



УКРАЇНА

(19) UA (11) 28080 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/48
A61B 10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ХРОНІЧНИХ МІЕЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ З ВИСОКИМ ВІМСТОМ ТРОМБОЦИТІВ

1

(21) u200707768

(22) 10.07.2007

(24) 26.11.2007

(72) АНДРЕЄВА СВІТЛАНА ВАСИЛІВНА, UA,
РИЖАК ОЛЕГ АНАТОЛІЙОВИЧ, UA

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ТРАНСFUЗИОЛОГІЇ АМН
УКРАЇНИ", UA

(56)

(57) Спосіб діагностики хронічних
мієлопроліферативних захворювань з високим
вмістом тромбоцитів, що включає культивування

2

суспензії клітин кісткового мозку в поживному середовищі RPMI-1640, який **відрізняється** тим, що використовують двоступеневу підготовку клітин кісткового мозку або периферичної крові, при цьому до суспензії додають розчин ACD-A (фірми Haemonetics, USA) з розрахунку 0,4 мл на кожний мілілітр суспензії клітин, перемішують і додають 0,2 мілілітри гепарину (5000 Од/мл) на кожні 10 мілілітрів поживного середовища, готують препарати метафазних хромосом та проводять аналіз.

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема до онкогематології. Він може бути застосований для діагностики хронічних мієлопроліферативних захворювань.

Хронічні мієлопроліферативні захворювання (ХМПЗ) - це група захворювань, яка характеризується клональним та аномальним ростом. При ХМПЗ, однак, поряд з підвищеною реплікацією клітин-попередників зберігається і їх диференціювання. При різних ХМПЗ підвищення проліферативної активності реєструється в різних паростках кровотворення. Продукція еритроцитів найбільш суттєво збільшується при справжній поліцитемії (СПД), тромбоцитів - при есенціальній тромбоцитемії (ЕТ), гранулоцитів - при хронічній мієлоїдній лейкемії (ХМЛ), а мегакаріоцитів - при мієлоїдній метаплазії (ММ). Всі ці захворювання представляють собою клональні злоякісні процеси, які виникають внаслідок ураження ранньої стовбурової клітини з залученням в кожному випадку всіх трьох паростків кровотворення. Діагноз підтверджують спленомегалія, яку виявляють при фізикальному огляді, аномальна кількість клітин крові та морфологічна оцінка пунктату клітин кісткового мозку. Для всіх ХМПЗ характерний високий і дуже високий вміст тромбоцитів. Окрім того, в сучасних протоколах лікування одним із діагностичних і прогностичних методів є проведення цитогенетичних досліджень для диференційної

діагностики ХМЛ від інших типів ХМПЗ. Для ХМЛ характерною рисою є присутність транслокації t(9;22)(q34;q11) [1, 2].

Відомий спосіб ранньої діагностики злоякісних клітин, який базується на виявленні деконденсації центромерного гетерохроматину у вигляді дифузії центромер за допомогою пофарбування 4',6'-діаміно-2 фенілініндола (DAPI) гетерохроматин-специфічним барвником [3].

Недоліком способу є неможливість виявлення числових змін конкретних пар хромосом та структурних перебудов метафазних хромосом. Характеристика таких перебудов покладена в основу діагностики як гострих лейкемій, так і ХМПЗ. Виконання аналізу ускладнюється використанням люмінесцентного мікроскопу та флюорохромів для пофарбування хромосом і неможливістю створення довгострокового архіву отриманих препаратів.

Найбільш близьким аналогом є спосіб діагностики ХМПЗ, який включає короткочасове культивування клітин гепаринізованого кісткового мозку або периферичної крові на протязі 17 годин з наступним приготуванням метафазних хромосом, їх диференційного забарвлення на G-диски та каріотипування [4]. Діагноз встановлюють на основі певних хромосомних аномалій.

Недоліком аналогу є те, що для отримання суспензії клітин кісткового мозку використовують розчин гепарину, дія якого виявляється

(19) UA (11) 28080 (13) U

недостатньою при вмісті тромбоцитів вище $450 \times 10^9/\text{л}$. Збільшення концентрації гепарину призводить до блокування мітотичної активності клітин.

Задача корисної моделі - запобігання утворення фібрину в суспензії клітин кісткового мозку або периферичної крові при ХМПЗ. Це досягається шляхом двоступеневої обробки суспензії клітин кісткового мозку після процедури пункції розчином ACD-A (фірми Haemonetics, USA), з розрахунку 0,4мл на кожний мілілітр суспензії клітин. Даний розчин застосовують в процесі приготування тромбоконцентратів. Перенесення суспензії клітин в поживне середовище приводить до зменшення концентрації ACD-A, тому потрібно додати 0,2мл гепарину (50000 ОД/мл) на кожні 10мл цього середовища, щоб уникнути утворення фібрину при зменшенні концентрації ACD-A майже в 10 разів.

Спосіб діагностики ХМПЗ ілюструється конкретним прикладом його використання. При проведенні цитогенетичного дослідження використовують суспензію клітин кісткового мозку, яку забирають асептично. Розраховують необхідну кількість клітин кісткового мозку для культивування (оптимальна концентрація - $1 \times 10^6/\text{мл}$). Препарати готують згідно методики [4].

Вищезазначеним способом проводили цитогенетичні дослідження: 1. Пацієнт Г., 15 років, був госпіталізованим до Центру дитячої онкогематології з відділенням мегадозової хіміотерапії та трансплантацією кісткового мозку української дитячої спеціалізованої лікарні (УДСЛ) „ОХМАТДИТ”, де під час тестування в периферичній крові було виявлено: лейкоцитоз $28,0 \times 10^9/\text{л}$, гемоглобін 136 г/л , еритроцити $4,6 \times 10^{12}/\text{л}$, тромбоцитоз $690 \times 10^9/\text{л}$. Формула периферичної крові: мієлоцити 3,0%, метамієлоцити 1,0%, паличкоядерні нейтрофіли 3,0%, сегментоядерні нейтрофіли 57,0%, еозинофіли 5,0%, базофіли 2,0%, лімфоцити 26,0%, моноцити 3,0%. В пунктаті кісткового мозку: бласти 2,0%, метамієлоцити 9,2%, паличкоядерні нейтрофіли 15,8%, сегментоядерні нейтрофіли 46,8%, еозинофіли 8,0%, базофіли 0,6%, лімфоцити 7,8%, моноцити 4,8%, поліхроматофільні нормобласти 0,8%. Цитогенетичне дослідження виявило патологічний клон, який характерний для ХМПЛ: $46,XY,t(9;22)(q34;q11)$. 2. Пацієнт С, 28 років, був госпіталізованим до Центру дитячої онкогематології з відділенням мегадозової хіміотерапії та трансплантацією кісткового мозку УДСЛ „ОХМАТДИТ”. У аналізі периферичної крові: лейкоцитоз $17,2 \times 10^9/\text{л}$, гемоглобін 119 г/л , еритроцити $1,19 \times 10^{12}/\text{л}$, тромбоцитоз $1219 \times 10^9/\text{л}$. Формула периферичної крові: мієлоцити 3,0%, метамієлоцити 2,0%, паличкоядерні нейтрофіли 6,0%, сегментоядерні нейтрофіли 65,0%, базофіли 5,0%, лімфоцити 12,0%, моноцити 4,0%. В пунктаті кісткового мозку: бласти 1,6%, промієлоцити 5,0%, мієлоцити 16,6%, метамієлоцити 2,0%, паличкоядерні нейтрофіли 21,6%, сегментоядерні нейтрофіли 29,4%. Цитогенетичне дослідження виявило три аномальні клони: $46,XY,t(9;22)(q34;q11)[22]/46, \text{idem}, del(11)(q23)[3]/4n$

$\pm, \text{idem}x2[5]$. Присутність в 22 метафазах транслокації $t(9;22)(q34;q11)$ - характерна для ХМПЛ. В другому клоні (3 метафази) додатково була встановлена делеція $del(11)(q23)$ і в третьому клоні (5 метафаз) - білятетраплоїдія. Таким чином, цитогенетично було зареєстровано ХМПЛ з еволюцією пухлинного клону. Прогностичне значення складного каріотипу є несприятливою прогностичною ознакою і пацієнту була проведена аlogenна трансплантація кісткового мозку.

3. Пацієнт І., 11 років, був госпіталізованим до Центру дитячої онкогематології з відділенням мегадозової хіміотерапії та трансплантацією кісткового мозку УДСЛ „ОХМАТДИТ”. У аналізі периферичної крові було виявлено лейкоцитоз $13,7 \times 10^9/\text{л}$, гемоглобін 180 г/л , еритроцитоз $7,59 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитоз $766 \times 10^9/\text{л}$. Формула периферичної крові: паличкоядерні нейтрофіли 2,0%, сегментоядерні нейтрофіли 63,0%, еозинофіли 6,0%, базофіли 6,0%, лімфоцити 19,0%, моноцити 4,0%. В пунктаті кісткового мозку: бласти 1,0%, промієлоцити 1,4%, мієлоцити 4,6%, метамієлоцити 2,2%, паличкоядерні нейтрофіли 7,2%, сегментоядерні нейтрофіли 52,0%, еозинофіли 6,0%, базофіли 2,8%, лімфоцити 2,8%, моноцити 5,2%, еритробласти 8,8%. Аналіз метафазних хромосом показав присутність трьох клонів: $46,XY,der(1)del(p36.3)[5]/46,XY[15]/4 \pm -8n \pm [8]$. Перший аномальний клон (5 метафаз) мав делецію $del(p36.3)$, другий клон - нормальний (15 метафаз), та третій клон (8 метафаз) - білятетраплоїдний та біля-октаплоїдний клони. На основі фізикальних, морфологічних та цитогенетичних досліджень було встановлено діагноз ЕТ.

Таким чином, діагностика ХМПЗ з високим вмістом тромбоцитів за допомогою аналізу диференційно забарвлених метафазних хромосом відкриває нові можливості в застосуванні класичного метода цитогенетичних досліджень у випадках, коли неможливо отримати якісні препарати при утворенні фібрину. Це стало можливим завдяки поєднанню двох антикоагулянтів - розчину ACD-A та гепарину.

Література

1. Human Cytogenetics. A practical approach. Malignancy and acquired abnormalities. Second edition. Rooney D.E., Czepulkovsky B.H. IRL Press at Oxford University Press. Oxford, New York, Tokyo - 1995. V.II - 293p.
2. Tanaka K., Minamihisamatu M., Jagy S., Kyo T., Dohy H., Kamada N. Two step mechanism for formation of complex 9;22 chromosome translocation in myelocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization // Experimental Oncology. 2001. V.23, №3, P.29-38.
3. Патент України №64533, МПК А61В5/00; G01N33/49, G01N33/48, заявка №2002065207. Спосіб ранньої діагностики злоякісних пухлин. Опубл. 16.02.2004. Бюл. №2.
4. Патент України №11079, МПК А61В5/00; G01N33/48, заявка №u2005 04665. Спосіб прогнозування перебігу гострих лейкемій у дітей та підлітків. Опубл. 15.12.2005. Бюл. №12.