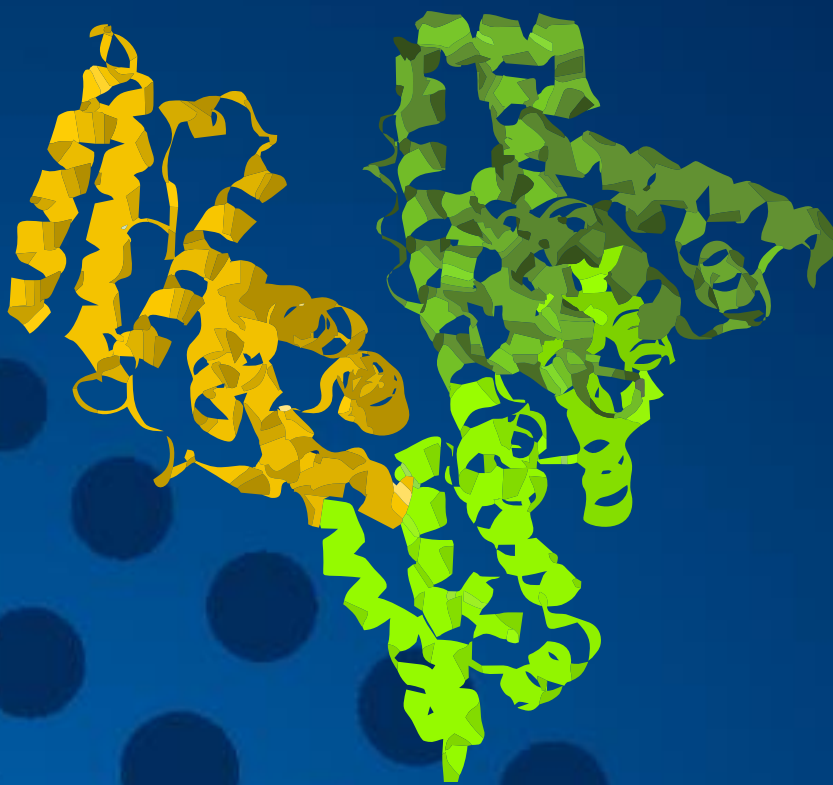




MedInnovation

Advanced Molecular Diagnostics



**Analyse der funktionalen Charakteristika
des Serumalbumins**

Prinzip - Albumin

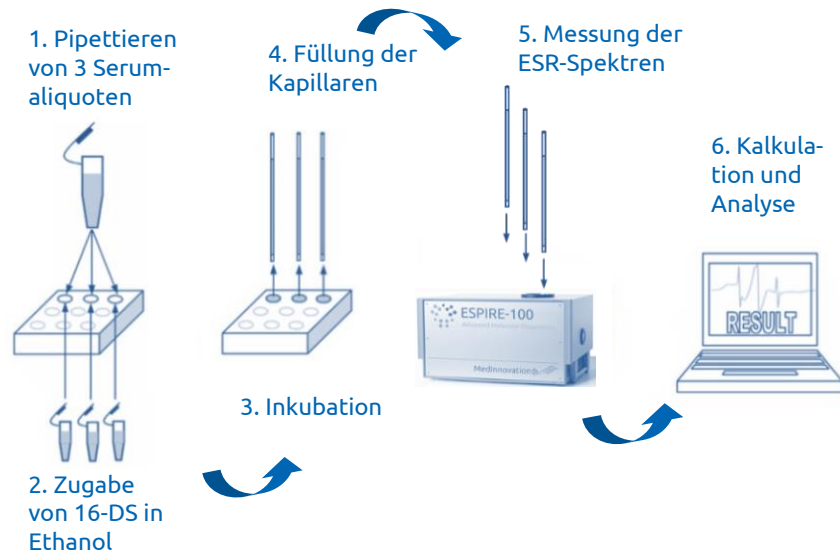
Albumin ist das häufigste Protein im humanen Serum. Es wird in der Leber synthetisiert und hat eine Halbwertszeit im Serum von ca. 19 Tagen.

Seine Hauptaufgabe ist der Transport einer Vielzahl hydrophober Substanzen wie Fettsäuren, Stoffwechselprodukte oder Medikamente [1].

Außerdem ist es für die Aufrechterhaltung des onkotischen Druckes im Blut verantwortlich und trägt zur Pufferkapazität des Blutes bei.

Es sind sieben Bindungsstellen für langkettige Fettsäuren bekannt [2], drei mit hoher und vier mit niedrigerer Bindungsaffinität [3]. Die Bindungsstellen mit hoher Affinität werden als lange und schmale Taschen beschrieben, wogegen die niedrigaffinen kürzer und weiter sind [2].

In den letzten Jahren wurden Biomarker mit niedrigem Molekulargewicht, gebunden an Transportproteine des Serums wie Albumin, intensiv untersucht, um ihren Nutzen zur frühen Diagnose von Erkrankungen zu prüfen [4, 5, 6].

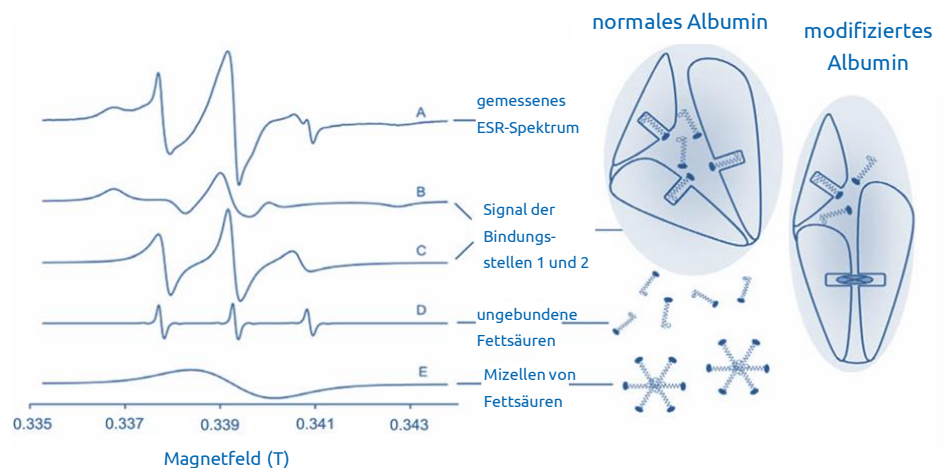


ESR Technologie

Der Albumin-Funktionstest untersucht die Konformationsmobilität des Albuminmoleküls mit Hilfe der Elektronenspinresonanz.

Dabei werden drei unterschiedliche Serumalbuminlösungen mit steigenden Konzentrationen an Ethanol und spinmarkierter Fettsäure (16-DS) untersucht. Diese simulieren die Ladungs-, Transport- und Entladungsbedingungen in vitro [7, 8]. Durch Zugabe einer spinmarkierten Fettsäure können Bindungsstellen des Albuminmoleküls untersucht werden.

Die Simulation der ESR-Spektren erlaubt die Berechnung von Bindungskonstanten, Bindungskapazitäten und biophysikalischen Parametern der beiden Bindungsgruppen für die drei verschiedenen Serumalbuminlösungen. Mit Hilfe dieser Parameter können die Transportparameter (BE = Bindungseffizienz, RTQ = reale Transportqualität, DTE = Detoxifikationseffizienz) berechnet werden.





Das Gerät – der ESR-Analysator

- anwendbar im Routinelabor – einfach im Gebrauch
- automatisiertes Gerät – automatisierte Kontrollalgorithmen, automatisierte Messprozedur, Signalaufnahme und Vorverarbeitung der Spektren als integraler Prozess
- bietet eine hohe Genauigkeit, Stabilität und Sensitivität – bei hoher Durchsatzrate
- garantiert vergleichbare Analyseergebnisse von mehreren Ansätzen einer Probe
- speziell entworfen für die Probenanalyse von biologischem Material bei dem molekulare Konformationsänderungen durch Temperatur, pH-Wert und andere Faktoren ausgelöst werden
- sämtliche Algorithmen sind programmierbar und bieten sowohl eine große Bandbreite an Routine, als auch bei wissenschaftlichen Anwendungen



Das Diagnostik-Kit

- Set von 16-doxyL-Stearin-säurelösungen in Ethanol (drei verschiedene Konzentrationen mit unterschiedlicher Deckelfarbe)
- 96-well Mikrotiterplatten zur Probeninkubation
- Deckel für Mikrotiterplatten
- Glaskapillaren
- Versiegelungswachsplatten
- Laborfilm zum zusätzlichen Verschließen der Mikrotiterplatten während der Inkubation
- Verpackung

Anwendungsgebiete

- Krebsdiagnostik und Monitoring
- Qualitätskontrolle von kommerziellen Albuminlösungen
- Bestimmung der Transport- und Detoxifikationsparameter des Albumins von Patienten mit verschiedenen Krankheiten

Transportparameter

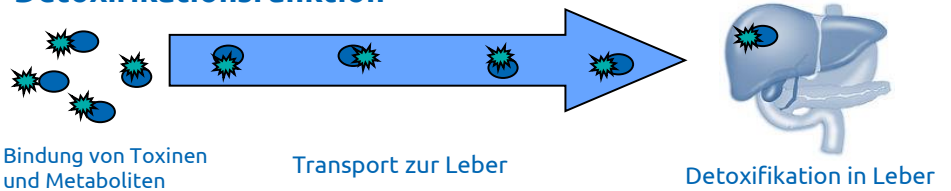
Der Albumin-Funktionstest untersucht verschiedene Parameter zur umfassenden Bewertung der Albuminfunktionalität mit Hilfe der ESR Technologie.

Die **Detoxifikationseffizienz** (DTE in %) ist ein funktioneller Parameter zur Analyse der Qualität des Albumins als Transportmolekül in einer kompetitiven Situation.

Die DTE beschreibt wie gut Metabolite und Toxine, auch im Fall einer vermehrten Ansammlung von Schadstoffen im Organismus, eliminiert werden können.

Zusätzlich beschreibt die **Bindungseffizienz** (BE in %) die physiko-chemischen Eigenschaften der Fettsäurebindungsstellen. Die **reale Transportqualität** (RTQ in %) ist ein globaler Parameter für die Albumintransportfunktion.

Detoxifikationsfunktion



Bindung von Toxinen und Metaboliten

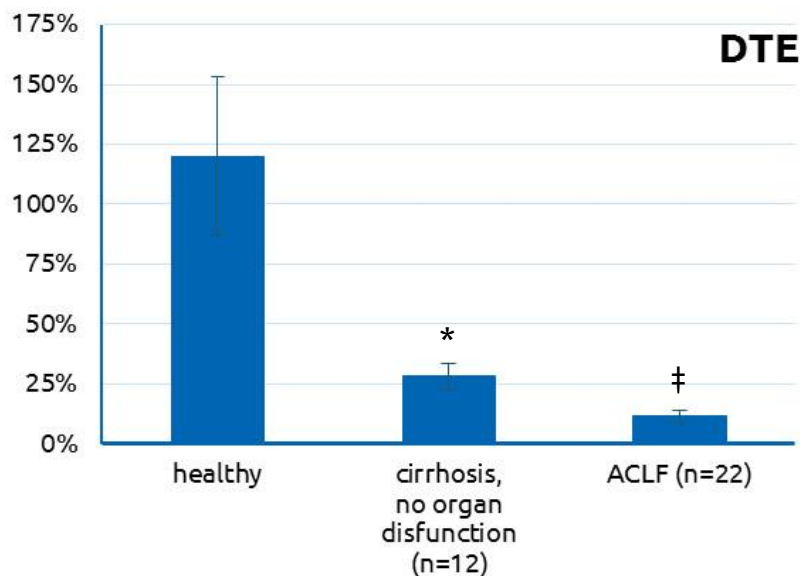
Transport zur Leber

Detoxifikation in Leber

Studienergebnisse

Der Albumin-Funktionstest konnte bei Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen zeigen, dass die Detoxifikationseffizienz im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich vermindert ist [9].

Patienten mit einer acute-on-chronic Leberinsuffizienz (ACLF) zeigten eine weitere Verminderung der DTE im Vergleich zu Patienten mit einer Zirrhose ohne Organversagen.



* $p < 0.001$ compared with healthy volunteers

‡ $p < 0,01$ compared with cirrhosis

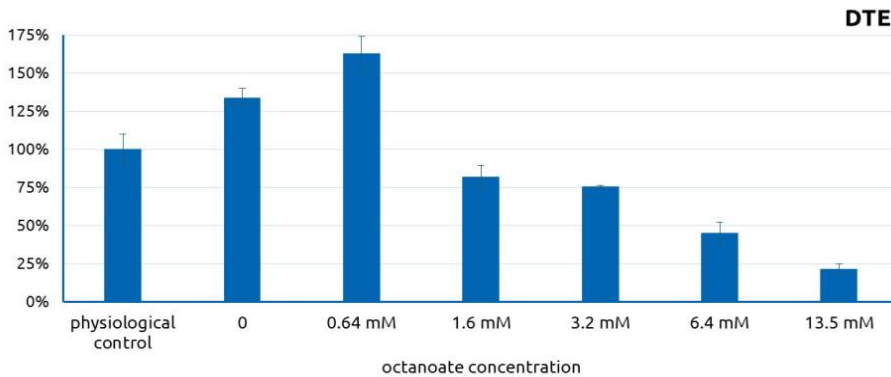
Kommerzielles Albumin

Qualitätskontrolle

In-vitro Experimente zeigten, dass die Zugabe hydrophober Liganden zu einer Albuminlösung die Transporteigenschaften des Albumins abhängig von der Ligandenkonzentration verändert.

Als Ligand wurde Oktanoat eingesetzt, da es ein allgemein verwendeter Stabilisator in kommerziellen Albuminlösungen ist.

Die kommerziell eingesetzten Konzentrationen schwanken zwischen 4mM und 20mM.



Bei Oktanoatkonzentrationen von mehr als 3mM ist eine deutliche Reduktion der Detoxifikationseffizienz (DTE) des Albumins zu beobachten.

Hingegen erhöhte sich bei einer Konzentration unterhalb 1mM die DTE im Vergleich zum physiologischen Wert.

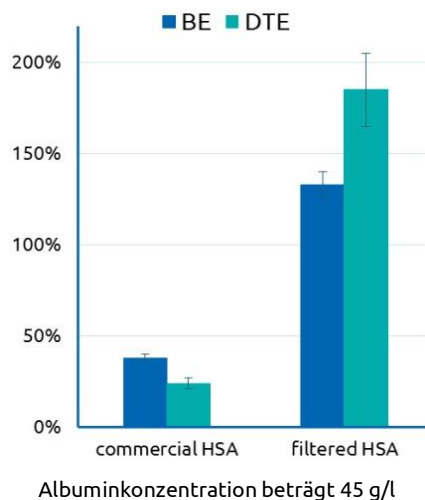
Dieses kann damit begründet werden, dass die DTE der Normalbevölkerung durch Einflüsse von Ernährung, Medikamenten oder Entzündungen den Maximalwert nicht erreichen kann.

Gefiltertes Albumin

Kommerzielles Humanalbumin (HSA) zeigt vor der Filtration reduzierte Transportparameter.

Durch den Einsatz des Hepalbin™ – Adsorbers (Albutec GmbH) können die Stabilisatoren aus einer Albuminlösung herausgefiltert werden.

Erste Ergebnisse zeigen eine deutliche Verbesserung der Detoxifikations- (DTE) und Bindungseffizienz (BE) des filterten Albumins.



Die Regeneration der Parameter erfolgt bis zu den physiologischen Werten und darüber hinaus.

Schlussfolgerungen

Der Einsatz kommerziellen Albumins bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen wie Leberinsuffizienz, hepato-renales Syndrom oder Aszites, sollte mit Vorsicht erfolgen.

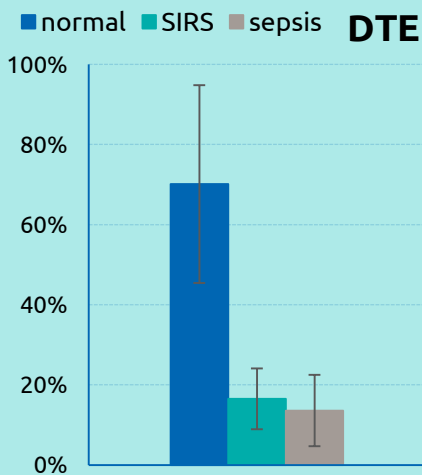
Diese Albuminlösungen sind nicht nur nicht in der Lage die Toxine aus dem Blut der Patienten zu binden, sie geben auch zusätzlich unerwünschte Moleküle (Stabilisatoren) an den geschwächten Organismus ab.

DTE bei Patienten mit Sepsis bzw. SIRS

In einer Pilotstudie wurden die Transporteigenschaften des Albumins von Patienten einer Intensivstation retrospektiv und verblindet bestimmt.

Fünf Patienten entwickelten eine SIRS und fünf eine Sepsis.

Der Transportparameter DTE bei Patienten mit Sepsis bzw. SIRS wurde mit der gesunder Individuen verglichen.



Mit Werten von weniger als 20% ist die Detoxifikationseffizienz im Vergleich zu den physiologischen Werten in beiden Gruppen signifikant reduziert.

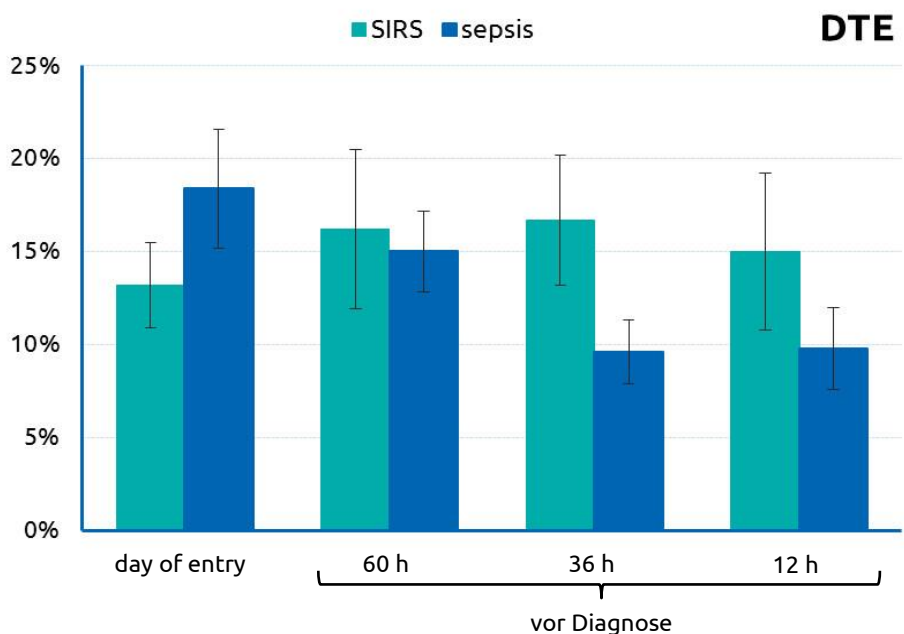
Verlauf der DTE

Es wurden Blutproben von Patienten untersucht, die am Tag der Aufnahme und 60, 36 bzw. 12 Stunden vor der Diagnose Sepsis bzw. SIRS mit den Standardmethoden entnommen wurden.

Im Verlauf der DTE zeigen sich signifikante Unterschiede ($p = 0.009$, u-Test) zwischen Sepsis und SIRS.

Während die DTE-Werte der Patienten mit SIRS nahezu konstant bleiben, fallen die Werte der Patienten mit Sepsis im zeitlichen Verlauf ab.

Damit wäre eine Unterscheidung, ob der Patient eine Sepsis oder SIRS entwickelt, möglich.



Dieses kann durch eine tägliche Bestimmung der Transportparameter des Albumins, beginnend mit dem ersten Tag der Patientenüberwachung, umgesetzt werden.

Damit würde die Tendenz rechtzeitig erkannt und systemische Maßnahmen könnten frühzeitig eingeleitet werden.

Diese ersten Ergebnisse müssen in einer Studie mit einer größeren Anzahl von Patienten überprüft werden.

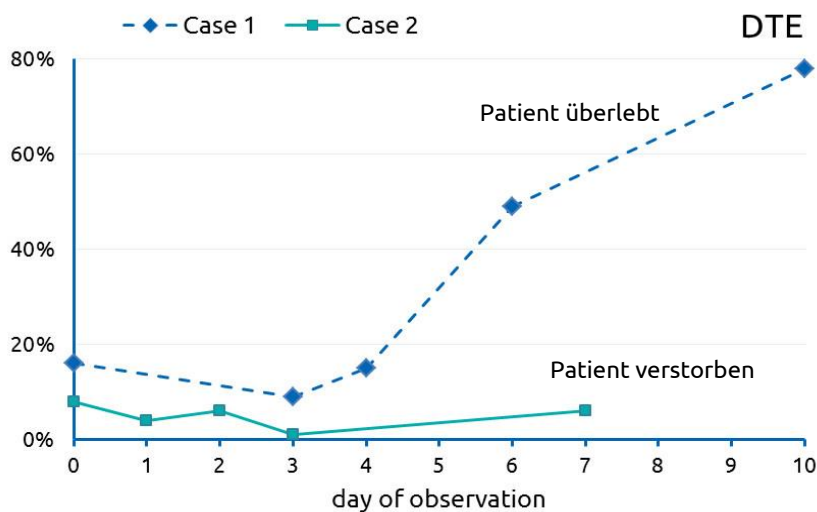
Verlauf der DTE

In einer prospektiven Studie mit Patienten einer Intensivstation wurden Blutproben beginnend am Tag der Aufnahme bis zum Verlassen der Intensivstation gesammelt.

Zwei unterschiedliche Patienten sind exemplarisch dargestellt.

Fall 1: Patient mit einer Sepsis (E. coli) nach einer Nephrektomie wegen eines Nierenkarzinoms, Leberinsuffizienz und Enzephalopathy, Antibiotikatherapie

Fall 2: Patient mit einer Sepsis (C. albicans und C.spp), Lymphom mit linksseitiger Lungenaffektion, Therapie mit Fungizone®



Langzeit-Monitoring:

Fall 1: Patient zeigt eine ansteigende Detoxifikationseffizienz im Verlauf des Monitoring, Anzeichen für selektiven Effekt der Antibiotikatherapie, günstige klinische Prognose bestätigt, Patient hat überlebt

Fall 2: Patient zeigt eine konstant niedrige Detoxifikationseffizienz im Verlauf des Monitoring, keine Anzeichen eines Ansprechens auf die Therapie mittels Antimykotikum, ungünstige Prognose bestätigt, Patient verstorben

Schlussfolgerung

Die Bestimmung der Detoxifikationseffizienz mittels Albumin-Funktionstest kann bei Patienten mit Sepsis bzw. SIRS zur Verlaufsbeobachtung und zur Prognose genutzt werden.

Anwendungsgebiete

- Verlaufsbeobachtung und Prognose bei akuter Leberinsuffizienz
- Überprüfung der Wirksamkeit von Leberdialyse-Systemen
- Qualitätskontrolle bei kommerziellen Albuminen
- Verlaufsbeobachtung und Prognose bei SIRS / Sepsis

Literatur

1. Peters, Academic Press, New York 1995
2. Bhattacharya et al. JMB, 2000
3. Simard et al., PNAS, 2005
4. Kawashima et al. , J Proteome Res 2010
5. Lowenthal et al. , Clin Chem 2005
6. Mehta et al. , Dis Markers 2003
7. Taboada et al., Chemical Physics, 2007
8. Reed et al., JBC, 1989
9. Jalan et al., Hepatology, 2009

