



УКРАЇНА

(19) UA (11) 31408 (13) U  
(51) МПК (2006)  
A61B 5/15  
C12Q 1/68  
G01N 33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РИЗИКУ РОЗВИТКУ ЦИТОМЕГАЛОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ХВОРИХ НА В-КЛІТИННУ ХРОНІЧНУ ЛІМФОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ ПРИ ЛІКУВАННІ ФЛУДАРАБІНОМ ТА/АБО МОНОКЛОНАЛЬНИМИ АНТИТІЛАМИ**

1

2

(21) u200712703

(22) 16.11.2007

(24) 10.04.2008

(46) 10.04.2008, Бюл.№ 7, 2008 р.

(72) ЧУМАК АНАТОЛІЙ АНДРІЙОВИЧ, UA,  
АБРАМЕНКО ІРИНА ВІКТОРІВНА, UA,  
ЗАВГОРОДНЯ АННА ВАЛЕРІЇВНА, UA, БІЛОУС  
НАДІЯ ІВАНІВНА, UA, БАЗИКА ДИМИТРІЙ  
АНАТОЛІЙОВИЧ, UA, КРЯЧОК ІРИНА  
АНАТОЛІЙВНА, UA, ЦЕНТР РАДІАЦІЙНОЇ  
МЕДИЦИНИ АМН УКРАЇНИ, UA

(57) Спосіб визначення ризику розвитку  
цитомегаловірусної інфекції у хворих на В-клітинну  
лімфоцитарну лейкемію, який включає взяття у  
пацієнта з вени крові, виділення сироватки (або  
мононуклеарів), визначення

антицитомегаловірусних антитіл  
імуноферментним методом та ДНК  
цитомегаловірусу в полімеразній ланцюговій  
реакції, який відрізняється тим, що до початку  
терапії флударабіном та/або моноклональними  
антитілами випробовують чутливість  
мононуклеарів периферичної крові до дії  
іонізуючого випромінювання в дозі 5 Гр за 110 с з  
оцінкою показників клітинної загибелі  
мононуклеарів в опромінених і неопромінених  
культурах через 48 год. культивування та за умов  
відсутності вірогідної різниці в загибелі клітин й  
виявлення ДНК цитомегаловірусу прогнозують  
високий ризик розвитку цитомегаловірусної  
інфекції.

Корисна модель відноситься до медицини і може бути використана в гематології при лікуванні хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію (В-ХЛЛ) за допомогою пуринового аналогу - препарату флударабін та моноклональних антитіл (мкАТ), спрямованих проти поверхневих антигенів пухлинних клітин. Відомо, що ці препарати високоефективні та в більшості хворих за їх допомогою вдається досягнути ремісії захворювання. Однак, досить часто причиною передчасного припинення терапії є розвиток вірусних захворювань, насамперед цитомегаловірусної (ЦМВ) етіології. Так, за даними Visani G et al. при лікуванні 15 хворих на ХЛЛ із застосуванням мкАТ алемтузумаба у 5 розвинулась ЦМВ-інфекція, незважаючи на профілактичний прийом противірусних препаратів ацикловіру та ганцикловіру [1].

Відомо, що за даними [2] по прогнозуванню вірогідності розвитку ЦМВ-інфекції у різних категорій імуноспроможних хворих, до яких належать і хворі на В-ХЛЛ. Традиційно до них

відносяться визначення імуноферментним методом анти-ЦМВ антитіл класу IgG і IgM у сироватці крові пацієнтів та геному вірусу методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Два послідовних позитивних результатів ПЛР-аналізу розцінюються як свідчення реактивації ЦМВ [2]. Також проводять кількісне визначення вірусного навантаження методом ПЛР у реальному часі - real-time PCR [3, 4]. Метод має більшу чутливість, ніж звичайна ПЛР, а зростання кількості копій ДНК дозволяє своєчасно розпочати профілактичний курс противірусної терапії з метою попередження розвитку ЦМВ-обумовлених захворювань. Оскільки результати, отримані при дослідженні периферичної крові, не завжди адекватно відображають процеси, що відбуваються у тканинах, з метою передбачення реактивації ЦМВ досліджують також і тканинну рідину [5].

Однак для хворих на ХЛЛ залишається нез'ясованими групи ризику реактивації ЦМВ і розвитку інфекційних ускладнень.

(13) U

(11) 31408

(19) UA

Найближчим аналогом корисної моделі є метод передбачення розвитку ЦМВ-інфекції у новонароджених, за яким враховуються не тільки показники вірусної активності, але і певні показники, які прямо не пов'язані з вірусною активністю, наприклад - протівірусної резистентності організму, який ми прийняли за прототип. Цей метод передбачає виділення груп ризику появи ЦМВ-обумовлених захворювань у дітей на основі визначення наявності антигенів вірусу у сироватці крові матері та морфологічних порушень плаценти [6]. Однак, цей метод не може бути застосований для прогнозування ризику розвитку ЦМВ-інфекції у хворих на ХЛЛ, що потребує визначення інших маркерних ознак, які не пов'язані з вірусною активністю.

Технічним завданням корисної моделі є створення способу визначення ризику розвитку цитомегаловірусної інфекції у хворих на В-ХЛЛ в процесі лікування флударабіном та мкАТ.

Поставлене технічне завдання вирішується проведенням перед початком терапії тесту відповіді лімфоцитів периферичної крові на дію іонізуючого випромінювання (ІВ) *in vitro* (доза 5Гр, отримана клітинами за 110сек.) за показником клітинної загибелі в опромінених і неопромінених культурах клітин через 48год. після опромінення та встановлення вірогідності розбіжностей у показнику кількості загиблих клітин за критерієм

50-квадрат; після початку терапії - визначення вірусної ДНК методом ПЛР у сироватці крові хворих. Хворі з атиповою клітинною відповіддю на ІВ, в яких розбіжності в кількості загиблих клітин між опроміненими і неопроміненими культурами були невірні  $\chi^2 < 3,85$ ), та позитивною ПЛР-реакцією відносяться до групи ризику по розвитку ЦМВ-обумовленим ускладнень терапії.

Спосіб визначення груп ризику розвитку цитомегаловірусної інфекції у хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію був апробований при обстеженні 23 хворих на В-ХЛЛ, які отримували терапію флударабіном і, в окремих випадках, додатково моноклональними анти-АТЛОВА клітинна відповідь на дію ІВ була визначена у 9 хворих, яким в подальшому проводилось лікування. У трьох з них розвинулись ЦМВ-обумовлені ускладнення, в одному випадку - з фатальним кінцем. Навпаки, в жодного з 14 хворих з непорушеною клітинною відповіддю на ІВ ЦМВ-інфекційні ускладнення терапії не розвинулись ( $\chi^2 = 5,36$ ;  $p < 0,05$ ). При порівнянні за іншими показниками, з якими теоретично могла б бути пов'язана вірогідність активації ЦМВ-інфекції, хворі, в яких розвинулись вірусні ускладнення, та хворі, в яких активація ЦМВ на фоні лікування не відбулась, вірогідно не відрізнялись (табл.1).

Таблиця 1

Імунологічні показники у хворих з цитомегаловірусною інфекцією різного ступеня активності

Показник до початку лікування	Хворі з активацією ЦМВ-інфекції, n=3	Хворі без активації ЦМВ-інфекції, n=20	Вірогідність
Середній вік хворих, роки	56,1 ± 2,05	57,85 ± 2,44	0,71
Присутність анти-ЦМВ IgG антитіл у сироватці крові до терапії	В усіх хворих	В усіх хворих	
Середній рівень анти-ЦМВ антитіл (оптична щільність)	2,66 ± 0,11	2,32 ± 0,15	0,82
Кількість CD4 <sup>+</sup> клітин, %	1,68 ± 0,40	6,28 ± 1,74	0,25
Кількість CD4 <sup>+</sup> клітин, Г/л	1,09 ± 0,14	5,74 ± 2,91	0,48
Кількість CD8 <sup>+</sup> клітин, %	2,39 ± 0,31	4,97 ± 1,09	0,30
Кількість CD8 <sup>+</sup> клітин, Г/л	1,61 ± 0,11	3,69 ± 1,82	0,61
Кількість CD3 <sup>+</sup> клітин, %	4,55 ± 1,42	10,65 ± 1,42	0,25
Кількість CD3 <sup>+</sup> клітин, Г/л	3,36 ± 0,93	9,92 ± 4,96	0,50

Таким чином, на основі характеру відповіді лімфоцитів периферичної крові на дію ІВ можна виділити групу хворих на ХЛЛ, в яких вірогідність розвитку ЦМВ-інфекції вища порівняно з іншими хворими. Ці хворі потребують більш ретельного моніторингу лабораторних показників, які вказують на активацію ЦМВ-інфекції до появи її клінічних проявів.

Спосіб, що заявляється, може бути впроваджений при проведенні терапії флударабіном та моноклональними антитілами в усіх гематологічних відділеннях України.

Використані джерела літератури:

1. An observational study of once weekly intravenous ganciclovir as CMV prophylaxis in heavily pre-treated chronic lymphocytic leukemia patients receiving subcutaneous alemtuzumab / G.

Visavi, A. Mele, B. Guiducci et al. // Leuk. Lymphoma. - 2006. - Vol.47. - P.2542-2546.

2. Barkholt L. Polymerase chain reaction for the early diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in liver transplant patients // Clin.Diagn. Virology. - 1995. - Vol.4, N 1. - P.121-134.

3. Quantitative real-time PCR with automated sample preparation for diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection in bone marrow transplant patients / K.M. Hong, H. Najjar, M. Hawley, R.D. Press // Clin. Chem. - 2004. - Vol.50, N 5. - P.846 - 856.

4. Quantitative analysis of HCMV DNA load in whole blood of renal transplant patients using real-time PCR assay / S. Gouarin, A. Vabret, E. Gault et al. // J. Clin. Virol. -2004. - Vol.29, N 3. - P.194-201.

5. A method for the early detection of CMV retinitis in HIV patients / R.B. Nussenblatt, R.J. Belfort, M. de Smet // Patent W09218843; A61B3/10; A61B5/117; A61B3/10; A61B5/117; (IPC1-7): G01N21/00; A61B3/10; A61B5/117.

6. The method for predicting the risk of intrauterine herpes virus transmission to the newborn /L.O. Panchenko, A.S. Lykhachova O.O. Radchenko et al. // Patent UA67413; A61B10/00; G01N33/48; A61B10/00; G01N33/48; (IPC1-7): A61B10/00; G01N33/48.