



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **44235** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61B 5/145МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ АУТОІМУННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ**

1

2

(21) u200903903

(22) 21.04.2009

(24) 25.09.2009

(46) 25.09.2009, Бюл.№ 18, 2009 р.

(72) ВОЛОШИН ПЕТРО ВЛАСОВИЧ, ВОЛОШИНА
НАТАЛІЯ ПЕТРІВНА, ЛЕКОМЦЕВА ЄВГЕНІЯ ВО-
ЛОДИМИРІВНА, ЄГОРКІНА ОЛЬГА ВІКТОРІВНА,
ГАПОНОВ ІВАН КОСТЯНТИНОВИЧ, ГОРБАЧ ТЕ-
ТЯНА ВІКТОРІВНА, ГУБІНА-ВАКУЛИК ГАЛИНА
ІВАНІВНА(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ НЕВРО-
ЛОГІЇ, ПСИХІАТРІЇ ТА НАРКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ"(57) Спосіб діагностики аутоімунних захворювань
нервової системи за даними вмісту теплового тау
білка в сироватці крові, який **відрізняється** тим,
що використовують імунофлюоресцентний метод,
де визначення рівня тау білка здійснюють в іму-
нофлюоресцентній реакції з використанням пер-
винних та вторинних мишачих моноклональних
антитіл.

Корисна модель належить до галузі медицини,
а саме до неврології, психіатрії і медичної біохімії,
та може бути застосована для діагностики аутоі-
мунних захворювань нервової системи.

Аутоімунні демієлінізуючі захворювання нер-
вової системи є найбільш актуальною проблемою
сучасної клінічної неврології і однією з основних
причин інвалідизації та смертності населення
України. Велике медико-соціальне значення цієї
проблеми обумовлено насамперед їх суттєвою
долею у структурі захворюваності та смертності
населення, так, розповсюдженість на розсіяний
склероз, який посідає провідне місце серед за інші
демієлінізуючі розлади, у 2008р. по Україні скла-
дала приблизно 49.0 на 100 тис. нас., а захворю-
ваність - 3.2 на 100тис. нас.

На сьогодні актуальною і складною пробле-
мою нейроімунології та практичної неврології є
діагностика хворих на демієлінізуючі захворюван-
ня центральної нервової системи. Біля 30-40%
випадків аутоімунних демієлінізуючих захворю-
вань дебютують різноманітними больовими та
чутливим порушеннями і своєчасна діагностика у
таких хворих значно запізнюється, що зменшує
ефективність їх подальшого лікування. Тому ви-
значення вмісту аутоантитіл, біомаркерів поразки
нейронних мембран дозволить вирішити питання
ранньої та своєчасної діагностики аутоімунних
розладів, знизити відсоток інвалідизації та покра-
щити якість життя таких хворих (Vincent A., Lang
B., Kleopa K.A. Autoimmune channelopathies and
related neurological disorders // Neuron. - 2006. - Vol.
52. - P. 123-138).

Тау білок є асоційований з мікротьюбулами
протеїн, що утримується в аксонах нейронів, при-

ймає участь у нейрональному спраутінігу і прове-
дженню потенціалу дії. Проблема діагностики ауто-
імунних захворювань нервової системи з
використанням специфічних біомаркерів нейронів
активно розробляється як зарубіжними, так й віт-
чизняними дослідниками, де, насамперед, значна
увага приділяється визначенню у лікворі рівню
теплового тау білку та аутоантитіл (Samarasekera
S.R., Vincent A., Welch J.L., Jackson M., Nichols P.,
Griffiths T.D. The course and outcome of acute limbic
encephalitis with negative voltage-gated potassium
channel autoantibodies // J. Neurol. Neurosurg.
Psychiatry. - 2006. - P. 93-96.).

За прототип корисної моделі правлять факти
збільшення концентрації теплового тау білку в
лікворі та крові хворих на аутоімунні демієлінізуючі
захворювання нервової системи, що вимірюване
імуноферментним методом (Karak E. et all.
Increased cerebrospinal fluid tau protein in multiple
sclerosis // Eur. Neurol. - 2000. - Vol. 43 (4). - P. 228-
232). Серед недоліків прототипу звертає на себе
увагу низька специфічність методу, складна мето-
дика виконання, наявність у складі методики не-
безпечних для здоров'я реактивів та відсутність
візуалізації отриманих даних.

В основу корисної моделі поставлено задачу
вдосконалення способу діагностики аутоімунних
захворювань нервової системи шляхом вивчення
вмісту теплового тау білку в сироватці крові іму-
нофлюоресцентним методом з використанням
первинних й вторинних моноклональних антитіл,
що забезпечить підвищення специфічності та од-
нозначності й чутливості способу діагностики
(Higuchi M., Trojanowski J., Lee V. Tau protein and

(13) **U**(11) **44235**(19) **UA**

Taupathy / Tau positive filamentous lesions in neurodegenerative diseases, 2000. - 332p.).

Суть корисної моделі полягає в тому, що у хворих на аутоімунні захворювання вивчається вміст тау білку імунофлюоресцентним методом з використанням первинних та вторинних моноклональних антитіл порівняно з даними контрольної групи здорових осіб та неврологічним контролем.

Задача, яку покладено в основу корисної моделі, вирішується тим, що у відомому способі діагностики аутоімунних захворювань нервової системи в сироватці крові хворих на аутоімунні захворювання вивчається вміст тау білку імунофлюоресцентним методом з використанням первинних й вторинних моноклональних мишачих антитіл порівняно з даними контрольної групи здорових осіб та неврологічним контролем хворих на епілепсію. Імунофлюоресцентний метод дає змогу виявлення субклітинного компонента за допомогою імунологічної флюоресцентної реакції, цей метод відзначається високою специфічністю та чутливістю, та ґрунтується на конкурентному зв'язуванні моноклональних антитіл, які є специфічними до різних епітопів IgG та IgM дослідних високоглобулярних молекул тау протеїну. За умов імунофлюоресцентної реакції з первинними і вторинними моноклональними антитілами було продемонстровано значне збільшення рівню тау білку в сироватці крові хворих на аутоімунні запальні захворювання нервової системи, на відміну від зниження цього показника у хворих неврологічного контролю та здорових осіб. Таким чином, застосування корисної моделі у клініці за допомогою імунофлюоресцентного дослідження надасть можливість ранньої та адекватної діагностики аутоімунних захворювань нервової системи.

Спосіб діагностики здійснюється таким чином.

У пацієнта одержують кров і заморожують при -20°C . Зразки, отримані від хворих, та стандарти, отримані від контрольної групи, а також, у зв'язку, з відсутністю стандартної калібровочної кривої, в якості контрольної групи згідно з методикою Zemlan (Zemlan F. US Patent 6589746 - Method of detecting axonally-derived protein tau in patients with

traumatic CNS injury // Traumatic CNS injury, 2003), додають до контрольної групи, так званий, «неврологічний контроль», який складається із хворих на епілепсію у міжпадний період. Зразки й подвійні стандарти (контроль та неврологічний контроль) інкубують з першим моноклональним мишачим Anti- τ (Tau, clon 2) антитілом протягом 2 годин у термостаті при температурі $+37^{\circ}\text{C}$ в присутності вторинного антитіла, міченого ізоціанід (FITC) флюоресцентом специфічним до IgG. Після інкубації зміст відмивається у буферному розчині з твином для вилучення не зв'язувальних комплексів антитіл до тау. Для визначення тау білку імунофлюоресцентним методом використовують стандартні набори фірми Sigma (USA). Далі формують базу даних з показників здорових осіб (контрольна група) і порівнюють з нею показники пацієнтів з аутоімунними демієлінізуючими захворюваннями нервової системи (основана клінічна група) і показники пацієнтів неврологічного контролю з епілепсією (група порівняння).

Приклад

У ході дослідження було обстежено 3 клінічні групи - 1 група складалася з 18 хворих (з них 11 жінок, 62%; та 7 чоловіків, 38%; у віці від 34 до 42 років) на аутоімунні демієлінізуючі запальні захворювання, що знаходилися на лікуванні у відділенні нейроінфекцій та розсіяного склерозу, 10 хворих жінок на епілепсію (середній вік складав $33,78 \pm 11,09$ р.) та 10 здорових осіб (з них 8 жінок, 80% та 2 чоловіка, 20% у віці від 27 до 33 років). Середній вік пацієнтів 1 групи складав $43,67 \pm 15,22$ років, середній вік контрольної групи - $29,11 \pm 7,14$ років.

В ході дослідження було з'ясовано, що пацієнти з аутоімунними захворюваннями нервової системи мають дуже високий рівень тау білку в сироватці крові та статистичне підвищення його рівню на $0,972$ ум. од. оптичної щільності (ОЩ, D) порівняно зі здоровим контролем ($p < 0,01$) та на $0,68$ порівняно з неврологічним контролем ($p < 0,01$). Показники даних рівню тау білку наведені у таблиці.

Таблиця 1

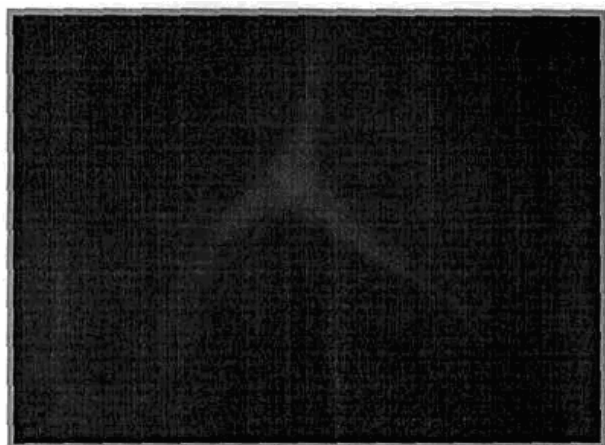
Вміст рівню теплового тау білку в сироватці крові хворих на аутоімунні захворювання нервової системи (I група), хворих на епілепсію (II група неврологічного контролю) та контролю (III група), $D = \log_{10} F_0 / F_1$ оптична щільність

Показник	1 клінічна група, (n=18)	2 клінічна група, (n=10)	контрольна група, (n=10)
Тау білок	$1,012 \pm 18,01^*$	$0,33 \pm 0,2$	$0,04 \pm 0,01$

Примітка * - зміни статично значимі порівняно до контрольної групи та при зіставленні з групою неврологічного контролю ($p < 0,01$)

Аналіз степенів відхилення від контрольних даних (t-критерій) рівню тау виявив, що у групах співставлення спостережлива різниця між показниками була $t=4,12$ і $t=1,9$ відповідно ($p < 0,01$). Таким чином, у хворих на аутоімунні захворювання нервової системи відмічається достовірне підвищення рівню тау білку в сироватці крові.

Таким чином, дані теперішнього дослідження переконливо показують ефективність діагностики аутоімунних захворювань нервової системи за даними визначення в сироватці крові вмісту теплового білку тау.



Електронна мікрофотографія демонструє імунофлюоресцентне фарбування теплового білку тау у хворих на аутоімунні захворювання нервової системи

Фіг.1