



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **82892** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 5/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2012 13624	(72) Винахідник(и):	Андрєва Світлана Василівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	28.11.2012	(73) Власник(и):	ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ",
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	27.08.2013		вул. М. Берлінського, 12, м. Київ, 04060 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	27.08.2013, Бюл.№ 16		

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ МІЕЛОДИСПЛАСТИЧНИХ СИНДРОМІВ У ДІТЕЙ ТА ПІДЛІТКІВ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики мієлодиспластичних синдромів у дітей та підлітків включає проведення цитогенетичних досліджень. При цьому визначають клональні аномалії хромосом в суспензії клітин кісткового мозку і при наявності кількісних аномалій хромосом та структурних перебудов діагностують МДС.

UA 82892 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до онкогематології, і може бути застосована для діагностики неопластичних дисплазій (мієлодиспластичні синдроми - МДС).

МДС частіше зустрічається серед дорослих пацієнтів. Клінічно МДС характеризується цитопеніями різних ліній гемопоєзу периферичної крові (ПК) внаслідок його неефективності. Тільки у 2008 році був класифікований особливий варіант МДС - гіпоклітинний (за даними трепанобіопсії), який вважається найбільш складним у первинній диференційній діагностиці між МДС і апластичною анемією (АА) і здебільшого виявляється у дітей. Сучасна класифікація Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), ґрунтується на додаткових результатах цитогенетичних досліджень, що значно полегшує процес діагностики МДС (1, 2).

Парадокс співіснування збільшення аномального клону та апоптозу характеризує МДС як один з найскладніших гематологічних синдромів. Виявляються як кількісні (трисомія, моносомія), так і структурні аномалії хромосом (делеція, транслокація, ізохромосома). Для дорослих пацієнтів характерна делеція довгого плеча хромосоми Хр 5 del(5q) - 5q-синдром, яка зустрічається у 20 % випадків (3). Часто виявляються -7 та делеція довгого плеча Хр 7 del(7q), які пов'язані з несприятливим прогнозом і трансформацією в ГЛ. У 5 % випадків МДС виявляється делеція довгого плеча Хр 20 del(20q) - 20q-синдром. Залучення дисків 3q21 та 3q26 у вигляді inv(3)(q21;q26) та t(3;3)(q21;q26), класифіковані як 3q21q26-синдром (4).

АА теж характеризується цитопеніями та розвивається внаслідок зупинки проліферації, загибелі стовбурових кровотворних клітин (СКК) та характеризується практично повною зупинкою кровотворення, що морфологічно проявляється в заміщенні функціонально активного кісткового мозку (КМ) інертною жировою тканиною без збільшення ретикулуму та панцитопенією у ПК. У 80 % АА є набутих захворюванням і тільки у 20 % випадків виникає внаслідок вроджених генетичних порушень. Існує два піки у віковому розподілі АА: від 10 до 25 та старше 60 років. Серед типів структурних перебудов переважають делеції (5).

На сьогодні у дорослих пацієнтів з діагнозом АА виявлено чимало хромосомних аномалій в гемопоетичних клітинах КМ. За типом структурних перебудов переважають делеції. Аномалії хромосоми (Хр) 7 виявляються у 40 % випадків, окрім того реєструється моносомія Хр 7 (-7), трисомія Хр 8 (+8) (6-8).

Відомий спосіб ранньої діагностики злоякісних клітин, до яких належать клітини КМ при МДС, базується на виявленні деконденсації центромірного гетерохроматину у вигляді дифузії центромір за допомогою пофарбування 4',6'-діаміно-2 фенілініндола (DAPI) гетерохроматин-специфічним барвником (9).

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

Найближчим аналогом є спосіб діагностики ХМПЗ, який включає короткотривале 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 (10). Діагноз встановлюють на основі певних клональних аномалій хромосом.

Недоліком способу є відсутність даних про відмінності змін у каріотипі клітин КМ при МДС у пацієнтів дитячого віку.

Задача корисної моделі - визначення значення клональних аномалій хромосом в клітинах кісткового мозку на час встановлення діагнозу МДС та АА як групи порівняння. Це досягається шляхом оцінки клональних аномалій хромосом, що притаманні тільки одному із зазначених захворювань.

Спосіб діагностики МДС ілюструється конкретними прикладами його використання. Для цитогенетичного дослідження використовують суспензію клітин КМ, яку забирають асептично. Розраховують необхідну кількість клітин кісткового мозку для культивування (оптимальна концентрація - 1×10^6 /мл). Препарати готують згідно з методикою (10).

Вищезазначеним способом проводили цитогенетичні дослідження гемопоетичних клітин КМ у 112 пацієнтів, які обстежувалися з приводу цитопенічного синдрому. Серед обстежених - 49 дівчаток і 71 хлопчик. Вік хворих становив в середньому 11,6 роки (від 1 до 18 років). Морфологічними методами діагноз АА підтверджено у 42 пацієнтів, МДС - у 70 пацієнтів.

Для вивчення клінічних особливостей цитопенічного синдрому на етапі первинної діагностики у всіх пацієнтів досліджували клінічні та гематологічні параметри: вік, стать, показники ПК (рівень гемоглобіну, вміст лейкоцитів та тромбоцитів, ступінь гранулоцитопенії),

морфологічну характеристику стану кровотворного КМ за даними гістологічного дослідження трепанобіоптатів КМ, наявність проліферативного синдрому (гепатоліснальний синдром, гіперплазія ясен).

Цитогенетичні дослідження показали подібність багатьох хромосомних аномалій у обох групах захворювань за структурою клонів, типами структурних перебудов - делеція, транслокація, парацентрична інверсія, маркерна хромосома, транслокація t(9;22)(q34;q11), делеція короткого плеча Хр 12 del(12)(p12), делеція довгого плеча Хр 9 del(9q22), del(9)(q34).

Як діагностику МДС пропонується враховувати сукупність морфологічних та цитогенетичних досліджень. До морфологічних досліджень належить дизеритропоез, дизгранулоцитопоез, мікроформи та мікроглобуляція мегакаріоцитів, підвищений відсоток бластних форм у мієлограмі; за даними трепанобіопсій - наявність фіброзу строми КМ, підвищену мієлопроліферацію. До хромосомних аномалій, що реєструвалися тільки при МДС, належать кількісні аномалії хромосом - трисомія Хр 8, моносомія Хр 5 та 7. За структурними перебудовами - парацентрична інверсія довгого плеча Хр 3 із залученням дисків 3q21 та 3q26, делеції короткого плеча Хр 9 по дискам 9p21, 9p22, делеції довгого плеча Хр 11 по дискам 11q14, 11q21, 11q23.

Таким чином, цитогенетичні дослідження мають важливе діагностичне значення. Інформація щодо структурних перебудов хромосом у клітинах кісткового мозку, в сукупності з морфологічними та гістологічними даними, дозволяє на ранніх етапах провести діагностику МДС, в тому числі гіпоклітинного варіанта. Необхідність діагностики полягає у подальшій стратегії терапії пацієнтів з МДС, яка полягає у показанні до трансплантації СКК у першій лінії терапії для пацієнтів дитячого віку.

Джерела інформації:

1. Глузман Д.Ф. Опухоли кроветворной и лимфоидной тканей (цитоморфология, иммуноцитохимия, алгоритмы диагностики / Глузман Д.Ф., Складенко Л.М., Надгорная В.А. // К.: ДИА, 2008. - С. 52-64.
2. Ohyashiki K. Cytogenetics in myelodysplastic syndromes / Ohyashiki K., Kodama A., Ohyashiki J.H. // Methods Mol Biol.-2011.-730. - P. 79-88.
3. An uncommon case of a child with del(5q) and hypocellular myelodysplastic syndrome / de Souza D.C., Otero L., de Tavares R.C. [et al] // Pediatr. Blood Cancer.-2010.-55,4. - P. 767.
4. Myelodysplastic syndromes / Hofmann W.-K., Lubbert M., Hoelzer D. [et al] // The Hematology Journal.-2004.-5. - P. 1-8.
5. Severe aplastic anemia in the Nordic countries: a population based study of incidence, presentation. Course and outcome / Clausen N., Kreuger A., Salmi T. [et al] // Arch Dis Child.-1996.-74. - P. 319-322.
6. Auewarakul C.U. Monosomy 7 in patients with aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with evolution into acute myeloid leukemia / Auewarakul C.U., Tocharoentanaphol C., Wanachiwanawin W. [et al] // J Med Assoc Thai.-2004. - № 6(87). - P. 717-721.
7. Aplastic anemia and monosomy 7-associated dysmegakaryocytopoiesis / Dolan M.M., Singleton T.P., Neglia J. [et al] // Am J Clin Pathol.-2006. - № 6(126). - P. 925-930.
8. Expansion of trisomy 8 and Sweet syndrome in a prolonged course of aplastic anemia / Ohga S., Nomura A., Takada H. [et al] // J Pediatr Hematol.-2002. - № 1 (24). - P. 64-68.
9. Патент України № 64533, МПК А61В 5/00; G01N 33/49, G01N 33/48, заявка № 2002065207. Спосіб ранньої діагностики злоякісних пухлин. Опубл. 16.02.2004. Бюл. № 2.
10. Патент України № 11079, МПК А61В 5/00; G01N 33/48, заявка № u200504665. Спосіб прогнозування перебігу гострих лейкозів у дітей та підлітків. Опубл. 15.12.2005. Бюл. № 12.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики мієлодиспластичних синдромів у дітей та підлітків шляхом проведення цитогенетичних досліджень, який **відрізняється** тим, що визначають клональні аномалії хромосом в суспензії клітин кісткового мозку і при наявності кількісних аномалій хромосом - трисомія хромосоми 8, моносомія хромосом 5, 7 та структурних перебудов - парацентрична інверсія довгого плеча Хр 3 із залученням дисків 3q21 та 3q26, делеція короткого плеча Хр 9 по дискам 9p21, 9p22, делеція довгого плеча Хр 11 по дискам 11q14, 11q21, 11q23 діагностують МДС.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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