



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **94944** (13) **U**  
(51) МПК (2014.01)  
**G01N 30/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2014 05691</b>	(72) Винахідник(и): <b>Лісяний Олександр Миколайович (UA), Потапова Антоніна Ігнатіївна (UA), Ключникова Антоніна Іванівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>26.05.2014</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.12.2014</b>	(73) Власник(и): <b>ІНСТИТУТ НЕЙРОХІРУРГІЇ ІМ. А.П. РОМОДАНОВА НАМН УКРАЇНИ, вул. Платона Майбороди, 32, м. Київ, 04050 (UA)</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.12.2014, Бюл.№ 23</b>	

## (54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ІНФІКУВАННЯ ЦИТОМЕГАЛОВІРУСОМ (ЦМВ) ПУХЛИН ГОЛОВНОГО МОЗКУ

### (57) Реферат:

Спосіб діагностики інфікування цитомегаловірусом (ЦМВ) пухлин головного мозку є лабораторним методом діагностики. Для точної та швидкої діагностики збудника використовують визначення даного вірусу у тканинах пухлин, взятих під час операції, або у фіксованих в формаліні тканин методом полімеразно-ланцюгової реакції.

UA 94944 U



Спосіб діагностики інфікування цитомегаловірусом (ЦМВ) пухлин головного мозку, що є лабораторним методом діагностики, який відрізняється тим, що для точної та швидкої діагностики збудника використовується визначення методом полімеразно-ланцюгової реакції наявності у тканинах пухлин взятої під час операції або з фіксованої в формаліні тканини даного вірусу.

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме нейрохірургії, і може бути використана для діагностики вірусної інфекції у хворих на пухлини головного мозку.

Протягом останніх років в медичну практику, в тому числі в нейрохірургію, впроваджуються високочутливі та високоспецифічні методи дослідження, які кардинально розширюють наші погляди на патогенез, етіологію таких складних захворювань, як пухлини головного мозку та ускладнення при них, які обтяжують перебіг цих захворювань, а саме визначення наявності активації латентної вірусної інфекції, яка визивається герпесвірусними інфекціями, в тому числі ЦМВ.

Своєчасне визначення наявності вірусу в організмі пацієнтів з пухлинами або іншими захворюваннями дозволяє використовувати для лікування сучасні протівірусні препарати, а саме ацикловіри, інтерферони, специфічні імуноглобуліни, що приводять до покращення стану хворих та запобігає передчасній їх смерті.

Особливо важливим є визначення наявності вірусів у самому пухлинному вогнищі (вузлі), що має важливе теоретичне та практичне значення, а саме відомо, що може бути причиною розвитку пухлин, що цей вірус є онкомодулятором, який здатний підсилювати ріст пухлини, пригнічувати імунну систему та скорочувати тривалість життя пацієнтів.

Своєчасне визначення наявності вірусу в пухлинному вогнищі дозволяє не лише причину виникнення пухлин та прогнозувати наслідки її розвитку та тривалості життя хворих, а й є основою для включення в комплексну терапію схем протівірусної терапії, яка сприяє покращенню якості та тривалості життя хворих.

Найбільш близьким до запропонованого, атому, прийнятому за прототип, є класичні вірусологічні методики, а саме визначення вірусів в культурі клітин на курячих ембріонах або в організмі чутливих тварин [1].

Вперше ще в 1922 році в Е.Гудпасгером та співавторами була запропоновано культивування вірусів в ембріонах курчат, але ця процедура займала 8-10 діб. Пізніше в 50 роки було розроблено методику культивування клітин *in vitro* та вирощування на цих культурах ембріональних або пухлинних клітин вірусів, що також займало багато часу та вимагало наявності спеціальних лабораторій та дороговартісного обладнання. Метод культивування та діагностики вірусів на тваринах (хом'ячках, мишах, приматах) також потребує досить багато часу та потребує наявності віварію та тварин для проведення досліджень.

Недоліки методів. Складна техніка обстежень, велика тривалість досліджень, необхідність великої кількості працівників, складність діагностичного визначення не одного, а цілого ряду вірусів, які можуть бути присутні в тканинах пухлини. Крім того, необхідно для визначення вірусів свіжий матеріал, безпосередньо взятий під час операції, що ускладнює виконання цих досліджень.

Задачею запропонованого методу є розробка способу діагностики вірусної інфекції у клітинах пухлині пацієнтів із внутрішньо мозковими новоутвореннями головного мозку, який дозволить досить швидко, протягом 1-2 діб визначати наявність вірусу або груп вірусів не в крові, а безпосередньо в пухлинному вогнищі, що дозволяє зробити точну діагностику етіології вірусів, їх локалізацію та прогнозувати характер подальшого перебігу пухлинного процесу.

Поставлена задача вирішується тим, що для точної та швидкої діагностики збудника використовують визначення даного вірусу у тканинах пухлин, взятих під час операції, або у фіксованих в формаліні тканин методом полімеразно-ланцюгової реакції.

А саме, для швидкої точної діагностики збудників та для прогнозування наслідків захворювання, використовується метод полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) та тканини пухлини, отримані протягом 2-3 годин після операції або фіксовані в формаліні зразки пухлин, що дозволяє відтермінувати дослідження та проводити його не з одним зразком, а з певною кількістю 5-10 зразків одночасно.

Запропонований спосіб здійснюється наступним чином, у кілька етапів:

1 етап - підготовчий, взяття тканин пухлини під час оперативного її видалення в стерильну без вірусної контамінації пластикову чашку Петрі, транспортування протягом 20 хвилин пухлинного зразка в лабораторію, очищення пухлинного зразка від згустків крові, сполучної тканини, розділення зразка на 2 фрагменти розміром по 0,5-0,8 см<sup>3</sup> перший - для виділення ДНК, проведення ПЛР, другий - поміщується в 4 % розчин формаліну для фіксації та збереження і наступного гістологічного установлення типу пухлини ступеня злоякісності та при

необхідності повторного виділення ДНК для ПЛР. Термін зберігання матеріалу без фіксації не повинен перевищувати 3 години, тому що за цей термін проходить загибель пухлинних клітин, активація ферментів, особливо ДНК-ази, яка руйнує ДНК, що не уможливорює проведення визначення вірусів в пухлині.

2 етап - виділення ДНК із забраних зразків та проведення ПЛР з певним праймером. Цей етап складається із 3-х стадій. Перша - виділення із свіжовзятої або фіксованої тканини пухлини ДНК, яка проводиться згідно з існуючими реагентами, які входять в стандартні набори для ПЛР, що випускаються різними фірмами. Незалежно від виробника цих наборів, методика стандартна і складається із перенесення 80-100 мг зразка пухлини в лікуючий розчин і інкубації певний час в цьому розчині та подальшому виділенні та очищенні ДНК розчинами хлороформу та спирту. Після чого виділену загальну ДНК використовують на 2-й стадії ПЛР, стадії розмноження ДНК в присутності відомого фрагмента ДНК (праймером), що займає 3-3,5 години часу в спеціальному приладі, терцику. Третя стадія включає електрофорез в агарозному гелі продуктів розмноження ДНК та оцінка результатів, яка проводиться візуально під дією ультрафіолетового опромінення. Наявність полоси преципітації ДНК в агарі свідчить, що є даний вірус, відсутність смуги з ДНК свідчить про відсутність цього вірусу у зразку пухлини. Цим методом можна у одному зразку визначити наявність 5-8 вірусів, що дозволяє діагностувати різні віруси одночасно із одного зразка пухлинної ДНК. Тривалість цього дослідження складає 6-8 годин в залежності від тривалості другої стадії ампліфікації. Цей метод дозволяє використовувати мінімальні об'єми тканини і при виникненні необхідності та замість свіжої тканини можна використовувати фіксовану тканину. Запропонований метод може використовуватись при масових обстеженнях, коли матеріал для дослідження забирати в різних місцях та фіксувати та зберігати в розчині формаліну. Крім того, запропонований метод дозволяє пере повторити дослідження та робити багаторазові дослідження для виконання діагностико-прогностичної та наукової роботи.

Отримані за допомогою цього запропонованого способу дані мають важливе значення, як для розуміння патогенезу, так і для прогнозування наслідків та лікування хворих.

Прикладом застосування заявленого способу є історія хвороби №375 від 2012 року. У хворого Х-ко, 39 р. була виявлена при клінічному та комп'ютерному (КТ) обстеженні пухлина задньої черепної ями. Хворого з його згоди прооперували, була видалена пухлина, подібна до медулобластоми, яку взяли на гістологічне та вірусологічне дослідження. Діагноз підтвердився, була медулобластома з інфільтративним характером росту. Проведене вірусологічне дослідження на герпес групу, а саме герпес 1, 4, 6, 8 типів та ЦМВ взятого матеріалу виявив в пухлині ЦМВ, що послужило насторогою для подальшого лікування. У хворого після операції піднялась температура до 39,5 °С, підсилювався головний біль, появились менінгіальні симптоми, стала смутна свідомість, що дозволило запідозрити ЦМВ енцефаліт, який був підтверджений повторною ПЛР. Призначення короткого курсу, 3 дні всього, цимевена, інтерферону, імунофану стабілізувало стан хворого. Через 3 дні він був переведений із реанімації в клініку та на 9-й день виписаний додому. Через 3 дні він був переведений із місяць променевої терапії злоякісної медулобластоми. Таким чином, застосування цього способу дало можливість установити загрозу для життя хворого в ранньому післяопераційному періоді, завдяки виявленню в пухлині ЦМВ, який потім визвав розвиток ускладнень. Своєчасна діагностика та лікування спасли життя хворому, завдяки швидкості та широті досліджень. Виконання цих досліджень іншими методами практично зайняло б до 15-20 діб, що могло бути фатальним для хворого.

Приклад 2. При ретроспективному аналізі результатів нейрохірургічного лікування 42 хворих з медулобластомами головного мозку було виявлено, що ступені інфільтративного росту вони розділились на 2 великі групи з несприятливим інфільтративним ростом, що класифікація Чанга мало Т<sub>3</sub>-Т<sub>4</sub> стадію та невеликі пухлини без інфільтративного проросту (Т<sub>1</sub>-Т<sub>2</sub>). Причини такого стану були незрозумілі, з чим можна пов'язати інфільтративний ріст. При проведенні ПЛР дослідження зразків цих пухлин, які були попередньо зафіксовані в формаліні та досліджені на наявність вірусів герпеса. У них було встановлено, що 20 пухлин містили в собі ЦМВ та герпес 4 типу, тобто майже половина із обстежених пухлин. При визначенні ступеня злоякісності по Чангу встановлено, що 14 пухлин (70 %) були більш злоякісні (Т<sub>3</sub>-Т<sub>4</sub> по Чашу), тоді як із решти 22 пухлин лише 6 пухлин були Т<sub>3</sub>-Т<sub>4</sub> - це лише 14 %. Таким чином, наявність вірусів герпеса 4 типу та ЦМВ є несприятливим чинником для медулобластом, який може обумовлювати агресивний інфільтративний ріст пухлини. Це важлива наукова інформація потрібна для визначення тактики лікування наступних пацієнтів, у яких є пухлини з інфільтративним ростом і яким потрібно рекомендувати подальше променеве лікування у супроводі противірусної терапії та регулярного ПЛР дослідження крові на ре активацію вірусів.

Клінічна апробація заявленого способу проведена в відділі імунології та онкологічних клініках №2 та №4 Інституту нейрохірургії та нейрохірургічному відділенні Київської обласної лікарні.

5 Застосування заявленого способу діагностики наявності вірусів у пухлинах дозволило попередити виникнення ускладнень та зрозуміти деякі причини несприятливого перебігу захворювання, яке пов'язане з активацією вірусної інфекції в пухлинах.

Таким чином, проведені клінічні співставлення з даними використання запропонованого способу дозволить зробити висновок про можливість використання ПЛР для визначення вірусної інфекції у тканинах, взятих зразу після операції та у фіксованих формаліном пухлинах.

10 Запропонований нами спосіб має такі переваги:

розроблений спосіб дозволяє швидко, протягом 6-8 годин провести визначення наявності вірусної інфекції;

розроблений спосіб дозволяє одночасно із одного зразка пухлини визначити до 5-7 збудників;

15 розроблений спосіб дозволяє визначити збудників в "свіжій" та фіксованій формаліном пухлині;

розроблений спосіб дозволяє проведення багаторазових від термінованих у часі досліджень наявності вірусів

20 розроблений метод не вимагає необхідної кількості спеціального обладнання, реагентів, тварин та клінічних культур, а також великої кількості дослідників.

Джерела інформації:

1. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения. Москва, Россия.-1996.-15с.

25 2. Меньшиков В.В. Молекулярно-биологические исследования в клинической лабораторной диагностике: возможности проблемы (лекция). Клиническая лабораторная диагностика.-2006,№3.-С.23-30.

3. Глоба А.Г., Демидова В.С., Дикова О.Н. Определение уровня экспрессии генов цитокинов и маркеров апоптоза методом полимеразной цепной реакции в реальном времени у пациентов с хирургической инфекцией. Молекулярная медицина.-2007,№7.-С.48-51.

4. Трофимов Д.Ю., Бурминская О.В., Батенева Е.И. и др. Разработка комплекса Тест систем на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени для определения цитокинового профиля в мононуклеарных клетках крови. Медицинская иммунология.-2008,№6.-С.513-570.

35 5. Nishimura N. et al. Direct polymerase chain reaction from whole blood without DNK isolation. Ann.Clin.Biochim.-2000,V.37.-P.674-800.

6. Baryawno N., Rahbar A., Wolmer-Solberg N., Taher C, Odeberg A. et al. Detection of human cytomegalovirus in medulloblastomas reveals a potential therapeutic target. J. Clin.Invest.-2011.-V.121.-P.4043-4055.

#### 40 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики інфікування цитомегаловірусом (ЦМВ) пухлин головного мозку, що є лабораторним методом діагностики, який **відрізняється** тим, що для точної та швидкої діагностики збудника використовують визначення даного вірусу у тканинах пухлин, взятих під час операції, або у фіксованих в формаліні тканин методом полімеразно-ланцюгової реакції.