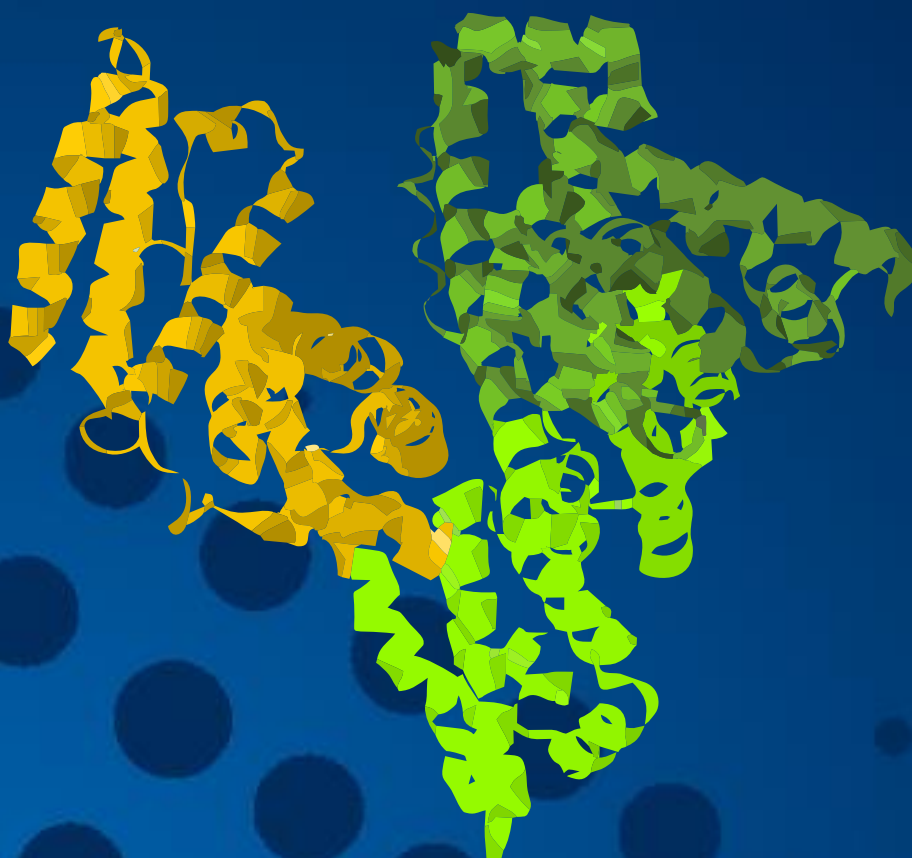




MedInnovation
Advanced Albumin Research



**Analyse der funktionalen Charakteristika
des Serumalbumins in der
Intensivmedizin**

Prinzip - Albumin

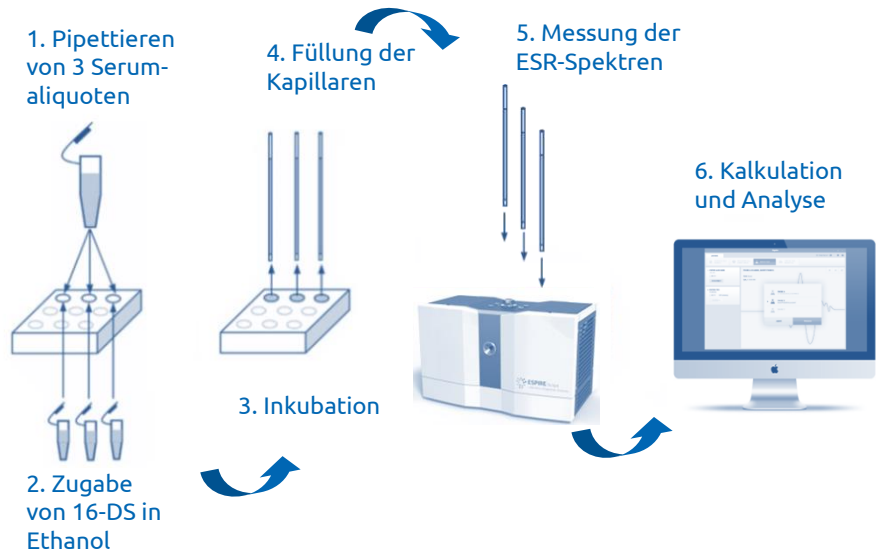
Albumin ist das häufigste Protein im humanen Serum. Es wird in der Leber synthetisiert und hat eine Halbwertszeit im Serum von ca. 19 Tagen.

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].

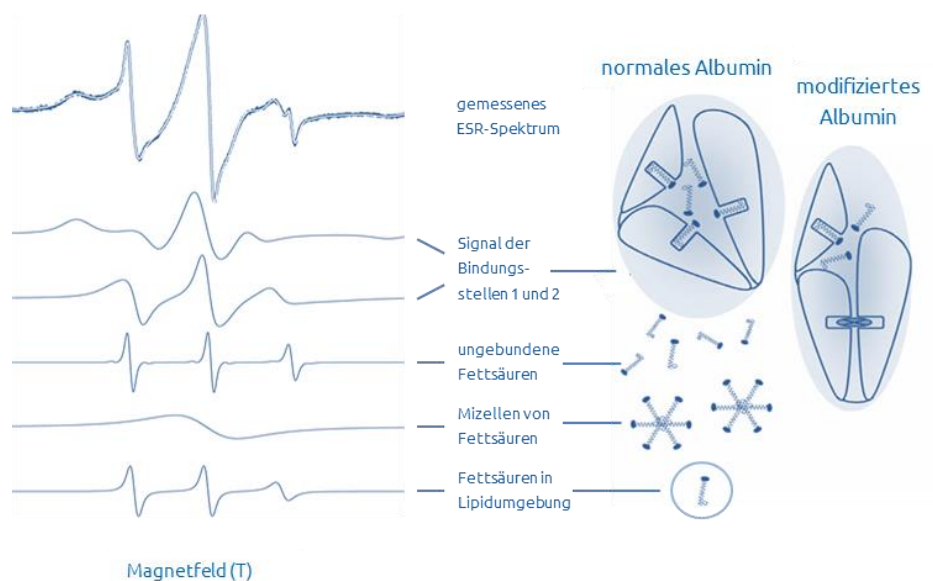


ESR Technologie

Der Albumin-Funktionstest untersucht die Konformationsmobilität des Albuminmoleküls mit Hilfe der Elektronenspinresonanz. Diese Plattform-Technologie beinhaltet Module für verschiedene Krankheitsbilder.

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.



Equipment



ESPIRE Scope Laboratory Diagnostic Analyzer

- 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

ESPIRE AlbuMini Automated Liquid Handling System

- Präzises kontakt- und berührungsloses Probenvorbereitungssystem für den Umgang mit chemischen oder biologischen Lösungen oder Suspensionen
- Vermeidet menschliche Pipettierfehler, zeigt hoch reproduzierbare Ergebnisse und erhöht die Produktivität
- Hochauflösendes Touchpanel-Display mit intuitiver, benutzerfreundlicher Oberfläche
- Hohe Pipettiergenauigkeit mit weniger als 2% (10-14µl)



Das Diagnostik-Kit

- Set von 16-doxyl-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

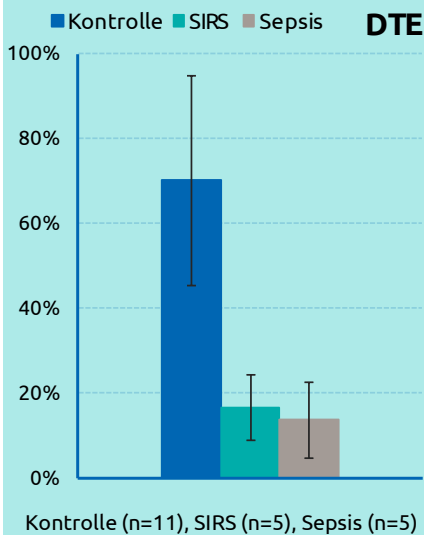
- Krebsdiagnostik und Monitoring
- Bestimmung der Transport- und Detoxifikationsparameter des Albumins von Patienten mit Lebererkrankungen bzw. Sepsis
- Qualitätskontrolle von kommerziellen Albuminlösungen

DTE bei Patienten mit Sepsis bzw. SIRS

In einer Pilotstudie wurden die Transporteigenschaften des Albumins von Patienten einer Intensivstation retrospektiv und verblindet bestimmt (nicht publizierte Daten).

Fünf Patienten entwickelten eine SIRS* (Systemic Inflammatory Response Syndrome) und fünf eine Sepsis.

Der Transportparameter DTE bei Patienten mit Sepsis bzw. SIRS wurde mit der DTE von Patienten der Intensivstation ohne Sepsis/SIRS verglichen.



Mit Werten von weniger als 20% ist die Detoxifikationseffizienz im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert.

* Definition vor Sepsis-3

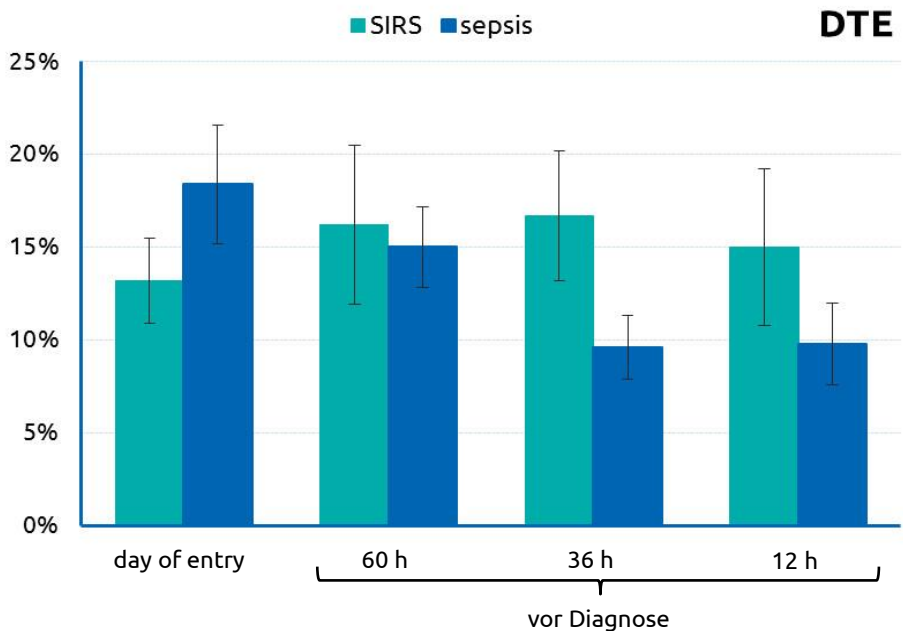
Verlauf der DTE

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



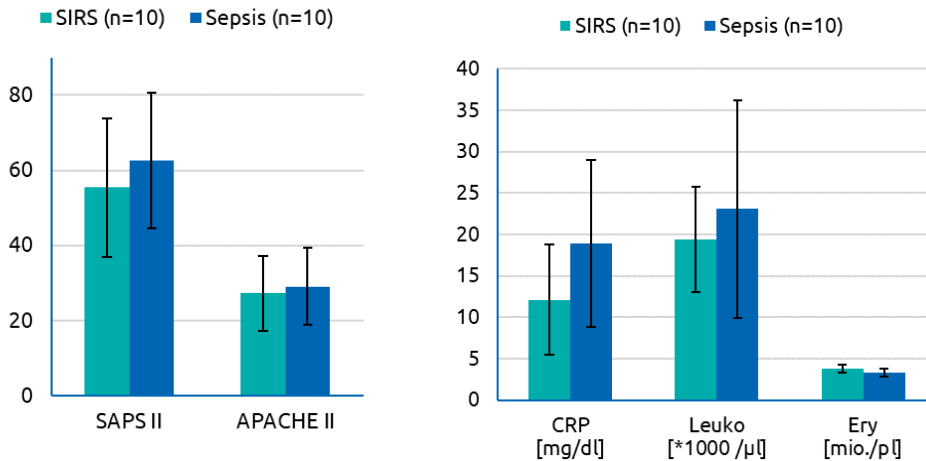
Dieses kann durch eine tägliche Bestimmung der Transportparameter des Albumins, beginnend mit dem ersten Tag der Patientenüberwachung, umgesetzt werden.

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

Diese ersten Ergebnisse werden derzeit in einer Studie überprüft [Universität Rostock und Fraunhofer IZI; DRKS00025079].

Vergleich mit anderen Parametern

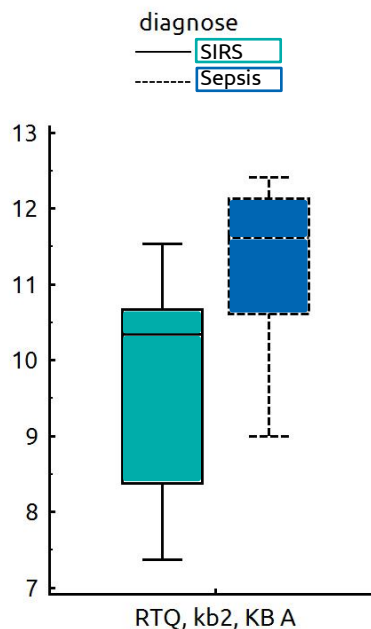
In einer weitere Pilotstudie wurden Patienten mit Sepsis bzw. SIRS zum Zeitpunkt der Diagnose untersucht. Andere klinischen Parameter wurden mit denen des Albumin-Funktionstests verglichen, um herauszufinden, ob der Albumin-Funktionstest eine gleichwertige oder sogar bessere diagnostische Güte in der Trennung von Sepsis und SIRS aufweist.



Wie in den Abbildungen und der Tabelle dargestellt, zeigen SIRS II, APACHE II und Anzahl der Leukozyten nahezu gleiche Werte für beide Gruppen. Der CRP, Anzahl der Erythrozyten, BE, DTE und KB A zeigen Unterschiede, die jedoch die Signifikanz nicht erreichen.

Nur der RTQ und kb2 zeigen signifikante Unterschiede.

Mittels logistischer Regression wurde eine Parameterkombination von RTQ, kb2 und KB A gefunden, welche Patienten mit Sepsis und SIRS signifikant unterscheiden kann und dies besser als die Einzelparameter ($P=0.023$).



Für die Patienten mit Sepsis oder SIRS waren noch weitere klinische Parameter verfügbar:

- SAPS II (Simplified Acute Physiology Score)
- APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation)
- C-reactives Protein
- Procalcitonin
- Blutzellen

Da Procalcitonin nur für die Hälfte der Patienten verfügbar war, wurde es nicht mit in die Analyse einbezogen (kleine Gruppengröße).

	u-test		u-test
SAPS II	0.473	BE	0.082
APACHE II	0.650	RTQ	0.049
CRP	0.141	DTE	0.131
Leuko	0.821	kb2	0.049
Ery	0.059	KB A	0.096

signifikant $P < 0,05$

Schlussfolgerung

Obwohl in der Pilotstudie nur eine geringe Patientenzahl untersucht wurde, zeigen die Ergebnisse das Potential zur Unterscheidung von Sepsis und SIRS. Eine Kombination von Parametern des Albumin-Funktionstests kann die diagnostische Güte verbessern.

Schlussfolgerung

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

Um diese und auch die vorherigen Daten zu validieren, wurden weitere Studien initiiert.

Mit dem Universitätsklinikum Rostock und Fraunhofer IZI (DRKS00025079) wurden erst Patienten mit Sepsis, septischem Schock und ITS-Patienten ohne septische Erkrankungen verglichen, dem schließt sich eine Langzeitbeobachtung an.

Die CytoSorbents Europe GmbH führt eine Studie zur Anwendung ihres CytoSorb® Adsorbens durch (NCT04963920). Der Albumin-Funktionstest wird als ein diagnostisches Verfahren eingesetzt.

In allen Studien werden die Parameter des Albumin-Funktionstests nicht nur mit den etablierten Transportparametern verglichen, sondern immer auch Parameterkombinationen untersucht. Ziel ist es eine größtmögliche diagnostische Güte zu erreichen.

Verlauf der DTE

In einer prospektiven Studie mit Patienten einer Intensivstation wurden Blutproben beginnend am Tag der Aufnahme bis zum Verlassen der Intensivstation gesammelt (nicht publizierte Daten).

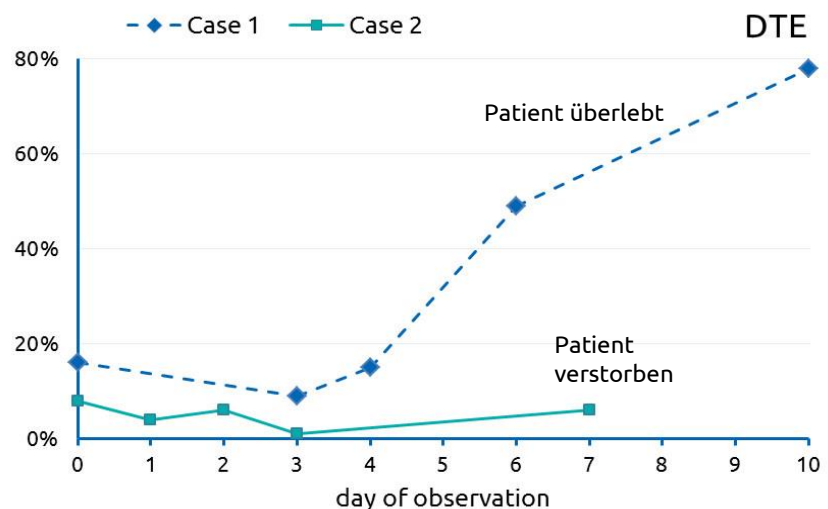
Zwei unterschiedliche Patienten sind exemplarisch dargestellt.

Fall 1:

Patient mit einer Sepsis (E. coli) nach einer Nephrektomie wegen eines Nierenkarzinoms, Leberinsuffizienz und Enzephalopathie, Antibiotikatherapie

Fall 2:

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



Langzeit-Beobachtung:

Fall 1:

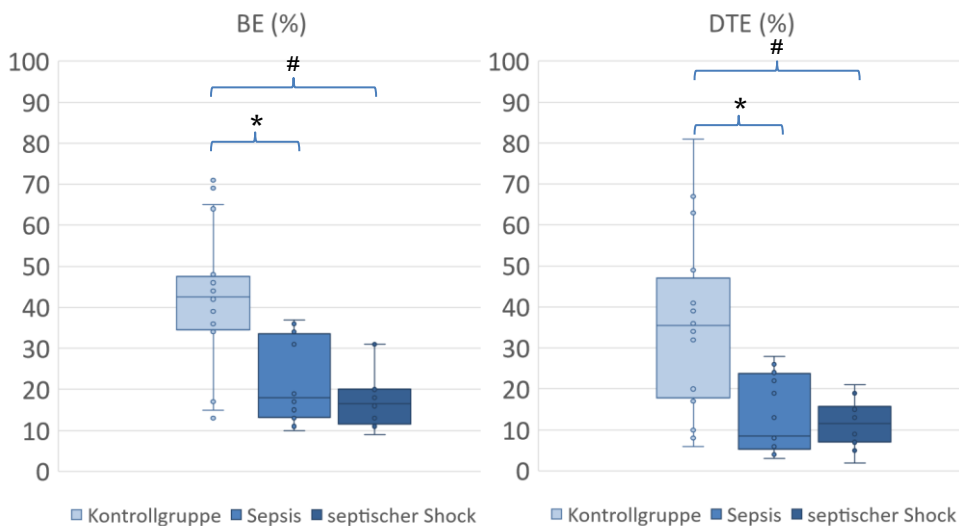
Patient zeigt eine ansteigende Detoxifikationseffizienz im Verlauf der Beobachtung, Anzeichen für selektiven Effekt der Antibiotikatherapie (nach drei Tagen), günstige klinische Prognose bestätigt, Patient hat überlebt

Fall 2:

Patient zeigt eine konstant niedrige Detoxifikationseffizienz im Verlauf der Beobachtung, keine Anzeichen eines Ansprechens auf die Therapie mittels Antimykotikum, ungünstige Prognose bestätigt, Patient verstorben

Vorstudie Intensivmedizin

In der oben erwähnten Vorstudie mit dem Universitätsklinikum Rostock und Fraunhofer IZI (DRKS00025079) wurden zehn Patienten der Intensivmedizin ohne Anzeichen einer Sepsis oder eines septischen Schocks zehn Patienten mit einer Sepsis und sechs Patienten mit einem septischen Schock gegenübergestellt.



Mann-Whitney-test (independent samples) *P<0,01, # P<0,03

Alle Patienten zeigen deutlich reduzierte Transportparameter im Vergleich zu Gesunden (100%). Sowohl die Bindungseffizienz als auch die Detoxifikationseffizienz sind bei Patienten mit Sepsis bzw. septischen Schock gegenüber Patienten ohne diese Komplikationen signifikant reduziert.

Eine multiple lineare Analyse mit den Variablen Alter und Geschlecht, den Entzündungsparametern PCT (Procalcitonin) und CRP (C-reaktives Protein), den Leberparametern Bilirubin und Albumin und den Nierenparametern Kreatinin und Harnstoff zeigte, dass CRP und Harnstoff die besten Prädiktoren für die BE und DTE sind.

Die Daten wurden zur Publikation eingereicht.

Die Vorstudie mit dem Universitätsklinikum Rostock und Fraunhofer IZI (DRKS00025079) diente der Erfassung aller relevanter Parameter, die zur Planung einer Monitoring-Studie mit Patienten der Intensivmedizin notwendig sind. Dies geschah mit der neuesten Generation der Geräte.

Dabei wurden die Transportparameter (BE und DTE) zwischen den verschiedenen Patientengruppen verglichen. Es erfolgte eine Analyse der Zusammenhänge mit Patientendaten wie Laborparametern, Alter oder Organbeeinträchtigungen.

Schlussfolgerung

Alle notwendigen Parameter zur Fallzahlplanung und zum Entwurf eines Studienprotokolls einer größeren Studie zur Verlaufskontrolle bei Patienten der Intensivmedizin konnten erhoben werden.

Literatur

1. Peters TJ (1995) All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications Academic Press, New York
2. Bhattacharya AA, Grune T, Curry S (2000) Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol* 303: 721-732
3. Simard JR, Zunszain PA, Ha CE et al. (2005) Locating high-affinity fatty acid-binding sites on albumin by x-ray crystallography and NMR spectroscopy. *PNAS* 102: 17958-17963
4. Kawashima Y, Fukutomi T, Tomonaga T et al. (2010) High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples. *J Proteome Res* 9: 1694-1705
5. Lowenthal MS, Mehta AI, Frogale K et al. (2005) Analysis of albumin-associated peptides and proteins from ovarian cancer patients. *Clin Chem* 51: 1933-1945
6. Mehta AI, Ross S, Lowenthal MS, Fusaro V et al. (2003) Biomarker amplification by serum carrier protein binding. *Dis Markers* 19: 1-10
7. Taboada P, Barbosa S., Emilio Castro et al. (2007) Effect of solvation on the structure conformation of human serum albumin in aqueous–alcohol mixed solvents. *Chemical Physics* 340: 59-68
8. Reed RG, Burrington CM (1989) The albumin receptor effect may be due to a surface-induced conformational change in albumin. *J Biol Chem* 264: 9867-9872



MedInnovation GmbH – Groß-Berliner Damm 151, 12487 Berlin
Telefon: +49 (0)30 720 126 31 – Fax: +49 (0)30 720 126 36
www.medinnovation.de