



УКРАЇНА

(19) UA (11) 62082 (13) U

(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ГЕНЕТИЧНИХ РОЗЛАДІВ ГЛІКОЗИЛЮВАННЯ У ДІТЕЙ З КЛІНІЧНИМИ ОЗНАКАМИ НЕЗ'ЯСОВАНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ

1

(21) u201100985

(22) 28.01.2011

(24) 10.08.2011

(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.

(72) ТОКАРЄВ ДМИТРО СЕРГІЙОВИЧ, ШОСТАКОВИЧ-КОРЕЦЬКА ЛЮДМИЛА РОМАНІВНА, МАВРУТЕНКОВ ВІКТОР ВОЛОДИМИРОВИЧ

(73) ТОКАРЄВ ДМИТРО СЕРГІЙОВИЧ, ШОСТАКОВИЧ-КОРЕЦЬКА ЛЮДМИЛА РОМАНІВНА, МАВРУТЕНКОВ ВІКТОР ВОЛОДИМИРОВИЧ

(57) Спосіб діагностики генетичних розладів глікозилювання у дітей з клінічними ознаками нез'ясованого захворювання, що включає відбір проби венозної крові, виділення сироватки, дослідження концентрації маркера та оцінку перебігу генетич-

2

них розладів глікозилювання, який відрізняється тим, що як маркер крові залучають α -1-кислий глікопротеїн, визначають шляхом перехресного афінного імуноелектрофорезу його мікрогетерогенність, за допомогою високо-, слабо- і нульової до Соп А афінних фракцій C_s , C_w і C_0 , відповідно, розраховують площини їхніх піків, % співвідношення площин кожної з глікоформ до їх загальної суми, а під час оцінки, визначають наявність або відсутність генетичних розладів глікозилювання, якщо співвідношення площин глікоформ афінних фракцій $C_s:C_w:C_0$ становить 8:50:42 або 0,26:61,28:38,46 %, відповідно.

Корисна модель відноситься до дослідження або аналізу матеріалів шляхом визначення їхніх хімічних або фізичних властивостей, переважно біологічних, наприклад крові, та може бути використаною в медицині, насамперед, у неонатології, клінічній генетиці або в дитячій неврології для встановлення генетичних сома-тоневрологічних розладів у дітей, які відбуваються на тлі підвищеного рівня стигм дізембріогенезу.

Відомий спосіб діагностики генетичних розладів метаболізму, що ґрунтується на визначенні біохімічних показників, притаманних захворюванню, аномального розподілу глікоформ протеїнів та аномально глікозильованих білків [1]. Причинами, які перешкоджають досягненню низькозначеного технічного результату є неспецифічна симптоматика залучених показників і замала частота розладів метаболізму, що стримує можливість відокремлення генетичних метаболічних порушень від інфекційних захворювань.

Відомий спосіб діагностики генетичних розладів процесу глікозилювання білків, у дітей з клінічними ознаками нез'ясованого захворювання, який ґрунтується на ковалентному з'єднанні

поліпептидної групи з модифікованою, наприклад з водорозчинним полімером PEG. Амінокислотна послідовність поліпептиду включає одну або більше послідовностей для О-глікозилювання, кожна з яких є субстратом для GlcNAc-трансферази. Модифікована група ковалентно зв'язана з поліпептидом через глікозилзв'язуючу групу, котра ковалентно зв'язана як з поліпептидом так і з модифікованою групою, а глікозамінзв'язуюча група прямо зв'язана з амінокислотним залишком О-глікозильованої послідовності. За цих умов забезпечується отримання поліпептидних сполук, які включають, щонайменше, одну О-глікозильовану послідовність [2]. Недоліком аналогу є недостатня інформативність і надмірна тривалість виявлення білків. Це зумовлене тим, що суттєвим недоліком наведених аналогів слід вважати відсутність чітких діагностичних доказів (критеріїв), що саме вони є безпосередньою причиною захворювання у дітей, досить складні технологічні умови виконання, відсутність попереднього клініко-фенотипічного аналізу, що в свою чергу знижує ефективність та інформативність дослідження. Більш наближеним серед об'єктів аналогічного призначення за

(19) UA (11) 62082 (13) U

кількістю істотних ознак до дійсної корисної моделі є спосіб діагностики генетичних розладів глікозилювання у дітей, з клінічними ознаками нез'ясованого захворювання, що включає відбір проби венозної крові, виділення сироватки, дослідження концентрації маркера та оцінку перебігу генетичних розладів глікозилювання, у відповідності з котрим, як маркер крові залучають α -1-кислий глікопротеїн, а перебіг генетичних розладів глікозилювання встановлюють за змінами співвідношення глікоформ α -1-кислого глікопротеїну. Завдяки можливості мутантної бета-1,4-галактозилтрансферази селективно переносити неприродним чином функціонуючий бетон O-GlcNAc, наведений аналог допускає шляхом глікозилюваності прискорення детекції посттрансляційно модифікованих білків у межах прийнятної чутливості та виявлення посттрансляційних змін протеїнів O-GlcNAc, адже після переносу кетон стає ділянкою приєднання біотину [3]. Недоліком наведеного аналога є недостатня кореляція протеїнів O-GlcNAc з клінічними ознаками нез'ясованого захворювання соматоневрологічного ґенезу, які з'являються на тлі підвищення стигм дізембріогенезу, що, відповідно, стримує інформативність дослідження.

В основу заявленої корисної моделі поставлена задача вдосконалити спосіб діагностики генетичних розладів глікозилювання у дітей, з клінічними ознаками нез'ясованого захворювання, застосування котрого сприяло б шляхом селекції інформативних маркерів крові підвищенню інформативності, під час розладів соматоневрологічного ґенезу, які відбуваються на тлі підвищення рівня стигм дізембріогенезу.

Поставлена задача вирішується тим, що при використанні у відомому способі діагностики генетичних розладів глікозилювання у дітей, з клінічними ознаками нез'ясованого захворювання, що включає відбір проби венозної крові, виділення сироватки, дослідження концентрації маркера та оцінку перебігу генетичних розладів глікозилювання, відповідно до корисної моделі, як маркер крові залучають α -1-кислий глікопротеїн, визначають шляхом перехресного афінного імуоелектрофорезу його мікрогетерогенність, за допомогою високо, слабо і нульової до Con A афінних фракцій C_s , C_w і C_0 , відповідно, розраховують площини їхніх піків, % співвідношення площин кожної з глікоформ до їх загальної суми, а під час оцінки, визначають наявність або відсутність генетичних розладів глікозилювання, якщо співвідношення площин глікоформ афінних фракцій $C_s:C_w:C_0$ становить 8:50:42 або 0,26:61,28:38,46 %, відповідно.

Причинно-наслідковий зв'язок сукупності істотних ознак заявленої корисної моделі зі збільшенням інформативності діагностування полягає в наступному.

Діагностична комбінація значень концентрацій афінних фракцій C_s , C_w , C_0 α -1-кислого глікопротеїну, що корелює з розладами соматоневрологічного ґенезу, які відбуваються на тлі підвищеного рівня стигм дізембріогенезу, яка реалізована у вигляді площин їхніх глікоформ,

дозволяє діагностувати уроджені порушення глікозилювання у дітей, з можливістю диференціювання інфекційної патології.

Поєднання уніфікованого клініко-фенотипічного аналізу та дослідження співвідношення глікоформ α -1-кислого глікопротеїну розширює уявлення щодо механізмів клінічної реалізації патологічного, генетично детермінованого глікозилювання. Це зумовлене тим, що глікозилювання є важливим біологічним та одним із найпоширеніших типів модифікації білків процесом, завдяки якому більша частина білків, яка секретується клітиною, приєднує вуглеводний компонент, унаслідок чого білки набувають цілісну функціональну активність. Оскільки глікопротеїни складають більш ніж 70 % усіх білків організму і приймають участь практично в усіх внутрішньо- й позаклітинних процесах, порушення їхньої структури призводить до зміни багатьох метаболічних реакцій, а клінічні прояви носять, відповідно, системний, мультиорганный характер.

Поєднання уніфікованого клініко-фенотипічного аналізу з дослідженням мікрогетерогенності α -1-кислого глікопротеїну підвищує специфічність діагностики уроджених дефектів глікозилювання, що сприяє визначенню його клінічних порушень соматоневрологічного ґенезу, які відбуваються у дітей, й добре корелюють з підвищенням рівня стигм дізембріогенезу.

Запропоноване рішення задачі здійснюється за стандартних умов, за відсутності протипоказань, вікових або тендерних обмежень.

Для використання корисної моделі залучають: прилад для афінного імуоелектрофорезу, агарозний гель, лектин *Canavalia ensiformis* джерело живлення 10 В /см, рН-метр, Кумасі блакитний (0,2 %), препарат антигенів, трис-вероналовий буферний розчин, барвник бромфеноловий синій.

Сутність. Для здійснення способу діагностики генетичних розладів глікозилювання у дітей, з клінічними ознаками нез'ясованого захворювання, згідно шкали оцінки фенотипу, залучають відповідних пацієнтів, у яких відбирають венозну кров, з подальшим виділенням сироватки. Для підвищення інформативності способу при розладах соматоневрологічного ґенезу на тлі підвищеного рівня стигм дізембріогенезу, у пробі сироватки досліджують α -1-кислий глікопротеїн, визначають шляхом перехресного афінного імуоелектрофорезу його мікрогетерогенність, за допомогою високо, слабо і нульової до Con A афінних фракцій C_s , C_w і C_0 , відповідно. При цьому використовували лектин із *Canavalia ensiformis* (Con A) як афінний ліганд до N-гліканів. Преципітати α -1-кислого глікопротеїну з антитілами висушували та фарбували за допомогою Кумасі синього, а на пластинці спостерігали розподілення досліджуваного α -1-кислого глікопротеїну на вищезазначені фракції. Надалі розраховують площини їхніх піків, % співвідношення площин кожної з глікоформ до їх загальної суми, а під час оцінки, визначають наявність або відсутність генетичних розладів глікозилювання, якщо співвідношення площин

глікоформ афінних фракцій $C_s:C_w:C_0$ становить 8:50:42 або 0,26:61,28:38,46 %, відповідно.

В динаміці, у електрофоретичному русі антигенів у агарозному гелі, що включає антитіла, які при pH 8,6 у трис-вероналовому буферному розчині практично не мають електрофоретичної рухливості. Молекули антигенів, які рухаються до аноду, зустрічають на своєму шляху антитіла та утворюють нерозчинні імунні комплекси, які гальмують рух, та преципітують при досягненні співвідношення антиген/антитіло, що є близьким до одиниці. Перехресний афінний імуноелектрофорез (ПАІЕФ) є комбінацією зонального електрофоретичного розділення білків у агарозному гелі з електрофорезом у гелі, який містить антитіла, у напрямку, перпендикулярному першому процесу. Метод забезпечує двомірну картину розподілу антигенів у складній суміші, з чутливістю 0,1-1,0 мкл/мл. У першому напрямку здійснюється звичайний зональний електрофорез у 1 % агарозному гелі, при напруженості електричного струму 10 В/см, впродовж 50-60 хв. Після початку електрофорезу додають по 3 мкл барвника бромфенолового синього, що зв'язується з альбуміном - білком з найбільшою концентрацією та високою електрофоретичною рухливістю. Після закінчення електрофорезу смужку гелю з антигеном розміром 4,5x1,5 см відрізають скальпелем і переносять на катодну сторону пластинки габаритами 6,0 x 4,5 см. Потім заливають з анодної сторони агарозний гель, що містить або антитіла до α -1-кислого глікопротеїну, або антитіла до білків плазми крові, або лектини і проводять імуноелектрофорез у перпендикулярному напрямку. Електрофорез у другому напрямку проводять в режимі напруженості електричного струму 1-2 В/см протягом 18 годин.

За цих умов підвищують інформативність процесу, з можливістю диференціювання вихідних даних від норми до розладів глікозилювання за погіршенням значень будь якої з фракцій C_s , C_w і C_0 α -1-кислого глікопротеїну.

Приклад. Новонароджена дівчинка перебувала у відділенні патології новонароджених дитячої міської клінічної лікарні м. Дніпропетровська з приводу лікування Перинатально-гіпоксичного ураження ЦНС (Іст. хвороби № 43, від 16. 01. 2004).

Застосовували запропонований спосіб діагностики генетичних розладів глікозилювання у дітей, з клінічними ознаками нез'ясованого захворювання (з нез'ясованими соматоневрологічними розладами на тлі високого рівня стигм дізембріогенезу). Відбирали пробу венозної крові, виділяли сироватку, досліджували методом перехресного афінного імуноелектрофорезу мікрогетерогенність α -1-кислого глікопротеїну, використовуючи його високо афінну C_s , слабо афінну C_w і нульову C_0 до Con A фракції. Розраховували площини їхніх піків і % співвідношення площин кожної з глікоформ до їх загальної суми.

Співвідношення площин кожної з глікоформ α -1-кислого глікопротеїну до їх загальної суми становили 4,4;47;48,6 %. За рахунок зниження значень фракцій C_s, C_w (4,4; 47 %) від норми (8;50 %) дійшли висновку про наявність генетичних розладів глікозилювання (аномальний розподіл глікоформ α -1-кислого глікопротеїну). Оцінюючи вихідні дані, констатували уроджене порушення глікозилювання білків з можливим несприятливим, а у подальшому, що було підтверджене у подальшому, нервово-психічним розвитком. Виявлення порушення глікозилюваності білків надало можливість відмовитися від антибіотикотерапії та сконцентрувати лікувальні зусилля на неврологічній реабілітації.

Тож, вищенаведений приклад конкретного використання способу на основі засобів, які стали відомі за подією пріоритету, підтверджує можливість його відтворення в неонатології, клінічній генетиці або в дитячій неврології, насамперед, при встановленні генетичних соматоневрологічних розладів, які відбуваються на тлі підвищеного рівня стигм дізембріогенезу.

Джерела інформації:

1. Jaeken J. What's new in congenital disorder of glycosylation? / J. Jaeken, H. Carc-hon // Eur. J. of Paediatric Neurol. -2000. -Vol.4. -P. 163-167.
2. Руководство по количественному иммуно-электрофорезу / под. ред. Н. Аксе-льсена.-М.: Мир, 1987.-216 с.
3. Freeze H., Balancing N. Linked glycosylation to avoid disease / H.Freeze, V.Wes-tphal // Biochemie. -2001. -Vol.83. -P.791-799.