

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

¹Kerstin Schnurr, ¹Katja Waterstradt, ²Gert Matthes, ³П. Н. Дмитриев

¹MedInnovation GmbH, Berlin, Germany

²Institute of Transfusion Medicine, Leipzig, Germany

³EPR TECHNOLOGIES LLC, Москва, Россия

APPLICATION OF ESR-SPECTROSCOPY FOR DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF CANCER

¹Kerstin Schnurr, ¹Katja Waterstradt, ²Gert Matthes, ³P. N. Dmitriev

¹MedInnovation GmbH, Berlin, Germany

²Institute of Transfusion Medicine, Leipzig, Germany

³EPR TECHNOLOGIES LLC, Moscow, Russia

© Коллектив авторов, 2017 г.

Диагностическая медицина претерпела значительные изменения в последние десятилетия. Появление протеомики и геномики значительно расширило наши представления о болезни. Данные области открыли широкий спектр протеинов, которые участвуют во многих процессах, связанных с болезнями, одной из которых является рак. Измерение этих единичных протеинов, проявляющихся в определенных болезнях, позволяет предложить диагностические подсказки или позволяет оценить прогноз пациента. Другое направление — выявление действий, которые эти лиганды оказывают на структуру и функциональность альбумина. Альбумин, как известно, играет важную роль в регулировании концентрации различных протеинов, производимых клетками опухоли, в сыворотке крови. В этой статье представлен метод использования спиновой метки с последующей электронной парамагнитной резонансной спектроскопией. Данный метод — мощный инструмент для оценки структурных и функциональных изменений, которые происходят с альбумином при связывании с различными лигандами. Мы описываем возможности применения этого метода как для диагностики онкологических заболеваний и сепсиса, так и с другими потенциальными целями.

Ключевые слова: морская медицина, альбумин, рак, диагностическая медицина, электронная парамагнитная резонансная спектроскопия, сепсис.

Diagnostic medicine has significantly changed during the past decade. The emergence of proteomics and genomics has significantly increased our understanding of disease. These fields have also revealed the vast array of proteins that are expressed in various disease processes, such as cancer. Measurement of these unique proteins expressed in certain diseases may offer diagnostic clues or allow patient prognosis to be assessed. Another approach is to measure the effects that these ligands have on the structure and function of albumin. Albumin is known to play an important role in modulating the serum concentrations of various proteins produced by tumor cells. In this review, we introduce the reader to the technique of spin labeling followed by electron paramagnetic resonance spectroscopy. This method is a powerful tool for evaluating the structural and functional changes that can occur to albumin following the binding of various ligands. We describe the utility of this technique for the diagnosis of cancer and sepsis, as well as some other novel potential applications.

Key words: marine medicine, albumin, cancer, diagnostic medicine, electron paramagnetic resonance spectroscopy, sepsis.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22328/2413-5747-2017-3-4-95-103>

Роль клинической лаборатории в ранней диагностике и мониторинге злокачественных новообразований (ЗН) претерпела огромные изменения в течение последних нескольких лет. Достижения в области геномики и протеомики привели к разработке и применению новых методов диагностики для выявления лиц из групп повышенного риска, у которых начался процесс малигнизации. Однако даже при таких усовершенствованиях методов диагностики и мониторинга ЗН в настоящее время наиболее действенные противоопухолевые стратегии лечения по-прежнему зависят от срока, на котором эти заболевания выявлены, и от тщательности мониторинга эффективности проводимой терапии [1–4].

Существуют различные подходы для диагностики и мониторинга ЗН. Одно из недавних предложений включает в себя использование широкого спектра существующих белков и продуктов их распада, которые могут иметь диагностическую или прогностическую ценность, в качестве опухолевых биомаркеров. Примером могут служить белки, продуцируемые непосредственно опухолью или тканями, окружающими опухоль. Секвестрация этих опухолевых пептидов белками-переносчиками, такими как альбумин, который присутствует в кровяном русле в высоких концентрациях (40–50 г/л) со средним временем жизни около 27 дней, защищает эти маркеры от катаболизма и значительно увеличивает их концентрацию в кровотоке. Пептиды, связанные с альбумином, являются богатым источником информации о биомаркерах, ассоциированных с опухолью [5]. Многочисленные исследования показали, что альбумин играет важную роль в изменении концентрации белков, продуцируемых опухолями [6, 7].

Измерение концентраций альбумина в сыворотке крови пациента является одним из наиболее распространенных тестов, проводимых в клинической лаборатории. Альбумин необходим для поддержания онкотического давления, а также является основным транспортным белком в сыворотке крови. Он служит носителем многих гормонов, метаболитов и экзогенно-вводимых препаратов. Кроме того, концентрацию альбумина в крови обычно измеряют в качестве средства оценки синтезирующей способности печени и для оценки нутритивного статуса [8, 9].

В дополнение к установленной роли альбумина в оценке различных патофизиологиче-

ских процессов, недавние исследования показывают, что связывающие свойства альбумина и способность этого белка функционировать в качестве антиоксиданта могут существенно изменяться в различных клинических условиях [10]. Уменьшение связывающей способности альбумина из-за изменений в структуре N-концевого домена альбумина после ишемии было использовано в разработке тестов для диагностики ишемии. Была продемонстрирована клиническая польза альбумина, модифицированного ишемией, как раннего маркера для оценки состояния пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) [11, 12]. Также альбумин может играть важную роль в диагностике и мониторинге пациентов с другими заболеваниями, в частности ЗН.

Становится все более очевидным, что альбумин играет важнейшую роль в изменении концентрации различных белков, продуцируемых опухолевыми клетками, в сыворотке пациента [7]. Хотя эти опухолевые белки сами по себе могут быть использованы как средство для идентификации наличия ЗН, другой подход, который может быть использован для идентификации активного злокачественного процесса, заключается в измерении структурных и функциональных изменений, которые происходят с альбумином после связывания альбумина с белками опухолевых клеток. Нековалентное связывание альбумина со спиновой меткой в сочетании со спектроскопией электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), является мощным инструментом для оценки структурных и функциональных изменений, которые происходят с альбумином после связывания различных лигандов. Эти изменения структуры и функциональности белка могут быть легко оценены путем измерения подвижности и доступности спиновых меток, связанных с альбумином. Жирная кислота (16-доксилстеариновая кислота), присоединенная к нитроксильному радикалу, является примером спиновой метки, которая может быть использована для ЭПР-спектроскопии альбумина (рис. 1) [13, 14]. ЭПР-спектры спиновых меток, связанных с различными доменами альбумина, дают информацию о конформации α -спиралей и β -структур, относительно положения этих белковых доменов друг к другу и изменениях четвертичной структуры белка [15, 16].

Метод ЭПР использует присущее альбумину свойство связывать жирные кислоты. Связыва-

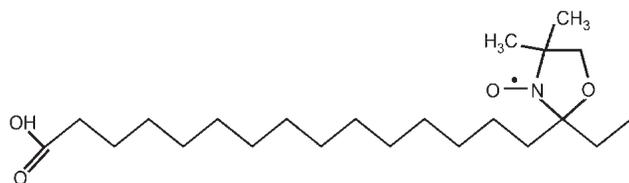


Рис. 1. Жирная кислота, меченная нитроксильным радикалом (16-доксилстеариновая кислота), используемая для мечения альбумина

ние жирных кислот, предварительно меченых нитроксильным радикалом, является основой для этой методики. Альбумин имеет несколько специфических центров связывания для жирных кислот с длинной углеводородной цепью, расположенных в разных доменах белка [17, 18]. Эти центры связывания обеспечивают чрезвычайно высокие константы связывания — приблизительно 10^8 моль⁻¹ [19]. Изменения подвижности, аффинности и распределения спиновой метки на молекуле альбумина позволяют оценить функциональные и структурные свойства белка. Сравнение подобных изменений у нормальных потенциально здоровых индивидов с изменениями, наблюдаемыми у пациентов с ЗН и некоторыми другими патологическими состояниями, выявило уникальные различия. Эти изменения могут быть легко оценены с помощью ЭПР-анализа, а различия, которые наблюдаются, обеспечивают точную дифференциацию между здоровыми пациентами и пациентами с ЗН.

Этот обзор знакомит читателя с методом ЭПР-спектроскопии сывороточного альбумина с использованием жирных кислот, меченных спиновым зондом, и демонстрирует применение этого перспективного метода для диагностики ЗН.

Обзор метода спектроскопии электронного парамагнитного резонанса. Методика ЭПР-спектроскопии имеет сходство со спектроскопией ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Однако ЯМР-спектроскопия основана на анализе ядерного спина, в то время как ЭПР-спектроскопия основана на анализе спина электрона. Сигнал ЯМР теоретически может возникнуть из любого ядра с ненулевым спином (т. е. соединений с неравным числом протонов и нейтронов). Однако только молекулы, содержащие неспаренные электроны, могут давать сигнал ЭПР.

Соединения, содержащие неспаренные электроны, вредны для органелл, поэтому меха-

низмы защиты эволюционировали так, чтобы ограничить концентрацию этих веществ в биологических системах. Отсутствие естественно возникающих неспаренных электронов в биологических системах можно преодолеть с помощью спиновых меток. Спиновая метка представляет собой органическую молекулу, которая обладает неспаренным электроном и способна связываться с другой молекулой.

Спектры ЭПР, которые генерируются из связанных с белком спиновых меток, могут нести большое количество информации об окружающей среде, в которой находится метка. Эта информация включает подвижность спиновой метки, прикрепленной к ее центру связывания, и сродство белка к спиновой метке. Кроме того, ЭПР-спектроскопия позволяет измерить дипольные взаимодействия между спиновыми метками, связанными с различными частями белка. Это дипольное взаимодействие позволяет рассчитать расстояния между метками спина. Поскольку сила дипольных взаимодействий обратно пропорциональна массе взаимодействующих частиц, дипольное взаимодействие между электронами намного больше по сравнению с дипольными взаимодействиями между протонами. Таким образом, ЭПР-спектроскопия позволяет проводить измерения на гораздо больших физических расстояниях по сравнению с ЯМР-спектроскопией [20]. Этот аспект ЭПР-спектроскопии позволяет точно измерять конформационные изменения больших молекул, таких как альбумин.

Образцы, содержащие спин-меченые белки, которые помещают в спектрометр ЭПР, подвергаются воздействию как сильного магнитного поля, так и микроволнового излучения. Высокое магнитное поле приводит к поляризации образца, вызывая расщепление уровней энергии для любого неспаренного электрона, что позволяет им адсорбировать квант микроволновой энергии. Ядра, окружающие электрон, индуцируют локальные магнитные поля, которые изменяют резонансный сигнал.

Аналитический метод

Методика ЭПР-спектроскопии с использованием нековалентных спиновых меток относительно проста и позволяет исследовать белки без изменения структуры нативного белка. Спиновые метки жирных кислот являются коммерчески доступными и могут быть использованы для изучения альбумина с помощью ЭПР-спектроскопии.

Маркировка альбумина

Процедура мечения альбумина спиновой меткой включает смешивание различных количеств спиновой метки жирной кислоты, то есть 16-доксилстеариновой кислоты, содержащей нитроксильный радикал, с небольшой аликвотой (50 мкл) сыворотки или плазмы. Отношение альбумина к жирной кислоте варьируется от 0,5 до 3,0 для предотвращения насыщения участков связывания жирных кислот альбумина. Спиновая метка стеариновой кислоты растворена в этаноле. Изменения связывающей способности альбумина со спиновой меткой опосредованы изменениями в гидрофобных взаимодействиях в области связывания жирных кислот путем смещения молекул воды в местах контакта жирных кислот с этанолом. После добавления спиновой метки к сыворотке или плазме полученную смесь инкубируют при постоянном перемешивании в течение 10 мин при 37° С. Общая процедура схематически описана на рис. 2.

Маркировка альбумина меткой стеариновой кислоты очень специфична для этого белка. Средство альбумина к 16-доксилстеариновой

подвергается воздействию сильного магнитного поля и мощного микроволнового излучения. Это вызывает резонанс спиновой метки и рассеивание микроволнового излучения. Спектр ЭПР генерируется последовательными сканирующими измерениями напряженности магнитного поля и рассеивания мощности СВЧ. Для получения этих измерений можно использовать любой обычный ЭПР-спектрометр с достаточным диапазоном, работающий на микроволновой частоте 9–10 ГГц. Важно, что в процессе измерения ЭПР-спектра образец выдерживают при 37° С для имитации физиологических температурных условий кровяного русла. Общее время, необходимое для получения измерений каждого капилляра, составляет приблизительно 3,5 мин.

Обработка данных

Спектр ЭПР, полученный с помощью спиновой метки, анализируется с использованием математического моделирования.

Спектр ЭПР состоит из большого массива данных — более 4000 точек. Специально для данного метода был разработан ряд различных протоколов расчетных параметров, позволяю-

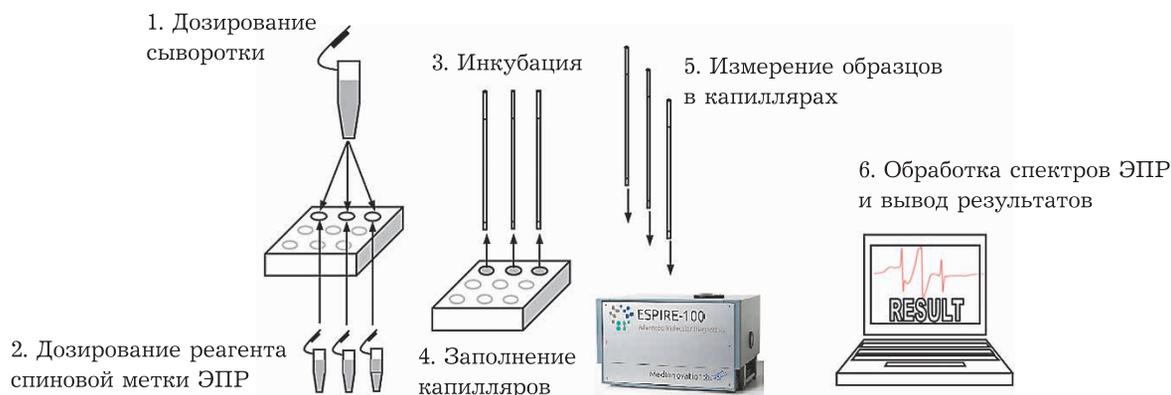


Рис. 2. Схема процедуры измерения параметров сывороточного альбумина методом ЭПР-спектроскопии

кислоте по существу идентично средству немеченой стеариновой кислоты [21]. Подавляющее, в сравнении с другими сывороточными белками, количество альбумина и наличие у него нескольких центров связывания с высоким сродством для длинноцепочечных жирных кислот приводит к тому, что более 99% спинового зонда стеариновой кислоты связывается исключительно с альбумином [19].

Анализаторы для ЭПР-спектроскопии

После инкубации спиновой метки с сывороточным альбумином образец помещают в стеклянный капилляр. Затем капилляр вставляют в ЭПР-спектрометр (MMS 01-08-XX, MedInnovation GmbH, Берлин, Германия), где образец

получить аппроксимированный модельный спектр для соединений, которые обладают более чем одним центром связывания спиновой метки [13, 22, 23].

Анализ ЭПР-спектра, получаемого от альбумина, связанного со спиновой меткой 16-доксилстеариновой кислоты, выявил четыре различных спектральных компонента. Основная часть спектра представлена двумя компонентами (рис. 3, линии В и С). Каждый из этих основных компонентов спектра получен из спиновой метки жирной кислоты, связанной с альбумином. Два оставшихся компонента получены из свободных или несвязанных жирных кислот, присутствующих в растворе. Несвязанные жир-

ные кислоты могут присутствовать в растворе в виде единичных молекул (рис. 3, линия D) или в виде мицелл жирных кислот (рис. 3, линия E). Процесс моделирования расчетных параметров спектра обеспечивает наилучшую аппроксимацию всех четырех компонентов. Эти параметры включают в себя интенсивность каждой спектральной составляющей, а также конкретные параметры ЭПР, определяющие положение, ширину и форму линий спектра.

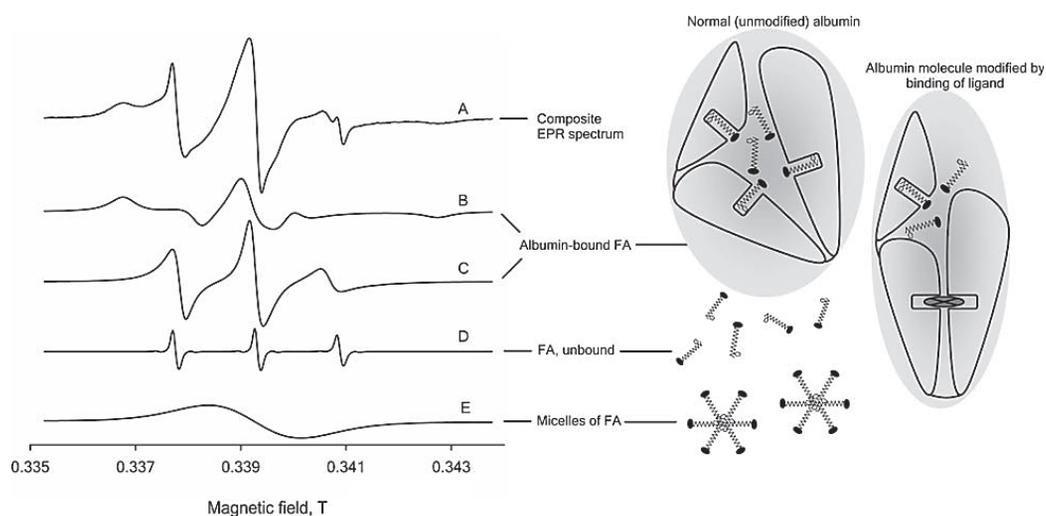


Рис. 3. Типичный суммарный ЭПР-спектр спиновой метки (спектр А). Спектр 16-доксилстеариновой кислоты (16 DS), связанной с первичными центрами связывания альбумина (спектр В). Спектр, соответствующий 16-DS, связанной со вторичными центрами связывания альбумина (спектр С). Спектр, соответствующий несвязанной 16-DS (спектр D). Спектр, соответствующий мицеллам несвязанной 16-DS (100-кратная фактическая измеренная интенсивность) (спектр E). FA — жирная кислота

Каждый спектр ЭПР отражает структурные и функциональные характеристики белка, которые влияют на связывание спиновой метки с альбумином. В методике, применяемой для построения спектров ЭПР, используются три аликвоты образца, которые различаются по концентрации спиновой метки. Кроме того, сила гидрофобных взаимодействий в смеси альбумин-спиновой метки варьируется с помощью различного количества этанола. Меняя концентрацию спиновой метки, добавляемой к альбумину, и изменяя ионную силу смеси спиновых меток, можно получать спектры ЭПР в разных условиях. Различия между спектрами ЭПР, которые получены при этих различных условиях концентрации спиновых меток и гидрофобной силы, позволяют оценить изменения структуры и функции альбумина в результате связывания с различными типами лигандов. Характеристики альбумина, которые можно оценить по полученным спектрам ЭПР, включают:

1) Оценку констант связывания жирных кислот. Этот параметр можно оценить, измеряя концентрацию связанной и несвязанной спиновой метки [24, 25].

2) Оценку изменений конформации белка в месте связывания альбумина с жирными кислотами. Определенные параметры спектра ЭПР указывают на подвижность спиновой метки жирной кислоты в месте ее связывания с альбумином. На подвижность спиновой метки

в участке связывания влияют несколько параметров, но основным фактором являются конформационные изменения, которые произошли с самой молекулой альбумина [26–28].

Спектроскопический анализ альбумина ЭПР у пациентов с ЗН

Ранние исследования с помощью ЭПР-спектроскопии выявили изменения конформационной гибкости альбумина у пациентов с раком легкого [29, 30]. Изучались конформационные изменения альбумина после добавления спиновой метки жирной кислоты с изменяющимся значением pH среды для инкубации. В данных исследованиях наблюдались отчетливые изменения спектров ЭПР между пациентами, проходящими курс лечения от рака легкого, и здоровыми контрольными группами. Альбумин у пациентов с раком легкого продемонстрировал значительно меньшую конформационную гибкость по сравнению с альбумином у контрольных пациентов. Было сделано предполо-

жение, что потеря конформационной гибкости может быть результатом посттрансляционной модификации альбумина ферментами и другими лигандами, происходящими из опухолевых клеток. Например, модификация альбумина гомоцистеином (Hcy) тиолактоном приводит к образованию N-Hcy-альбумина, который ограничивает структурные переходы белка [31].

Другое исследование, посвященное пациентам с широким спектром различных типов ЗН, показало, что спектральный анализ ЭПР выявляет уникальные изменения у больных с ЗН по сравнению со здоровыми индивидуумами [32]. Это исследование показало, что информационная ценность ЭПР-спектроскопии альбумина превышала ценность информации, полученной с использованием традиционных опухолевых маркеров, таких как СЕА и СА 19-9. Кроме того, спектроскопия ЭПР обеспечивала дополнительное диагностическое значение в сочетании с результатами измерений СЕА или СА 19-9.

Исследования пациентов с опухолью толстой кишки, легких, груди, предстательной железы и ряда других тканей продемонстрировали значительные изменения спектров ЭПР у больных ЗН по сравнению со здоровыми людьми и с людьми с различными хроническими заболеваниями. Эти изменения были очевидны даже после визуального сравнения полученных спектров (рис. 4). Различия в спектрах ЭПР были подтверждены анализом индивидуальных параметров ЭПР, таких как интенсивность и ширина спектральных линий, которые соответствуют различным центрам связывания жирных кислот на альбумине. Эти спектральные параметры при анализе с использованием нейронной сети правильно классифицировали пациентов с ЗН с чувствительностью 91,7% и специфичностью 92,9%. Таким образом, количественный анализ спектров ЭПР с помощью моделирования позволил правильно диагностировать ЗН у более чем 90% пациентов.

В более поздней публикации Kazmierczak и соавт. [14] оценивали спектры ЭПР альбумина из образцов, полученных из популяции здоровых доноров ($ns=349$), пациентов с широким спектром гематологических и негематологических злокачественных заболеваний ($ns=135$) и пациентов с широким спектром хронических заболеваний, таких как желудочно-кишечные и легочные заболевания, диабет

и цирроз ($ns=91$). Эти три группы были сопоставлены по возрасту и полу. Диагностическая чувствительность и специфичность теста ЭПР для дифференцирования здоровых лиц от онкологических больных составила 91,4% и 95,7% соответственно. Диагностическая чувствительность и специфичность этого теста для дифференциации пациентов с раком от пациентов с хроническим заболеванием составила 87,4% и 85,7% соответственно.

В этих же исследованиях также оценили прогностическую полезность ЭПР-спектроскопии альбумина у больных с ЗН, контролируя последовательные изменения в спектре ЭПР альбумина у нескольких пациентов, которые предоставляли материал для исследования в течение их болезни. Они обнаружили, что изменения в значении DR очень хорошо коррелируют с клиническим состоянием пациента. Ремиссия после резекции опухоли или химиотерапии сопровождалась восстановлением функциональности альбумина с соответствующим

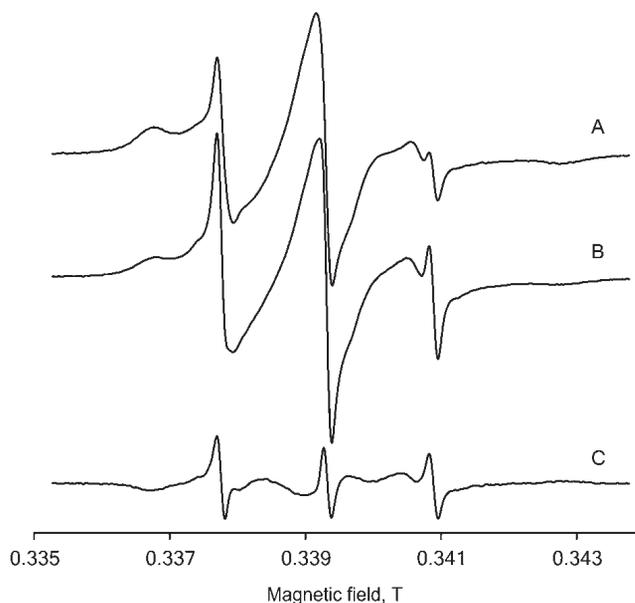


Рис. 4. Спектры ЭПР альбумина, меченного спиновой меткой жирной кислотой у 45-летнего здорового мужчины (А), 55-летнего мужчины с раком предстательной железы (В) и арифметической разницы между двумя спектрами (С)

щим увеличением диагностического результата (DR). У пациентов, у которых терапевтическое вмешательство было безуспешным или заболевание демонстрировало постоянное прогрессирование, значение DR либо оставалось постоянным, либо показывало снижение значений.

Точность спектроскопического анализа ЭПР оценивалась путем повторных измерений образцов в течение нескольких дней. Было определено, что погрешность воспроизводимости и сравнимости анализа (% коэффициента вариации, % CV) составляет приблизительно 3% и 6% соответственно.

Другие медицинские применения ЭПР-спектроскопии альбумина

Контроль качества плазмы

ЭПР-спектроскопия была также применена для исследования изменений связывающей и транспортной функции альбумина, которая происходит после плазмафереза и фильтрации вводимых плазменных продуктов [24]. В этих исследованиях использовали спектроскопический анализ альбумина методом ЭПР для оценки параметра, который был определен как транспортная эффективность альбумина. Эффективность транспорта рассчитывали из аффинности альбумина к спиновой метке на разных участках связывания жирных кислот, а также из гибкости спиновой метки в ее центрах связывания. Эффективность транспорта является общей мерой активности альбумина с точки зрения его способности связывать, транспортировать и выгружать лиганд в органе-мишени. Результаты ясно показывают, что эффективность транспорта альбумина значительно снижается на 43–54% после плазмафереза и на 43–65% после фильтрации вводимой плазмы. Исследователи считают, что конформация альбумина и эффективность связывания жирных кислот меняется из-за связывания альбумина со стабилизаторами, которые используются при этих процедурах.

Сепсис и синдром системного воспаления

Снижение концентрации сывороточного альбумина является хорошо известной особенностью сепсиса. Концентрация сывороточного альбумина обратно пропорциональна заболеваемости и смертности у пациентов, страдающих тяжелым сепсисом. Сепсис и несептическое системное воспаление характеризуются повышенным высвобождением медиаторов воспаления, таких как интерлейкины, и увеличением обновления клеток, что приводит к образованию различных метаболитических отходов. Эти метаболитические отходы связываются альбумином для транспорта и элиминации. Нарушение функции печени у пациентов с сепсисом может привести к дальнейшему увеличению метаболитических отходов, которые могут изме-

нить способность альбумина связывать лиганды. Исследование пациентов с циррозом печени показали медианное снижение способности альбумина связывать лиганд на 36%, по сравнению с контрольной группой здоровых пациентов [32, 33]. Образцы были получены от всех пациентов в течение 12 часов после поступления в отделение интенсивной терапии. Эффективность связывания альбумина, измеренная с помощью ЭПР-спектроскопии, показала отличную корреляцию со статусом болезни (рис. 5). Использование анализа рабочих характеристик показало, что ЭПР-спектроскопия эффективности связывания альбумина позволяет дифференцировать пациентов с сеп-

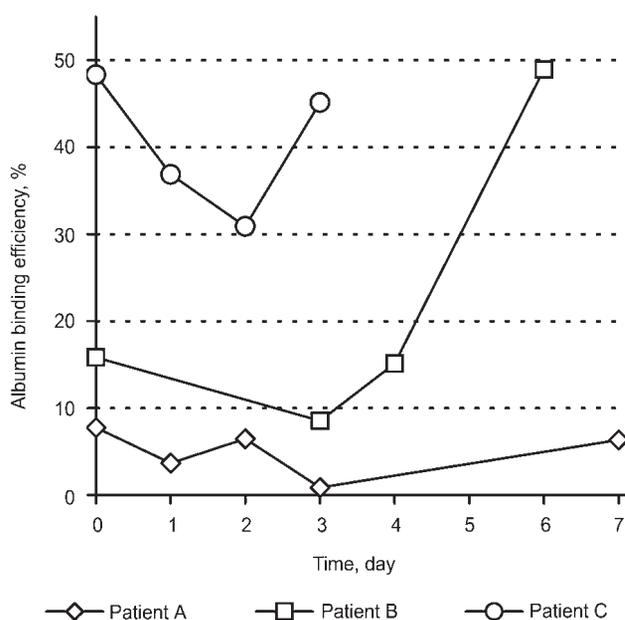


Рис. 5. Эффективность связывания альбумина, оцениваемая с помощью ЭПР-спектроскопии, у пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии (ОИТ). (А) Больной с лимфомой и септическим шоком, острой дыхательной недостаточностью и острой почечной недостаточностью. Пациент умер на 7-й день после поступления в отделение интенсивной терапии. (В) Пациент, поступивший в ОИТ с сепсисом и печеночной недостаточностью, с успешной терапией антибиотиками. (С) Пациент с частично компенсированной дыхательной недостаточностью, успешно выписанный из отделения интенсивной терапии на 4-й день

сисом от пациентов с несептическим системным воспалением с диагностической эффективностью 75%. Результаты спектроскопических измерений эффективности связывания альбу-

мина отдельно или в сочетании с другими биохимическими маркерами, такими как прокальцитонин, С-реактивный белок или интерлейкины, могут способствовать лучшей оценке и мониторингу лечения этих пациентов.

Выводы

Недавние исследования показывают, что альбумин играет более значительную роль в диагностике и мониторинге ряда заболеваний, чем считалось ранее. Изменения, происходящие с конформацией альбумина и его связывающей эффективностью в результате различных патофизиологических процессов, дают уникальное понимание важной роли, которую альбумин играет в ходе некоторых заболеваний.

ЭПР-спектроскопия альбумина имеет ряд преимуществ по сравнению с другими лабораторными методами ранней диагностики. Основным преимуществом являются более высокие аналитические характеристики в сравнении с традиционными онкологическими маркерами. Вторым преимуществом является простота и универсальность метода. Обилие альбумина в крови и важная роль, которую этот белок иг-

рает в связывании и переносе широкого спектра соединений, предоставляет уникальную возможность для лабораторной оценки процессов различных заболеваний.

На сегодняшний день метод ЭПР активно применяется по всему миру для диагностики ЗН у пациентов, находящихся в группах высокого риска возникновения ЗН, для мониторинга пациентов с ЗН, находящихся на лечении (медикаментозном, лучевом или операционном) и для наблюдения за ранее излеченными пациентами с целью отслеживания начала развития рецидивов. Также метод применяется для диагностики септических осложнений в условиях интенсивной терапии.

Однако ввиду того, что альбумин является универсальным транспортным белком кровяного русла, ученые полагают, что потенциальные области применения ЭПР-спектроскопии может быть существенно шире. Проводятся масштабные исследования по применению метода ЭПР для диагностики атеросклероза, инфекционных заболеваний и других патологических состояний организма пациентов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Etzioni R., Urban S., Ramsey M., McIntosh S., Schwartz B., Reid J. et al. The case for early detection. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, Vol. 3, pp. 243–252.
2. Villanueva D.R., Shaffer J., Philip C.A., Chaparro H., Erdjument-Bromage A.B., Olshen M. et al. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *J. Clin. Invest.* 2006, Vol. 116, pp. 271–284.
3. Johann D.J.Jr, McGuigan M.D., Patel A.R., Tomov S., Ross S., Conrads T.P. et al. Clinical proteomics and biomarker discovery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2004, Vol. 1022, pp. 295–305.
4. Liu H., Sadygov R.G., Yates J.R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal. Chem.*, 2004, Vol. 76, pp. 4193–4201.
5. Dennis M.S., Zhang M., Meng Y.G., Kadkhodayan D., Kirchofer D., Combs D. et al. Albumin binding as a general strategy for improving pharmacokinetics of proteins. *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, pp. 35035–35043.
6. Lowenthal M.S., Mehta A.I., Frogale K., Bandle R.W., Araujo R.P., Hood B.L. et al. Analysis of albumin-associated peptides and proteins from ovarian cancer patients. *Clin. Chem.*, 2005, Vol. 51, pp. 1933–1945.
7. Mehta A.I., Ross S., Lowenthal M.S., Fusaro V., Fishman D.A., Petricoin E.F. et al. Biomarker amplification by serum carrier protein binding. *Dis. Markers.*, 2003, Vol. 19, pp. 1–10.
8. Hasan K., Hassan F., Michelis R. The relationship between oxidized serum albumin and blood pressure in hypoalbuminemic peritoneal dialysis patients. *Clin. Exp. Hypertens*, 2017, Vol. 39(5), pp. 416–420.
9. Meyer C.P., Rios-Diaz A.J., Dalela D., Ravi P., Sood A., Hanske J., Chun F.K.H., Kibel A.S., Lipsitz S.R., Sun M., Trinh Q.D. The association of hypoalbuminemia with early perioperative outcomes — A comprehensive assessment across 16 major procedures. *Am. J. Surg.*, 2017, Nov., Vol. 214 (5), pp. 871–883.
10. Oettl K., Stauber R.E. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br. J. Pharmacol.*, 2007, Vol. 151, pp. 580–590.
11. Bar-Or D., Winkler J.V., Vanbenthuyzen K., Harris L., Lau E., Hetzel F.W. Reduced albumin-cobalt binding with transient myocardial ischemia after elective percutaneous transluminal coronary angioplasty: a preliminary comparison to creatine kinase-MB, myoglobin, and troponin I. *Am. Heart J.*, 2001, Vol. 141, pp. 985–991.
12. Apple F.S., Wu A.H., Mair J., Ravkilde J., Panteghini M., Tate J. et al. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. *Clin. Chem.*, 2005, Vol. 51, pp. 810–824.

13. Gurachevsky A., Shimanovitch E., Gurachevskaya T., Muravsky V. Intra-albumin migration of bound fatty acid probed by spin label ESR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, Vol. 360, pp. 852–856.
14. Kazmierczak S.C., 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, Vol. 52, pp. 2129–2134.
15. Livshits V.A., Marsh D. Fatty acid binding sites of serum albumin probed by non-linear spin-label EPR. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, Vol. 1466, pp. 350–360.
16. Hubbell W.L., Cafiso D.S., Altenbach C. Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. *Nat. Struct. Biol.*, 2000, Vol. 7, pp. 735–739.
17. Curry S., Mandelkow H., Brick P., Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat. Struct. Biol.* 1998. Vol. 5. P. 827–835.
18. Moman R.N., Bhimji S.S. Albumin. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2017, Jun, Vol. 2017, Oct 6.
19. Peters T. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. *San Diego, CA: Academic Press*, 1996.
20. Levitt M.H. Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance. *Chichester: John Wiley & Sons*, 2001.
21. Perkins R.C.Jr, Abumrad N., Balasubramanian K., Dalton L.R., Beth A.H., Park J.H. et al. Equilibrium binding of albumin in human blood plasma. *Eur. J. Biochem.*, 1990, Vol. 189, pp. 343–349.
22. Strancar J. EPRSIM-C: a spectral analysis package. http://www.ijc.si/ijc/dept/epr/EPRSIMC_overview.htm. Accessed March 12, 2008.
23. Stoll S., Schweiger A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson.*, 2006, Vol. 178, pp. 42–55.
24. Matthes G., Seibt G., Muravsky V., Hersmann G., Dornheim G. Albumin transport analysis of different collected and processed plasma products by electron spin resonance spectroscopy. *Transfus. Apher. Sci.*, 2002, Vol. 27, pp. 129–135.
25. Muravskaya E.V., Lapko A.G., Muravskii V.A. Modification of transport function of plasma albumin during atherosclerosis and diabetes mellitus. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2003, Vol. 135, pp. 433–435.
26. Gurachevsky A., Muravsky V., Matthes G. Changes in serum albumin measured by electron spin resonance: in vitro diagnostic EPR test. *Proc. Int. Soc. Magn. Reson. Med.*, 2007, Vol. 15, pp. 13–23.
27. Muravsky V., Gurachevsky A., Matthes G. Disease specific albumin patterns defined by electron spin resonance. *Tumor Biol.*, 2007, Vol. 28 (Suppl. 1), p. 19.
28. 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, Vol. 25, pp. 378–383.
29. Javrid E., Mashevsky A., Muravsky V., Prokchorova V., Korotkevich E., Milutin A. A comparative study of conformation properties of human serum albumin in lung cancer by spin probe technique. *Ann. Oncol.*, 1994, Vol. 5 (Suppl. 8), p. 9.
30. Mashevsky A., Muravsky V., Prokchorova V., Milutin A. Comparative investigation of long chain fatty acid binding sites of normal serum albumin with the one from lung cancer patients carried out by the spin probe method. *Grizunov J., Dobretsov E., eds. Blood serum albumin in clinical medicine. Moscow: IRUS*, 1994.
31. Glowacki R., Jakubowski H. Cross-talk between Cys34 and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, pp. 10864–10871.
32. Gurachevsky A., Kazmierczak S.C., Jorres A., Muravsky V. Application of spin label electron paramagnetic resonance in the diagnosis and prognosis of cancer and sepsis. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2008, Vol. 46 (9), pp. 1203–1210.
33. Klammt S., Mitzner S., Stange J., Brinkmann B., Drewelo B., Emmrich J. et al. Albumin-binding function is reduced in patients with decompensated cirrhosis and correlates inversely with severity of liver disease assessed by model for end-stage liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2007, Vol. 19, pp. 257–263.

Поступила в редакцию: 27.11.2017 г.

Контакт: *Дмитриев Петр Николаевич*, p.dmitriev@medinnovation.de

Сведения об авторах:

Schnurr Kerstin — Medical Doctor (MD), Head of R&D team Medinnovation GmbH, Berlin, Germany. Groß-Berliner Damm. 1516-12487 Berlin; tel.: (+49) 30-720-126-31; e-mail: k.schnurr@medinnovation.de;

Waterstradt Katja — PhD, Head of laboratory Medinnovation GmbH, Berlin, Germany. Groß-Berliner Damm. 1516-12487, Berlin; tel.: (+49) 30-720-126-31; e-mail: k.waterstradt@medinnovation.de;

Matthes Gert — Medical doctor (MD), Head of transfusion Department, Institute of Transfusion Medicine, University Hospital Leipzig, Germany; e-mail: gert.matthes@yahoo.de;

Дмитриев Петр Николаевич — генеральный директор ООО «ЭПП Технологии»; 121552, Москва, Островная ул., д. 2, офис 226; тел.: +7 (495) 234-52-47; e-mail: p.dmitriev@medinnovation.de