



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80766** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**A61B 5/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2012 14596</b>	(72) Винахідник(и): <b>Глузман Данило Фішелевич (UA), Склярєнко Лілія Михайлівна (UA), Іванівська Тетяна Степанівна (UA), Коваль Стелла Володимирівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>20.12.2012</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.06.2013</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.06.2013, Бюл.№ 11</b>	(73) Власник(и): <b>ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ, вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)</b>

## (54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ МІЄЛОДИСПЛАСТИЧНИХ СИНДРОМІВ І МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

### (57) Реферат:

Спосіб диференційної діагностики мієлодиспластичних синдромів і мієлопроліферативних захворювань, в якому для ідентифікації клітин, які здійснюють фагоцитоз уламків загинлих внаслідок апоптозу активно проліферуючих гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників, застосовується цитохімічна реакція визначення активності кислої неспецифічної естерази.

UA 80766 U



Корисна модель належить до галузі медицини, лабораторної діагностики онкогематологічних захворювань.

Мієлодиспластичні синдроми (МДС) - біологічно гетерогенна група захворювань, в основі розвитку яких є збільшення ступеня апоптозу (програмованої загибелі) в кістковому мозку активно проліферуючих CD34-позитивних стовбурових кровотворних клітин і клітин-попередників. Процес програмованої загибелі асоціюється зі змінами експресії в кровотворних клітинах про- та антиапоптотичних білків, збільшенням активності одного з ключових ферментів апоптозу - ядерної  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  - залежної ендонуклеази. Фагоцитоз компонентів загиблих внаслідок апоптозу клітин здійснюється клітинами, що належать до системи мононуклеарних фагоцитів (СМФ). Цим МДС докорінно відрізняється від подібних за клініко-морфологічними ознаками деяких форм мієлопроліферативних захворювань (МПЗ), що також є клональними патологічними процесами, які виникають внаслідок трансформації гемопоетичної стовбурової клітини [1].

Диференційна діагностика МДС і МПЗ (нейтрофільний лейкоз, справжня поліцитемія, первинний мієлофіброз, есенціальна тромбоцитемія), яка є важливою для вибору адекватної терапії та визначення прогнозу, базується на результатах цитологічного дослідження препаратів кісткового мозку та периферичної крові [2]. Недостатньо ефективним на сьогоднішній день є використання з цією метою імуноцитохімічних методів і моноклональних антитіл, а також вивчення аномалій росту на напівтвердих поживних середовищах гемопоетичних клітин-попередників [3]. Основними недоліки зазначених способів полягають в тому, що існуючі методи лабораторної диференційної діагностики МДС і МПЗ не дозволяють досягти надійності і точності, оскільки спектр поверхневих антигенів і функціональні властивості патологічних клітин при цих захворюваннях є подібними.

В основу корисної моделі поставлена задача доповнити існуючі цитоморфологічні та цитохімічні методи диференційної діагностики МДС і МПЗ таким методом, що дозволяє більш точно ідентифікувати клітини СМФ, кількість яких є збільшеною при різних формах МДС, а їх функціональним призначенням є фагоцитоз фрагментів кровотворних клітин, які утворилися внаслідок апоптозу.

Поставлена задача вирішується тим, що при мікроскопічному дослідженні мазків з пунктату кісткового мозку, пофарбованого рутинним методом, додатково використовується цитохімічна реакція визначення активності кислої неспецифічної естерази (КНЕ), що є маркером клітин, які належать до системи мононуклеарних фагоцитів (промоноцитів, моноцитів, гістіоцитів, макрофагів), виходячи з відомих даних про високу активність цього ферменту в клітинах, які, за даними експертів ВООЗ, належать до СМФ. Виявлення за допомогою цитохімічної реакції на КНЕ клітин, які здійснюють фагоцитоз уламків загиблих внаслідок апоптозу активно проліферуючих гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників, є додатковою ознакою, яка дозволяє у спірних випадках з більшою надійністю провести диференційну діагностику.

Визначення активності КНЕ виконується модифікованим методом одночасного азосполучення, який включає фіксацію свіжовиготовлених і висушених на повітрі мазків кісткового мозку в парах 10 %-го розчину нейтрального формаліну протягом 3 хв., інкубацію мазків протягом 3 год. при кімнатній температурі в суміші, що складається з 10 мг  $\alpha$ -нафтилацетату натрію, розчиненого в 0,2 мл хімічно чистого ацетону, 0,067 М фосфатного буферу, рН 6,5 (40 мл); гексаазотованого парарозаніліну (2 мл). За допомогою 2 н. NaOH суміш доводиться до рН 5,8.

В результаті в клітинах СМФ, які мають високу активність КНЕ, визначають інтенсивно забарвлені кінцеві продукти реакції. Завдяки інтенсивному забарвленню при мікроскопічному дослідженні вдається чітко ідентифікувати клітини СМФ, кількість яких є значно підвищеною при МДС (в середньому на 10-15 %) і є незначною при різних формах МПЗ (менш ніж 0,5 %).

Приклади практичного застосування корисної моделі.

Результати ензімоцитохімічного вивчення клітин кісткового мозку хворих на МДС і МПЗ ілюструють можливості заявленої корисної моделі.

Приклад 1. У хворої П. 1987 р.н. спостерігалася стійка анемія протягом 5 років. В периферичній крові визначено знижений показник гемоглобіну і незначний лімфоцитоз, що, враховуючи дані мієлограми, дозволило встановити попередній діагноз МДС. Для встановлення точного діагнозу мазки-препарати периферичної крові та пунктату кісткового мозку були попередньо досліджені за допомогою цитоморфологічного методу. За результатами дослідження пунктату кісткового мозку виявлена збільшена клітинність за рахунок клітин еритробластичного ряду різного ступеня зрілості, ознаки дизеритропоезу. Проведена цитохімічна реакція визначення активності КНЕ продемонструвала різке збільшення в мазках

кісткового мозку (до 10 %) моноклеарів з вираженою реакцією на КНЕ, що свідчить на користь МДС, а саме форми рефрактерної анемії.

Приклад 2. Хвора М. 1951 р.н. Попередній клініко-гематологічний діагноз - МДС, що супроводжується цитопенією і анемією в периферичній крові. Для встановлення точного діагнозу мазки-препарати були попередньо досліджені за допомогою цитоморфологічного методу. За результатами дослідження пунктату кісткового мозку встановлена гіперклітинність кісткового мозку, мультилінійна дисплазія клітин декількох ліній мієлопоезу (зменшення кількості гранул у сегментоядерних нейтрофілах і псевдопельгеровська аномалія нейтрофілів, збільшення кількості молодих і незрілих клітин еритробластичного ряду з ядрами неправильної форми і багатолопасними, гіподольчастість ядер мегакаріоцитів і наявність мікроформ мегакаріоцитів), менш ніж 5 % бластних клітин мієлоїдної природи і морфологічно визначені клітини (до 15 % всіх мієлокаріоцитів кісткового мозку), що належать до СМФ. Проведена цитохімічна реакція визначення активності КНЕ в клітинах демонструє інтенсивне забарвлення в клітинах, що належать до СМФ. Ці дані, враховуючи клініко-гематологічні дані хворої, дозволяють діагностувати рефрактерну цитопенію з мультилінійною дисплазією (РЦМД), яка є однією з форм МДС.

Приклад 3. Хвора В, 1939 р.н. Попередній клініко-гематологічний діагноз - МПЗ нез'ясованого генезу на фоні анемії, лейкоцитозу, тромбоцитозу і наростаючої спленомегалії. Для встановлення точного діагнозу мазки-препарати були попередньо досліджені за допомогою цитоморфологічного методу. За результатами дослідження пунктату кісткового мозку встановлена гіперклітинність кісткового мозку з переважною проліферацією клітин мегакаріоцитарного і гранулоцитарного паростків гемопоєзу, анізоцитоз і пойкилоцитоз еритроцитів. Проведення цитохімічних реакцій з визначення активності мієлопероксидази, PAS-позитивних речовин і кислої фосфатази дозволило встановити попередній діагноз хронічного мієлопроліферативного процесу, а саме первинний мієлофіброз, що характеризується анемією, лейкоцитозом і тромбоцитозом. Проведення цитохімічної реакції визначення активності КНЕ в клітинах дозволило виключити діагноз МДС, а виявлення початкової стадії фіброзу кісткового мозку в результаті трепанобіопсії підтвердило діагноз первинного мієлофіброзу з анемією, лейкоцитозом і наростаючою спленомегалією, зумовленою розвитком в ній екстрамедулярного гемопоєзу.

Таким чином, одержані дані підтверджують дієвість способу, що заявляється, адже завдяки використанню цього способу вдається з високою надійністю здійснювати диференційну діагностику МДС і МПЗ.

Джерела інформації:

1. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, E.S. Jaffe, eds. Lyon: IARC Press, 2008. - 439 p.
2. Bain B.J. Leukaemia diagnosis, 4th ed. London: Wiley-Blackwell, 2010. - 377 p.
3. Hoffbrand V., Pettit J.E., Vyas P. (eds). Color atlas of clinical hematology, 4th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2010. - 527 p.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб диференційної діагностики мієлодиспластичних синдромів і мієлопроліферативних захворювань, який **відрізняється** тим, що для ідентифікації клітин, які здійснюють фагоцитоз уламків загиблих внаслідок апоптозу активно проліферуючих гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників, застосовується цитохімічна реакція визначення активності кислої неспецифічної естерази.

---

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

---

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