

РАЗРАБОТКА НОВЫХ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К ПРОБЛЕМЕ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВОЗМОЖНОСТЕЙ МЕТОДОВ МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА В ИССЛЕДОВАНИИ СВОЙСТВ МОЛЕКУЛ АЛЬБУМИНА

Т. Н. Николаева, Ю. А. Фатрахманова, А. Ш. Гиззатуллина, В. Д. Скирда
Казанский (Приволжский) федеральный университет
г. Казань

Анализ статистических данных Всемирной Организации Здравоохранения за последние годы свидетельствует о нарастании заболеваемости населения Земного шара различными формами рака. В связи с этим любые исследования, прямо или косвенно связанные с этой проблемой, следует считать актуальными. Очевидно, что в поисках подходов к разработке методов ранней диагностики следует обращать внимание на возможности применения этих методов в широкой практике. В связи с этим существует необходимость поиска такого скринингового теста на онкологические заболевания, который позволил бы проводить быстрое и массовое обследование людей. Совершенно очевидно, что в качестве первого кандидата на объект исследования является кровь, так как кровь может нести информацию об онкологическом процессе в организме. Так, известно, что в крови онкологических пациентов могут быть обнаружены как сами раковые клетки, так и продукты их метаболизма - онкомаркеры. Также существует гипотеза, что при онкологических заболеваниях определенным образом изменяется способность сывороточного белка альбумина связывать некоторые субстраты. Кровь онкологических пациентов может содержать также специфические раковые антитела. Таким образом, кровь может нести информацию об онкологическом процессе в организме. Кровь является сложным многокомпонентным объектом, поэтому вместо цельной крови часто объектом исследования является сыворотка крови или плазма. В частности, экспериментально показано, что магнитно-резонансные характеристики плазмы крови больных различными онкологическими заболеваниями отличаются от соответствующих характеристик плазмы крови здоровых доноров.

Еще в 1985 году в сыворотке крови больных онкологическими заболеваниями впервые был обнаружен уникальный ком-

плекс, содержащий липиды, белки и РНК. Он получил название комплекс РНК-протеолипид. На основе тестирования плазмы крови на содержание в ней комплекса РНК-протеолипид предложены методики ранней диагностики. Не смотря на успешность этих исследований их результаты пока не нашли широкого применения, возможно, в связи с трудоемкостью процедуры выделения упомянутого комплекса из плазмы крови.

В ряде работ разрабатывается альтернативный подход, основанный на гипотезе о том, что при онкологическом заболевании может блокироваться способность сывороточного белка альбумина к изменению своей конформации. На основе использования упомянутого эффекта относительно недавно предложен метод диагностики онкологических заболеваний, в котором конформационный набор молекул альбумина предлагается тестировать путем добавления в плазму крови специальной парамагнитной спиновой метки (16-доксилстеариновая кислота). Другими словами предполагается, что в результате взаимодействия альбумина с молекулами 16-доксилстеариновой кислоты (16-ДСК) последние либо сами приобретают некую специфичную конформацию, либо экранируются соответствующим образом так, что их состояние начинает соответствовать состоянию молекул альбумина. Состояние спиновой метки, сигнализирующее о конформации молекул белка альбумина, регистрируется методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Вывод о наличии заболевания (диагноз) делают на основе сравнения спектра ЭПР образца, приготовленного из плазмы крови тестируемого пациента, с контрольным спектром, вид которого установлен предварительно исследованиями плазмы крови контрольной группы здоровых людей.

Для количественной оценки разницы спектров ЭПР сыворотки крови вводят пара-

метр DR (discriminant variable), полученный с использованием дискриминантного анализа.

Анализ литературных данных показывает, что параметр DR, вычисляемый из результатов обработки спектров ЭПР, характеризуется очень большой дисперсией. Это обстоятельство не позволяет данную методику использовать в клинической практике, так как в результате ее применения не могут быть достигнуты необходимые значения чувствительности и онкоспецифичности. Поскольку молекула 16-доксилстеариновой кислоты парамагнитна, то можно предположить, что ее состояние может быть протестировано не только на основании анализа спектра ЭПР, но и по более простому признаку - влиянию на спин-решеточную релаксацию протонов плазмы крови.

На основе вышеизложенного, **целью данного проекта** является детальное исследование методами магнитного резонанса (ЯМР и ЭПР) свойств молекул альбумина и условий их взаимодействия с молекулами 16-доксилстеариновой кислоты, в том числе, при наличии в плазме крови онкоспецифических метаболитов или их аналогов. Альбумины в данном случае представляют большой интерес, поскольку их количество составляет ~ 50 % по массе (рисунок 1). Но в первую очередь пристальное внимание к альбумину как кандидату на роль маркера онкологического процесса обусловлено его уникальными свойствами и функциями, осуществляемыми в организме.

Основная роль альбумина – участие в поддержании онкотического давления плазмы и объема циркулирующей крови, а также транспорт и депонирование различных веществ. Период полураспада альбумина в крови составляет 18-20 дней. Он связывает неполярные вещества, такие как билирубин и жирные кислоты, холестерин, является переносчиком ряда гормонов. Около 40% кальция плазмы обратимо связывается с альбумином, находясь в подвижном равновесии с физиологически активным ионизированным кальцием плазмы.

Как говорилось выше, при онкологических заболеваниях в кровь могут попадать вещества, выделяемые опухолевыми клетками. В большинстве своем эти вещества имеют низкую молекулярную массу и поэтому отфильтровываются в почках и выводятся из организма (в почках отфильтровываются все вещества молекулярной массой меньше 60 кДа). По этой причине концентрация таких веществ в крови не достигает необходимой

величины для уверенного определения лабораторными методами. Альбумин не фильтруется в почках (не попадают в мочу), способен связывать низкомолекулярные соединения и, защищая их от выделения через почки, увеличивать их время жизни в кровотоке (до 58 раз). При онкологических заболеваниях происходит интеграция молекулы альбумина с некоторыми опухолевыми метаболитами, причем общая концентрация альбумина сыворотки остается в основном неизменной. Такая интеграция вызывает конформационную перестройку молекулы альбумина, вследствие чего изменяется способность других сайтов связывания альбумина к связыванию веществ различной природы. Таким образом, исследование способности альбумина связываться с различными веществами может дать информацию о наличии или отсутствии в организме онкологического заболевания.

Полученные результаты.

При сравнительном анализе данных по временам спин-решеточной релаксации протонов плазмы крови и концентрации сывороточного альбумина корреляции между ними не наблюдается (рисунок 1).

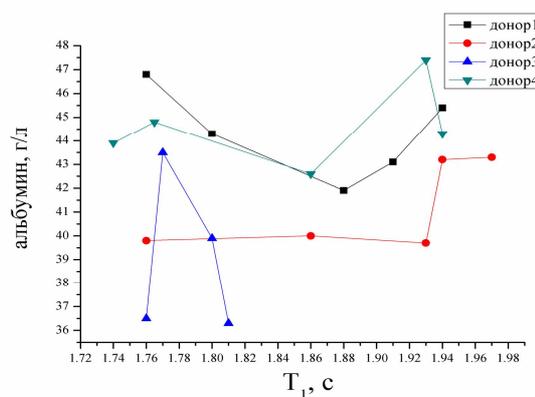


Рисунок 1 – Распределение значений альбумина (г/л) и значений времени T_1 (сек)

Необходимо отметить, что при работе с биологическими объектами возникает ряд сложностей, связанных с их сложностью и многокомпонентностью. Также немаловажным является и то обстоятельство, что, как правило, исследуемые биологические объекты, в том числе и плазма крови, содержат большое количество воды. В связи с этим может возникнуть проблема взаимодействия молекул парамагнитных меток с водной компонентой исследуемого биологического объекта. Так, в силу амфифильной природы 16-доксил стеариновая кислота не растворяется

РАЗРАБОТКА НОВЫХ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К ПРОБЛЕМЕ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВОЗМОЖНОСТЕЙ МЕТОДОВ МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА В ИССЛЕДОВАНИИ СВОЙСТВ МОЛЕКУЛ АЛЬБУМИНА

в воде. В связи с этим в большинстве опубликованных работ, избегая проблемы нерастворения 16-ДСК в водных растворах, предварительно растворяют ее в этиловом спирте или в диметилсульфоксиде (ДМСО).

С другой стороны, при исследовании взаимодействия молекул 16-ДСК с компонентами плазмы крови неминуемо возникает проблема исследования влияния самого спирта на характеристики системы. В конечном счете, неясно и то, какой компонент системы (16-ДСК или спирт?) будет оказывать доминирующее влияние на скорость спин-решеточной релаксации тройной системы плазма/16-ДСК/спирт?

В контексте вышесказанного проведены соответствующие исследования. На основе полученных экспериментальных данных показано, что доминирующее влияние на скорость спин-решеточной релаксации тройной системы плазма/16-ДСК/спирт оказывает парамагнитная метка – 16-доксилстеариновая кислота.

Кроме того, на основе исследования модельной молекулярной системы буфер/альбумин/16-ДСК/спирт и системы плазма/16-ДСК/спирт получены предварительные экспериментальные данные (рис.2), не противоречащие основной гипотезе о том, что в плазме крови молекула 16 ДСК взаимодействует, прежде всего, с сывороточным белком – альбумином.

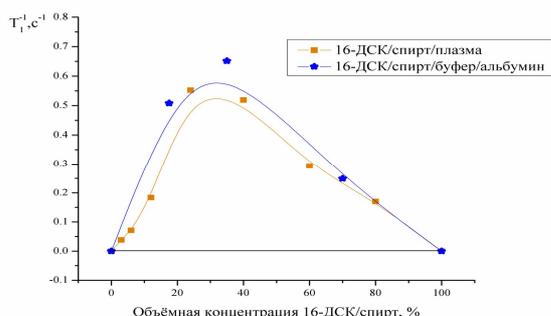


Рисунок 2 – Зависимости величины неаддитивного вклада в среднюю скорость спин-решеточной релаксации протонов молекул в смесях плазма/раствор 16-ДСК в спирте и буфер/альбумин/раствор 16-ДСК в спирте от состава смеси. Концентрация 16-ДСК в спирте составила 2 г/л. Концентрация альбумина в буфере составила 40 г/л. Температура измерения $+37^{\circ}C$

Ожидаемые результаты.

Закономерности, определяющие взаимосвязи между временами спин-решеточной релаксации протонов плазмы крови и соотношениями (весовыми или молярными) основных компонент (вода, альбумин, 16-ДСК, спирт и др.) системы.

Анализ указанных закономерностей и заключение о возможности разработки на их основе методики ранней диагностики онкологических заболеваний.

Экономическая эффективность: Снижение уровня смертности от онкологических заболеваний. Снижение расходов на лечение онкологических больных.

План коммерциализации полученных результатов:

Этап 1. Подготовка систем, оборудования для проведения исследования (ноябрь 2010г.- декабрь 2010г.).

Этап 2. Организация и проведение экспериментов, направленных на получение закономерностей, определяющие взаимосвязи между временами спин-решеточной релаксации протонов плазмы крови и соотношениями (весовыми или молярными) основных компонент (вода, альбумин, 16-ДСК, спирт и др.) системы. (январь 2011г.-декабрь 2011г.)

Этап 3. Выработка заключения о возможности разработки на основе полученных данных эффективной методики ранней диагностики онкологических заболеваний. Оформление интеллектуальной собственности. Подготовка предложений для потенциальных партнеров и разработка аппаратного сопровождения предлагаемой методики в рамках плана работ ООО НПП «Центр инновационных разработок и технологий в области градиентного ЯМР» (январь 2012г. – декабрь 2012г.)

Этап 4. Проведение клинических испытаний. Подготовка документов для лицензирования методики и ее внедрение. (с января 2013 года)

Публикация: Влияние парамагнитной метки (16-доксил стеариновая кислота) на скорость спин-решеточной релаксации протонов плазмы крови