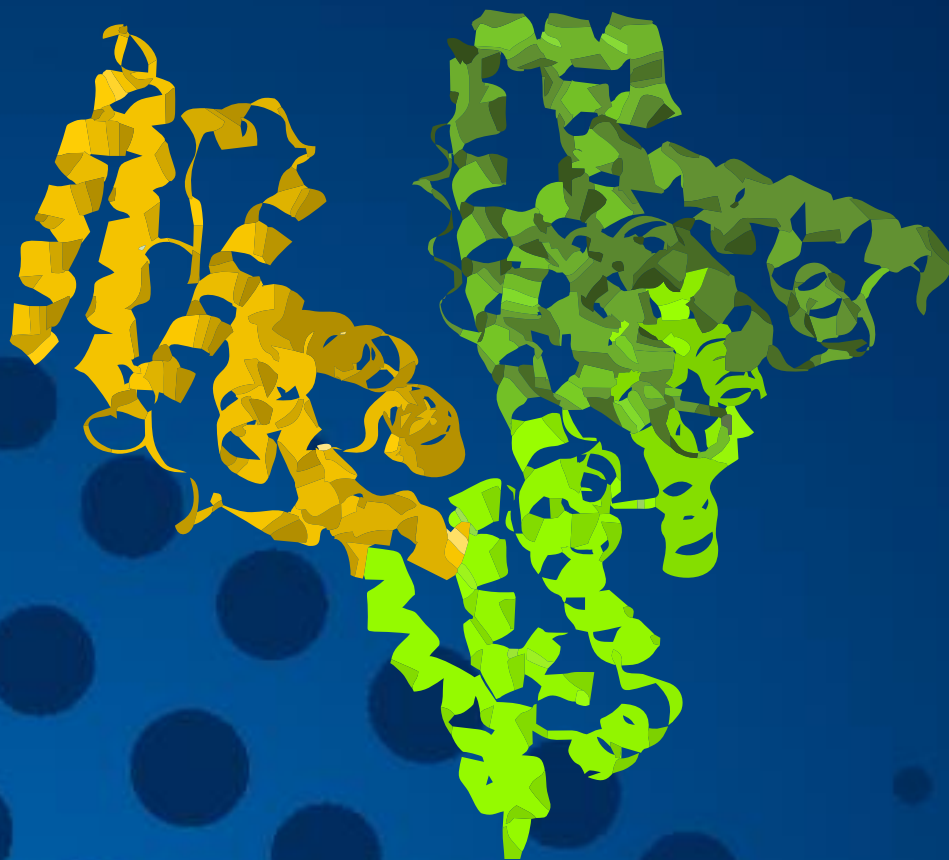




MedInnovation

Advanced Molecular Diagnostics



**Analyse der funktionalen Charakteristika des
Serumalbumins**

Ein Test zur Krebsdiagnose und zum Monitoring

Methode

Albumin

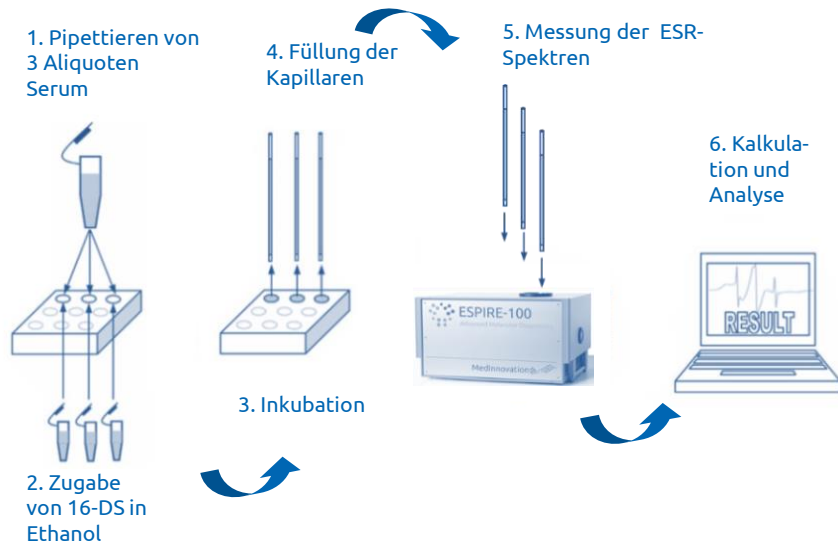
Albumin ist das häufigste Protein im menschlichen Blut. Es wird in der Leber synthetisiert und hat eine Halbwertszeit im Serum von ca. 19 Tagen.

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

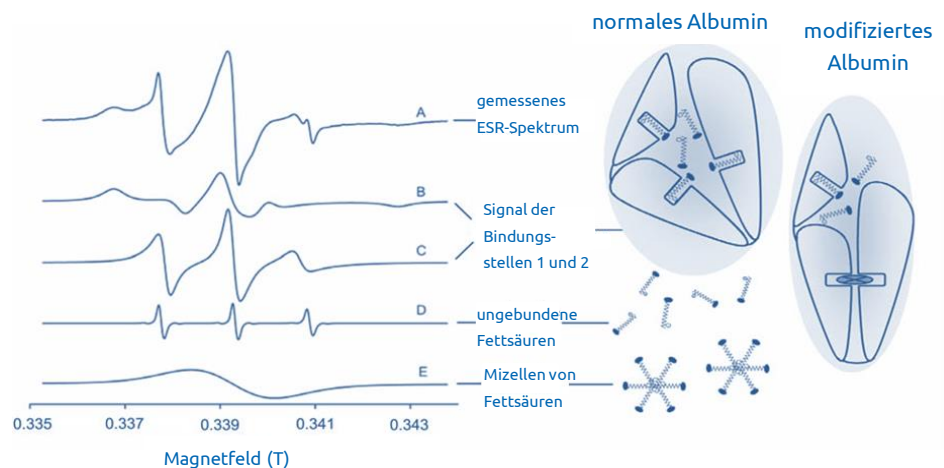


ESR Technologie

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

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 die Zugabe einer spinmarkierten Fettsäure können die Bindungsstellen des Albuminmoleküls untersucht werden.

Die Simulation der ESR-Spektren erlaubt die Berechnung von Bindungskonstanten, Bindungskapazitäten und biophysikalischen Parametern der beiden Bindungsstellengruppen 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, automatische 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-doxy-Stearinsäurelösungen 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 Albumin-Transport- und Detoxifikationsparameter von Patienten mit verschiedenen Krankheiten**

Albumin-Funktionstest

Der Albumin-Funktionstest bietet die Möglichkeit, auf schnelle und einfache Weise zu überprüfen, ob im Körper ein aktives Tumorgeschehen vorliegt.

Dass Albumin eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle transportieren kann, basiert auf seiner hohen Konformationsflexibilität.

Die von Tumorzellen ins Blut abgegebenen Peptidfragmente oder Lipide können an das Albumin binden [5, 9] und beeinflussen die Albuminfunktion durch Veränderungen in seiner Konformation.

Unter pathologisch veränderten Bedingungen kommt es zu verschiedenen Modifikationen der Konformationsmobilität des Albumins, welche zu veränderten Transport- und Detoxifikationscharakteristika führen.

Im Fall einer malignen Erkrankung unterscheiden sich die Bindungskapazitäten des Albumins signifikant von nicht malignen bzw. gesunden Serumproben.

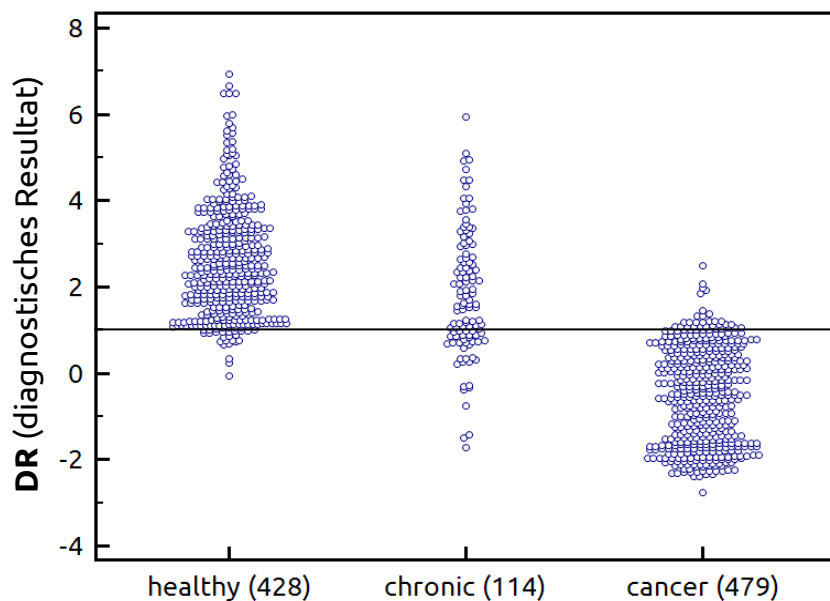
Diese veränderte Fettsäurebindung kann mit Hilfe der Elektronenspinresonanz (ESR) gemessen werden.

Die aus den ESR-Spektren gewonnenen Parameter ermöglichen die Berechnung einer integralen Diskriminierungs-Funktion (**DR** – diagnostisches **R**esultat).

Im Falle eines DR-Wertes kleiner als 1,0 ist der Konformationsstatus des Albumins verändert, das bedeutet, es besteht bzw. entwickelt sich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine maligne Erkrankung.

Bei Messung eines DR-Wertes größer als 1,2 liegt kein aktives Tumorgeschehen vor. Der Grenzbereich umfasst Werte von 1,0 bis 1,2. In diesem Grenzbereich besteht ein erhöhtes Risiko für das Vorhandensein von aktivem Tumorgeschehen.

Der Albumin-Funktionstest zeigte in klinischen Studien -in Abhängigkeit der Lokalisation- eine hohe Spezifität (ca. 90%) und Sensitivität (ca. 90%) [10 - 14].



Anwendungsgebiete

- Therapiemonitoring und Rezidivkontrolle
- Früherkennung von Krebs bei Risikogruppen (Kontakt zu potentiell krebsauslösenden Stoffen, gehäuftes Auftreten von Krebs in der Familie)

Analysevoraussetzungen

Für eine einwandfreie Analyse benötigen wir:

- Mindestens 2 ml Vollblut bei ca. 8°C gelagert. Dieses sollte binnen 24h nach der Abnahme zur Analyse bei der MedInnovation GmbH eingetroffen sein.
- "Reines" (zentrifugiertes) Blutserum sollte innerhalb von max. 4 Tagen bei uns eintreffen. Die Zentrifugation der Blutprobe sollte bei 1000 – 1500 x g bei Raumtemperatur erfolgen. Das Serum bzw. EDTA-Plasma ist in ein separates und beschriftetes Röhrchen zu überführen.



- Bei der Abnahme ist zu beachten, dass kein Blutabnahmesystem mit Antikoagulantien (mit Ausnahme von EDTA) oder Gel und -sofern möglich- kein Vakuumabnahmesystem verwendet wird.
- Die Probenlagerung für mehr als vier Tage muss bei unter -20°C erfolgen, wiederholtes Einfrieren und Auftauen des Serums / Plasmas ist nicht gestattet.
- Ein leichtes Frühstück vor der Blutentnahme ist zulässig.
- Die Blutentnahme sollte vormittags erfolgen.

Ausschlusskriterien

Akute Schübe von chronisch entzündlichen Erkrankungen wie z.B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder rheumatoide Arthritis verfälschen das Testergebnis.

Es sollte ein Abstand von 4 Wochen eingehalten werden, damit der Körper das Serumalbumin zuvor regenerieren kann.

Nach operativen Eingriffen sowie nach einer Chemotherapie bzw. Bestrahlung, sollte ebenfalls ein Abstand von 4 Wochen eingehalten werden. Dies gilt auch für Erkrankungen mit entzündlichem Geschehen.

Da der Albumin-Funktionstest derzeit* noch keine Aussage zur Lokalisation der Krebserkrankung treffen kann, ist es nicht ratsam ihn als eine allgemeine Screening-Untersuchung anzuwenden.

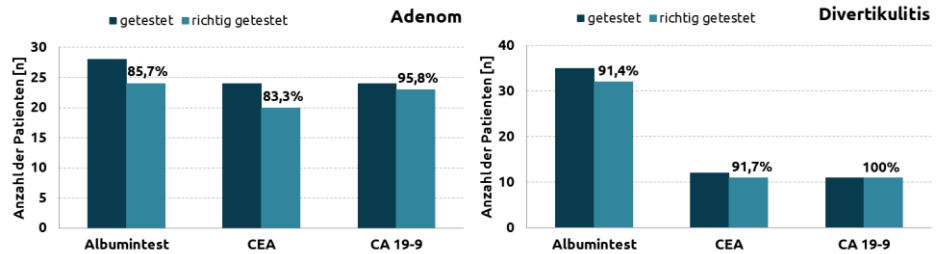
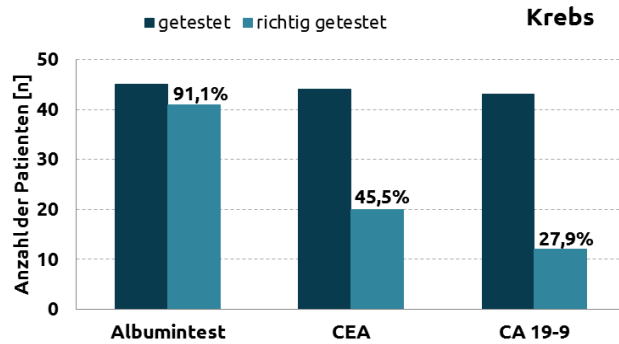
* siehe Seite 7

Studienergebnisse

Vergleich mit Tumormarkern

Im Rahmen einer Studie mit Patienten mit Dickdarm-erkrankungen wurde der Albumin-Funktionstest mit den Tumormarkern CEA (Carcino-Embryonales Antigen) und CA 19-9 verglichen.

Bei Krebspatienten zeigte der Albumin-Funktionstest eine deutliche Überlegenheit (91,1% richtig) im Vergleich zu den Tumormarkern CEA (45,5% richtig) und CA19-9 (27,9% richtig).



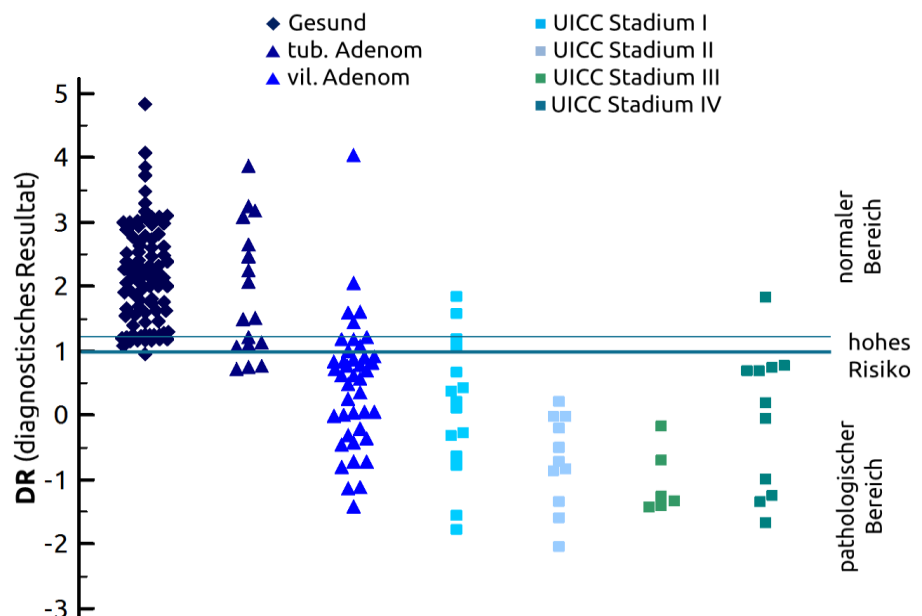
Bei Patienten mit Adenomen bzw. Divertikulitis sind der Albumin-Funktionstest und die konventionellen Tumormarker CEA und CA 19-9 in ihrer Spezifität vergleichbar.

Patienten mit Kolo-rektalen Erkrankungen

In Berlin, Bochum und Moskau wurden Studien mit Patienten mit malignen und benignen kolorektalen Erkrankungen durchgeführt.

Es zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen dem DR-Wert und der Malignität bzw. dem Risiko der malignen Entartung.

Weitere Studien folgen, um die Fallzahlen in den verschiedenen Gruppen zu erhöhen und diese Ergebnisse zu überprüfen.



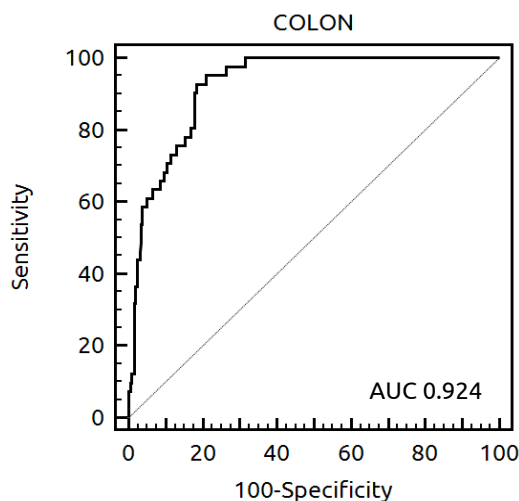
Nach einer Validierungsstudie bezüglich benigner und maligner kolorektalen Erkrankungen könnte der Albumin-Funktionstest in der Früherkennung von Dickdarmkrebs bei Risikogruppen und zur Verlängerung der Zeitintervalle von Koloskopien eingesetzt werden.

Experimentelle Ergebnisse

Erste Ergebnisse zur Bestimmung der Krebs-Lokalisation

In einem „proof of concept“-Projekt wurden für die vier Krebsarten Darm-, Pankreas-, Prostata- und Brustkrebs Algorithmen entwickelt.

Die ROC Kurve der Darmkrebs-Klassifikation ist exemplarisch dargestellt. Es wurden 41 Darmkrebspatienten mit 322 Patienten mit Pankreas-, Prostata- oder Brustkrebs, sowie Patienten mit gutartigen Darmerkrankungen und gesunden Personen verglichen.

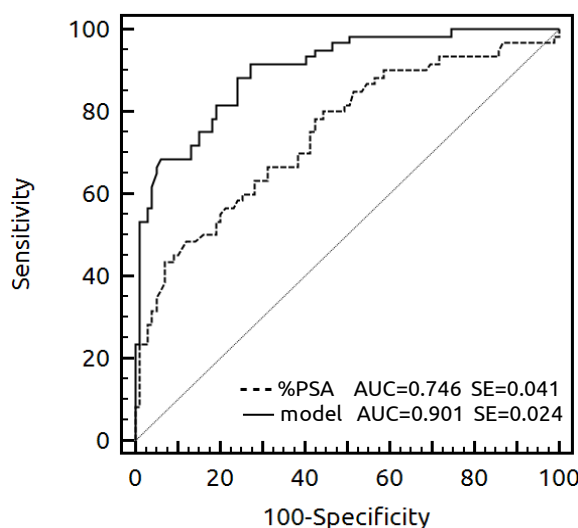


Die ersten Analysen der, aus den ESR-Spektren gewonnenen, biophysikalischen Parameter haben gezeigt, dass eine Unterscheidung verschiedener Krebsarten möglich ist.

Weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen und weiteren Krebsarten werden durchgeführt, um diese ersten Ergebnisse zu überprüfen.

Der Albumin-Funktionstest kann die Diagnostik von Prostatakrebs verbessern

Dargestellt ist ein Vergleich der ROC Kurven vom Verhältnis von freiem zu totalem PSA (%PSA) und einer Parameterkombination von %PSA, totalem PSA, der Albuminkonzentration und dem DR-Wert (Modell) von 60 Prostatakrebspatienten und 99 gesunden Kontrollen (gleiche Altersverteilung).



Die Studie wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Onkologie und Krebs-Epidemiologie des Universitätskrankenhauses Lund in Schweden 2010 durchgeführt, (unveröffentlichte Ergebnisse).

Mit Hilfe einer Parameterkombination von PSA-bezogenen Werten und dem Albumin-Funktionstest ist es möglich die Diagnostik von Prostatakrebs ohne weitere invasive Methoden zu verbessern.

Alle Werte können aus der selben Blutprobe gewonnen werden.

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. Xu et al. , JAMA 1998
10. Seidel et al. , Z Med Phys 2005
11. Kazmierczak et al. , Clin Chem 2006
12. Gurachevsky et al. , Clin Chem Lab Med 2008
13. Gelos et al. , Int J Colorectal Dis 2010
14. Mörgel et al. , Clin Oral Investig 2012

