



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86930** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**G01N 33/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2013 10200</b>	(72) Винахідник(и): <b>Коляда Олександр Костянтинович (UA), Вайсерман Олександр Михайлович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>19.08.2013</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.01.2014</b>	(73) Власник(и): <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕРОНТОЛОГІЇ ІМ. Д.Ф. ЧЕБОТАРЬОВА НАМН УКРАЇНИ", вул. Вишгородська, 67, м. Київ, 04114 (UA)</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.01.2014, Бюл.№ 1</b>	

## (54) СПОСІБ ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ХВОРОБИ ПАРКІНСОНА

### (57) Реферат:

Спосіб генетичної діагностики хвороби Паркінсона включає генотипування мутації L444P (T>C) в гені GBA методом полімеразної ланцюгової реакції з подальшою рестрикцією. Використовують праймери: 5-GGAGGACCCAATTGGGTGCGT-3 та 5-ACGCTGTCTTCAGCCCACTTC-3, режимом проведення ампліфікації: 95 °C протягом 30 секунд, 60 °C протягом 30 секунд, 72 °C протягом 30 секунд. Рестрикцію проводять за допомогою рестриктази Neil I, при наявності характерних для C алелі продуктів рестрикції довжиною 536 п.н. та 102 п.н. при електрофоретичному розділенні фрагментів в агарозному гелі діагностують наявність ризику розвитку хвороби Паркінсона.

UA 86930 U



Корисна модель належить до галузі медичної генетики, а саме до біотехнології і має відношення до діагностики хвороби Паркінсона (ХП).

Ген GBA пов'язаний з розвитком ХП. В даний час вважається, що гомозиготність або компаундна гетерозиготність по мутаціях в гені GBA є причиною розвитку захворювання у майже 30 % хворих на аутосомно-домінантний паркінсонізм і 5-10 % хворих зі спорадичною ХП з раннім початком розвитку захворювання. Генотипування за геном GBA може слугувати основою для ранньої діагностики ХП.

У великій кількості епідеміологічних та популяційних досліджень встановлена безперечна спадкова компонента схильності до розвитку ХП. При аналізі великих вибірок хворих доведено, що наявність сімейного анамнезу є одним із провідних чинників ризику розвитку ХП. Позитивний сімейний анамнез виявлено у 10-30 % хворих на ХП, що свідчить про те, що ризик виникнення хвороби серед родичів значно перевищує загальнопопуляційний. Така сімейна форма прояву ХП особливо характерна для випадків раннього захворювання. Здійснюється активний пошук алейних варіантів генів, пов'язаних з розвитком ХП. Для цього у пацієнтів з ХП і в контрольних групах проводиться аналіз асоціацій з рядом генів-кандидатів, які, імовірно, можуть бути пов'язані з патогенезом захворювання. Відомий патент Іспанії № заявки PCT/ ES2012/000039 від 22.02.2012, номер публікації WO201213948A1 від 30.08.2012 "Method for determining genetic predisposition to parkinson's disease", автори Calancha Jose et al. в якому пропонується генотипування за деякими локусами асоційованими з ХП. Недоліком цього методу є необхідність в великій кількості реактивів та важкість аналізу отриманих даних.

Найбільш близьким аналогом є патент США № заявки US 127956.525 від 30.11.2009, номер публікації US8187811 від 29.05.2012 "Polymorphisms associated with parkinson's disease", автори Liat Ben-Moyal et al. в якому пропонується спосіб скринінгу пацієнтів на чинники генетичної схильності до ХП. В цьому патенті пропонується аналізувати 8 генетичних поліморфізмів в різних генах. Цей підхід є надзвичайно трудомістким та враховує лише генотипи що є характерними для американської популяції.

В основу запропонованої корисної моделі поставлена задача розробити спосіб діагностики ХП на основі генотипування поліморфізму L444P (T>C) в гені GBA.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб генетичної діагностики хвороби Паркінсона, що включає генотипування мутації L444P (T>C) в гені GBA методом полімеразної ланцюгової реакції з подальшою рестрикцією, згідно з корисною моделлю, використовують праймери: 5-GGAGGACCCAATTGGGTGCGT-3 та 5-ACGCTGTCTTCAGCCCACTTC-3, режимом проведення ампліфікації: 95°C протягом 30 секунд, 60°C протягом 30 секунд, 72°C протягом 30 секунд, рестрикцію проводять за допомогою рестриктази Neil, і при наявності характерних для С алелі продуктів рестрикції довжиною 536 п.н. та 102 п.н. при електрофоретичному розділенні фрагментів в агарозному гелі діагностують наявність ризику розвитку хвороби Паркінсона.

Спосіб базується на рутинному та дешевому способі встановлення генотипу методом ПДРФ-ПЛР, що не потребує рідкісного обладнання.

На базі ДУ "Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України" обстежено 176 хворих на ХП (106 чоловіків та 90 жінок), середній вік  $63,1 \pm 1,3$  років, із середньою тривалістю захворювання  $7,6 \pm 0,33$  роки. Діагноз ХП встановлювали відповідно до міжнародних критеріїв, рухові функції оцінювали за допомогою шкали Hoehn и Yahr та частини III UPDRS в період "включення" протипаркінсонічних засобів, що використовувалися. До контрольної групи входили 200 клінічно здорових людей домірних з основною групою за віком та статтю. За результатами генотипування було встановлено що мутація L444P зустрічається з частотою 6 % серед пацієнтів з ХП, та не виявлена в контрольній групі.

Спосіб здійснюють наступним чином.

У пацієнта беруть зразок крові об'ємом 2 мл в пробірки з антикоагулянтном. ДНК виділяють за допомогою рутинних методів. Отриманий зразок ДНК (10нг) використовують для полімеразної ланцюгової реакції, яку проводять в реакційній суміші об'ємом 20 мкл, що містить 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, по 8 пкмоль кожного з праймерів, 1,0 одиницю Taq полімерази. Використовують наступні праймери: 5-GGAGGACCCAATTGGGTGCGT-3 та 5-ACGCTGTCTTCAGCCCACTTC-3. Перед проведенням ампліфікації реакційну суміш прогривають протягом 5 хвилин при температурі 95 °C. Перший етап ампліфікації складається з прогріву реакційної суміші при температурі 95 °C протягом 30 секунд. Другий етап передбачає прогрів суміші при 60 °C протягом 30 секунд. Третій етап складається з елонгації при 72 °C протягом 30 секунд. Четвертий етап складається з інкубації реакційної суміші при 72 °C протягом 5 хвилин. Етапи 1-3 повторюють послідовно 40 разів. Отриману суміш ампліконів вносять по 10 мкл в чисті пробірки та додають 5 о.а. рестриктази Neil та 5 мл буферу для рестрикції. Суміш інкубують 2 години при температурі 37 °C Отриману суміш ампліконів вносять в лунки 1 % агарозного гелю

та проводять електрофорез з додаванням бромистого етидію в буфер для візуалізації ДНК. Електрофорез проводять 30 хвилин при напрузі, що відповідає напрузі електричного поля 10-15 В/см довжини гелю. При наявності мутантної алелі С в гомозиготному стані спостерігаємо дві смуги, що відповідають молекулам довжиною 536 п.н. та 102 п.н., при наявності алелі Т в гомозиготному стані спостерігаємо одну смугу, що відповідає молекулам довжиною 638 п.н. При гетерозиготному стані спостерігаємо всі три смуги (638, 536 та 102 п.н.).

Таким чином встановлюють наявність С алелі, що є чинником ризику розвитку ХП у пацієнта та показанням для проведення обстеження його родичів на наявність мутації.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб генетичної діагностики хвороби Паркінсона, що включає генотипування мутації L444P (T>C) в гені GBA методом полімеразної ланцюгової реакції з подальшою рестрикцією, який **відрізняється** тим, що використовують праймери: 5-GGAGGACCCAATTGGGTGCGT-3 та 5-ACGCTGTCTTCAGCCCACTTC-3, режимом проведення ампліфікації: 95 °C протягом 30 секунд, 60 °C протягом 30 секунд, 72 °C протягом 30 секунд, та тим, що рестрикцію проводять за допомогою рестриктази Neil I, при наявності характерних для С алелі продуктів рестрикції довжиною 536 п.н. та 102 п.н. при електрофоретичному розділенні фрагментів в агарозному гелі діагностують наявність ризику розвитку хвороби Паркінсона.

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601