



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **108194**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 12489**

(22) Дата подання заявки: **17.12.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **11.07.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **11.07.2016, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Глузман Данило Фішелевич (UA),
Скляренко Лілія Михайлівна (UA),
Іванівська Тетяна Степанівна (UA),
Завелевич Михайло Петрович (UA),
Коваль Стелла Володимирівна (UA),
Українська Наталя Іванівна (UA),
Полудненко Людмила Юріївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ
ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ,
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)**

(54) СПОСІБ ІМУНОЦИТОХІМІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ БЛАСТНОГО КРИЗУ ХРОНІЧНОГО МІЄЛОЛЕЙКОЗУ

(57) Реферат:

Спосіб імуноцитохімічної діагностики бластного кризу хронічного мієлолейкозу включає проведення цитоморфологічного та ензімоцитохімічного дослідження. Безпосередньо за допомогою широкої панелі моноклональних антитіл в мазках крові і препаратах кісткового мозку визначають експресію лінійно-специфічних і диференціювальних антигенів, які найбільш точно характеризують природу лейкемічних клітин при БК ХМЛ мієлоїдного і лімфоїдного походження.

UA 108194 U

Запропонована корисна модель належить до медицини, а саме до лабораторної імуноцитохімічної діагностики онкогематологічних захворювань.

Хронічний мієлолейкоз (ХМЛ), який виникає внаслідок трансформації BCR-ABL1-позитивної поліпотентної гемопоетичної стовбурової клітини (ПГСК), є однією з найбільш частих форм мієлопроліферативних новоутворень. В процесі розвитку ХМЛ виділяють три фази хронічну, акселерації і бластного кризу [1, 2]. В хронічній фазі захворювання набуті мутації відповідальні за виживаність і аберантне диференціювання ПГСК, що призводить до продукції та експансії популяції лейкоемічних клітин, які до певного часу зберігають здатність до дозрівання. Завдяки цьому в хронічній фазі ХМЛ в крові та кістковому мозку виявляються незрілі клітини (промієлоцити, юні) та зрілі клітинні елементи гранулоцитарного ряду.

У багатьох хворих на ХМЛ в результаті прогресування захворювання спостерігається перехід у гостру фазу з розвитком бластного кризу (БК), при якому в крові та кістковому мозку виявляється більше 20 % бластних клітин [2, 3]. Саме природа переважаючого клону бластних клітин (мієлоїдна чи лімфоїдна) визначає ефективність лікування хворих на ХМЛ у фазі БК. У 70 % випадків БК ХМЛ субстратні клітини мають мієлоїдне походження і представлені трансформованими клітинами-попередниками гранулоцитарного або еритробластодного і мегакаріоцитарного ряду. У 30 % пацієнтів бластні клітини мають лімфоїдну природу.

Діагностика БК мієлоїдного і лімфоїдного походження, як і взагалі БК ХМЛ із стадією трансформації в гострий лейкоз, яка спостерігається при інших формах мієлопроліферативних новоутворень (первинний мієлофіброз, есенціальна тромбоцитемія), що є важливою для вибору адекватної терапії та визначення прогнозу, базується на результатах цитологічного і цитохімічного дослідження препаратів кісткового мозку і периферичної крові [4].

Однак самого лише визначення бластних клітин за допомогою цитоморфологічного методу та імунофенотипування із застосуванням стандартної панелі з мінімальним набором моноклональних антитіл в ряді випадків буває недостатньо для вирішення питання щодо природи бластних клітин у препаратах при БК ХМЛ [5], що є недоліком наявної моделі діагностики БК ХМЛ мієлоїдного і лімфоїдного походження. Визначення більш широкого спектру маркерних лінійно-специфічних та диференціальних антигенів стовбурових гемопоетичних клітин та клітин-попередників дозволило би більш точно діагностувати БК ХМЛ та диференціювати його від інших форм гемобластозів у складних випадках, і отже, забезпечувати призначення оптимальних схем лікування.

В основу корисної моделі поставлено задачу, що полягає у більш точному визначенні природи лейкоемічних бластних клітин при БК ХМЛ, яке б дозволило диференціювати БК ХМЛ мієлоїдного і лімфоїдного походження.

Поставлена задача вирішується тим, що для ідентифікації мієлоїдної чи лімфоїдної природи лейкоемічних бластів безпосередньо в мазках крові і кісткового мозку як маркери використовують визначення експресії на поверхневих мембранах клітин лінійно-специфічних диференціальних антигенів, які найбільш точно характеризують природу лейкоемічних клітин при БК ХМЛ мієлоїдного і лімфоїдного походження, за допомогою широкої панелі моноклональних антитіл.

Схема застосування способу.

Визначення експресії антигенів на поверхневих мембранах бластних клітин виконували за допомогою методу АВС-АР, що включає фіксацію мазків крові і кісткового мозку, які перед цим вилучають з морозильної камери, в парах 10 % розчину нейтрального формаліну впродовж 3 хв., інкубацію мазків впродовж 1 год. при температурі 18-22 °С з антитілами першого етапу. На другому етапі після відмивання на мазки наносять на 30 хв. сироватку проти імуноглобулінів мишей, кон'юговану з біотином. На третьому етапі після відмивання мазків у 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,2-7,4) наносять на 1 год. комплекс стрептавідин-лужна фосфатаза. Для визначення зв'язування моноклональних антитіл з тим чи іншим досліджуваним антигеном проводять цитохімічну реакцію визначення активності лужної фосфатази за допомогою реакції азосполучення з використанням в якості субстрату реакції нафтол-AS-MX-фосфату і зв'язуючого агента - гексаазотованого парарозаніліну. Ядра клітин дофарбовують метиловим зеленим. Препарати крові і кісткового мозку досліджують за допомогою імерсійної системи мікроскопу. Природу лейкоемічних бластних клітин визначають на підставі наявності чи відсутності експресії тих чи інших маркерних антигенів.

Приклади практичного застосування корисної моделі.

Наведені результати імуноцитохімічного дослідження лейкоемічних клітин крові і кісткового мозку хворих на ХМЛ в фазі БК ілюструють можливості корисної моделі, що заявляється.

Приклад 1

До лабораторії надійшли мазки крові і кісткового мозку хворого С-ко 1989 р. н., який впродовж 4 років хворів на ХМЛ. За останній місяць у хворого було виявлено 37 % бластних клітин в препараті крові і 42 % в препараті кісткового мозку, екстрамедулярні вогнища лейкоемічної інфільтрації (шкіра, лімфатичні вузли). Для встановлення цитологічного варіанту БК ХМЛ мазки-препарати були попередньо досліджені за допомогою цитоморфологічного та ензімоцитохімічного методів. Реакція при цитохімічному дослідженні на мієлопероксидазу (МПО) та кислу фосфатазу (КФ) була негативною. Активність кислої неспецифічної естерази (КНЕ) виявлялась у вигляді помірного дифузного забарвлення цитоплазми клітин. Імуноцитохімічне дослідження субстратних клітин дало наступні результати: CD34⁺, CD117⁺, CD15⁺, CD35⁺, HLA-DR⁺, CD13⁺, CD36⁺, CD14⁺, CD11b⁺, CD11c⁺.

Ці дані свідчили про наявність БК ХМЛ мієлоїдного типу, субстратні клітини при якому представлені монобластами з низьким рівнем диференціювання.

Приклад 2

До лабораторії надіслали мазки препарати крові і пунктату кісткового мозку хворої М-ої 1959 р. н. з попереднім діагнозом БК ХМЛ? МДС (рефрактерна анемія з надлишком бластів РАНБ-2?). При помірному лейкоцитозі в крові було виявлено 6 % бластів і в кістковому мозку 19-20 %. Бласти давали негативну реакцію при цитохімічному визначенні МПО. В них спостерігали лише дрібно гранулярну реакцію при визначенні активності КФ на тлі дифузно забарвленої цитоплазми. Результати імуноцитохімічного дослідження CD34⁺, HLA-DR⁺, CD117⁺, CD38⁺, MPO⁺, CD14⁺, CD33⁺, CD13⁺, CD36⁺, CD61⁺, CD41⁺ відповідали імунофенотипу ранніх мегакаріоцитів. Отримані дані свідчили про наявність у хворої БК ХМЛ мегакаріоцитарного типу.

Приклад 3

У хворого М-ва, 47 років, при наявності спленомегалії та гепатомегалії був діагностований ХМЛ безпосередньо в стадії бластного кризу. В периферичній крові пацієнта було виявлено 67 %, а в кістковому мозку 72 % клітин невеликого або середнього розміру. Крім визначення клітинного типу БК ХМЛ, важливим було питання щодо проведення типу диференційної діагностики з гострим лейкозом. При імуноцитохімічному дослідженні на поверхневих мембранах бластних клітин подібно до клітин при гострому лімфобластному лейкозі загального типу виявили експресію антигенів CD19. Проте, у даного хворого був значно вищим в крові та кістковому мозку відсоток CD34⁺ і CD33⁺ бластів. Отримані результати дозволили діагностувати у нього БК ХМЛ лімфоїдного типу з ранніх клітин-попередників В-лімфоцитів.

Таким чином, одержані дані підтверджують дієвість запропонованого способу діагностики.

Джерела інформації:

1. Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications, 5th Edition. E.M. Keohane, L.J. Smith, J.M. Walenga (eds.). Elsevier, 2015. 898 pp.
2. Bain B.J. Leukaemia diagnosis, 4th ed. London: Wiley-Blackwell, 2010. 377 p.
3. Hoffbrand V., Pettit J.E., Vyas P. (eds). Color atlas of clinical hematology, 4th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2010. 527p.
4. Льюис С.М., Бэйн Б., Бэйтс И. Практическая и лабораторная гематология. М.: Гэотар-Медиа, 2009. 670 с.
5. Руководство по гематологии /Под ред. А.И. Воробьева. М., 2003, - Т. 1, 2. 234 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб імуноцитохімічної діагностики бластного кризу хронічного мієлолейкозу, що включає проведення цитоморфологічного та ензімоцитохімічного дослідження, який **відрізняється** тим, що за допомогою широкої панелі моноклональних антитіл безпосередньо в мазках крові і препаратах кісткового мозку визначають експресію лінійно-специфічних і диференціальних антигенів, які найбільш точно характеризують природу лейкоемічних клітин при БК ХМЛ мієлоїдного і лімфоїдного походження.