



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **97826** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61B 5/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 10373	(72) Винахідник(и): Андрєва Світлана Василівна (UA), Корець Катерина Веніамінівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 22.09.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.04.2015	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. М. Берлінського, 12, м. Київ, 04060 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2015, Бюл.№ 7	

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ В КЛІТИННОЇ ХРОНІЧНОЇ ЛІМФОЦИТАРНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування перебігу В-клітинної хронічної лімфоцитарної лейкемії шляхом проведення цитогенетичних досліджень бласттрансформованих В-лімфоцитів. До поживного середовища додають CpG-олігодезоксинуклеотидом (CpG-ODN) у концентрації 2,5 мкг/мл і за наявності клональних аномалій хромосом визначають групу цитогенетичного прогнозу.

UA 97826 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до онкогематології. Вона може бути застосована для хронічної лімфоцитарної лейкемії.

В-клітинна хронічна лімфоцитарна лейкемія (В-ХЛЛ) - це клональне захворювання із залученням В-лімфоцитів. Клітини при ХЛЛ блокуються на фазі G0/G1 клітинного циклу і не діляться спонтанно, вони спочатку накопичуються у результаті втрати апоптозу, а не у результаті прискорення поділу клітин. Оцінка цитогенетичних аберацій необхідна на час встановлення діагнозу для стратифікації ризику, прогнозу і встановлення біології лейкемії та лімфом. Проведення цитогенетичних досліджень при ХЛЛ обмежено у зв'язку з низьким рівнем проліферативної активності.

Клітини периферійної крові при В-ХЛЛ іноді відповідають на деякі В-клітинні мітогени, такі як PWM, 12-0-декатинолі-форбол-13-ацетат (TPA) та ліпосахариди, але при цьому відмічається низький рівень виявлення аномальних клонів, який становить тільки в 40-50 % випадків (1, 2).

Відомий спосіб діагностики злоскісних клітин, який базується на застосовуванні флуоресцентної гібридизації на склі (FISH) на інтерфазних ядрах як клітин кісткового мозку (КМ), так і периферійної крові (ПК) (3).

Недоліком способу є неможливість виявлення кількісних та структурних перебудов у всіх хромосомах геному. Метод FISH є обмеженим та виявляє тільки ті райони геному, для яких розроблені FISH проби. Цей метод не дозволяє виявити інші аберації і що дуже важливо ускладнення каріотипу, яке визначається як три та більше непов'язаних аберацій, що розглядається як несприятливий прогностичний фактор.

Найбільш близьким аналогом є спосіб культивування клітин гепаринізованої ПК у поживному середовищі з додаванням CpG-олігодезоксинуклеотидом (CpG-ODN) у концентрації 20 мкг/мл з наступним приготуванням метафазних хромосом, їх диференційного забарвлення на G-диски та каріотипування (4). Діагноз та прогноз перебігу захворювання встановлюють на основі певних хромосомних аномалій.

Недоліком аналога є те, що у процесі культивування інтерфазні ядра приймають нерівні обриси, а хроматин - деструктурований.

Задача корисної моделі - запобігання деформації клітин та отримання препаратів придатних до аналізу метафазних хромосом. Це досягається шляхом зниження концентрації реагенту, що запускає реакцію бласттрансформації В-лімфоцитів за допомогою CpG-ODN.

Спосіб прогнозування перебігу ХЛЛ ілюструється конкретним прикладом його використання. При проведенні цитогенетичного дослідження використовують суспензію клітин ПК, яку забирають асептично. Розраховують необхідну кількість клітин ПК у для культивування (оптимальна концентрація - $2-4 \times 10^6$ /мл). Середовище для культивування містить RPMI 1640 з додаванням ембріональної телячої сироватки у кінцевій концентрації 10 %, антибіотика гентаміцину у кінцевій концентрації 3,6 мг/мл та CpG-ODN у кінцевій концентрації 2,5 мкг/мл. Час культивування 3 доби.

Групи цитогенетичного прогнозу визначають за наступними перебудовами: трисомія хромосоми 12 та/або структурні зміни хромосом (делеція довгого плеча хромосоми 6 або 13) належать до цитогенетичної групи сприятливого прогнозу, делеції короткого плеча хромосоми 17 по диску p12, хромосоми 11 по диску q13→q23 - до групи несприятливого прогнозу (5).

Вищезазначеним способом проводили цитогенетичні дослідження:

1. Пацієнт Г., 53 роки, був госпіталізованим до гематологічного відділення Хмельницької обласної лікарні, де був встановлений діагноз В-ХЛЛ. Цитогенетичне дослідження клітин КМ показало мозаїчний чоловічий каріотип, який складався з нормального 17 (метафаз) та білятетраплоїдного (3 метафази) клонів: 46,XY[17]/4n±[3]. Аналіз бласттрансформованих В-лімфоцитів виявив каріотип з незбалансованою структурною перебудовою (12 метафаз): 46,XY, del(6)(q16)[12]. Тобто, було зафіксовано структурну перебудову, яка реєструється при всіх новоутвореннях лімфоїдної тканини і призводить до втрати генів супресорів пухлини та належить до групи сприятливого цитогенетичного прогнозу.

2. Пацієнт Р., 64 роки, був госпіталізованим до гематологічного відділення Черкаського Хмельницької обласної лікарні, де був встановлений діагноз В-ХЛЛ. Цитогенетичне дослідження клітин КМ показало мозаїчний чоловічий каріотип, який складався з нормального (22 метафази) та білятетраплоїдного (3 метафази) клонів: 46,XY[22]/4n±[3]. Аналіз бласттрансформованих лімфоцитів показав каріотип з незбалансованою перебудовою (20 метафаз): 46,XY, t(2;18)(p24;q12),del(11)(q13)[20]. Таким чином, було зареєстровано дві непов'язані структурні перебудови, одна з яких del(11)(q13) описана при В-ХЛЛ і належить до цитогенетичної групи несприятливого прогнозу.

3. Пацієнт К., 51 рік, був госпіталізованим до гематологічного відділення Вінницької обласної лікарні, де був встановлений діагноз В-ХЛЛ. Цитогенетичне дослідження клітин КМ показало

мозаїчний чоловічий каріотип, який складався з нормального (23 метафази) та білятетраплоїдного (2 метафази) клонів: 46,XY[23]/4n±[2]. У результаті аналізу бласттрансформованих В-лімфоцитів зареєстровано мозаїчний каріотип: 46,XY, del(13)(q14)[9]/46,XY[9]. У першому клоні була присутня незбалансована перебудова делеція довгого плеча хромосоми 13 по диску q14 (метафаз) та нормальний клон (9 метафаз). Втрата генетичного матеріалу на довгому плечі хромосоми 13 описана при В-ХЛЛ і належить до цитогенетичної групи сприятливого прогнозу.

Таким чином, цитогенетичні дослідження бласттрансформованих В-лімфоцитів ПК при В-ХЛЛ за допомогою CpG-ODN у кінцевій концентрації 2,5 мкг/мл відкривають можливість виявити аномальні клони у порівнянні з нормальним клоном у клітинах КМ і визначити групу цитогенетичного прогнозу, що дає можливість призначити адекватну терапію.

Джерела інформації:

1. Geisler C. H., Philip P., Christensen B. E., Hou-Jensen K., Pedersen N. T., Jensen O. M. In B-cell chronic lymphocytic leukaemia chromosome 17 abnormalities and not trisomy 12 are the single most important cytogenetic abnormalities for the prognosis: a cytogenetic and immunophenotypic study of 480 unselected newly diagnosed patients // *Leuk Res.* - 1997. - V. 21, № 11-12. - P. 1011-23.

2. Juliusson G., Oscier D., Juliusson G., Gahrton G., Oscier D., Fitchett M. Cytogenetic Findings and Survival in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. Second IWCCLL Compilation of Data on 662 Patients // *Leukemia & Lymphoma.* - 1991. - V. 5, № S1. - P. 21-25.

4. Lin T. S., Blum K. A., Fischer D. B., Mitchell S. M., Ruppert A. S., Porchu P. Flavopiridol, fludarabine, and rituximab in mantle cell lymphoma and indolent B-cell lymphoproliferative disorders // *J Clin Oncol.* - 2010. - V. 28, № 3. - P. 418-23.

4. D.E. Rooney, B.H. Czepulkowski. Human cytogenetics. A practical approaches. Volume II. Malignancy and Acquired abnormalities. Second edition // New York: Oxford university press. - 1997. - P. 11-15.

5. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissue // Lyon: IARC Press. - 2008. - 439p.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування перебігу В-клітинної хронічної лімфоцитарної лейкемії шляхом проведення цитогенетичних досліджень бласттрансформованих В-лімфоцитів, який **відрізняється** тим, що до поживного середовища додають CpG-олігодезоксинуклеотидом (CpG-ODN) у концентрації 2,5 мкг/мл і за наявності клональних аномалій хромосом визначають групу цитогенетичного прогнозу.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601