



УКРАЇНА

(19) UA (11) 48630 (13) U
(51) МПК (2009)
A61B 10/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ВІДПОВІДІ НА ТЕРАПІЮ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ЛІМФОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ

1

2

(21) u200910401

(22) 14.10.2009

(24) 25.03.2010

(46) 25.03.2010, Бюл.№ 6, 2010 р.

(72) БЕБЕШКО ВОЛОДИМИР ГРИГОРОВИЧ, МІНЧЕНКО ЖАННА МИКОЛАЇВНА, ДМИТРЕНКО ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА, ДЯГІЛЬ ІРИНА СЕРГІЇВНА, ШЛЯХТИЧЕНКО ТЕТЯНА ЮРІЇВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАУКОВИЙ ЦЕНТР РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"

(57) Спосіб прогнозування відповіді на терапію у хворих на хронічну лімфоїдну лейкемію (ХЛЛ), який включає прогнозування перебігу ХЛЛ, який **відрізняється** тим, що на основі визначення імунотипу хворого і при наявності алелів та їх сполучень: HLA-B*27, HLA-B*40 HLA-DRB1*04; HLA-DQB1*0302, прогнозують рефрактерність до високкодозової хіміотерапії, а при наявності в генотипі хворого специфічностей за групами генів в локусах HLA-A*01, HLA-B*14, HLA-DQA1*0103 прогнозують позитивний результат лікування.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до гематології, і може бути використана для прогнозування ефективності лікування та перебігу захворювання у хворих на хронічну лімфоїдну лейкемію (ХЛЛ).

Існує певна кількість клініко-лабораторних ознак, що корелюють з ефективністю лікування хворих на ХЛЛ і як наслідок - з тривалістю їх життя, однак на сьогодні питання індивідуального прогнозування виживаності пацієнтів залишається недостатньо вирішеним.

Труднощі в лікуванні хворих на ХЛЛ обумовлені варіабельністю клінічних проявів та активністю патологічного процесу. Пухлинна прогресія при ХЛЛ опосередковано пов'язана із взаємодією пухлинного клону і імунотипу клітин організму людини. Визначальним чинником індивідуального варіювання імунотипу реакцій є поліморфізм імунотипу клітин, а саме генів головного комплексу гістосумісності (HLA-Human Leukocyte Antigen), що може бути використано для прогнозування ефективності лікування ХЛЛ.

Відомо декілька способів прогнозування клінічного перебігу захворювання. Існує рішення щодо використання досліджень рівня β_2 -мікроглобуліну в сироватці крові [1], як незалежного прогностичного фактору - підвищення рівня β_2 -мікроглобуліну свідчить про негативний прогноз протікання хвороби, а низький рівень є позитивним прогностичним критерієм. Даний спосіб, прийнятий за прототип, має певні недоліки, а саме: прогнозування перебігу

захворювання на підставі кількісного вмісту лише одного показника.

Доведене негативне прогностичне значення високого рівня ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ) в сироватці крові, який корелює з тяжким перебігом захворювання ХЛЛ, зокрема, таких його проявів, як поява заочеревних лімфатичних вузлів та короткий період виживаності [2].

Але відомі критерії є недостатньо інформативними при індивідуальному прогнозуванні ефективності обраної терапії, що значно знижує можливість призначення адекватної для даного хворого схеми лікування.

Застосування способу визначення хромосомних мутацій значно підвищує прогностичний рівень диференційної діагностики. Наявність хромосомних мутацій в каріотипі хворих на ХЛЛ є поганою прогностичною ознакою щодо розвитку рецидиву захворювання та формування рефрактерності до стандартної терапії [3]. Але, спосіб на основі такого твердження є суб'єктивним, достатньо трудомістким і вимагає тривалих динамічних спостережень.

Наведені рішення мають конкретні недоліки: виключно обмежені діагностичні можливості застосування, відсутність сучасних молекулярно-генетичних підходів до клінічної діагностики, а також відсутність позицій прогнозування ефективності лікування.

Запропонований нами підхід дозволяє уникнути цих недоліків і підняти рівень діагностико-прогностичних можливостей на новий ступінь.

(19) UA (11) 48630 (13) U

Метою корисної моделі є розробка способу прогнозування ефективності лікування шляхом використання імуногенетичних маркерів HLA-системи в якості прогностичних маркерів розвитку індивідуальної рефрактерності до високодозової хіміотерапії (ВД ХТ) у хворих на ХЛЛ. Завдяки даному методичному підходу досягається висока достовірність і надійність результатів, що сприяє індивідуалізації в обранні адекватної терапії, і тим самим, підвищенню ефективності лікування і періоду виживаності хворих без ознак хвороби.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі прогнозування ефективності лікування ХЛЛ, згідно з корисною моделлю, на основі визначення імуногенетичних маркерів HLA системи аналізують генотип хворого, і при наявності HLA-B*27, HLA-B*40 HLA-DRB1*04; HLA-DQB1*0302, прогнозують рефрактерність до ВД ХТ, а при наявності в генотипі хворого специфічностей за групами генів в локусах HLA-A*01, HLA-B*14, HLA-DQA1*0103, прогнозують позитивний результат лікування.

Клінічне, інструментальне та клініко-лабораторне обстеження пацієнтів з визначенням ефективності терапії проводилось у співставленні з імуногенетичним паспортом хворого, з визначенням асоціативного зв'язку імуногенетичних маркерів з ефективністю терапії із застосуванням ВД ХТ.

За цим принципом для аналізу були виділені групи хворих в залежності від відповіді на лікування.

Для вирішення поставленої задачі спочатку проводили генотипування алельних варіантів HLA I класу (локуси A, B, Cw), II класу (локуси DRB1, DQA1, DQB1), що було здійснено на ДНК, яку вилучали з периферичної крові хворого на ЕДТА стандартним методом висолювання [4]. Алелі визначали методом алель-специфічної ампліфікації з сіквенса-специфічними праймерами (SSP) фірми PROTRANS (Німеччина) [5].

На основі вищезазначених показників прогнозували відповідь хворого на лікування.

На основі статистичного розрахунку коефіцієнта імуногенетичного ризику відсутності відповіді на лікування ХЛЛ підтвердили високу інформативність маркерів - алелей HLA-B*27, HLA-B*40 HLA-DRB1*04; HLA-DQB1*0302, наявність яких свідчить про високий ризик рефрактерності до ВД ХТ, а при наявності в генотипі хворого специфічностей за групами генів в локусах HLA-A*01, HLA-B*14, HLA-DQA1*0103 прогнозують позитивний результат лікування.

Прогностична ефективність дослідження була статистично підтверджена на групі хворих з позитивною відповіддю на лікування (ВД ХТ) - 32 особи та з негативною відповіддю на лікування - 26 осіб. Термін спостереження склав 6 років. У хворих з позитивною відповіддю на лікування було відсутнє прогресування хвороби протягом 3 років, а у хворих з відсутністю відповіді на лікування ВД ХТ спостерігалось прогресування захворювання, що призводило до залучення додаткових методів терапії. Таким чином, важливість диференційної діагностики ХЛЛ з позицій прогнозування рефрактерності до терапії сприяє індивідуалізації терапевтичних підходів до лікування.

При цьому популяційним контролем дослідження служила група здорових неспоріднених донорів крові (150 осіб).

Корисна модель пояснюється прикладами конкретного виконання.

Приклад 1

Хворий Г., 53 роки, історія хвороби №3584-2008. Діагноз: Хронічний лімфолейкоз, В-клітинний варіант, IV С стадія, prolongation morbi. Діагноз встановлений на підставі морфологічного, цитохімічного, імунофенотипового дослідження кісткового мозку та периферичної крові, клінічної картини. Проведено 4 курси ПХТ "СОР" 2 курси ПХТ "СНОР" з незначним ефектом. У зв'язку з прогресуванням захворювання в подальшому відмічено погіршення клінічного стану, значне збільшення в розмірах периферичних лімфовузлів, посилення загальної слабкості, виражений інтоксикаційний синдром. В об'єктивному статусі: шкіра бліда, геморагій немає, всі периферичні лімфовузли збільшені, розмір від 0,8 до 1,5см, в черевній порожнині пальпується конгломерат лімфовузлів в навколо пупкової ділянці розмірами до 10см. Біохімічний аналіз крові: білірубін 11,7мкмоль/л, прямих - 1,4мкмоль/л, сечовина - 6,5мкмоль/л, креатинін - 85,7мкмоль/л, активність ЛДГ - 780МО/л. При контрольній КТ черевної порожнини в порівнянні з даними 2008 р. відмічається негативна динаміка у вигляді збільшення конгломерату в мезогастрії, поперековий розмір конгломерату до 150мм. Крім цього, відмічається збільшення інших груп лімфовузлів: в воротах печінки лімфовузли розмірами 29x50мм, збільшення лімфовузлів вздовж судинної ніжки лівої нирки.

У зв'язку з цим, призначена терапія із використанням комбінації моноклональних антитіл та хіміопрепаратів: 2 курси ПХТ "Flu CAM" - Кампат 30мг/внутрішньовенно 1-3 дні, флудара 50мг день 1-3 дні, симптоматична та дезінтоксикаційна терапія. Після проведеного лікування не було досягнуто клініко-гематологічної ремісії.

Імуногенетичний паспорт хворого: 0(I), Rh(+), HLA-A*02,26; B*27,40; Cw*05,12; DRB1*04,16; DQB1*0302, 0502; DQA1*0101, 0505. Наявність в генотипі хворого алелей HLA-B*27,40; HLA-DRB1*04 та HLA-DQB1*0302 дозволила прогнозувати рефрактерну форму перебігу захворювання, що є негативним прогнозом для лікування і було підтверджено перебігом захворювання.

Приклад 2

Хвора Л., 55 років, історія хвороби №976-2009. Діагноз: Хронічний лімфолейкоз, В-клітинний варіант, IV С стадія. Виражений геморагічний синдром. Діагноз В-ХЛЛ було верифіковано на підставі морфологічного і імунофенотипового дослідження крові та кісткового мозку. У 2006 році отримувала терапію лейкоераном в дозі 4-10мг з перервами 2-3 тижні без суттєвого терапевтичного ефекту, що було розцінено, як резистентність до терапії. У зв'язку з чим було проведено 2 курси хіміотерапії препаратом Флудара в моно режимі у зв'язку із розвитком тромбоцитопенії 4 ст. У подальшому пацієнтці проведено 3 курси комбінованої ХТ (флудара + циклофосфан). За результатами лікування було досягнуто стабілізації стану хворої. У

подальшому специфічної терапії не отримувала, однак перебіг захворювання супроводжувався розвитком частих інфекційних ускладнень. У травні 2008 року у зв'язку з наростаючою прогресією захворювання отримала курс ПХТ за схемою CHOP - без суттєвого ефекту, потім 4 курси за схемою "Flu CAM". Проведення терапії супроводжувалося розвитком тяжких тривалих цитопеній, а також численними інфекційними ускладненнями. Через деякий час хвора померла.

Імуногенетичний паспорт хворого: 0(I), Rh(+), HLA-A*02,02; B*27,40; Cw*05,12; DRB1*04,16; DQB1*0302, 0502; DQA1*0101, 0505. Наявність в генотипі хворого алелей HLA-B*27,40; HLA-DRB1*04 та HLA-DQB1*0302 дозволила прогнозувати рефрактерну форму перебігу захворювання, що є негативним прогнозом для лікування і було підтверджено перебігом захворювання.

Приклад 3

Хворий К., 59 років, історія хвороби №674-2009. Діагноз: Хронічний лімфолейкоз, В-клітинний варіант, III В стадія. Діагноз В-ХЛЛ було встановлено на підставі клінічної картини, морфологічного і імунофенотипового дослідження крові та кісткового мозку в 2004 р. У зв'язку з доброякісним перебігом до грудня 2005 р. не лікувався, а знаходився під наглядом гематолога. З кінця 2005 р. по квітень 2006 р. проведено 6 курсів FC, що привело до стабілізації клінічного стану хворого та нормалізації лабораторних показників. У подальшому специфічної терапії не отримував, так як перебіг захворювання характеризувався доброякісністю, зберігає активність, працює. Спостерігається амбулаторно, периферичні лімфатичні вузли не зби-

льшені, лейкоцити тримаються в межах фізіологічної норми.

Імуногенетичний паспорт хворого: A(II), Rh(+), HLA-A*01,02; B*14,18; Cw*01,06; DRB1*07,15; DQB1*0101,0602; DQA1*0103, 0501. Наявність алелей HLA-A*01, HLA-B*14 та HLA-DQA1*0103 свідчить про позитивний результат лікування, що було підтверджено перебігом захворювання.

Таким чином, наведені приклади підтверджують високу інформативність запропонованих генетичних маркерів, що дає можливість надійно прогнозувати ефективність лікування і, відповідно, розробляти адекватну індивідуальну тактику лікування і тим самим збільшувати виживаність хворих.

Використані джерела інформації:

1. ИЗОБРЕТЕНИЕ. Патент Российской Федерации RU 2242004.
2. B. Desablens et al. Prognostic factors among 477 patients with stage A B-CLL. Leukemia 2000 towards the cure. Program and abstract book, p. 62, abstr. P068.
3. H. Dohner et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. Blood 1997, 89, 2516-2522.
4. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell // Nucleic Acid Res. - 1988. - Vol. 16. - P. 1216-1218.
5. Bunce, O'Neill, Barnado, Krausa, Morris. Comprehensive DNA Typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQB1, DQA1, by PCR with mixes utilizing sequence-specific primers (PSR-SSP) // Tissue Antigens. - 1995. - V.45. - P. 355-367.