



УКРАЇНА

(19) UA (11) 44558 (13) U  
(51) МПК (2009)  
A61B 5/145

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОЇ ПЕРВИННО-ГЕНЕРАЛІЗОВАНОЇ ЕПІЛЕПСІЇ

1

(21) u200903567  
(22) 13.04.2009  
(24) 12.10.2009  
(46) 12.10.2009, Бюл.№ 19, 2009 р.  
(72) ЛЕКОМЦЕВА ЄВГЕНІЯ ВОЛОДИМИРІВНА  
(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ НЕВРО-  
ЛОГІЇ, ПСИХІАТРІЇ ТА НАРКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ"  
(57) Спосіб діагностики фармакорезистентної пер-  
винно-генералізованої епілепсії за даними вмісту

2

теплого тау протеїну в сироватці крові, який відрізняється тим, що використовують імуно-  
флюоресцентний метод, де визначення концент-  
рації тау протеїну здійснюють в імунофлюоресце-  
нтній реакції з використанням первинних  
моноклональних мишачих анти-тау антитіл та вто-  
ринних моноклональних антитіл IgG ( $\gamma$ ) FITC.

Корисна модель належить до галузі медицини,  
а саме до неврології, психіатрії та медичної біохі-  
мії, і може бути використана для діагностики фар-  
макорезистентної первинно-генералізованої епі-  
лепсії.

Епілепсія та епілептичні синдроми є одними з  
найбільш поширених захворювань нервової сис-  
теми. Поширеність епілепсії у загальній популяції  
більшості країн Європи складає 5-10 випадків на  
1000 нас, тоді як в Україні на неї страждають в  
середньому 7-12 осіб на 1000 нас. В останній час  
значна увага приділяється патології та дисбалансу  
у біохімічних системах нейропептидів та внутріш-  
ньонейрональних білків і нейроімунологічним ме-  
ханізмам, які сприяють епілептизації нейронів та  
розповсюдженню генералізованої епілептичної  
активності в структурах головного мозку [Зенков Л.  
Р. Клиническая эпилептология (с элементами  
нейрофизиологии). - М.:МИА, 2002. - 416 с.].

Згідно узагальнених даних провідних проти-  
епілептичних центрів світу виразний терапевтич-  
ний ефект при лікуванні протиепілептичними пре-  
паратами досягається лише у 65-75 % хворих на  
епілепсію; залишені - так звані фармакорезистент-  
ні форми епілепсії, де вивчення механізмів фор-  
мування резистентності та пошук нових методів  
діагностики є на сьогодні актуальною та дуже  
складною проблемою практичної неврології й епі-  
лептології. Проблема діагностики епілепсії з вико-  
ристанням нейробіомаркерів щодо епілептичних  
зон кори мозку активно розробляється. Значна  
увага приділяється визначенню у лікворі та крові  
рівню нейронального протеїну тау,  $\tau$  [Wagner U.,  
Uttonl M., Gallo J., Miller C. Cellular phosphorylation

of tau by GSK influences tau binding to microtubules  
and microtubule organization//J. of Cell Science. -  
1996.- Vol. 109.- P.1537-1543.].

Тепловий білок тау є мікротьюбул-  
асоційований протеїн аксонів, який приймає участь  
у нейрональному спраутінгу та проведенню потен-  
ціалу дії. Тау протеїн відіграє дуже важливу роль в  
процесах фосфорилування мікротьюбул, які є  
основним компонентом цитоскелету аксонів, його  
рівень зростає після генералізованих епілептичних  
нападів у хворих на тлі інфекційних менінгітів та  
менінгоенцефалітів [Irazuzta J.E., Courten-Myers  
G., Zemlan F. et all. Serum cleaved Tau protein and  
neurobehavioral battery of tests as markers of brain  
injury in experimental bacterial meningitis // Brain  
Research.-2001.-Vol. 913 (1).- p. 95-105.]. Визна-  
чення вмісту аксональних протеїнів, які є біомар-  
керами поразки нейронних мембран, дозволить  
вирішити питання ранньої і адекватної діагностики  
епілепсії, відокремити її тип та покращити якість  
життя цієї групи хворих.

За прототип корисної моделі правлять факти  
збільшення в лікворі та крові рівню тау у хворих на  
епілепсію з когнітивними розладами [Riemen-  
schneider M. et all Tau and A $\beta$ 42 protein in CSF of  
patients with frontotemporal degeneration // Neurol-  
ogy.- 2002.-Vol. 58.- P. 1622-1628.] та у хворих з  
черепно-мозковою травмою, що супроводжується  
розвитком генералізованого судомного синдрому,  
вимірюваний методом імуноферментного аналізу  
[Bulut M. et all. Tau protein as a serum marker of  
brain damage in mild traumatic brain injury: Prelimi-  
nary results // Advances in Therapy.- 2006.- Vol. 23  
(1).- P. 12-22.]. Серед недоліків прототипу звертає

UA (11) 44558 (13) U

на себе увагу низька специфічність методу, складна методика виконання, відсутність візуалізації отриманих даних.

У зв'язку з вищевикладеним, в основу корисної моделі покладено задачу вдосконалення способу діагностики фармакорезистентної первинно-генералізованої епілепсії шляхом вимірювання вмісту маркера аксонального пошкодження головного мозку - тау протеїну в сироватці крові імунофлюоресцентним методом з використанням первинних й вторинних моноклональних антитіл, що забезпечить покращення специфічності та однозначності способу.

Задача, яку покладено в основу корисної моделі, вирішується тим, що у відомому способі діагностики фармакорезистентної первинно-генералізованої епілепсії в сироватці крові вивчається вміст теплового тау протеїну порівняно з даними контрольної групи в імунофлюоресцентній реакції з використанням первинних й вторинних моноклональних мишачих антитіл. Імунофлюоресцентний метод дає змогу виявлення субклітинного компонента (нейроантигену) за допомогою специфічної імунологічної флюоресцентної реакції; метод відзначається високою чутливістю та ґрунтоване на конкурентному зв'язуванні моноклональних антитіл, які є специфічними до різних епітопів IgG ( $\gamma$ ) та IgM дослідних високо-глобулярних молекул тау протеїну. За умов імунофлюоресцентної реакції з первинними і вторинними моноклональними антитілами було продемонстровано збільшення рівню тау протеїну в сироватці крові у хворих на фармакорезистентну первинно-генералізовану епілепсію на відміну від зниження цього показника у хворих на парціальну епілепсію та здорових осіб. Таким чином, застосування корисної моделі в клініці надасть можливість за допомогою імунофлюоресцентного дослідження вмісту тау протеїну в сироватці крові виявити та відокремити фармакорезистентну первинно-генералізовану епілепсію з усього пулу епілептичних синдромів.

Спосіб діагностики здійснюється таким чином.

У пацієнта одержують кров, відстоюють її протягом години при кімнатній температурі і центрифугують при 3 тис/об. 15-20 хв. Зразки, отримані від хворих, й стандарти, отримані від контрольної групи, інкубують з першим моноклональним мишачим анти-тау (anti-t) антитілом протягом 2 годин у термостаті при температурі  $+37^{\circ}\text{C}$  в присутності вторинного мишачого антитіла, міченого ізоціанідом (FITC) флюоресцентом специфічним до IgG ( $\gamma$ ). Після інкубації зміст відливають у фосфатно-сольовому буферному розчині з твином для вилучення не зв'язувальних комплексів антитіл до тау. Для визначення тау протеїну в імунофлюоресцентній реакції використовують стандартні набори фірми Sigma (USA). Далі формують базу даних з показників здорових осіб (контрольна група) і порівнюють з нею показники пацієнтів з первинно-генералізованою епілепсією (основана клінічна група) та пацієнтів з парціальною епілепсією (група порівняння).

Приклад.

В ході дослідження було обстежено 3 клінічні групи: 1 група складалася з 16 хворих на фарма-

корезистентну первинно-генералізовану епілепсію (згідно з міжнародною класифікацією епілепсій та епілептичних синдромів, 1989) в міжнападний період (з них 11 жінок, 69 %; і 5 чоловіків, 31 %; у віці від 24 до 37 років); середній вік обстежених хворих складав  $31,78 \pm 8,9$  р.; 2 клінічна група складалася з 16 хворих на парціальну епілепсію в міжнападний період (з них 8 жінок і 8 чоловіків у віці від 29 до 46 років; середній вік хворих 2 групи складав  $36,23 \pm 6,56$  р.); 3 група складалася з 10 здорових осіб (з них 8 жінок, 80 % та 2 чоловіка, 20 % у віці від 27 до 33 років), середній вік контрольної групи складав  $29,11 \pm 7,14$  років. Середня тривалість первинно-генералізованої епілепсії у хворих -  $19,76 \pm 9,54$  р., частота епілептичних нападів: 3-7 разів на місяць, середня тривалість парціальної епілепсії -  $12,34 \pm 4,71$  р., частота парціальних нападів: 1-3 на місяць.

В ході дослідження було з'ясовано, що хворі на фармакорезистентну первинно-генералізовану епілепсію мають в крові патологічний тау протеїн та статистичне підвищення його рівню на  $0,32$  ум. од. оптичної щільності (ОЩ, D) порівняно зі здоровим контролем ( $p < 0,05$ ) та на  $0,26$  - порівняно з хворими 2 групи ( $p < 0,05$ ). Показники даних рівню тау протеїну наведені у діаграмі (мал.1). Аналіз ступеню відхилення від контрольних даних ( $t$  - критерій) рівню тау виявив, що в групах співставлення спостережлива різниця між показниками була:  $t=2,08$  и  $t=1,43$ , відповідно ( $p < 0,05$ ). Таким чином, у хворих на фармакорезистентну первинно-генералізовану епілепсію відмічається достовірне підвищення рівню теплового тау протеїну в крові.

Даний специфічний діагностичний тест дав змогу виявити та відокремити фармакорезистентну первинно-генералізовану епілепсію за даними вмісту теплового тау протеїну в сироватці крові в імунофлюоресцентній реакції з первинними моноклональними мишачими анти-тау та вторинними моноклональними антитілами.

Таким чином, дані теперішнього дослідження переконливо показують ефективність діагностики фармакорезистентної первинно-генералізованої епілепсії за даними вмісту теплового тау протеїну в сироватці крові.

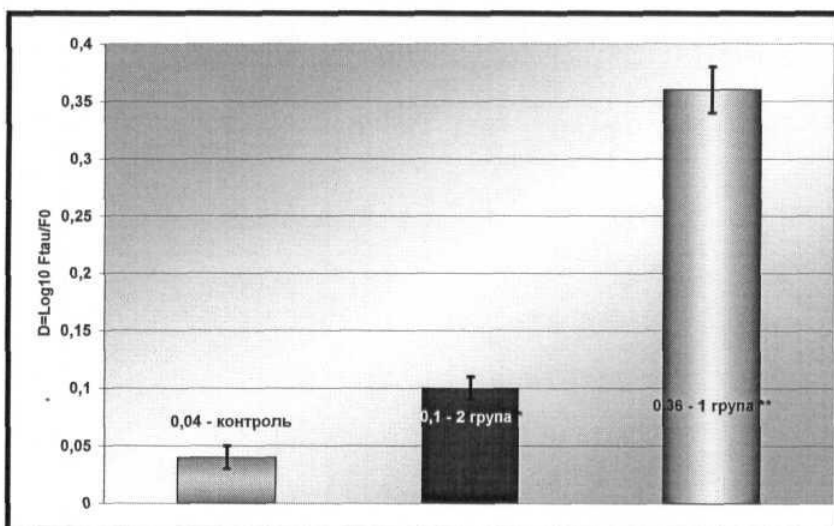
Фіг.1 Рівень теплового тау протеїну в сироватці крові хворих на фармакорезистентну первинно-генералізовану епілепсію (1 група), парціальну епілепсію (2 група) та контролю (3 група).

Фіг.2 Електронна мікрофотографія демонструє імунофлюоресцентне фарбування теплового білку тау у хворій ПЕГ (29 років) з первинно-генералізованою епілепсією в реакції з моноклональними антитілами фірми Sigma. В якості первинних антитіл для виявлення специфічної реакції було використано моноклональні мишачі анти-тау антитіла. Фото показує крупну зелену імунну флюоресцируючу курпускулу (immune particle) тау (green fluorescent tau protein, GFtP), міченого антимишачими IgG ( $\gamma$  - chain specific) FITC (Fluorescein Isothiocyanate) моноклональними ауто антитілами.

Фіг.3 Електронна мікрофотографія демонструє імунофлюоресцентне фарбування тау протеїну у хворій МАС (31 р.) з фармакорезистентною пер-

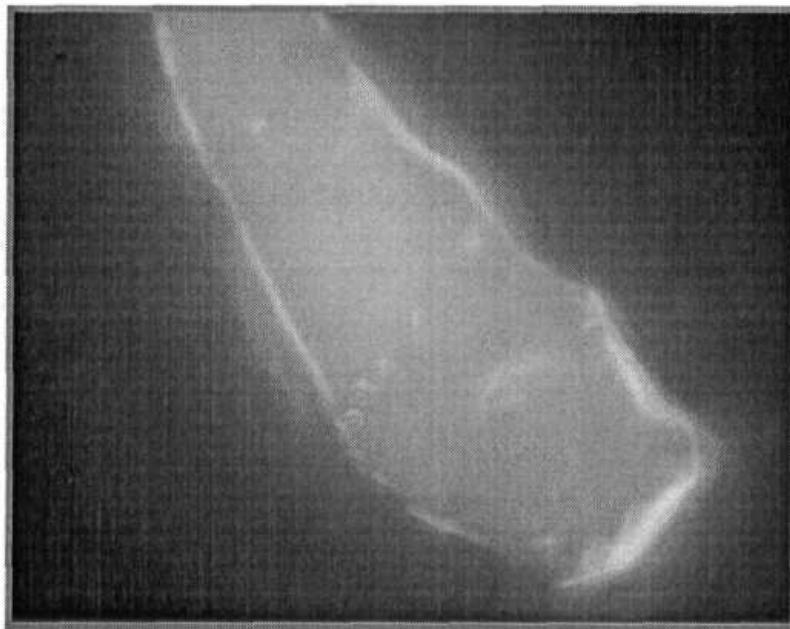
винно-генералізованою епілепсією в реакції з первинними та вторинними моноклональними мишачими анти-тау антитілами. Фото демонструє зелену імунну флюоресцируючу курпускулу тау протешу, міченого антимишачими FITC кон'югованими моноклональними антитілами.

Фіг.4 Гістограма розподілу високої оптичної щільності депозитів тау протеїну у хворі з фармакорезистентною первинно-генералізованою епілепсією.

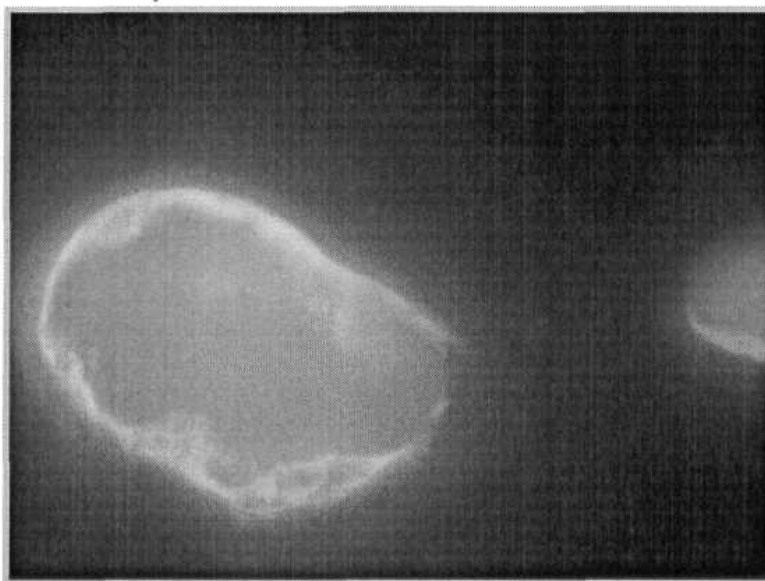


Примітка: \* -  $p < 0,05$  зміни статистично значимі порівняно з контролем  
та \*\* -  $p < 0,05$  - при зіставленні з групою порівняння

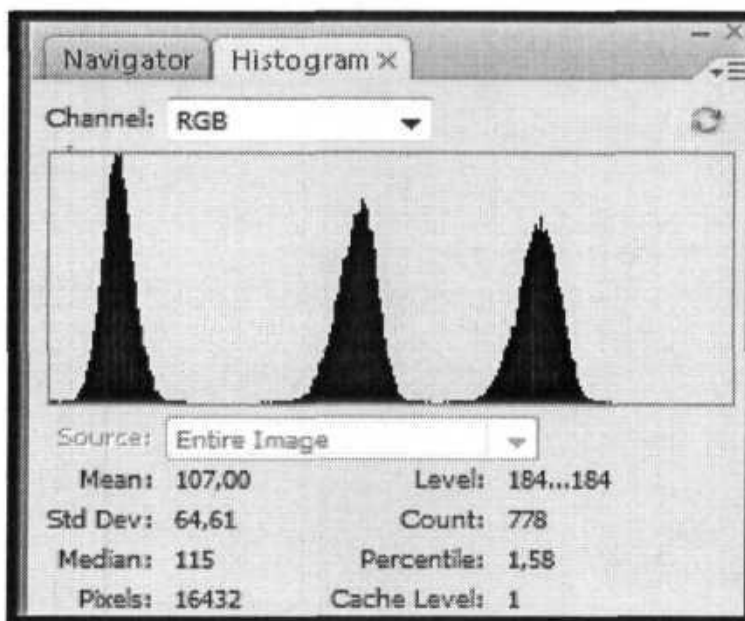
Фіг.1



Фіг.2



Фіг.3



Фіг.4