



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 97299

(13) U

(51) МПК

A61B 5/145 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 09437**

(22) Дата подання заявки: **26.08.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.03.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.03.2015, Бюл.№ 5**

(72) Винахідник(и):

**Волошина Наталія Петрівна (UA),
Волошин-Гапонов Іван Костянтинович
(UA),
Лекомцева Євгенія Володимирівна (UA),
Горбач Тетяна Вікторівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
НЕВРОЛОГІЇ, ПСИХІАТРІЇ ТА НАРКОЛОГІЇ
НАМН УКРАЇНИ",
вул. Академіка Павлова, 46, м. Харків,
61068 (UA)**

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ХВОРОБИ ВІЛЬСОНА-КОНОВАЛОВА

(57) Реферат:

Спосіб діагностики хвороби Вільсона-Коновалова включає визначення даних вмісту тау протеїну в сироватці крові. Використовують імунофлюоресцентний метод, де визначення рівня тау протеїну здійснюють в імунофлюоресцентній реакції з використанням моноклональних первинних мишачих анти-тау-5 та вторинних FITC кон'югованих антитіл.

UA 97299 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до неврології, психіатрії і медичної біохімії, та може бути застосована для діагностики хвороби Вільсона-Коновалова (ХВК).

ХВК є дуже важливою проблемою сучасної неврології, це рідкісне спадкове захворювання, що передається за аутосомно-рецесивним типом, виявляється переважно у молодому віці і характеризується надмірним накопиченням міді в організмі. Дане спадкове порушення метаболізму міді призводить до важких порушень центральної нервової системи та внутрішніх органів. ХВК починається в дитячому або молодому віці та має хронічний прогресуючий перебіг. Хвороба Вільсона-Коновалова одне з не багатьох спадкових захворювань, що піддається лікуванню (Stremmel W., Meyerrose K.W., Niderau C. Wilson's disease: clinical presentation, treatment and survival// *Ann. Intern. Med.* - 1991. - Vol. 115. - P. 720-726.), тому її своєчасна діагностика посідає важне місце в сучасній клінічній неврологічній практиці (Aggarwal A., Aggarwal N., Nagral A. et al. A novel global assessment scale for Wilson's disease (GAS for WD)// *Movement Disorders.* - 2009. - Vol. 24. - P. 509-518.).

На сьогодні питання адекватної та швидкої діагностики нейродегенеративних захворювань нервової системи і, зокрема ХВК з використанням нейроімунологічних біомаркерів є дуже актуальною проблемою, яка активно розробляється закордонними співдослідниками (Merle U., Schaefer M., Ferenci P., Stremmel W. Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study// *Gut.* - 2007. - Vol. 56. - P. 115-120.).

Значна увага в цьому напрямку приділяється визначенню у лікворі та крові базального рівня аксональних біомаркерів та нейротрансмітерів, й, особливо, визначенню рівня аксонального мікротьюбул-асоційованого білка тау, який приймає участь у нейрональному спраутінгу, проведенню потенціалу дії, організації нейрофіламентного скелету аксонів та нейронів. Тау протеїн (т-5) відіграє дуже важливу роль в процесах фосфорилування нейромікротьюбул, які є основним компонентом цитоскелету збуджуючих гаммаамінергічних нейронів. У експериментальних працях закордонних дослідників було показано, що тау білок є есенціальним для створення цитоархітекτονіки пірамідних нейронів, він є модулятором пластичної активності головного мозку, також приймає участь у нейроексайттоксичному процесі, прямо або опосередковано регулює основні процеси збудження та гальмування, синаптичну пластичність, емоції, пам'ять (Avila J., Lucas J., Perez M., Hernandez P. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions// *Physiol. Rev.* - 2004.- Vol. 84.- P. 361-384.).

Проблема діагностики ХВК з використанням аутоантитіл та специфічних біомаркерів щодо мембран нейронів та їх компонентів розробляється дослідниками, у цьому напрямку значна увага приділяється визначенню у лікворі рівню тау протеїну (Zhang J. et al. Proteomic biomarker discovery in cerebrospinal fluid for neurodegenerative diseases// *J. Alz. Dis.* - 2005. - Vol. 8(4). - P. 377-386.).

Прототипом корисної моделі є спосіб визначення збільшення концентрації тау білка в лікворі хворих з ХВК імуноферментним методом (Wiggelinkhuizen M, Tilanus M.E., Bollen C.W. et al: Systematic review: clinical efficacy of chelator agents and zinc in the initial treatment and diagnostics of Wilson's disease// *Aliment Pharmacol Ther.* - 2009. - Vol. 29. - P. 947-958.).

Серед недоліків прототипу звертає на себе увагу низька специфічність методу, складна методика виконання та відсутність візуалізації отриманих даних.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалення способу діагностики ХВК шляхом вивчення вмісту тау білка (clone, т-5) в сироватці крові імунофлюоресцентним методом з використанням первинних й вторинних моноклональних антитіл, що забезпечить підвищення специфічності, однозначності й чутливості способу діагностики та надасть можливість ранній та адекватній діагностиці ХВК.

Поставлена задача вирішується тим, що у хворих з ХВК визнається вміст тау білка імунофлюоресцентним методом, де визначення рівня тау протеїну здійснюють в імунофлюоресцентній реакції з використанням моноклональних первинних мишачих анти-тау-5 та вторинних FITC кон'югованих антитіл.

Імунофлюоресцентний метод дає змогу для виявлення субклітинного компонента за допомогою флюоресцентної реакції. Метод відрізняється високою специфічністю та чутливістю, оснований на конкурентному зв'язуванні моноклональних антитіл, які є специфічними до різних епітопів тау протеїну. За умов імунофлюоресцентної реакції з первинними і вторинними моноклональними антитілами було продемонстровано значне збільшення рівня тау протеїну в сироватці крові хворих з ХВК, на відміну від зниження цього показника у здорових осіб та хворих неврологічного контролю.

У пацієнта одержують кров і заморожують при - 20-30 °С. Зразки, отримані від хворих, та стандарти, отримані від контрольної групи, а також, у зв'язку, з відсутністю стандартної калібрувальної кривої, як контрольну групу згідно з методикою Землан (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 генералізовану епілепсію у міжпадний період. Зразки й подвійні стандарти (контроль та неврологічний контроль) інкубують з першим моноклональним мишачим Anti- τ (Tau, clone 5) антитілом протягом 2 годин у термостаті при температурі +37 °C в присутності вторинного антитіла, міченого ізотіоціанід флюоресцентом специфічним до IgG. Після інкубації вміст відмивається тричі у буферному розчині з твином для вилучення не зв'язувальних комплексів антитіл до тау при кімнатній температурі. Для визначення тау білка імунофлюоресцентним методом використовують стандартні набори фірми Sigma (USA). Для визначення концентрації тау в імунофлюоресцентній реакції використовують вимірювання флюоресцентного свічення, що проводиться з використанням імунофлюоресцентного мікроскопа "Olympus" BX41 (Японія) при збільшенні X800: де коефіцієнт поглинання Seizuss-135. Далі формують базу даних з показників здорових осіб (контрольна група) і порівнюють з нею показники пацієнтів з хворобою Вільсона-Коновалова (основана група) і показники пацієнтів неврологічного контролю з генералізованою епілепсією (група клінічного порівняння).

Приклад.

У ході дослідження було обстежено 3 клінічні групи - 1 група складалася з 26 хворих (з них 15 жінок, 57,69 % та 11 чоловіків, 42,31 %) у віці від 41 до 53 років на різні типи перебігу хвороби Вільсона-Коновалова, що знаходилися на лікуванні у відділенні нейроінфекцій та розсіяного склерозу інституту, 25 хворих на генералізовану епілепсію у міжпадний період у віці від 22 до 47 років (середній вік складав $37,59 \pm 9,71$ років) та 20 практично здорових осіб (з них 10 жінок, 50 % та 10 чоловіків у віці від 25 до 39 років). Середній вік пацієнтів 1 групи складав $49,28 \pm 6,95$ років, середній вік контрольної групи - $26,3 \pm 9,61$ років. Всі хворі 1 групи на момент обстеження приймали комплексне патогенетичне лікування: вітаміни, судинна терапія, метаболічні препарати. Всі хворі 2 групи отримували базисну терапію протиепілептичними засобами у середньотерапевтичних дозах.

В ході дослідження було з'ясовано, що всі пацієнти з ХВК мають дуже високий рівень тау білка в сироватці крові та статистичне підвищення його рівню на 0,88 ум. од. оптичної щільності (ОЩ, OD) порівняно зі здоровим контролем ($p < 0,01$) та на 0,56 порівняно з неврологічним контролем ($p < 0,01$). Показники даних рівня тау білка наведені у наступній таблиці.

Таблиця

Вміст рівня тау білка в сироватці крові
хворих з ХВК (I група), хворих на генералізовану епілепсію (II група
неврологічного контролю) та здорового контролю (III група), $OD = \log_{10} F_0 / F_1$ оптична щільність

Показник	1 клінічна група, (n=26)	2 клінічна група, (n=25)	контрольна група, (n=20)
Тау білок	$0,92 \pm 0,03^*$	$0,36 \pm 0,05$	$0,04 \pm 0,01$

Примітка

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

Аналіз ступенів відхилення від контрольних даних (t - критерій) рівню тау виявив, що у групах співставлення спостережлива різниця між показниками була $t=4,1$ і $t=1,82$ відповідно ($p < 0,01$). Таким чином, у хворих з ХВК відмічається достовірне підвищення рівня тау білка в сироватці крові.

На Фіг. 1. відображає електронна мікрофотографія, що демонструє імунофлюоресцентне фарбування тау білка у жінки з ХВК (49 років) в реакції з первинними та вторинними моноклональними мишачими анти-тау-5 антитілами. Фото демонструє імунофлюоресцируючий фрагмент тау білка, міченого FITC кон'югованими моноклональними антитілами.

На Фіг. 2. представлено гістограму розподілу оптичної щільності депозитів тау протеїну у хворі з ХВК (49 років).

Таким чином, застосування переконливо показують ефективність діагностики хвороби Вільсона-Коновалова за даними визначення в сироватці крові вмісту тау білка імунофлюоресцентним методом з використанням моноклональних первинних мишачих анти-тау-5 та вторинних FITC кон'югованих антитіл.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб діагностики хвороби Вільсона-Коновалова, що включає визначення даних вмісту тау протеїну в сироватці крові, який **відрізняється** тим, що використовують імунофлюоресцентний метод, де визначення рівня тау протеїну здійснюють в імунофлюоресцентній реакції з використанням моноклональних первинних мишачих анти-тау-5 та вторинних РІТС кон'югованих антитіл.

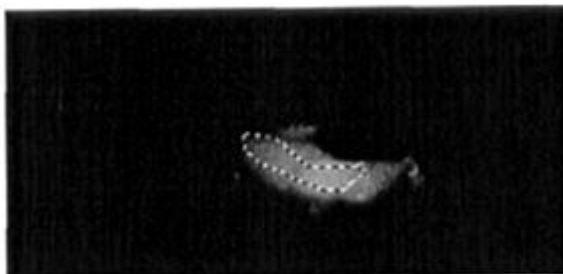


Fig. 1

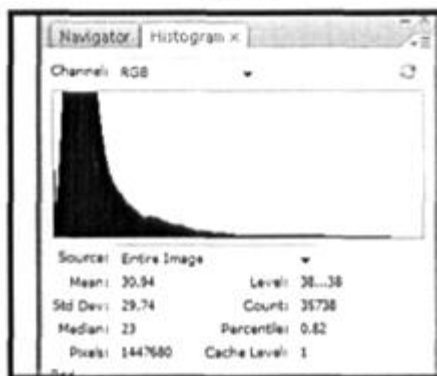


Fig. 2