



УКРАЇНА

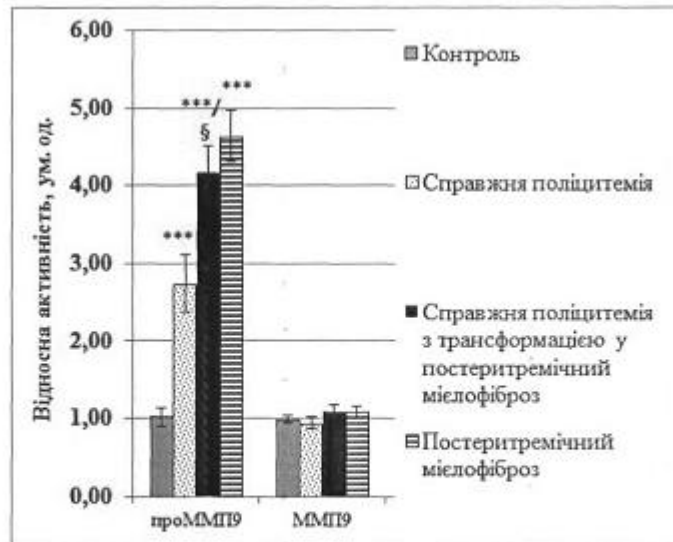
(19) **UA** (11) **102173** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)**A61B 5/00****G01N 33/49** (2006.01)**G01N 27/26** (2006.01)**G01N 33/84** (2006.01)**G01N 33/96** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: u 2015 01807 (22) Дата подання заявки: 02.03.2015 (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.10.2015 (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.10.2015, Бюл.№ 20	(72) Винахідник(и): Гордієнко Юлія Анатоліївна (UA), Ніколаєнко-Камишова Тетяна Петрівна (UA), Шаульська Ольга Едуардівна (UA), Шевцова Алла Іванівна (UA) (73) Власник(и): ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД "ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ", вул. Дзержинського, 9, м. Дніпропетровськ, 49044 (UA)
(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ТРАНСФОРМАЦІЇ СПРАВЖНЬОЇ ПОЛІЦИТЕМІЇ У ПОСТЕРИТРЕМІЧНИЙ МІЄЛОФІБРОЗ	

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування трансформації справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз включає визначення у кістковому мозку підвищеної у 6-7 разів експресії матриксних металопротеїназ ММП8 та ММП14. В плазмі крові хворих зі справжньою поліцитемією визначають активність проММГО та ММП9 і за наявності зростання активності проММГО у 4-5 разів відносно норми на тлі незмінної активності ММП9 прогнозують високий ризик трансформації справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз.

UA 102173 U



Примітка: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ – вірогідно відносно до контролю; § $p \leq 0,05$ – вірогідна різниця у порівнянні з групою зі справжньою поліцитемією.

Fig. 1

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до онкології, і може бути використана для прогнозування трансформації справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз.

Справжня поліцитемія (еритремія, хвороба Вакеза) належить до хвороб з неопластичною клональною проліферацією еритроїдного мієлоїдного та мегакаріоцитарного паростків гемопоєзу зі збільшенням кількості еритроцитів, лейкоцитів та тромбоцитів у крові. Захворювання частіше зустрічається у людей похилого віку, але може виявлятися у молодих осіб та дітей, причому перебіг хвороби у цієї категорії хворих більш агресивний. Для більшості пацієнтів характерний безсимптомний перебіг захворювання. Діагноз справжньої поліцитемії встановлюють на основі аналізу клінічної картини та лабораторних показників, до яких належать підвищення вмісту гемоглобіну більше 165 г/л для жінок та 185 г/л - для чоловіків, кількості еритроцитів більше $6-8 \times 10^{12}/л$, лейкоцитів - до $10-12 \times 10^9/л$, тромбоцитів - до $400-600 \times 10^9/л$, знижений рівень еритропоєтину.

У 5-10 % хворих спостерігається трансформація справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз. Попередній діагноз прогресування справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз встановлюють на підставі клінічних проявів, показників гемограми та за виявленням дифузного фіброзу у трепанобіоптатах кісткового мозку. Підтвердженням діагнозу вважають додаткове визначення тріади показників: CD34+ клітин крові, мутації гену JAK2 та підвищення активності лактатдегідрогенази [Меликян А.Л., Туркина А.Г., Абдулкадыров КМ., Зарицкий А.Ю., Афанасьев Б.В., Шуваев В.А., Ломана Е.Г., Морозова Е.В., Байков В.В., Голенков А.К., Суборцева И.Н., Соколова М.А., Ковригина А.М. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз) // Российское национальное гематологическое общество. - М.: 2014.-81 с.]. Мутацію V617F гену JAK2 визначають у зразках крові методом полімеразної ланцюгової реакції. Недоліком методу є висока вартість аналізу та низька специфічність тесту, оскільки мутація гену JAK2 виявляється також майже при усіх хронічних мієлопроліферативних захворюваннях. Клітини CD34+ крові визначають методом протокової цитофлуориметрії. Суттєвим недоліком методу є необхідність використання відповідного обладнання, що може бути доступним лише у спеціалізованих клініко-діагностичних закладах і не завжди доступне клінічним лабораторіям, які знаходяться на базі гематологічних центрів. Зростання рівня активності лактатдегідрогенази визначають кінетичним методом за допомогою вимірювальних приладів. Недоліком цього методу є низька специфічність даного тесту, оскільки цей показник може підвищуватись і при інших патологічних станах. Загальним недоліком всіх означених вище способів є відсутність прогностичного значення.

Найбільш близьким до запропонованого способу прогнозування трансформації справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз є дослідження експресії матриксних металопротеїназ методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі [Bock O., Neuse J., Hussein K., Brakensiek K., Buesche G., Buhr T., Wiese B., Kreipe H. Aberrant collagenase expression in chronic idiopathic myelofibrosis is related to the stage of disease but not to the JAK2 mutation status // Am. J. Pathol. 2006. - Vol. 169, № 2. - P. 471-481]. Спосіб заключається у визначенні експресії матриксних металопротеїназ ММП8 та ММП14 у зразках кісткового мозку. За посиленням експресії ММП8 у 6 разів у хворих діагностують префібротичну стадію ідіопатичного мієлофіброзу, підвищення експресії ММП14 у 7 разів підтверджує перехід ідіопатичного мієлофіброзу у розгорнуту стадію. Недоліком цього способу є недостатня специфічність, висока вартість аналізів та необхідність використання відповідного обладнання.

В основу корисної моделі поставлена задача розробки специфічного та доступного високочутливого способу прогнозування трансформації справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз.

Поставлена задача вирішується тим, що у запропонованому способі прогнозування трансформації справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз, що включає визначення у кістковому мозку підвищеної у 6-7 разів експресії матриксних металопротеїназ ММП8 та ММП14, в плазмі крові хворих зі справжньою поліцитемією визначають активність проММГО та ММП9 і за наявності зростання активності проММП9 у 4-5 разів відносно норми на тлі незмінної активності ММП9 прогнозують високий ризик трансформації справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз.

Корисну модель, що заявляють, здійснюють таким чином:

1. Зразки плазми крові попередньо інкубують при 37 °С протягом 20 хвилин, розводять у 20 разів забуференим фізіологічним розчином і додають буфер Леммлі з рН 6,8 у співвідношенні 1:1.

2. Проводять вертикальний електрофорез досліджуваних зразків плазми крові у 7,5 % поліакриламідному гелі, що містить 0,1 % додецилсульфату натрію та 2 мг/мл желатини.

3. Після закінчення електрофорезу гелі промивають 4 рази по 15 хвилин у розчині 2,5 % Тритон X-100, потім інкубують 18-20 годин при 37 °C у 0,025 М тріс-HCl (pH 7,5) буфері, що

5 містить 5 мМ CaCl₂, 0,9 % NaCl, 0,05 % NaN₃.
4. Для візуалізації протеолітичної дії матриксних металопротеїназ гелі фарбують впродовж декількох годин Кумассі діамантовим синім G-250, який розчинений у суміші метанол: оцтова кислота: вода у співвідношенні 3:1:6. Після цього гелі знебарвлюють у 7 % розчині оцтової

10 кислоти і зберігають у цьому розчині впродовж 2-3 діб при кімнатній температурі. Дія досліджуваних матриксних металопротеїназ проявляється як безбарвні смуги на блакитному фоні.
5. Гелі фотографують. Кількісну оцінку активності матриксних металопротеїназ та їх латентних форм проводять за допомогою програми Sorbfil Videodensitometer 2.0, розраховуючи активність ММП відносно такої у еталонному зразку плазми, в якому активність цих ензимів

15 прийнята за 1 ум. од.
Можливість здійснення запропонованої корисної моделі підтверджується результатами проведених досліджень активності проММГО та ММП9 у плазмі крові хворих (15 осіб) зі справжньою поліцитемією, 5 - з трансформацією справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз та 13 - з постеритремичним мієлофіброзом. Результати дослідження представлено на кресленні.

20 Ефективність запропонованого способу прогнозування трансформації справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз підтверджується наступними прикладами.

Приклад № 1.

Хвора П., 60 років, історія хвороби № 5471.

25 Була госпіталізована до стаціонару обласного гематологічного центру КЗ "Дніпропетровська міська багатoproфільна клінічна лікарня № 4" Дніпропетровської обласної ради" з діагнозом справжня поліцитемія у зв'язку з погіршенням загального стану.

Діагноз трансформація справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз попередньо встановлений на підставі клінічних проявів (збільшення розмірів печінки, селезінки, зниження ваги, підвищення температури до 37,5 °C) та лабораторних досліджень (гемоглобін 156 г/л, еритроцити $5,8 \times 10^{12}/л$, тромбоцити $350 \times 10^9/л$, лейкоцити $27,5 \times 10^9/л$, серед яких виявлено бласти, промієлоцити, мієлоцити).

30 Згідно з корисною моделлю у хворої до початку терапії визначили активність проММГО та ММП9 у плазмі крові. За результатами досліджень виявлено підвищення активності даного ензиму, яка дорівнювала 5,02 ум. од. при нормі $1,02 \pm 0,12$ ум. од. на тлі нормальних значень активності ММП9. Діагноз трансформації справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз також було підтверджено показниками мієлограми.

Приклад № 2.

Хвора Д., 65 років, історія хвороби № 11883.

40 Була госпіталізована до стаціонару обласного гематологічного центру КЗ "Дніпропетровська міська багатoproфільна клінічна лікарня № 4" Дніпропетровської обласної ради" з діагнозом справжня поліцитемія у важкому стані.

Діагноз трансформація справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз попередньо встановлений на підставі клінічних даних (гепатоспленомегалія) та лабораторних досліджень (гемоглобін 163 г/л, еритроцити $5,5 \times 10^{12}/л$, тромбоцити $342 \times 10^9/л$, лейкоцити $15,9 \times 10^9/л$, серед яких виявлено промієлоцити, мієлоцити та підвищену кількість базофілів).

45 Згідно з корисною моделлю у хворої визначили активність проММГО а ММП9 у плазмі крові. За результатами досліджень виявлено підвищення активності даного ензиму, що становила 3,69 ум. од. при нормі $1,02 \pm 0,12$ ум. од. на тлі нормальних значень активності зрілої ММП9. Діагноз було підтверджено показниками мієлограми.

50 Запропонований спосіб прогнозування трансформації справжньої поліцитемії у постеритремичний мієлофіброз характеризується високою чутливістю, простотою та доступністю реагентів і може бути використаний в клінічних і науково-дослідних лабораторіях. Перевагою способу є отримання вірогідних результатів досліджень при невеликих витратах на проведення експерименту у порівнянні з закордонними аналогами.

55 Технічний результат, що досягається при використанні корисної моделі, визначається дослідженням у хворих зі справжньою поліцитемією активності проММГО, в разі підвищення якої у 4-5 разів можна зробити припущення про прогресування даного захворювання та розвиток фіброзу кісткового мозку. Застосування корисної моделі дозволить своєчасно виявити

ризик розвитку постеритремічного мієлофіброзу. Таким чином, дослідження даного показника має прогностичний характер і дозволяє спростити та доповнити діагностичну процедуру.

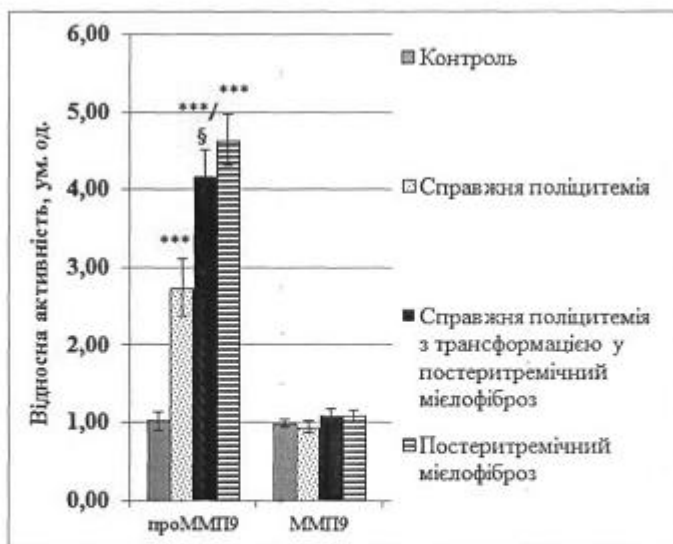
Розроблений спосіб відповідає умові "промислова придатність", що дозволяє кваліфікувати його як "корисну модель", яка може бути використана у науково-дослідних роботах та в лабораторній діагностиці для моніторингу перебігу справжньої поліцитемії.

Додаток 1.

На кресленні: Зміни активності різних форм матриксної металопротеїнази 9 у хворих з мієлопроліферативними захворюваннями.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування трансформації справжньої поліцитемії у постеритремічний мієлофіброз, що включає визначення у кістковому мозку підвищеної у 6-7 разів експресії матриксних металопротеїназ ММП8 та ММП14, який **відрізняється** тим, що в плазмі крові хворих зі справжньою поліцитемією визначають активність проММГО та ММП9 і за наявності зростання активності проММГО у 4-5 разів відносно норми на тлі незмінної активності ММП9 прогнозують високий ризик трансформації справжньої поліцитемії у постеритремічний мієлофіброз.



Примітка: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ – вірогідно відносно до контролю; § $p \leq 0,05$ – вірогідна різниця у порівнянні з групою зі справжньою поліцитемією.

Фіг. 1

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

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

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