированных исследований и опубликованных справочников.

Методы, использованные для оценки качества и силы доказательств

- Консенсус экспертов
- Оценка значимости в соответствии с рейтинговой системой – таблицы 1 и 2.

Таблица 1. Рейтинговая схема для оценки достоверности данных

Степень рекомендации	Описание уровней достоверности
А Высокая достоверность	Основана на заключениях систематических обзоров рандомизированных контролируемых испытаний. Систематический обзор получают путём системного поиска данных из всех опубликованных клинических испытаний, критической оценки их качества и обобщения результатов методом мета-анализа.
В Умеренная достоверность	Основана на результатах, по меньшей мере, одного независимого рандомизированного контролируемого клинического испытания
С Ограниченная достоверность	Основана на результатах, по меньшей мере, одного клинического испытания, не удовлетворяющего критериям качества, например, без рандомизации.

Степень рекомендации	Описание уровней достоверности
D Неопределённая достоверность	Утверждение основано на мнении экспертов; клинические исследования отсутствуют.

Таблица 2. Рейтинговая схема для оценки силы доказательств

Уровни доказательств	Описание
1++	Мета-анализы высокого качества, систематические обзоры рандомизированных контролируемых исследований (РКИ), или РКИ с очень низким риском систематических ошибок
1+	Качественно проведенные мета-анализы, систематические, или РКИ с низким риском систематических ошибок
1–	Мета-анализы, систематические или РКИ с высоким риском систематических ошибок
2++	Высококачественные систематические обзоры исследований случай-контроль или когортных исследований. Высококачественные обзоры исследований случай-контроль или когортных исследований с очень низким риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи
2+	Хорошо проведенные исследования случай-контроль или когортные исследования со средним риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи
2–	Исследования случай-контроль или когортные исследования с высоким риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи
3	Не аналитические исследования (например: описания случаев, серий случаев)
4	Мнение экспертов

Клиническая информативность лабораторных исследований

Клиническая информативность лабораторных исследований определяется путем расчета операционных характеристик теста (диагностической чувствительности и специфичности – ДЧ и ДС, предсказательной ценности положительных и отрицательных результатов, отношения правдоподобия положительных и отрицательных результатов -

ОППР и ОПОР) и с помощью ROC-анализа. Наиболее полезными являются лабораторные тесты с ОППР >5 и ОПОР $<0,2$; полезными – с ОППР >2 и ≤ 5 , ОПОР $>0,2$ и $\leq 0,5$; не имеющими пользы - с ОППР ≤ 2 и ОПОР $>0,5$.

Индикаторы доброкачественной практики (GoodPracticePoints – GPPs)

Рекомендуемая доброкачественная практика базируется на клиническом опыте членов рабочей группы по разработке рекомендаций.

Экономический анализ

Экономический анализ не проводился и публикации по фармакоэкономике не анализировались.

Метод валидации рекомендаций:

- Внешняя экспертная оценка
- Внутренняя экспертная оценка

ВВЕДЕНИЕ

Настоящие клинические рекомендации представляют собой изложение алгоритмов исследования и интерпретации определения транспортных свойств альбумина в сыворотке крови методом электронного парамагнитного резонанса (далее ЭПР-ТСА).

Метод ЭПР-ТСА позволяет *in vitro* проводить диагностику и мониторинг активности злокачественной пролиферации. Также, метод ЭПР-ТСА может применяться в специализированных лечебных заведениях с целью неспецифического контроля физиологических и патологических изменений гомеостаза в процессе лечения онкологического заболевания для последующей корректировки применяемого лечения, и с целью своевременной идентификации нарушений транспортной системы крови при интоксикации в отделениях интенсивной терапии.

Патофизиологический принцип метода

Альбумин – важный компонент транспортной системы крови, белок, который обеспечивает транспорт жирных кислот, триптофана, билирубина, кальция, стероидных гормонов и других функционально важных активных веществ к клеткам-мишеням, и участвует в связывании и выведении множества эндотоксинов [1].

Молекулы альбумина связывают и переносят метаболиты и эндотоксины, состав и концентрация которых зависит от состояния гомеостаза и изменяются в ходе развития патологических процессов. Накапливая таким образом специфичные молекулярные соединения, альбумин претерпевает структурные и аллостерические изменения, влияющие на его способность выполнять транспортные функции [2,3,4,5].

Вместе с тем, в процессе осуществления транспортной функции молекулы альбумина нековалентным образом реагируют с переносимыми жирными кислотами, обеспечивая сначала их эффективную сорбцию и связывание при загрузке, а затем – эффективную диссоциацию при передаче клеткам-мишеням. Изменчивость связывающих свойств альбумина в процессе транспорта метаболитов обеспечивается за счет конформационной подвижности этого белка и взаимодействий между его различными центрами связывания [6,7]. Вследствие структурных и функциональных изменений, вызванных в альбумине накоплением и переносом специфичных злокачественному процессу молекулярных соединений, при онкологических заболеваниях альбумин претерпевает изменения в отношении связывания и переноса жирных кислот [8].

Аналитический принцип метода

Определение транспортных свойств альбумина проводится посредством индуцирования целенаправленных конформационных изменений молекул альбумина исследуемого образца сыворотки путем добавления трех различных концентраций спин-меченой жирной кислоты (16-доксил-стеариновая кислота), связывающейся с альбумином, в трех различных концентрациях полярного растворителя – этанола. Таким образом, в методе ЭПР-ТСА исследуются три конформационные модификации сывороточного альбумина, целенаправленно вызванных различными концентрациями полярного реагента в присутствии трех различных концентраций спин-меченой жирной кислоты, используемой в качестве спинового зонда для ЭПР [9]. Комбинация концентраций обеспечивает регистрацию транспортных свойств исследуемого альбумина в различных симитированных состояниях, а именно: в физиологическом состоянии при связывании гидрофобных субстратов, как например, жирные кислоты; в физиологическом состоянии во время транспорта гидрофобных субстратов по кровеносной системе; в физиологическом состоянии при отдаче гидрофобных субстратов клеткам-мишеням [1].

Каждый зарегистрированный спектр ЭПР представляет собой суперпозицию специфичных спектров молекул спинового зонда, иммобилизованных различными центрами связывания альбумина. Зарегистрированные ЭПР-спектры трех конформационных состояний исследуемого альбумина аппроксимируются посредством физико-математической модели связывания альбумином жирной спин-меченой кислоты [1]. Как результат расчета при моделировании каждого ЭПР-спектра получают набор необходимых для дальнейшей оценки биофизических параметров, в том числе подвижность и концентрацию спин-меченой жирной кислоты для трех основных типов центров связывания альбумином гидрофобных субстратов. Данный набор параметров отражает конформационное и аллостерическое состояние исследуемого альбумина.

На основании полученных физических параметров связывания альбумином спин-меченой жирной кислоты производится автоматический расчет показателей функциональности альбумина в отношении жирных кислот: связывающая эффективность (BE), транспортная эффективность (RTQ), детоксикационная эффективность (DTE), а также показатель нативности конформации альбумина (DR) [10]. Величины показателей функциональности альбумина выражаются в процентах, показатель нативности конформации выражается в условных единицах.

Исследования по применению метода

В целях установления и уточнения диапазона нормальных значений функциональных характеристик сывороточного альбумина для популяции здоровых людей были проведены исследования:

- MedInnovation GmbH, Berlin; 2000-2004 гг.; обследовалась группа здоровых доноров-добровольцев (321 человека), включающая 146 женщин и 162 мужчины в возрасте от 9-и до 78-и лет;
- MedInnovation GmbH, Berlin; 2005-2007 гг.; обследовалась группа здоровых доноров-добровольцев (83 человека), включающая 41 женщину и 39 мужчин в возрасте от 17-и до 78-и лет.

С целью оценки эффективности метода ЭПР-ТСА в целях ранней диагностики активности злокачественных образований различных локализаций было проведено клиническое испытание:

- Институт переливания крови, Sachsen, Институт переливания крови, Baden Württemberg, Институт трансфузионной медицины, Leipzig совместно с MedInnovation GmbH, Berlin; 2003-2006 гг.; обследовалась группа из 188-и пациентов, в том числе 79-и доноров (45 мужчин и 34 женщины в возрасте от 29-и до 70-и лет), у которых онкологическое заболевание было обнаружено позже сдачи крови (или плазмы) и 99-и доноров (49 мужчин и 50 женщин в возрасте от 50-и до 68-и лет), у которых не было диагностировано онкологическое заболевание в течение сравнимого срока; метод ЭПР-ТСА показал высокую чувствительность метода для раннего обнаружения развития злокачественного образования – 94% в период до трех месяцев до обнаружения заболевания общепринятыми методами и чувствительность 84% для образцов, забранных от 4-х до 6-ти месяцев до постановки диагноза заболевания общепринятыми методами.

С целью оценки эффективности метода ЭПР-ТСА для раннего выявления активных злокачественных образований различных локализаций, а также мониторинга лечения и раннего выявления рецидивов были проведены клинические испытания:

- Клиника Kreiskrankenhaus Beeskow, Beeskow совместно с MedInnovation GmbH, Berlin; 2002-2005 гг.; обследовалась группа из 24-х пациентов (15 мужчин и 9 женщины в возрасте от 54-х до 84-х лет); метод ЭПР-ТСА показал чувствительность метода 95 % для диагностирования активного злокачественного процесса;
- Государственное учреждение «Российский онкологический научный центр» им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва совместно с MedInnovation GmbH, Berlin; 2005 гг.; обследовалась группа из 97-и пациентов и 70-и здоровых людей контрольной группы; общая чувствительность метода (в том числе с учетом данных непервичных онкологических пациентов, находящихся на плановом лечении) составила 71,4%, воспроизводимость измерений составила соответственно 98,3%.
- Федеральное Государственное Учреждение «Федеальный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна», Москва, совместно с MedInnovation GmbH, Berlin; обследовалось более 650 образцов сыворотки (2007-2010 гг.) от онкологических пациентов с различной клинической картиной, а также контрольная группа здоровых людей и пацентов без установленных онкологических заболеваний; полученная оценка чувствительности метода для определения активной злокачественной пролиферации составила 90,4%, оценка специфичности метода составила 100%.
- Общественный Фонд «Вместе против рака», Алматы совместно с Алматинским онкологическим центром и ТОО «Радиан» обследовали 150 образцов сыворотки (2010-2011 гг.) от 75 онкологических пациентов и 75 доноров контрольной группы; полученная оценка чувствительности метода составила 90,6%, оценка специфичности метода составила 85,3%.
- ФГБУ ФНКЦ ФМБА России (Клиническая больница № 83), Москва, совместно с MedInnovation GmbH, Berlin; обследовалось более 27 образцов сыворотки (2011-2012 гг.) от онкологических пациентов с различной клинической картиной, а также контрольной группы здоровых людей и пацентов без установленных онкологических заболеваний (в том числе из психиатрического отделения); полученная оценка чувствительности метода при определении активной злокачественной пролиферации составила 94%, оценка специфичности метода составила 88%.

С целью оценки эффективности и специфичности метода ЭПР-ТСА по сравнению с используемыми в медицинской практике опухолевыми маркерами СЕА и СА 19-9 для выявления активных злокачественных образований отделов толстого кишечника в условиях наличия у контрольной группы пациентов тяжелых хронических заболеваний (аденомы, дивертикулит) было проведено клиническое испытание:

- Клиника Augusta-Krankenanstalten, Bochum совместно с MedInnovation GmbH, Berlin; 2005-2008; обследовалась группа из 45-и пациентов со злокачественными образованиями, группа из 35-и пациентов с аденомами и группа из 28-и пациентов с хроническим дивертикулитом; метод ЭПР-ТСА показал чувствительность метода 91,1% и специфичность метода 88,9% для диагностирования активного злокачественного процесса, что значительно превзошло эффективность специфичных опухолевых маркеров СЕА и СА 19-9 (табл. 3).

Таблица 3. Сравнение эффективности использования метода ЭПР-ТСА по сравнению со специфичными опухолевыми маркерами СЕА и СА19-9 при диагностике активных злокачественных образований отделов толстого кишечника при использовании в качестве контрольной группы больных с аденомами и хроническим дивертикулитом.

Способ диагностики	ДЧ	ДС
метод ЭПР-ТСА	91,1 %	88,9 %
СЕА	45,5 %	86,1 %
СА 19-9	27,9 %	91,1 %

С целью оценки эффективности метода ЭПР-ТСА для выявления опухолей области лица, рта и челюсти было проведено клиническое испытание:

- Клиника Clinic for Mouth, Jaw and Facial surgery, Johannes-Gutenberg-University, Mainz; 2003 г.; обследовалась группа из 9-и пациентов со следующими локализациями опухолей: эпителиальный рак языка, мукоэпидермоидный рак языка, ороговевший эпителиальный рак щеки, эпителиальный рак дна полости рта, эпителиальный рак нижней челюсти, базально-клеточный рак, базалоидный эпителиальный рак, и группа из 10-и пациентов с незлокачественными заболеваниями области лица, рта и челюсти, и одного пациента с лейкоплакией; метод ЭПР-ТСА показал чувствительность метода 100 % для диагностирования опухолей области лица, рта и челюсти.

С целью оценки эффективности метода ЭПР-ТСА для мониторинга лечения и раннего выявления рецидивов у пациентов с хронической лимфатической лейкемией (BCLL) было проведено клиническое испытание:

- Клиника HUMAINE Klinikum, Bad Saarow совместно с MedInnovation GmbH, Berlin; 2002-2003 гг.; обследовалась группа из 12-и пациентов (5 мужчин и 8 женщины в возрасте от 34-х до 66-и лет) и группа из 4-х здоровых людей (5 мужчин и 8 женщин в возрасте от 37-х до 69-и лет); метод ЭПР-ТСА показал чувствительность метода 100% для диагностирования активного злокачественного процесса.

С целью оценки перспективности применения метода ЭПР-ТСА в качестве лабораторного теста для диагностики и мониторинга развития гнойно-септических осложнений в раннем послеоперационном периоде у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии было проведено клиническое испытание:

- Государственное учреждение «Российский онкологический научный центр» им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва совместно с MedInnovation GmbH, Berlin; 2006 гг.; обследовалась группа из 22-и пациентов, в том числе 8 пациентов с септическими осложнениями, из которых 5 погибли, 3 были излечены; 7 пациентов, у которых были диагностированы перитонит, эмпиема и т.п., все выжили; 2 пациента с пневмонией, все выжили; 5 пациентов с неосложненным течением, составившие контрольную группу; в заключительном отчете указано, что метод ЭПР-ТСА достоверно выявляет нарушения функции сывороточного альбумина при гнойно-септических осложнениях и может использоваться при их диагностике и мониторинге.

ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Материально-техническое обеспечение

Для осуществления метода ЭПР-ТСА используется следующее оборудование:

- анализатор электронного парамагнитного резонанса;
- набор реагентов и расходных материалов для *in vitro* функциональности альбумина в сыворотке крови методом спинового зонда;
- пипетка, позволяющая отбирать объем жидкости 40 мкл для наполнения капилляров, с наконечником;
- центрифуга лабораторная с центробежным ускорением 1000-1500 g;
- планшетный шейкер с термостабилизацией (37 °C);
- пробирки для сыворотки (емкостью 2-5 мл);

- микропипетки, позволяющие дозировать объемы жидкости 10, 12, 14 и 50 мкл, со сменными наконечниками;
- планшет для капилляров.

Анализируемые образцы

Биоматериалом для исследования являются нативные или размороженные после замораживания образцы сыворотки. Объем, достаточный для проведения исследования – 0,2 мл (200 мкл).

Взятие проб цельной крови следует производить путем обычной венопункции в объеме не менее 3 мл. Цельную кровь набирают в соответствующие пробирки для получения сыворотки крови, после свёртывания крови в пробирке её центрифугируют в течение 10 минут при центробежном ускорении 1000-1500g. Затем надсадочный вторичный биоматериал (сыворотку крови) отбирают в пробирки, обращая внимание на его гомогенность. При негомогенности центрифугирование следует повторить.

По возможности, не рекомендуется использовать вакуумные системы забора крови. Сыворотку до момента проведения исследования можно хранить максимально в течение 5 дней при 4 °С, либо максимально в течение 6 месяцев при температуре не выше минус 20 °С. Использование антикоагулянтов не допускается.

Размораживать пробирки с замороженной сывороткой необходимо быстро, в воде при температуре 37 °С, после размораживания исследование должно быть проведено не позднее чем в течение 2 часов. Повторное замораживание-размораживание образцов сыворотки не допускается. До анализа не допускаются хилёзные и гемолизные пробы сыворотки.

Подготовка реагентов

Перед вскрытием реагентов, их необходимо выдержать при комнатной температуре (18-25 °С) не менее 60 минут. В случае длительного хранения набора реагентов до использования (более 3 месяцев), необходимо выполнить на анализаторе, предназначенном для выполнения метода, проверку концентрации спинового зонда в пробирках в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

Проведение исследования

Исследование ЭПР-ТСА должно проводиться в лабораторных условиях, при температуре в помещении не выше 25 °С. Схема проведения исследования представлена на рисунке 1.

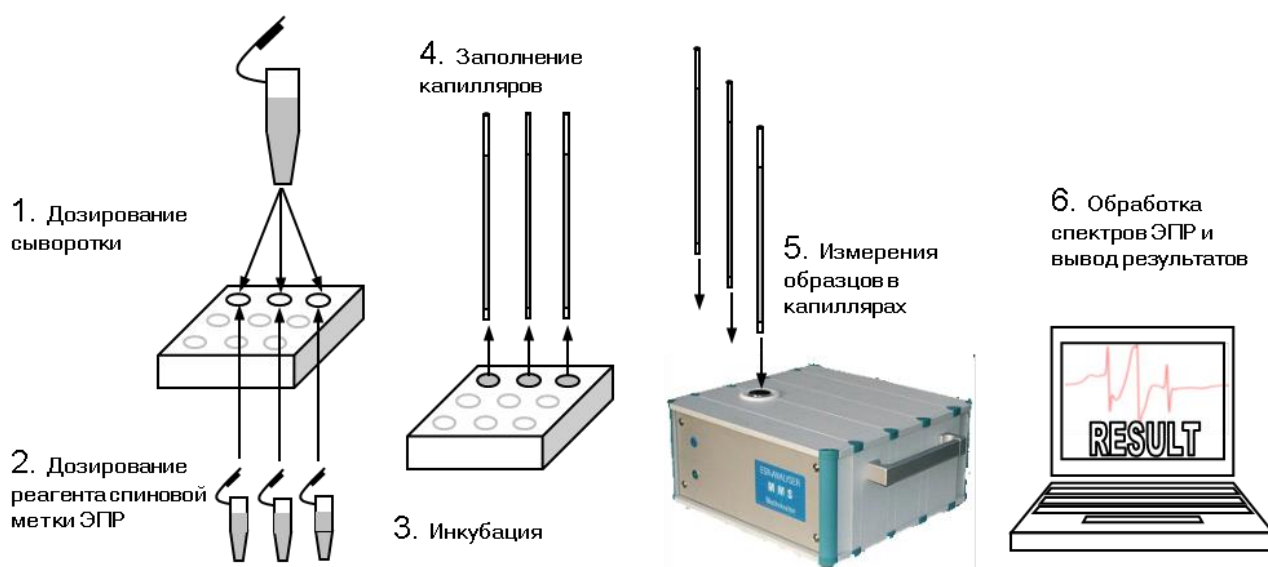


Рисунок 1. Схема проведения исследования методом ЭПР-спектроскопического определения изменений транспортных свойств альбумина в сыворотке крови.

При проведении исследования необходимо следующее.

Составить протокол маркировки лунок планшета и ячеек подставки для капилляров в соответствии с кодами образцов и аликвот (по три аликвоты: А, В, С для каждого образца).

Раскапать образцы сыворотки и реактивы в лунки планшета согласно схеме, приведенной в таблице 4. Допускается пипетирование и инкубирование аликвот одновременно нескольких образцов. Во избежание чрезмерного испарения этанола из лунок планшета, рекомендуется следующее:

- начинать пипетирование раствора спинного зонда только после того, как все запланированные к измерению образцы сыворотки раскапаны в лунки;
- пипетировать раствор спинного зонда сначала во все лунки, содержащие аликвоты “А”, затем аликвоты “В”, затем аликвоты “С”;
- раскапывать одновременно не более 8 образцов, чтобы затем раскапать растворы спинного зонда во все аликвоты не более чем за 3 минуты;
- не пипетировать более 8 образцов (24 лунки) одновременно;
- перед шейкерованием сначала плотно закрыть заполненные лунки планшета парафилмом (из набора «MMS-kit-SA01»), а затем накрыть планшет крышкой.

Таблица 4. Схема раскапывания образца сыворотки и реактивов в лунки планшета

Код аликвоты (не путать с кодом лунки нанесенным на планшет)	Объем сыворотки (мкл)	Раствор спинного зонда	Объем спинного зонда (мкл)
A	50	S1	10
B	50	S2	12
C	50	S3	14

Поместить планшет в шейкер и инкубировать образцы при температуре 37 °С при частоте встряхивания 5-8 Гц в течение 10 минут.

Из каждой лунки планшета набрать в отдельный стеклянный капилляр 40 мкл содержимого, используя пипетку с наконечником с резиновой трубкой. Для этого соединить верхнюю часть капилляра с наконечником, вставить нижнюю часть капилляра в лунку планшета и произвести забор содержимого лунки. Держа капилляр горизонтально, отсоединить наконечник, затем, изменяя угол наклона капилляра, расположить жидкость в капилляре согласно рисунку 2 и запечатать капилляр в его верхней части с помощью замазки.

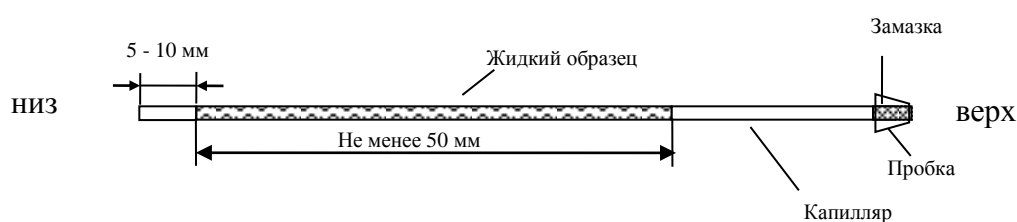


Рисунок 2. Позиция исследуемого жидкого образца в стеклянном капилляре

При наполнении капилляра необходимо удостовериться, что:

- в жидкости отсутствуют пузырьки;
- жидкий образец занимает не менее 50 мм длины капилляра и располагается на расстоянии 5-10 мм от нижнего конца капилляра (рис.2). Последнее обеспечивает необходимый резерв длины для небольших перемещений жидкости в закупоренном капилляре, что важно для предотвращения вытекания содержимого при последующих действиях;
- замазка надежно закупоривает капилляр, что предотвращает вытекание содержимого капилляра.

Поместить капилляр вертикально, запечатанным замазкой концом вверх, в ячейку планшета для капилляров, в соответствии с кодом образца и кодом аликвоты.

Содержимое всех лунок должно быть забрано в капилляры до начала измерений. Для предотвращения ошибок необходимо помещать капилляры в ячейки планшета строго в соответствии с маркировкой.

Зафиксировать капилляр в резиновой пробке, как показано на рисунке 2.

Провести измерения подготовленных капилляров на анализаторе в соответствии с Инструкцией по эксплуатации анализатора.

Расчет результатов

Расчет результата исследования должен выполняться программой, управляющей работой применяемого анализатора, автоматически, по завершению измерения трех капилляров. Результаты анализа должны автоматически выводиться на экран монитора персонального компьютера, записываться на его жесткий диск, и иметь возможность быть распечатанными на принтер при выборе оператором соответствующей опции в окне вывода результатов в соответствии с Инструкцией по эксплуатации анализатора. Рекомендуемые референтные значения показателей функциональности альбумина представлены в таблице 5.

Таблица 5. Референтные значения ЭПР-показателей функциональности альбумина

Показатель	норма	граничный	патологический
DR	1,2 – 5	1,2 – 0,8	< 0,8
BE	65 – 135 %	60 – 65 %	< 60 %
RTQ	60 – 100 %	55 – 60 %	< 55 %
DTE	50 – 175 %	40 – 50 %	< 40 %

ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА

Метод ЭПР-ТСА рекомендуется к применению:

1. С целью выявления и мониторинга активного онкологического процесса для корректировки проводимой терапии онкологического заболевания, а также предотвращения рецидивов.

В случаях использования метода в качестве индикатора при контроле рецидивов и мониторинге проводимой противоопухолевой терапии необходимо проводить предварительный сбор анамнеза:

- история болезни и лечения пациента;
- наличие симптомов и жалоб;
- сбор данных по приему препаратов.

Важными особенностями применения метода в мониторинге течения заболевания является необходимость исключения влияния медикаментов (после медикаментозного лечения необходимо выдержать индивидуальную паузу до измерения в течение 4-6 недель

для того, чтобы сывороточный альбумин пришел в равновесное аллостерическое состояние без влияния препаратов).

В целях контроля над рецидивами рекомендуется применять метод каждые 3-4 месяца в первый год после лечения, каждые 6 месяцев – во второй год после лечения и ежегодно в последующие периоды.

2. С целью профилактического обследования широкого круга лиц, относящихся к группе с повышенным риском возникновения онкологического заболевания, в том числе при диспансерном осмотре лиц, профессиональная деятельность которых связана с повышенным риском возникновения онкологических заболеваний, в целях ранней диагностики активных злокачественных образований всевозможных видов и локализаций.

Базовая схема диагностики при диспансерном наблюдении и профилактическом осмотре методом ЭПР-ТСА отображена на **рисунке 3**.

В случаях профилактического обследования круга лиц из групп риска, относящихся к онкологическим заболеваниям, необходимо проводить предварительный сбор анамнеза:

- история болезни пациента;
 - наличие симптомов и жалоб;
 - сбор семейного анамнеза с целью выявления родственников, страдающих наследственными онкологическими заболеваниями;
 - опрос на предмет контакта с условиями окружающей среды, которые могут иметь повышенную канцерогенность.
- Пациентам, относящимся к группам риска развития злокачественных заболеваний, при их согласии и в условиях информирования о предмете исследования и об ограничениях обследования методом ЭПР-ТСА рекомендуется проведение контрольных измерений методом ЭПР-ТСА с интенсивностью один раз в год.
 - В случае получения положительного результата ($DR < 1,0$) пациенту производится разъяснение результатов обследования и назначается повторное обследование в течение месяца. После получения второго измерения, подтверждающего понижение показателя DR, назначается дальнейшее обследование и проведение уточняющей диагностики конкретной нозологической формы.

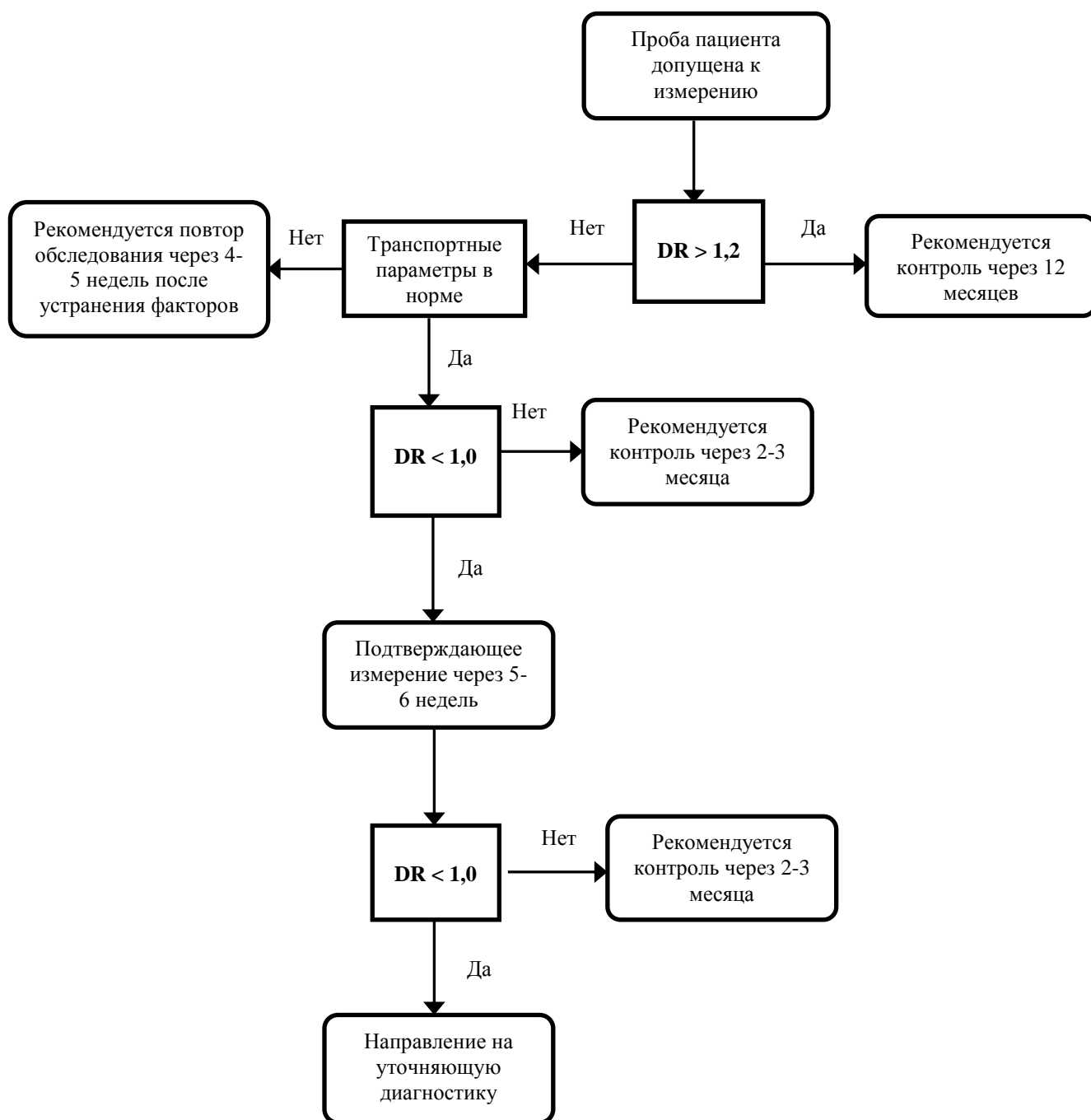


Рисунок 3. Схема проведения диагностики методом ЭПР-ТСА

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА

Заболеваниями, симптомами, состояниями, клиническими ситуациями, снижающими точность и чувствительность метода ЭПР-ТСА, и повышающие вероятность получения **ложноположительных** результатов при диагностике активности онкологического процесса являются:

- сепсис – SIRS, септический шок (при диагностике и мониторинге онкологических заболеваний);

- множественный отказ внутренних органов;
- 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.

Заболеваниями, симптомами, состояниями, клиническими ситуациями, снижающими точность и чувствительность метода ЭПР-ТСА, и повышающие вероятность получения **ложноотрицательных** результатов являются:

- 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

Ранняя диагностика активной злокачественной пролиферации

Исследование сывороточного альбумина методом электронного парамагнитного резонанса путем определения изменений конформационного состояния молекулы сывороточного альбумина предоставляет возможность получать информацию о наличии активной злокачественной пролиферации. Исследование может применяться для обследования групп риска. К группам риска, например, относятся пациенты, у которых имеется более частый контакт с канцерогенными веществами, либо пациенты с наследственной предрасположенностью. Исследование сывороточного альбумина методом электронного парамагнитного резонанса на настоящий момент ещё не стратифицировано по локализации злокачественного процесса. У симптоматических пациентов метод может применяться для подтверждения заболевания [6,13,14].

На данный момент сила рекомендаций для использования метода в целях ранней диагностики групп риска при пороговом значении показателя нативности конформации альбумина (DR) равном «1.0» соответствует силе рекомендаций «С» (наличие

нерандомизированных клинических исследований). Уровень доказательности и данные клинических испытаний с оценкой рейтинга исследований приведены в таблице 6.

Контроль противоопухолевой терапии, ранняя диагностика рецидивов

Исследование сывороточного альбумина методом электронного парамагнитного резонанса может применяться с целью контроля терапевтического эффекта при проведении противоопухолевого лечения и с целью ранней диагностики рецидивов.

На данный момент сила рекомендаций для использования метода контроля терапевтического эффекта при проведении противоопухолевого лечения и с целью ранней диагностики рецидивов, а также в целях ранней диагностики групп риска при пороговом значении показателя нативности конформации альбумина (DR) равном «1.0» соответствует силе рекомендаций «В» (наличие одного рандомизированного клинического исследования). Уровень доказательности и данные клинических испытаний с оценкой рейтинга исследований приведены в таблице 6.

Заболевания печени и сепсис

В исследованиях сывороточного альбумина методом электронного парамагнитного резонанса при заболеваниях печени и сепсисе было показано, что детоксикационная эффективность альбумина снижается [4,10,12].

На данный момент сила рекомендаций для использования метода в целях ранней диагностики нарушений транспортной системы крови при интоксикации при пороговом значении показателя детоксикационной эффективности (DTE) равном «45%», соответствует силе рекомендаций «С» (наличие нерандомизированных клинических исследований).

Таблица 6. Перечень исследований по клинической интерпретации метода ЭПР-ТСА

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.	
2003	Dr. Schulz / Клиника Бад-Сааров	11		Мониторинг терапии	Результаты совпадают с иммунологическими тестами и клиническим статусом		Хроническая лимфоцитарная лейкемия В клеток В-CLL	2-
2003	Prof. Koch / Окружная клиника Беесков	24		Мониторинг терапии	Корреляция с результатом терапии		Желудочно-кишечный рак	2+
2004	Dr. Reszka / Max-Delbrück-Center, Берлин	24	10	здоровые	100	100	Опухоли головного мозга	2-
			14	онкологические				
2005	Prof. Hofmeister, Dr.Kramer / Charité, Берлин	27	14	здоровые	75	93	Опухоли челюсти, лица	2-
			13	онкологические				

Год	Автор и место проведения	N	n	Группы	ДЧ, %	ДС, %	Комментарий	Рейтинг
2005	Prof. Wagner, Dr. Moergel / Университет Майнца	20	10	здоровые	87	83	Опухоли челюсти, лица	2+
			10	онкологические				
2005	Проф. Давыдов, проф. Зубрихина / РОНЦ, Москва	167	70	здоровые	78	86	желудок, подж. железа, почки, пищевод, прямая кишка и другие	2+
			97	онкологические				
2005-2006	Dr. Mann, Dr. Gelos / Augusta Krankenanstalten, Бохум	108	35	дивертикулит	Корректно идентифицированный дивертикулит: ЭПР тест = 91% / СЕА = 92% / СА19-9 = 100%			2++
			28	аденома	Корректно идентифицированная аденома ЭПР тест = 86% / СЕА = 83% / СА19-9 = 96%			
			45	рак прямой кишки	Корректно идентифицированный рак прямой кишки: ЭПР тест = 91% / СЕА = 46% / СА19-9 = 28%			
2006-2008	Dr. Pilarsky, Dr. Grützmann / Дрезден	134	63	поджелудочная железа	Корректно идентифицированный рак поджелудочной железы: 94%			2-
			20	Прочие локализации				
			51	доброкачественные / воспалительные заболевания				
2008-2010	Д-р Трофименко, д-р Маландин / ФМБЦ, Москва	222	115	Онкология	90	100	Мол. железа, простата, почки, мочевой пузырь, 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		95	Раковые - здоровые	2+
			200	рак кишечника	90		Раковые – здоровые и доброкачественные опухоли	
			100	доброкачественные заболевания		80	Раковые – доброкачественные опухоли	
			100	иные локализации		90	Раковые – здоровые и доброкачественные опухоли, а также злокачественные опухоли иной 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		Мониторинг терапии	Сравнение теста со стандартными методами при наличии опухоли, в процессе лечения и после лечения			2++

Критерии для интерпретации результатов

Значения рассчитанных в результате анализа показателей функциональности альбумина: связывающая эффективность (BE), транспортная эффективность (RTQ), детоксикационная эффективность (DTE), а также показатель нативности конформации альбумина (DR), позволяют сделать заключение о транспортных свойствах исследованного альбумина.

Основным показателем при диагностике активных злокачественных образований, прошедшим клинические испытания на проверку диагностической эффективности является показатель нативности конформации альбумина (DR). Иные приводимые показатели функциональности альбумина в процедуре диагностики онкологических заболеваний являются вспомогательными характеристиками, позволяющими оценить общее состояние альбумина, тем самым повысить надежность получения достоверного результата.

Общий алгоритм интерпретации результатов измерения приведен в таблице 7.

Таблица 7. Алгоритм интерпретации результатов метода ЭПР-ТСА

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)
-	+	-	-	-/-
-	-	+	+	-/-
-	-	+	-	-/-
-	-	-	+	-/-
-	-	-	-	-/-

"+" - значение показателя в референтных пределах

"-" - значение показателя вне референтных пределов

Значение показателя нативности конформации альбумина (DR) в «серой зоне» ($0,8 < DR < 1,2$), одновременно со значениями показателей функциональности альбумина BE, RTQ и DTE в референтных пределах, указывает на повышенный риск возникновения активного злокачественного образования. В таких случаях показано повторное обследование в течение месяца. В то же время, при значении показателя DR в «серой зоне» одновременно с патологическим(и) значением(ями) показателей BE, RTQ и DTE для получения достоверного

результата показано повторное обследование пациента в течение месяца при устранении причин, ведущих к нарушению функциональности альбумина (таблица 8).

Таблица 8. Меры по предотвращению вероятных ложноположительных и/или ложноотрицательных результатов метода ЭПР-ТСА

Мешающий фактор	Устранение
сепсис – SIRS, септический шок (при диагностике и мониторинге онкологических заболеваний)	Отбор крови на анализ после стабилизации состояния пациента и возвращения показателей крови к нормальным значениям
множественный отказ внутренних органов	Отбор крови на анализ после стабилизации состояния пациента и возвращения показателей крови к нормальным значениям
печёночная недостаточность	Отбор крови на анализ после стабилизации состояния пациента и возвращения показателей крови к нормальным значениям
острое вирусное, либо воспалительное заболевание	Отбор крови на анализ после стабилизации состояния пациента и возвращения показателей крови к нормальным значениям
ожоги тела высокой степени	Отбор крови на анализ после стабилизации состояния пациента и возвращения показателей крови к нормальным значениям
тяжелая травма при высокой потере крови	Отбор крови на анализ после стабилизации состояния пациента и возвращения показателей крови к нормальным значениям
тяжелая медикаментозная интоксикация, прием препаратов из списка мешающих при проведении диагностики *	Отбор крови на анализ после стабилизации состояния пациента и возвращения показателей крови к нормальным значениям
послеоперационный (до 14 суток) период	Отбор крови на анализ после стабилизации состояния пациента и возвращения показателей крови к нормальным значениям
нахождение под воздействием алкоголя и наркотических средств	Отбор крови на анализ после стабилизации состояния пациента и возвращения показателей крови к нормальным значениям
период беременности	Отбор крови на анализ после стабилизации состояния пациента и возвращения показателей крови к нормальным значениям
гипо- либо гиперальбуминемия	Установление действительной концентрации альбумина в крови пациента
повышенное содержание в анализируемой сыворотке триглицеридов и липопротеинов по сравнению с нормальными значениями	Визуальный тест сыворотки перед анализом. Автоматическое уведомление посредством программного обеспечения о повышенном содержании триглицеридов и липопротеинов после проведения измерения.

* кортизон, октаноаты, салицилаты, варфарин, лизофосфатическая кислота, лизофосфатидилхолин, третиноин, вальпроаты, латрозол, диклофенак, тамоксифен

На основании полученных в клинических исследованиях данных правомерно осуществлять нижеследующие обобщения для использования вспомогательных параметров:

- сниженное значение показателя детоксикационной эффективности альбумина (DTE), при нахождении значений показателей функциональности альбумина DR, BE, RTQ в референтных пределах, указывает на наличие воспалительного процесса, либо обусловлено влиянием медикаментов, связывающихся с альбумином;
- значительное снижение значений показателей функциональности альбумина BE, RTQ, DTE указывает на возможную печеночную недостаточность. Значение DTE менее 25 % одновременно со значением RTQ менее 35% указывает на риск развития сепсиса – SIRS. В приведенных условиях показатель нативности конформации альбумина (DR) свидетельствует о патологическом процессе, однако определение активности злокачественного образования в таких условиях не является значимым;
- наличие нескольких измеренных во время терапии онкологического заболевания значений показателя нативности конформации альбумина (DR) позволяет сделать заключение о течении заболевания. Увеличение во время терапии значения показателя DR до значения 1 и более указывает на отсутствие активного роста злокачественного образования. Наоборот, уменьшение значения показателя DR в области значений менее 1 свидетельствует о прогрессировании онкологического заболевания. Стабильное значение показателя DR во времени указывает на стабилизацию (замедление развития) злокачественного процесса.

Таким образом, в соответствии с вышеприведенными данными, метод ЭПР-ТСА демонстрирует необходимость его применения для ранней диагностики нарушений транспортной системы крови при интоксикации и ранней диагностике активных злокачественных образований, а также при мониторинге и контроле рецидивов онкологических заболеваний. Метод ЭПР-ТСА, в частности, значительно превосходит по специфичности и чувствительности используемые в настоящее время опухолевые маркеры при диагностике активной злокачественной пролиферации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muravsky VA, Matthes G, Seibt G, Milutin A. Verfahren zur Diagnose und/oder Überwachung physiologischer oder pathologischer Veränderungen im menschlichen oder tierischen Körper und ESR-Spektrometer zur Durchführung des Verfahrens. 2000; Patent DE10011163 (28.02.2000) (PCT/EP01/02248), (WO 01/65270).
2. 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.

3. 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.
4. Peters T. All about albumin. Biochemistry, genetics, and medical application. San Diego, USA:Academic press 1996.
5. Curry S, Mandelkow H, Brick P, Franks N et al. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Biol* 1998;5:827-35.
6. Kazmierczak SC, Gurachevsky A, Matthes G, Muravsky V. Electron spin resonance spectroscopy of serum albumin: a novel new test for cancer diagnosis and monitoring. *Clin Chem* 2006;52:2129–34.
7. Hubbell WL, Cafiso DS, Altenbach C. Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. *NatStruct Biol* 2000;7:735–9.
8. Matthes, G., Seibt, G., Muravsky V. A.: Analysis of Plasma Proteins and Tumor Screening Diagnostic Using ESR. *New Drugs* 2 (2001) 26–32.
9. Gurachevsky A, Muravskaya E, Gurachevskaya T, Smirnova L, Muravsky V. Cancer-associated alteration in fatty acid binding to albumin studied by spin-label electron spin resonance. *Cancer Invest* 2007;25:378–83.
10. Gurachevsky A, Kazmierczak SC, Joerres A, Muravsky V. Assessment of albumin function by use of electron paramagnetic resonance spectroscopy: a promising tool for diagnosis and prognosis of cancer and sepsis. *Clin Chem Lab Med* 2008;46(9).
11. Muravsky V, Gurachevskaya T, Berezenko S, Schnurr K, Gurachevsky A. Fatty acid binding sites of human and bovine albumins: Differences observed by spin probe ESR. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2009 May 9.
12. Rajiv Jalan, Kerstin Schnurr, Rajeshwar P Mookerjee, Sambit Sen, Lisa Cheshire, Stephen Hodges, Vladimir Muravsky, Roger Williams, Gert Matthes, Nathan A Davies. Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality. *HEPATOLOGY* 2009;50:555-564.
13. Gelos M, Hinderberger D, Welsing E, Belting J, Schnurr K, Mann B. Analysis of albumin fatty acid binding capacity in patients with benign and malignant colorectal diseases using electron spin resonance (ESR) spectroscopy. *Int J Colorectal Dis.* 2010 Jan 25(1):119-127.
14. Moergel, M., Kämmerer, P.W., Schnurr, K., Klein, M.O., Al-Nawas, B. (2012): Spin electron paramagnetic resonance of albumin for diagnosis of oral squamous cell carcinoma (OSCC).*Clin Oral Investig*, PubMed listed.