



УКРАЇНА

(19) UA (11) 53176 (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 ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ СІАЛЬОВАНOSTІ АЛЬФА-1-КИСЛОГО ГЛІКОПРОТЕЇНУ

1

(21) u201003808

(22) 02.04.2010

(24) 27.09.2010

(46) 27.09.2010, Бюл.№ 18, 2010 р.

(72) СТЕКЛЕНЬОВА НАТАЛІА ІВАНІВНА, ШЕВЦОВА АЛЛА ІВАНІВНА, БРАЗАЛУК ОЛЕКСАНДР ЗАХАРОВИЧ, МАШЕЙКО ІВАН ВОЛОДИМИРОВИЧ

(73) ДНІПРОПЕТРОВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

(57) Спосіб визначення ступеня сіальованості альфа-1-кислого глікопротеїну плазми крові людини, який включає проведення адсорбції специфічних антитіл в імуноферментному планшеті, проми-

2

вку планшета трис-фосфатним буфером, внесення зразків плазми крові, додавання в лунки сіалоспецифічного лектину, внесення субстрату, який відрізняється тим, що на стадії адсорбції використовують специфічні деглікозильовані антитіла до альфа-1-кислого глікопротеїну, блокують вільні сайти зв'язування твін-фосфатним буфером (ТФБ), що містить 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну, вносять в лунки сіалоспецифічний лектин SNA, кон'югований з пероксидазою хрому, оцінюють ступінь сіальованості як відсоток від еталонного зразка, що є пулом плазми крові здорових донорів.

Корисна модель відноситься до біології і медицини, а саме, до способів визначення глікозування глікопротеїнів, зокрема, для визначення ступеню сіальованості альфа-1-кислого глікопротеїну (АГП) плазми крові людини, що може бути використано у лабораторній діагностиці різноманітних патологічних станів.

Найбільш близьким до запропонованої корисної моделі є спосіб визначення сіальованості фібронектину [Hampel D.J., Kottgen B., Dudenhausen J.W., Kottgen E. Fetal fibronectin as a marker for an imminent (preterm) delivery. A new technique using the glycoprotein lectin immunosorbent assay // Journal of Immunological Methods (224) - 1999 Apr 22 - P. 31-42], який включає наступні етапи: 1 - сорбція антитіл до фібронектину, десіальованих періодатним методом, у лунках полістиролового планшета впродовж 1 години з наступною триразовою промивкою 0,01 М трис-буфером pH=8,5 що містить 0,05% твін-20 та 1ммоль/л CaCl<sub>2</sub> і MgCl<sub>2</sub>; 2 - внесення у лунки планшета по 100мкл досліджуваних зразків плазми крові, що попередньо оброблені латексними кульками та доведені до концентрації за фібронектином 5г/л буфером для зразків, інкубація впродовж двох годин при кімнатній температурі та наступне триразове відмивання означеним вище буфером; 3 - внесення у лунки планшета по 100мкл сіалоспецифічного лектину Sambucus nigra agglutinin (SNA) або Maackia amurensis (MAA), кон'югованого з біотином, інку-

бація впродовж 30 хвилин, промивка; 4 - внесення у кожну лунку планшета по 100мкл стрептавідину, кон'югованого з пероксидазою кореню хрому, інкубація впродовж 30 хвилин та наступна промивка; 5 - додавання субстрату і вимірювання на мікропланшетному рід ері оптичної густини кінцевого розчину (довжина хвилі 450nm); 6 - оцінка неспецифічного зв'язування лектину з полістиролом шляхом постановки аналогічних реакцій але замість антитіл на 1-му етапі вносять буфер для зразків.

Недоліками прототипу є те, що використання на першому етапі десіальованих антитіл, отриманих шляхом окиснення термінальних залишків олігосахаридних структур періодатом натрію, обмежує можливості подальшого аналізу вуглеводних структур у складі досліджуваного глікопротеїну та знижує його специфічність; попередня обробка зразків латексними кульками ускладнює аналіз, відсутність контрольних (калібрувальних) зразків не дозволяє кількісно оцінювати ступінь сіальованості досліджуваного глікопротеїну.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу визначення сіальованості АГП шляхом формування нового набору та співвідношення головних компонентів: деглікозильованих антитіл до альфа-1-кислого глікопротеїну і лектину Sambucus nigra agglutinin (SNA), кон'югованого з пероксидазою кореню хрому, умов розведення дослідних зразків та компонентів буферу для блокування та промивки, що дозволить прис-

(19) UA (11) 53176 (13) U

тосувати його для оцінки сіальованості саме АГП, значно спростити аналіз, підвищить відтворюваність отриманих даних. За цим способом олігосахаридні ланцюги АГП, імобілізованого через шар деглікозильованих антитіл на поверхні полістиролу, взаємодіють з вуглеводзв'язуючими ділянками лектину SNA, кон'югованого з пероксидазою хрому; ступень подібної взаємодії оцінюють за кількістю окисненого пероксидазою субстрату шляхом вимірювання на мікропланшетному рідері світлопоглинання забарвлених продуктів реакції.

Ознаками прототипу, які співпадають з істотними ознаками запропонованого способу є проведення адсорбції специфічних антитіл в імуноферментному планшеті, промивка лунок планшета трис-фосфатним буфером, з подальшим додаванням сіалоспецифічних лектинів і внесенням субстрату.

Поставлена задача вирішується тим, що у запропонованому способі визначення сіальованості АГП, що включає проведення адсорбції специфічних антитіл в імуноферментному планшеті, промивку планшета буфером, що містить твін, внесення зразків плазми крові, додавання в лунки сіалоспецифічного лектину, внесення субстрату, в якому, згідно корисної моделі, на стадії адсорбції використовують специфічні деглікозильовані антитіла до альфа-1-кислого глікопротеїну, блокують вільні сайти зв'язування твін-фосфатним буфером (ТФБ), що містить 1мг/мл бичачого сироваткового альбуміну, вносять в лунки сіалоспецифічний лектин SNA, кон'югований з пероксидазою хрому, оцінюють ступень сіальованості як відсоток від еталонного зразку, що є пулом плазми крові від здорових донорів.

Між сукупністю основних ознак способу, який пропонується, і технічним результатом, який може бути досягнутий, виявляється наступний причинно-наслідковий зв'язок: використання деглікозильованих антитіл дозволяє безпосередньо вносити до лунок планшета досліджувані зразки плазми крові у підібраному робочому розведенні, що значно спрощує підготовку зразків до аналізу та є найбільш оптимальним для виявлення вірогідної різниці в ступені сіалювання альфа-1-кислого глікопротеїну; проведення адсорбції деглікозильованих антитіл у кількості 100мкл з концентрацією 3мкг/мл при температурі 4°C протягом 12 годин дозволяє отримати рівномірний шар антитіл на поверхні лунок планшета та уникнути «крайового ефекту», що сприяє відтворюваності способу; блокування вільних сайтів зв'язування додаванням 200мкл ТФБ, що містить 1мг/мл бичачого сироваткового альбуміну, протягом 1 години дозволяє досягти високого ступеня гідрофобної взаємодії реагентів з поверхнею твердої фази і забезпечує повне перекриття всіх вільних валентностей лунки; подальше внесення в лунки лектину, кон'югованого з пероксидазою хрому, в об'ємі 100мкл при концентрації 10мкг/мл дозволяє значно збільшити чутливість та відтворюваність лектин-ферментного аналізу, використання в якості еталона порівняння пула плазми крові від здорових донорів дозволяє кількісно оцінювати ступень сіальованості АГП.

Спосіб полягає у наступному.

Вносять в лунки імуноферментного планшета (Microtest Plate 96, Sarstedt) по 100мкл 3мкг/мл розчину деглікозильованих антитіл у 0,1 М натрій-карбонат-бікарбонатному буфері (0,015 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,035 М  $\text{NaHCO}_3$ , 0,2 М  $\text{NaN}_3$ , pH=9,6) та проводять адсорбцію при температурі 4°C протягом 12 годин, після чого промивають лунки твін-фосфатним буфером (ТФБ, забуферений фізіологічний розчин, що містить 0,05% TWEEN 80, pH=7,2). Блокують лунки планшета додаванням 200мкл ТФБ, що містить 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (BSA, Sigma-Aldrich) протягом 1 години за кімнатної температури, після чого проводять чотирьохразову, по 10 хвилин за кожним разом, промивку планшета ТФБ по 200мкл на лунку. Таким чином, лунки ретельно промивають від антитіл, що не зв'язалися, і одночасно проводять блокування вільних валентностей планшета.

У лунки імуноферментного планшета вносять зразки досліджуваної плазми, розведені у ТФБ до концентрації 1мкг/мл по 100мкл в лунку, в дві лунки вносять еталонний зразок, що є пулом плазми крові від здорових донорів, у контрольні лунки вносять по 100мкл того ж буферного розчину і інкубують планшет 1 годину при температурі 37°C. Після закінчення інкубації проводять чотирьохразову, по 10 хвилин за кожним разом, промивку лунок планшета ТФБ.

На наступному етапі вносять по 100мкл лектину SNA, кон'югованого з пероксидазою хрому (SNA-HRP, BioRad), розведеному до концентрації 10 мкг/мл у ТФБ, що містить по 1 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  і  $\text{MgCl}_2$ , витримують планшет 1 годину за кімнатної температури, після чого проводять стандартну промивку планшета і вносять в лунки по 100мкл субстратної суміші (0,004 М o-Phenylenediamine, Serva в 0,1 М фосфатно-цитратному буфері (pH=5,0), що містить 0,01% перекису водню). Через 10 хвилин зупиняють реакцію внесенням до лунок по 50мкл 2 М сірчаної кислоти ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) та вимірюють оптичну густину кінцевого розчину (довжина хвилі 492nm) на мікропланшетному рідері. Оцінюють ступень сіальованості АГП, порівнюючи значення екстинції досліджуваних зразків з екстинцією еталонного зразку (пул плазми крові здорових донорів), в якому ступень сіальованості АГП прийнятий за 100%.

Сукупність ознак корисної моделі є суттєвою, оскільки відповідає очікуваному технічному результату. Наведені твердження інформують про те, що запропонований спосіб відповідає критерію корисної моделі «новизна».

Відсутність еквівалентних способів визначення ступеню сіальованості альфа-1-кислого глікопротеїну плазми крові людини для досягнення очікуваного технічного результату дозволяє зробити висновок про відповідність запропонованого способу умові «винахідницький рівень».

Відомості, що підтверджують можливість використання заявленого способу з досягненням вищевказаного технічного результату наведені нижче.

Приклад

Визначення ступеню сіальованості АГП проводять за наступною схемою:

1 - Вносять в лунки імуноферментного планшету (Microtest Plate 96, Sarstedt) по 100мкл 3мкг/мл розчину деглікозильованих антитіл у 0,1 М натрій-карбонат-бікарбонатному буфері (рН=9,6) та проводять адсорбцію при температурі 4°C протягом 12 годин, промивають планшет 4 рази твін-фосфатним буфером (ТФБ), та блокують вільні сайти лунок планшету додаванням 200мкл ТФБ, що містить 1мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (BSA, Sigma-Aldrich) протягом 1 години за кімнатної температури, після чого проводять чотирьохразову, по 10 хвилин за кожним разом, промивку лунок планшета 200мкл ТФБ.

2 - У лунки імуноферментного планшету вносять по 100мкл еталонних і досліджуваних зразків плазми крові, що розведені у ТФБ до кінцевої концентрації за альфа-1-кислим глікопротеїном 1мкг/мл, у контрольні лунки вносять по 100мкл ТФБ і інкубують впродовж 1 години за температури 37°C. Потім проводять чотирьохразову, по 10 хвилин за кожним разом, промивку лунок планшета 200мкл ТФБ.

3 - вносять по 100мкл сіалоспецифічного лектину SNA, кон'югованого з пероксидазою хрону (SNA-HRP, BioRad), розведеному до концентрації 10мкг/мл у ТФБ, що містить по 1ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  і  $\text{MgCl}_2$ , витримують планшет 1 годину за кімнатної температури, після чого проводять стандартну промивку планшету і вносять в лунки по 100мкл субстратної суміші (0,004 М o-Phenylenediamine, Serva в 0,04 М фосфатно-цитратному буфері (рН=5,0), що містить 0,01% перекису водню). Через 10 хвилин зупиняють реакцію внесенням до лунок по 50мкл 2 М сірчаної кислоти ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) та вимірюють оптичну густину кінцевого розчину (довжина хвилі 492нм) на мікропланшетному рідері. Оцінюють ступень сіалюваності АГП, порівнюючи значення екстинції досліджуваних зразків з екстинцією контрольного зразку (пул плазми крові здорових донорів), в якому ступень сіалюваності АГП прийнятий за 100%.

Для перевірки наявності вищевказаного технічного результату, за допомогою запропонованого способу, визначався ступень сіалюваності альфа-1-кислого глікопротеїну плазми крові людини при запальних процесах вірусного та бактеріального походження, а також при проліферативних захворюваннях системи крові за спорідненістю до лектину SNA.

За нашими даними, при гострому запальному процесі вірусного походження має місце достовірне підвищення взаємодії АГП з SNA у порівнянні з нормою: афінність АГП до цього лектину при гострому вірусному гепатиті А підвищується на 68%, а при гострому вірусному гепатиті В (без дельта-агенту) - на 6%. Найбільш суттєві зміни спостерігались при гострому вірусному гепатиті В за фульмінантного перебігу: зв'язування АГП з SNA підвищувалось у середньому у 8,57 раз. Напроти, при хронічному вірусному гепатиті С спостерігалось зниження SNA-зв'язувальної здатності АГП на 38% у порівнянні із нормою (фіг. 1). Враховуючи специфічність SNA, можна зробити висновок про підвищення вмісту сіалових кислот, що приєднані у положенні 2→6 при гострому запальному процесі

вірусного походження та зниження цього показника при хронічному запальному процесі.

Дослідження сіалюваності АГП при сепсисі показало, що вміст сіалових кислот сягав 130% у порівнянні з нормою, тоді як при пневмонії цей показник був лише на рівні 62% (Фіг.2). Зниження сіалюваності АГП пояснюється тим, що для запальних процесів бактеріального ґенезу характерною є експресія глікоформ АГП, що переважно містять біантенні глікани і менше поліантенних гліканових структур. Отримані нами дані вказують на менш суттєве порушення сіалювання АГП при гострому запаленні бактеріального походження у порівнянні з гострим запаленням вірусного походження.

Як видно з рисунку (Фіг.3), при проліферативних захворюваннях системи крові має місце досить широке варіювання вмісту сіалових кислот у складі АГП при різних видах лейкемій. При мієлопроліферативних захворюваннях було виявлено наступне: зниження вмісту сіалових кислот до 53,12% при поліцитеїї та підвищення сіалюваності АГП при хронічному мієлоїдному лейкозі до 145,06% відносно норми. Навпаки, всі лімфопроліферативні стани характеризуються підвищенням сіалюваності АГП у 1,18-1,97 рази у порівнянні із контрольною групою. Особливо вражаючим є підвищення вмісту сіалових кислот при хронічному лімфолейкозі, що становить 563,27% у порівнянні із контрольною групою. За даними літератури відомо, що лейкоцити при хронічному В-клітинному лейкозі гіперсіалювані внаслідок зростання активності сіалілтрансфераз, тому можна припустити, що підвищений вміст сіалових кислот може спостерігатись не лише у складі мембранних глікопротеїнів, а й таких плазмових білків, як АГП.

Таким чином, спосіб дозволяє за рахунок ефектної сорбції деглікозильованих антитіл на полістиролі лунок планшету і використанні лектину, кон'югованого з пероксидазою хрону, підвищити точність визначення вуглеводних детермінант АГП, а також спростити процедуру приготування зразків і кількісно оцінити ступень сіалюваності.

Запропонований спосіб визначення ступеню сіалюваності альфа-1-кислого глікопротеїну характеризується високою чутливістю, специфічністю, простотою і доступністю відносно реагентів і може бути використаний як в клінічних, так і в науково-дослідних лабораторіях.

Технічний результат, що досягається при використанні корисної моделі, визначається комбінацією деглікозильованих антитіл та лектину, кон'югованого з пероксидазою хрону, що дозволяє значно підвищити специфічність та відтворюваність лектин-ферментного аналізу у порівнянні із запропонованими раніше способами.

Розроблений спосіб відповідає умові «промислова придатність», що дозволяє кваліфікувати його як «корисну модель», яка може бути використана у лабораторній діагностиці різноманітних патологічних станів.

Перелік фігур креслення.

Додаток 1.

Фіг.1. Ступень сіальованості АГП за спорідненістю до лектину *Sambucus nigra* agglutinin при процесах вірусного походження (по групах).

Додаток 2.

Фіг.2. Ступень сіальованості АГП за спорідненістю до лектину *Sambucus nigra* agglutinin при

запальних процесах бактеріального походження (по групах).

Додаток 3.

Фіг.3. Ступень сіальованості АГП за спорідненістю до лектину *Sambucus nigra* agglutinin при проліферативних захворюваннях системи крові (по групах).

