



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **78555** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 10120	(72) Винахідник(и): Миронова Олена Валеріївна (UA), Мазур Анастасія Геннадіївна (UA), Ткаченко Михайло Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 23.08.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.03.2013	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2013, Бюл.№ 6	

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РИЗИКУ РОЗВИТКУ ГОСТРОЇ МІЄЛОБЛАСТНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування ризику розвитку гострої мієлобластної лейкемії передбачає дослідження крові. В сироватці крові визначають рівень тимідинкінази та β_2 -мікроглобуліну до початку лікування та після завершення індукції ремісії, і при рівні тимідинкінази від 10,1 до 20,0 Од/л прогнозують середній ризик, більше 20,0 Од/л вказує на значну поширеність ураження та поганий прогноз, найбільш несприятливий прогноз спостерігається при рівні тимідинкінази більше 30,0 Од/л, підвищення рівня тимідинкінази в період ремісії >5,0 Од/л свідчить про неповну клініко-гематологічну відповідь на проведене лікування, і прогнозується розвиток рецидиву захворювання незалежно від клініко-гематологічних показників.

UA 78555 U

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, а саме: онкогематології, і може використовуватись для прогнозування мієлобластної лейкемії.

Значення прогностичних факторів в онкогематології стало очевидним з моменту появи стандартних програм адекватної хіміотерапії, що дає змогу формувати групи ризику пацієнтів для стратифікації лікування [16]. Найбільш широко застосовуються в гематології такі прогностичні фактори, як вік, стать, початковий соматичний статус хворого, клініко-лабораторні показники, цитоморфологічний варіант захворювання, імунофенотипічні характеристики варіанта лейкемії та ін. Але всі вони мають недостатню корелятивну залежність від ефективності хіміотерапії та тривалості життя, що не дає можливості використовувати їх як індивідуальні незалежні критерії прогнозу. Радіоімунологічний аналіз є сучасним методом дослідження і застосовується в онкогематології з метою виявлення пухлинних маркерів - з'єднань, які виділяються пухлинними клітинами або організмом у відповідь на розвиток пухлини. На сьогоднішній день їх відомо більше ніж 200. Частіше пухлинні маркери групують по хімічній структурі (глікопротеїни, поліпептиди, білки та інш.) або по біологічній функції, яку вони виконують в організмі (онкофетальні антигени, ензими, гормони, рецептори та інш.) [14, 15]. Останнім часом з метою прогнозування та контролювання перебігу злоякісних захворювань системи крові все ширше використовуються тимідинкіназа та бета-2 мікроглобулін (β_2 -МКГ) [7, 8, 10, 13, 17].

Тимідинкіназа належить до групи онкофетальних ензимів і є внутрішньоклітинним ферментом. Вона каталізує перетворення тимідину в тимідинмонофосфат, який потім як трифосфат включається до складу ДНК. Оскільки тимідин може включатися в ДНК тільки у фосфоризованій формі, тимідинкіназа відіграє ключову роль в процесі метаболізму тимідину в клітині [3, 4]. У клітинах еукаріот існують два ізоензими тимідинкінази: ТК1 та ТК2. Прогностичне значення має виявлення у сироватці крові чи інших біологічних рідинах, з якими безпосередньо контактують пухлинні клітини, ізоензим ТК1, відомий як фетальна тимідинкіназа. Він є ключовим ферментом біосинтезу тимідилата по "запасному" шляху і підтримує баланс концентрацій всіх дезоксирибонуклеотидів, необхідних для реплікації ДНК [5].

Відображуючи активність клітинної проліферації, тимідинкіназа не виявлена у спокійних клітинах [9]. Дослідження останніх років свідчать, що її активність у сироватці крові хворих на гостру мієлоїдну лейкемію (ГМЛ) значно вища, ніж при інших видах неоплазій. Але майже немає даних, чи можна прогнозувати відповідь на індукційну хіміотерапію на підставі значень тимідинкінази в дебюті захворювання, чи відповідає динаміка її змін результатам лікування та чи можливо прогнозувати подальший перебіг гострої мієлоїдної лейкемії на підставі концентрації цього пухлинного маркера в періоді ремісії.

Що стосується β_2 -МКГ, то це низькомолекулярний білок, який відноситься до класу імуноглобулінів і відображає біосинтетичну активність тканин. Він знаходиться на поверхні антигенів ядер клітин в якості антигену головного комплексу гістосумісності (HLA). До 98 % β_2 -МКГ в рідинах організму знаходиться у вільній формі і тільки 2 % його зв'язано з молекулою HLA [6]. Розміри молекули невеликі (радіус Стокса 16 Å) і при електрофорезі він мігрує в область β_2 -2 глобулінів (звідки і назва β_2 -мікроглобулін). Концентрація β_2 -МКГ в крові відображає клітинний оборот та проліферацію лімфоцитів і контролюється двома процесами: швидкістю синтезу і швидкістю виведення. Біосинтез у здорової людини є постійним процесом (100-150 мг/добу) і здійснюється практично всіма клітинами організму. Однак найбільшою здатністю володіють лімфоцити (до 50 %) та пухлинні клітини [2]. Виводиться β_2 -МКГ нирками і цей процес залежить від швидкості гломерулярної фільтрації (ШГФ).

За даними літератури збільшення концентрації β_2 -МКГ (в 4-5 разів) в сироватці крові спостерігається при еритромієлобластному, мієлобластному, монобластному та лімфобластному варіантах (в 100 %, 70 %, 64 %, 61 % випадках відповідно) (18). Але, значний розбіг отриманих результатів лишає можливості використовувати цей пухлинний маркер як ~ диференціальнодіагностичний тест при ідентифікації окремих клініко-морфологічних варіантів гострої лейкемії. Немає даних про кореляційний зв'язок між концентрацією β_2 -МКГ та кількістю лейкоцитів, лімфоцитів, бластних клітин в периферичній крові (ПК) та відсотковим вмістом останніх в кістковому мозку ні при жодному з варіантів гострої лейкемії.

Є розрізнені дані про використання β_2 -МКГ як прогностичний фактор при гострій мієлоїдній лейкемії, але немає досліджень про зміни його рівня при різних відповідях на хіміотерапію. Відомо, що інфекційні захворювання, які приєднуються, приводять до підвищення рівня β_2 -МКГ в крові у хворих на гостру мієлоїдну лейкемію [11, 12].

Найбільш близьким до способу, що заявляється, обраний як прототип (1), є спосіб прогнозування ризику розвитку гострої мієлоїдної лейкемії, що передбачає дослідження периферичної крові.

Недоліком цього способу є те, що він не дозволяє отримати достовірні дані про ризик розвитку гострої мієлоїдної лейкемії та потребує ряд додаткових досліджень.

В основу корисної моделі поставлено задачу дослідити вміст тимідинкінази та β_2 -МКГ у сироватці крові методом РІА у хворих на гостру мієлоїдну лейкемію в якості прогностичних факторів щодо лікування та ремісії.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, який передбачає дослідження крові, згідно корисної моделі, в сироватці крові визначають рівень тимідинкінази та β_2 -МКГ до початку лікування та після завершення індукції ремісії, і при рівні тимідинкінази від 10,1 до 20,0 Од/л прогнозують середній ризик, більше 20,0 Од/л вказує на значну поширеність ураження та поганий прогноз, найбільш несприятливий прогноз спостерігається при рівні тимідинкінази більше 30,0 Од/л, підвищення рівня тимідинкінази в період ремісії $>5,0$ Од/л свідчить про неповну клініко-гематологічну відповідь на проведене лікування, і прогнозується розвиток рецидиву захворювання незалежно від клініко-гематологічних показників.

Було обстежено 97 пацієнтів у віці від 17 до 73 років (середній вік $45,2 \pm 3,7$), 58 чоловіків і 39 жінок з гострою мієлоїдною лейкемією у першому гострому періоді, яким проводився аналіз клінічних та стандартних гематологічних показників і визначався рівень тимідинкінази та β_2 -МКГ у сироватці крові методом РІА до початку та після завершення індукції ремісії. Всі хворі перебували на лікуванні в КМКЛ № 9 в гематологічному відділенні № 1, яке є клінічною базою відділення захворювань системи крові ДУ „Інститут гематології та трансфузіології НАМН України”. Діагноз встановлювався на підставі клінічної картини, цитоморфологічного аналізу периферичної крові та цитологічного дослідження кісткового мозку (бластів $>20\%$ усіх нееритроїдних клітин). Мієлоїдна належність бластів виявлялась за допомогою цитохімічного дослідження мазків кісткового мозку і периферичної крові. Захворювання класифікували відповідно до Міжнародної статистичної класифікації захворювань 10-го перегляду.

Підваріанти гострої мієлоїдної лейкемії визначали за критеріями ФАБ-класифікації. Переважали пацієнти з М2, М4, М5 варіантами захворювання (23, 31, 29 випадків відповідно); М0, М6 і М3 діагностовано в 9 випадках, М1 виявлено у 5 пацієнтів. Середній вік хворих складав $45,2 \pm 3,7$ років, 72,2 % з них - молодше 60 років (таблиця 1).

Таблиця 1

Розподіл хворих за віком і статтю

Кількість хворих	Вік хворих (роках)									
	30-39		40-49		50-59		60-69		>70	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%
Жінки n=39	7	7,2	13	13,4	11	11,4	6	6,2	2	2,1
Чоловіки n=58	10	10,3	15	15,5	14	14,4	14	14,4	5	5,2
Всього n=97	17	17,5	28	28,9	25	25,8	20	20,6	7	7,3

Дослідження зразків сироватки крові на вміст тимідинкінази та β_2 -МКГ хворих на гостру мієлоїдну лейкемію методом РІА, який належить до конкурентних видів аналізу, проводили в радіологічному відділенні КМКЛ № 14 на кафедрі радіології та радіаційної медицини НМУ імені О.О. Богомольця. Рівні β_2 -МКГ та тимідинкіназу в зразках визначали згідно з інструкціями по використанню відповідних наборів (IMMUNOTECH, Чехія). Набір крові проводили у ті ж дні, що і стерильну пункцію кісткового мозку. Сироватка зберігалася при $t < -18^\circ\text{C}$ в сухих чистих скляних пробірках не більше 6 місяців.

РІА тимідинкінази проводили з використанням 5- ^{125}I -дезоксиуридину, який перетворював тимідинкіназу зразка, що досліджувався, у ^{125}I -дУМФ. Останній відділяли від реакційної суміші за допомогою іонообмінної смоли, яку промивали та вимірювали гамма-лічильником пов'язану активність. Рівень тимідинкінази у зразках визначався методом інтерполяції за калібрувальною кривою і був прямо пропорційним пов'язаній активності. Набір для визначення тимідинкінази в сироватці крові дозволяв виявити концентрацію ензиму в діапазоні від 0-80,0 Од/л (5-9 Од/л граничні значення, >9 Од/л - патологія).

При РІА β_2 МКГ, зразки, що досліджувалися, контрольні та калібрувальні проби проходили інкубацію з меткою ^{125}I - β_2 -МКГ в пробірках, вкритих моноклональними антитілами. Потім видалявся вміст пробірок та вимірювалась пов'язана активність ^{125}I . Концентрацію β_2 -МКГ, зворотно пропорційну зв'язаній активності, теж визначали методом інтерполяції по калібрувальній кривій. Набір для визначення β_2 -МКГ в сироватці крові дозволяє виявити його

концентрацію в діапазоні 0,48-52,0 мг/л. Було проведено дослідження рівнів β_2 -МКГ та тимідинкінази у 18 здорових добровольців та виявлене співпадіння норми, яка дається в інструкції до наборів до показників, що визначалися: для β_2 -МКГ - від 1,0 до 2,4 мг/л, для ТК - 0-5 Од/л.

- 5 В дослідження були включені тільки пацієнти, індукція ремісії яким проводилась по стандартній схемі "7+3": цитозар 100 мг/м²/добу в 7 днів, ідарубіцин (заведоз) 12 мг/м²/добу чи адриабластин 40 мг/м²/добу 3 дні. Проведення хіміотерапії хворим похилого віку проводилось по тій же схемі, але доза антрациклінового антибіотику була знижена на 1/3 (таблиця 2).

Таблиця 2

Клінічна характеристика хворих на ГМЛ до початку лікування

Клінічні ознаки	Кількість пацієнтів із зазначеними ознаками	%
Стать:		
Чоловіки	58	59,8
Жінки	39	40,2
Лімфаденопатія	24	24,8 %
Гепатоспленомегалія	29	29,9 %
Лейкопенія менше 3×10^9 /л	34	35,1 %
Лейкоцитоз понад 30×10^9 /л	38	39,2 %
Геморагічний синдром	56	57,7 %
Анемія	80	82,5 %
Інфекційно-запальні ускладнення	46	47,4 %

10

Контрольне дослідження кісткового мозку виконувалось після кожного курсу хіміотерапії перед наступним після виходу пацієнта із гранулоцитопенії (частіше на 21 добу після закінчення курсу). Якщо відновлення гемопоєзу не спостерігалось, то, незалежно від показників периферичної крові, стерильну пункцію повторювали через 4 тижні після останнього введення цитостатика. При відсутності досягнення ремісії після 1-го курсу лікування починали наступний курс індукційної хіміотерапії. При наявності ремісії переходили до її консолідації.

15

Відповідь на хіміотерапію оцінювалась після 1-го та 2-го курсів лікування згідно з загальноприйнятими критеріями. Повну ремісію констатували при нормальному співвідношенні всіх паростків кровотворення та виявленні <5 % бластних клітин в кістковому, відсутності їх в периферичній крові та спинномозковій рідині, кількості нейтрофілів у периферичній крові $\geq 1,5 \times 10^9$ /л, тромбоцитів $\geq 100 \times 10^9$ /л. Первинно-резистентна форма гострої мієлоїдної лейкемії констатувалася при відсутності повної ремісії після проведення двох курсів хіміотерапії. За ранню смерть вважали смерть хворого протягом 6-й тижнів від моменту встановлення діагнозу.

20

Оскільки гостра мієлоїдна лейкемія належить до лейкемій переважно дорослих, одним з параметрів аналізу був вік хворих, який коливався в межах від 23 до 62 років. При різних морфологічних варіантах гострої мієлоїдної лейкемії, "наймолодшими" були групи хворих з М3 та М5. Однак, у зв'язку з невеликою кількістю вибірки деяких морфологічних форм та кількісною неоднорідністю груп, статистичний порівняльний аналіз віку за морфологічними варіантами не проводився.

25

Аналіз середніх показників віку у підгрупах з досягнутою ремісією і без неї показав, що середній вік хворих з ремісією був помітно нижчий: 39,5 років проти 56,2 років. Крім того, відомо, що досягнення ремісії у хворих, старших за 60 років, вважається складною проблемою. Необхідно взяти до уваги і той факт, що лікування пацієнтів похилого віку проводилося антрациклінами, доза яких була знижена на 1/3. Тому були проаналізовані дані досягнення ремісії у хворих, молодших за 60 років, та хворих, старших за 60 років. Отримані дані підтверджують той факт, що похилий вік хворого є несприятливим прогностичним фактором, знижуючи ймовірність досягнення ремісії більше, ніж у 1,5 рази. Це насамперед, пов'язано із наявністю більшої кількості супутніх соматичних захворювань, приєднанням інфекційних ускладнень та необхідністю зменшення доз цитостатичних препаратів. Показник частоти досягнення кістково-мозкової ремісії після завершення хіміотерапії був достатньо високим і складав 59,5 %, хоча спостерігалися різні його значення при окремих морфологічних варіантах гострої мієлоїдної лейкемії за ФАБ-класифікацією. Так, при М0 та М6 варіантах ремісії не було отримано в жодному випадку, для М1 варіанта частота ремісії становила 18,6 %, для М2 - 28,8 %, для М3 - 22,0 %, для М4 - 16,1 %, для М5 - 14,4 %. Отримана тенденція співпадає з

30

35

40

даними літератури та корелює із значеннями тимідинкінази у сироватці крові, що не можна сказати про β_2 -МКГ.

Таблиця 3

Співвідношення кількості ремісій із рівнями ТК та β_2 -МКГ до лікування

Вік хворих	Ремісія, n=62 (63,9 %)	ТК, Од/л (95 % довірчий інтервал) норма: 0-5,0 Од/л	β_2 -МКГ, мг/л (95 % довірчий інтервал) норма: 1,0-2,4 мг/л
< 60 років, n=66 (68 %)	42 (43,2 %)	17,41±2,52 (12,41-22,41)	4,51±2,21 (3,12-6,72)
> 60 років, n=31 (32 %)	20 (20,6 %)*	18,18±3,99 (13,11-23,25)	6,35±3,72 (4,06-10,05)

Примітка: * $p < 0,05$ в порівнянні з групою <60 років, критерій достовірності процентів Стьюдента.

5 Як видно із наведених в таблиці 3 даних, значення тимідинкінази у всіх хворих на гостру мієлоїдну лейкемію значно більше норми і у двох основних вікових групах статистично не відрізняється. Це свідчить про те, що фермент тимідинкінази відображає проліферацію лейкемічних клітин, а не біологічні характеристики хворого.

10 Рівень β_2 -МКГ в сироватці крові в представлених групах має різницю трошки більшу: в групі похилого віку підвищується в порівнянні з нормою майже 4 рази. Але слід відмітити, що це спостерігається не у всіх хворих на гостру мієлоїдну лейкемію, а десь у 75 %. Скоріше це пов'язано з приєднанням інфекційних захворювань, з віковим порушенням функції нирок чи на фоні хіміотерапії, що корелює і з даними літератури. Відомо, що рівень β_2 -МКГ в крові контролюється двома процесами: швидкістю синтезу та швидкістю виведення. Синтез у 15 здорових людей є постійним процесом, виведення ж виключно залежить від швидкості гломерулярної фільтрації. Тому підвищення рівня β_2 -МКГ в крові відображає збільшення або його секреції, або зниження швидкості гломерулярної фільтрації. У хворих на гостру мієлоїдну лейкемію похилого віку спостерігаються і зниження швидкості гломерулярної фільтрації і підвищення синтезу, який пов'язаний з основним захворюванням.

20 Всі хворі, в залежності від отриманих результатів лікування, були розподілені на наступні групи:

25 I - з повною клініко-гематологічною ремісією після 1-го курсу індукційної хіміотерапії, II - з повною клініко-гематологічною ремісією після 2-го курсу індукційної хіміотерапії, III - первинно-резистентні до хіміотерапії, IV - померли протягом 6-й тижнів від моменту встановлення діагнозу (рання смерть).

30 Серед 97 обстежених у першому гострому періоді ремісією після 1 -го курсу хіміотерапії отримано у 24 хворих (24,7 %), після 2-го - у 38 хворих (39,2 %). 23 хворих (23,7 %) виявилися первинно-резистентними до хіміотерапії, а 12 осіб (12,4 %) померли протягом 6-й тижнів від моменту встановлення діагнозу. При аналізі смертельних випадків встановлено, що один пацієнт помер під час проведення курсу хіміотерапії від нирково-печінкової недостатності; 6 35 хворих загинули у зв'язку з ускладненнями хвороби або лікування, а саме: геморагічного синдрому із крововиливом у головний мозок (2 випадки), кишково-шлунковою кровотечею (1 випадок), важких інфекційних процесів на фоні глибокої нейтропенії (3 випадки, у тому числі 1 доведений аспергільоз); 5 пацієнтів померли внаслідок подальшої професії захворювання.

Таблиця 4

Взаємозв'язок між значеннями ТК, β_2 -МКГ та клініко-гематологічними показниками у хворих різних груп до початку хіміотерапії з часом виникнення ремісій

Показник	Групи пацієнтів			
	I Ремісія після 1 - го курсу ХТ (n=24) M \pm m (95 % ДІ)	II Ремісія після 2- го курсу ХТ (n=38) M \pm m (95 % ДІ)	III Первинно- резистентні хворі (n=23) M \pm m (95 % ДІ)	IV Рання смерть (n=12) M \pm m (95 % ДІ)
ТК, норма: 0-5,0 Од/л	7,1 \pm 1,672 (3,90-10,30)	13,89 \pm 1,679* (10,58-17,21)	34,33 \pm 5,287* (23,66-45,00)	53,946 \pm 8,46* (28,63-71,25)
β_2 -МКГ, норма: 1,0-2,4 мг/л	5,53 \pm 2,62 (3,91-8,15)	6,32 \pm 3,74 (4,06-10,05)	6,92 \pm 3,84 (5,60-11,76)	10,91 \pm 3,40 (8,30-14,31)
Еритроцити, $\times 10^{12}$	2,83 \pm 0,123 (2,58-3,08)	2,71 \pm 0,156 (2,55-2,87)	2,34 \pm 0,089 (2,16-2,52)	2,49 \pm 0,127 (2,34-2,64)
Гемоглобін, г/л	87,83 \pm 3,37 (81,10-94,56)	83,9 \pm 4,11 (79,1-88,8)	74,5 \pm 13,2 (36,0-113,0)	75,6 \pm 4,56 (71,1-83,6)
Лейкоцити, $\times 10^9$ /л	18,38 \pm 4,41 (9,57-27,19)	18,69 \pm 4,52 (11,39-25,99)	24,87 \pm 11,98 (1,04-48,7)	28,02 \pm 12,88 (1,15-54,90)
Тромбоцити, $\times 10^9$ /л	114,06 \pm 18,11 (57,16-170,97)	52,76 \pm 19,07 (33,82-71,7)	53,5 \pm 27,37 (5,4-101,6)	39,11 \pm 8,4** (21,88-56,35)
Бласти крові, %	42,54 \pm 10,87 (18,86-66,22)	42,83 \pm 4,47 (33,85-51,80)	48,37 \pm 14,18 (14,85-81,9)	61,31 \pm 7,13 (46,49-76,15)
Бласти кісткового мозку, %	57,92 \pm 9,67 (37,4-78,4)	62,3 \pm 3,7 (54,77-69,74)	55,8 \pm 12,36 (27,83-83,76)	81,06 \pm 5,09 (70,33-91,79)

Примітки:

1. *p < 0,005 порівняно з I групою.
2. **p < 0,05 порівняно з I групою.
3. ДІ - довірчий інтервал.

Доведено, що статистично достовірними змінами характеризувалися лише тимідинкінази сироватки крові у всіх пацієнтів в 3-х групах дослідження та деякі показники кількості тромбоцитів. Основні середні показники гематологічного обстеження хворих до лікування достовірно не відрізнялись між групами з досягнутою ремісією, резистентними формами та з смертельними випадками, окрім середньої кількості тромбоцитів в групі померлих порівняно із показником в групі з позитивною відповіддю на лікування після першого курсу.

Однак помічено, що в III та IV групах кількість еритроцитів та рівень гемоглобіну були все ж таки нижчими, ніж в перших двох групах. Звертає на себе увагу більш широкий діапазон коливання кількості лейкоцитів в III та IV групах (1,04-48,7 $\times 10^9$ /л і 1,15-54,90 $\times 10^9$ /л відповідно) та більш високі їх середні показники в зазначених групах.

Встановлено, що підвищені значення сироваткової тимідинкінази, як правило, не корелюють із кількістю лейкоцитів у периферичній крові та кількістю бластних клітин у кістковому мозку. Іноді при глибокій лейкопенії значення сироваткової тимідинкінази виявлялися збільшеними в десятки разів (наприклад: лейкоцити 0,98 $\times 10^9$ /л, тимідинкіназа - 56,7 Од/л), що дозволяло судити про ступінь злоякісності пухлинного клону й агресивності перебігу захворювання. Крім того, встановлено, що активність сироваткової тимідинкінази не корелює з віком і статтю хворих на гостру мієлоїдну лейкемію.

Як вже відмічалось, підвищення рівня β_2 -МКГ в сироватці крові до лікування спостерігалось у 75 % пацієнтів, але не було встановлено кореляційного зв'язку між концентрацією цього білка та кількістю лейкоцитів та бластних клітин в периферичній крові, кістковому мозку в жодній групі. Як видно із наведених в таблиці № 4 даних, середній рівень β_2 -МКГ в I-III групах пацієнтів якщо і був більше норми, то значно не відрізнявся. Що стосується пацієнтів IV групи, то можливо, що підвищення концентрації пухлинного маркера майже в 4,5 разів вірогідно пов'язано не тільки з основним захворюванням, а і з супутніми змінами в деяких органах та системах (в першу чергу в сечовидільній системі) або з інфекцією, яка приєдналася.

Значення β_2 -МКГ у пацієнтів з гострою мієлоїдною лейкемією до лікування також не корелювали з показниками виживаності і не мали паралельної залежності від частоти досягнення повних ремісій. Таким чином, висхідні різні даного пухлинного маркера в період встановлення діагнозу не мали практичного значення.

5

Таблиця 5

Взаємозв'язок між значеннями ТК, β_2 -МКГ та клініко-гематологічними показниками у хворих на різних етапах перебігу гострої мієлоїдної лейкемії після завершення хіміотерапії

Показник	Групи хворих		
	I Ремісія після 1-го курсу ХТ (n=24) M \pm m (95 % ДІ)	II Ремісія після 2-го курсу ХТ (n=38) M \pm m (95 % ДІ)	III Первинно-резистентні хворі(n=23) M \pm m (95 % ДІ)
ТК, норма: 0-5,0 Од/л	4,12 \pm 0,51 (2,58-5,66)	4,78 \pm 0,71 (2,5-7,06)	20,82 \pm 2,95* (12,77-28,87)
β_2 -МКГ, норма: 1,0- 2,4 мг/л	3,01 \pm 1,01 (2,50-4,02)	3,36 \pm 1,14 (3,0-4,5)	6,23 \pm 3,62 (5,27-9,85)
Еритроцити, $\times 10^{12}$	3,00 \pm 0,18 (2,63-3,38)	3,35 \pm 0,27 (2,35-4,35)	3,11 \pm 0,98 (2,9-3,32)
Гемоглобін, г/л	99,18 \pm 6,02 (86,91- 111,45)	89,38 \pm 7,53 (71,22- 107,54)	72,41 \pm 3,63 (65,09-79,73)
Лейкоцити, $\times 10^9$ /л	4,35 \pm 0,56 (3,09-5,61)	3,86 \pm 0,76 (2,51-5,21)	10,81 \pm 26,91 (5,2-16,42)
Тромбоцити, $\times 10^9$ /л	215,15 \pm 25,8(156,78- 273,52)	206,2 \pm 24,65 (108,15- 304,25)	80,29 \pm 13,99 (52,1-108,47)
Бласти крові, %	0	0	48,37 \pm 14,18* (14,85-81,9)
Бласти КМ, %	2,03 \pm 0,42 (-0,03-4,03)	1,85 \pm 0,55 (-0,01-3,6)	33,79 \pm 4,76* (24,22-43,36)

Примітки: 1. *p < 0,005 порівняно з I та II групами.

2. ДІ - довірчий інтервал.

Після завершення хіміотерапії істотно значущі розбіжності знайдені між групами з досягнутою ремісією та резистентними формами відносно значень сироваткової тимідинкінази та кількості бластних клітин в периферичній крові та кістковому мозку. Індукція вважалась завершеною після досягнення ремісії. У разі позитивної відповіді на лікування рівень тимідинкінази статистично достовірно знижувався (4,12 \pm 0,51 Од/л проти 7,1 \pm 1,672 Од/л в I групі та 4,78 \pm 0,71 Од/л проти 13,89 \pm 1,679 Од/л в II групі), чутливо відображуючи ефективність лікування. Значення тимідинкінази у діапазоні нормальних виявлялися лише в період лабораторно підтвердженої ремісії, залишаючись істотно підвищеними при неефективності терапії. Зменшення рівня тимідинкінази після завершення хіміотерапії у хворих, що виявилися первинно-резистентними до хіміотерапії, теж набувало статистичної значущості (20,82 \pm 2,95 Од/л проти 34,33 \pm 5,287 Од/л), але в жодному випадку не сягало нормальних показників. Серед пацієнтів зі смертельним кінцем, у яких вдалося встигнути провести дослідження тимідинкінази, вміст останньої виявився не тільки істотно не зменшеним (52,45 \pm 8,77 Од/л проти 53,946 \pm 8,46 Од/л), а в деяких випадках ще більш підвищеним, що могло свідчити про перехід хвороби в фазу неконтрольованого перебігу.

У більшості хворих на гостру мієлоїдну лейкемію з повною клініко-гематологічною ремісією був встановлений прямий, статистично достовірний кореляційний зв'язок між рівнем β_2 -МКГ та фазою перебігу хвороби - в процесі проведення індукції ремісії він знижався майже до нормальних значень при її досягненні. Наведені в таблиці № 5 дані свідчать, що рівень β_2 -МКГ у 75-80 % пацієнтів I-II груп після завершення хіміотерапії незначно перебільшував норму і в порівнянні з рівнями до лікування суттєво відрізнявся. Але у деяких пацієнтів (20-25 %) рівень β_2 -МКГ в період ремісії був достовірно вище контрольних. Вірогідно, що цей факт характеризує ступінь повноти ремісій, які були досягнуті, тому β_2 -МКГ сироватки крові можна використовувати як параметр контролю за повнотою ремісії.

Що стосується показників цього пухлинного маркера у пацієнтів III групи, то після лікування він майже не знизився, а у деяких пацієнтів ще й збільшився. Вірогідно, що хіміотерапія впливала на ШГФ нирок, тому виведення β_2 -МКГ було сповільнене. Таким чином, є сенс робити цим пацієнтам аналіз на вміст цього білка не тільки в сироватці крові, а й ще в сечі (як до

лікування так і після) і провести паралель між отриманими параметрами. Якщо і в крові і в сечі до лікування концентрація β_2 -МКГ буде підвищена, то це може бути пов'язано як з основним захворюванням, так і з патологією нирок, яка повинна діагностуватися на первинному етапі. Таким хворим слід призначати більш коректну терапію. Тому β_2 -МКГ не може використовуватися як ПФ для оцінки ефективності лікування хворих на гостру мієлоїдну лейкемію.

Результати динаміки вмісту тимідинкінази та β_2 -МКГ у сироватці крові в процесі лікування відображені в таблиці 6.

Таблиця 6

Динаміка вмісту тимідинкінази та β_2 -МКГ на різних етапах хіміотерапії

Групи пацієнтів	Показники			
	До початку ХТ		Після завершення ХТ	
	ТК норма: 0-5,0 Од/л	β_2 МКГ норма: 1,0-2,4 мг/л	ТК норма: 0-5,0 Од/л	β_2 МКГ норма: 1,0-2,4 мг/л
I Ремісія після 1-го курсу ХТ (n=24) $M \pm m$ (95 % ДІ)	7,1 \pm 1,672 (3,90-10,30)	5,53 \pm 2,62 (3,91-8,15)	4,12 \pm 0,51 (2,58-5,66)	3,01 \pm 1,01 (2,50-4,02)
II Ремісія після 2-го курсу ХТ (n=38) $M \pm m$ (95 % ДІ)	13,89 \pm 1,679 (10,58-17,21)	6,32 \pm 3,74 (4,06-10,05)	4,78 \pm 0,71 (2,5-7,06)	3,36 \pm 1,14 (3,0-4,5)
III Первинно-резистентні хворі (n=23) $M \pm m$ (95 % ДІ)	34,33 \pm 5,287 (23,66-45,00)	6,92 \pm 3,84 (5,60-11,76)	20,82 \pm 2,95* (12,77-28,87)	6,23 \pm 3,62 (5,27-9,85)
IV Рання смерть (n=12) $M \pm m$ (95 % ДІ)	53,946 \pm 8,46 (28,63-71,25)	10,91 \pm 3,40 (8,30-14,31)	52,45 \pm 8,77 (26,3-69,43)	10,23 \pm 6,12 (8,13-16,35)

Примітки: 1 - *p < 0,005 порівняно з I групою.

2. ДІ - довірчий інтервал.

Як вже обговорювалося, вміст β_2 -МКГ в сироватці крові хворих на гостру мієлоїдну лейкемію після проведення хіміотерапії якщо досягав норми, до це свідчило про повну ремісію і співпадало із статистично достовірним зниженням тимідинкінази та з клініко-гематологічними ознаками ремісії. У пацієнтів III групи показники β_2 -МКГ до лікування перевищували норму в 2,5-4 рази, але не так як ТК - в 7-9 разів. І після проведення хіміотерапії зменшення рівня β_2 -МКГ спостерігалось не більше ніж на 10 % і не у всіх хворих, а тимідинкінази на 40 %. Тому ПМ β_2 -МКГ не є незалежним критерієм досягнення ремісії, але в комплексі з показниками тимідинкінази може дати більш повну картину ефективності лікування.

Таким чином, зниження вмісту тимідинкінази при гострій мієлоїдній лейкемії після завершення курсу хіміотерапії до нормальних значень (<6 Од/л) свідчать про досягнення ремісії у хворих на ГМЛ, що відповідає результатам контрольного дослідження кісткового мозку зі вмістом бластних клітин у мієлограмі <5 %. Зменшення рівня цього ензиму до значень, що >6 Од/л, свідчать про неповну клініко-гематологічну відповідь на проведене лікування, що також підтверджується наявністю в кістковому мозку >5 % бластних клітин. Вивчення даних дослідження дозволило виявити зворотний корелятивний зв'язок між ініціальною активністю тимідинкінази в дебюті гострої мієлоїдної лейкемії та кількістю отриманих ремісій. Доведено, що чим нижче рівень тимідинкінази на момент діагностики хвороби, тим вище вірогідність отримання клініко-гематологічної ремісії. Кількість ремісій після завершення стандартної індукційної хіміотерапії в залежності від ініціальних значень тимідинкінази представлена в таблиці №7.

Таблиця 7

Кількість ремісій в залежності від ініціальних значень ТК

Кількість ремісій	ТК, Од/л			
	Менше 10,0	10,1-20,0	20,1-30,0	Більше 30
Після 1-го курсу ХТ, n=24, (24,8 %)	15 (15,5)	9 (9,3)	-	-
Після 2-го курсу ХТ, n=38, (39,2 %)	23 (23,7)	11 (11,3)	4 (4,1)	-
Всього: n=62, (63,9 %)	38 (39,2)	20 (20,6)	4 (4,1)*	-

Примітка. *p<0,005 у порівнянні з групами хворих, де ТК менше 10,0 та 20,0 Од/л.

Очевидно, що найбільша кількість ремісій досягнута при значеннях тимідинкінази в дебюті ГМЛ менших за 10,0 Од/л (61,3 %), при чому 24,2 % з них констатовані вже після першого курсу стандартної хіміотерапії. Високий відсоток ремісій спостерігався і при рівнях тимідинкінази від 10,1 до 20,0 Од/л (32,3 %), але їх досягнення в 17,8 % випадків потребувало проведення двох курсів індукції. При вмісті тимідинкінази у сироватці крові від 20,1 до 30,0 Од/л ремісія була зареєстрована в усіх випадках після 2-го курсу хіміотерапії лише у 6,5 % хворих. При значеннях тимідинкінази більше 30,0 Од/л ремісія не була досягнута в жодному випадку.

Порівняння окремих середніх показників гемограми і мієлограми між морфологічними ФАБ-варіантами ГМЛ показало, що між ними не було істотної різниці стосовно рівня гемоглобіну, кількості еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів в окремих групах, як до лікування, так і після. Проведений аналіз кількості первинно-резистентних форм захворювання та смертельних випадків встановив, що найбільш несприятливими варіантами захворювання є М0, М1 та М6 ГМЛ. Ці морфологічні варіанти дещо відрізнялись за значеннями вмісту тимідинкінази у сироватці крові на початку хіміотерапії. Найбільш високий рівень тимідинкінази у першому гострому періоді до початку хіміотерапії спостерігався при М0, М1 та М6 варіантах (медіана 24,94, 25,75, 30,6 Од/л відповідно). Після завершення індукції ремісії контрольне дослідження вмісту тимідинкінази довело, що її рівень знижувався при всіх морфологічних варіантах, але при М0, М1 та М6 все одно залишався істотно вищим (p<0,05, критерій Тьюкі для груп, різних за обсягом). Отримані дані співпадають з результатами лікування, які свідчать, що найменша кількість позитивних результатів спостерігається саме при цих варіантах захворювання.

Таким чином, при рівні тимідинкінази менше 10,0 Од/л спостерігається сприятливий перебіг гострої мієлоїдної лейкемії. Хворі, що мають в дебюті ГМЛ рівень тимідинкінази у сироватці крові від 10,1 до 20,0 Од/л, відповідають групі прогнозу середнього ризику. Значення тимідинкінази більше 20,0 Од/л вказують на значну поширеність лейкемічного ураження та поганий прогноз. Найбільш злоякісний перебіг гострої мієлоїдної лейкемії та вкрай несприятливий прогноз спостерігається при рівні тимідинкінази більше 30,0 Од/л. Підвищення рівня тимідинкінази в період ремісії >5,0 Од/л свідчать про неповну клініко-гематологічну відповідь на проведене лікування, і прогнозує розвиток рецидиву захворювання незалежно від клініко-гематологічних показників. Зниження вмісту тимідинкінази після завершення хіміотерапії до нормальних значень (0-5 Од/л), як правило, відповідає наявності досягнутої ремісії, що співвідноситься із кількістю бластних клітин у кістковому мозку <5 %.

Що стосується β_2 -МКГ в сироватці крові, то при його рівні на момент встановлення діагнозу <10,0 мг/л у 75 % хворих на гостру мієлоїдну лейкемію можливе настання клініко-гематологічної ремісії. Хворі, що мають в дебюті гострої мієлоїдної лейкемії рівень β_2 -МКГ від 11 до 14 мг/л можуть бути віднесені до первинно-резистентної групи, а при його значеннях >15 мг/л можливий агресивний перебіг хвороби.

Тимідинкіназа є незалежним прогностичним фактором щодо злоякісності перебігу гострої мієлоїдної лейкемії та відповіді на індукційну хіміотерапію, але її значення не корелюють із кількістю лейкоцитів у периферичній крові та кількістю бластних клітин у кістковому мозку. β_2 -МКГ не є незалежним прогностичним фактором щодо злоякісності перебігу гострої мієлобластної лейкемії та відповіді на індукційну хіміотерапію, але є додатковим критерієм ефективності лікування. Чим нижче ініціальні значення тимідинкінази та β_2 -МКГ, тим вище вірогідність отримання клініко-гематологічної ремісії.

Коли ремісія не є повною, показники вмісту ТК та β_2 -МКГ хоч і знижуються, але не досягають нормальних значень. β_2 -МКГ може використовуватися як критерій контролю за повнотою клініко-гематологічної ремісії та ранньої діагностики рецидивів. Рівень β_2 -МКГ в сироватці крові не має

диференційно-діагностичного значення при ідентифікації його окремих клініко-морфологічних варіантів.

Спосіб, що заявляється, був апробований на базі радіологічного відділення КМКЛ № 14 та на кафедрі радіології та радіаційної медицини Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Джерела інформації:

1. Amadori S., Stasi R. Emerging therapies for older adults with acute myeloid leukemia // Hematology. - 2006. - Vol. 2, № 1. - P. 127-131.

2. Aribi A., Ravandi F., Giles F. Novel agents in acute myeloid leukemia // Cancer J. - 2006. - № 12. - P. 7.

3. Aul C, Gattermann N., Germing U. et al. Serum deoxythymidine kinase in myelodysplastic syndromes. Cancer 2004; 73: 322-327.

4. Birringer M.S., Perozzo R., Kut E. et al. High-level expression and purification of human thymidine kinase 1: Quaternary structure, stability, and kinetics // Protein Expr Purif. - 2006. - № 1. - P. 12-16.

5. Broet P., Romain S., Daver A. et al. Thymidine kinase as a proliferative marker: clinical relevance in 1692 primary breast cancer patients. J.Clin. Oncol. 2001; 19: 2778-2787.

6. Campo AB, Aptsiauri N, Mendez R. et al. Efficient recovery of HLA class I expression in human tumor cells after beta2-microglobulin gene transfer using adenoviral vector: implications for cancer immunotherapy // Scand. J. Immunol. - 2009. - № 2. - P. 125-35.

7. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol 2003;21:4642-9.

8. Ellegaard J, Mogensen CE, Kragballe K. Serum β 2-microglobulin in acute and chronic leukaemia. Scand J Haematol 2008/25. - 215-85.

9. Evrin, P.E. et al. Serum levels and urinary secretion of b2Microglobulin. Scand. J Lab. Invest., 29, 69-74 (2009).

10. Giles F.G., Keating A., Goldstone A.H. et al. Acute Myeloid Leukemia. Haematology 2002; 73:110.

11. Gronowitz JS., Kallander CFR., Diderholm H. et al: Application of an in vitro assay for serum thymidine kinase: Results on viral disease and malignancies in humans. Int J Cancer 2004; 33: 5-12.

12. Haferlach T., Schnitger S., Kern W. et al. Genetic Classification of Acute Myeloid Leukemia (AML) // Ann. Hematol. - 2004. - Vol. 83, S97. - P. 100.

13. Hagberg H., Gronowitz JS., Killander A. et al.: Serum thymidine kinase in acute leukaemia. Br J Cancer 1984; 49: 537-540.

14. Immunotech [a Beckman coulter company] Опухолевые маркеры и их обследование. 2008.

15. Jacobs EL, Haskell CM. Clinical use of tumor markers in oncology // Curr. Probl. Cancer. - 2010. - № 3. - P. 299-360.

16. Luno E., Vicente J.M., Sanzo C. et al. Prognostic factors in patients diagnosed de novo acute myeloid leukemia (AML) with <65 years OLD // Hematol. J. - 2004. - Vol. 5, №2. - P. 149.

17. Melillo L, Cascavilla N, Lombardi G, et al. Prognostic relevance of serum β 2 microglobulin in acute myeloid leukemia. Leukemia 2002; 6:1076-8.

18. Montesinos P., Martin G., Perez-Sirvent M.L. et al. Identifications of Risk Factors for Tumor Lysis Syndrome in Patients with Acute Myeloid Leukemia: Development of a Prognostic Score // Hematol. J. - 2006. - Vol. 85, № 1. P. 24.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування ризику розвитку гострої мієлобластної лейкемії, що передбачає дослідження крові, який **відрізняється** тим, що в сироватці крові визначають рівень тимідинкінази та β_2 -мікроглобуліну до початку лікування та після завершення індукції ремісії, і при рівні тимідинкінази від 10,1 до 20,0 Од/л прогнозують середній ризик, більше 20,0 Од/л вказує на значну поширеність ураження та поганий прогноз, найбільш несприятливий прогноз спостерігається при рівні тимідинкінази більше 30,0 Од/л, підвищення рівня тимідинкінази в період ремісії >5,0 Од/л свідчить про неповну клініко-гематологічну відповідь на проведене лікування, і прогнозується розвиток рецидиву захворювання незалежно від клініко-гематологічних показників.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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