



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **98909**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/48** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 12970**

(22) Дата подання заявки: **03.12.2014**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **12.05.2015**

(46) Публікація відомостей **12.05.2015, Бюл.№ 9**  
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Глузман Данило Фішелевич (UA),  
Склярєнко Лілія Михайлівна (UA),  
Іванівська Тетяна Степанівна (UA),  
Коваль Стелла Володимирівна (UA),  
Завелевич Михайло Петрович (UA),  
Українська Наталія Іванівна (UA),  
Полудненко Людмила Юріївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ  
ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ  
ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ,  
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)**

## (54) СПОСІБ ІМУНОЦИТОХІМІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ПАТОЛОГІЧНИХ В-КЛІТИН В КІСТКОВОМУ МОЗКУ І КРОВІ ХВОРИХ НА НЕХОДЖКІНСЬКІ ЛІМФОМИ

(57) Реферат:

Спосіб імуноцитохімічного визначення патологічних В-клітин в кістковому мозку і крові хворих на неходжкінські лімфоми шляхом визначення клітин лімфоми в клітинних препаратах крові (типу "висушеної краплі") та в мазках-препаратах із пунктату кісткового мозку за допомогою спеціально відібраної панелі МКАТ (моноклональних антитіл).

**U  
98909  
UA**



Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, а саме до лабораторної імуноцитохімічної діагностики онкогематологічних захворювань.

Неходжкінські лімфоми (НХЛ) - гетерогенна група пухлин, які виникають з різного типу клітин лімфоїдної тканини [1]. НХЛ займають 5-е місце в загальній структурі злоякісних новоутворень. Захворюваність на НХЛ постійно зростає. В той же час показники 5-річної виживаності, за даними Національного інституту раку США, складають трохи більше 50 % [2].

Основний спосіб діагностики НХЛ - гістологічне дослідження отриманих при біопсії лімфатичних вузлів або матеріалу з екстранодальних вогнищ ураження. В теперішній час з метою диференційної діагностики та уточнення гістогенезу різних форм НХЛ, згідно з класифікацією ВООЗ 2008 р., все ширше використовують імуногістохімічні реакції і методи молекулярно-генетичного аналізу [3].

Серед НХЛ 85 % складають пухлини В-клітинного походження. Для В-клітинних НХЛ (В-НХЛ), особливо індолентних, характерною є генералізація патологічного процесу з ураженням селезінки, печінки, кісткового мозку. Пухлинні клітини в різні строки від початку захворювання можуть бути виявлені також в периферичній крові.

Фаза лейкемізації (більше 20 % лімфомних клітин в кістковому мозку і периферичній крові) діагностується з різною частотою при окремих формах В-НХЛ [4]. Найбільш часто лейкемізація процесу відбувається при лімфомі з клітин мантийної зони (МКЛ) - 64 %, лімфомі з клітин маргінальної зони селезінки (ЛМЗ) - 70 %, фолікулярній лімфомі - 42 %, значно рідше у хворих на дифузну В-великоклітинну лімфому - 16 %, анапластичну великоклітинну лімфому - 13 % і медіастинальну лімфому із великих В-клітин - 3 %.

Циркуючі в периферичній крові хворих різні типи лімфомних клітин у більшості випадків за цитоморфологічними ознаками (форма і розмір клітин, конденсація хроматину ядра і наявність ядерець, ступінь базofilії цитоплазми) не відрізняються між собою і нормальними лімфоцитами, які зберігаються у крові хворих на В-НХЛ. За цитоморфологічними ознаками вони також дуже подібні до клітин, що виявляються в крові при В-клітинному хронічному лімфолейкозі і В-пролімфоцитарному лейкозі.

Існуючі методи діагностики на основі гістологічного дослідження біоптатів лімфатичних вузлів не дозволяють діагностувати лімфоми у хворих з лейкемізацією процесу та при відсутності доступних для дослідження первинних вогнищ ураження (лімфоми селезінки, пухлини середостіння). Це ж стосується також виявлення лімфомних клітин в стернальних пунктатах кісткового мозку, які не можуть бути ідентифіковані при застосуванні рутинних методів дослідження [1, 3]

Для вирішення цих питань можуть бути використані сучасні імуноцитохімічні методи із застосуванням панелі моноклональних антитіл (МКАТ) до лінійних і диференціувальних антигенів В-лімфоцитів, експресія яких на поверхневих мембранах є різною на нормальних лімфоцитах та патологічних клітинах при тих чи інших формах В-НХЛ.

Для нормальних В-лімфоцитів характерна експресія наступних антигенів:

В-лімфоцити крові: CD19<sup>+</sup> (5-22 %), CD20<sup>+</sup> (8-19 %), CD23<sup>+</sup> (6-12 %), CD22<sup>+</sup> (18-20 %) (антиген CD25 експресується на 13-24 % активованих Т-лімфоцитів; антиген CD43 експресується на Т-клітинах);

В-лімфоцити кісткового мозку: CD19<sup>+</sup> (7-20 %), CD20<sup>+</sup> (3-10 %), CD22<sup>+</sup> (17-29 %), CD23<sup>+</sup> (поодинокі клітини), CD10<sup>+</sup> (до 15 %).

Клон патологічних В-клітин хворих на В-НХЛ характеризується таким імунофенотипом поверхневих мембран:

В-НХЛ з клітин маргінальної зони селезінки: CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD5<sup>-</sup>, CD10<sup>-</sup>, CD23<sup>-</sup>, CD43<sup>-</sup>, CD25<sup>-</sup>, CD 103<sup>-</sup>, CyclinD1<sup>-</sup>

В-НХЛ з клітин маргінальної зони лімфатичного вузла: CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD5<sup>-</sup>, CD10<sup>-</sup>, CD23<sup>-</sup>, CD43<sup>-</sup> (в половині випадків CD43<sup>+</sup>), CyclinD1<sup>-</sup>

В-НХЛ з клітин мантийної зони: CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD10, CyclinD1<sup>+</sup>

Фолікулярна ліфмома: CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD23<sup>-</sup>, CD43<sup>-</sup>, (іноді CD 10<sup>-</sup>, CD23<sup>+</sup> та/або CD43<sup>+</sup>)

Лімфоплазмочитарна ліфмома: CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD5<sup>-</sup>, CD10<sup>-</sup>, CD23<sup>-</sup> (в частині випадків CD25<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, іноді CD22<sup>-</sup>, CD23<sup>+</sup>).

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено задачу розробити спосіб імуноцитохімічного визначення патологічних В-клітин в кістковому мозку і крові хворих на неходжкінські лімфоми, який би дозволив ідентифікувати злоякісно трансформовані клітини при різних формах В-НХЛ та визначити їх кількість в кістковому мозку на стадії лейкемізації завдяки використанню спеціально підібраної панелі МКАТ. На цій основі також можлива верифікація

діагнозу при підозрі на лімфому при відсутності ознак вираженої гіперплазії тих чи інших груп лімфатичних вузлів, а також наявності ізольованої спленомегалії.

Поставлена задача вирішується тим, що діагностичне дослідження для верифікації форми НХЛ (імуноцитохімічні реакції) проводиться як в клітинних препаратах, виготовлених з периферичної венозної крові (цитоцентрифужних та типу "висушеної краплі"), так і безпосередньо в нативних мазках-препаратах кісткового мозку з метою кількісної оцінки лімфомних клітин в пунктаті для визначення лейкомізації процесу.

Схема застосування способу, що заявляється.

Для імунофенотипування моноклеари периферичної крові і кісткового мозку хворих на різні форми В-НХЛ або з підозрою на наявність лімфоми виділяють фракціонуванням в градієнті щільності фікол-урографіну.

Препарати готують за стандартними методиками або концентруючи клітини із суспензії на скельці за допомогою цитоцентрифуги, або висушуючи краплину відмитої клітинної суспензії на предметних скельцях, при кімнатній температурі. В одержаних цитопрепаратах проводять імуноцитохімічну реакцію, використовуючи панель діагностичних МКАТ. Для візуалізації місць зв'язування діагностичних антитіл з антигенами поверхневих мембран клітин використовують метод стрептавідин-біотин-лужна фосфатаза (АВС-комплекс) [5].

Результати імунофенотипування субстратних клітин крові і кісткового мозку хворих на В-НХЛ з гістологічно підтвердженим діагнозом або з підозрою на наявність лімфоми при неможливості проведення ексцизійної біопсії наведено в прикладах, які ілюструють можливості заявленої корисної моделі.

Приклади практичного застосування способу.

Приклад 1. Хвора К., 1950 р.н. Попередній діагноз - лімфома в стадії лейкомізації - за наявності майже 70 % субстратних клітин в крові і близько 20 % в кістковому мозку за даними попереднього цитоморфологічного та цитохімічного досліджень.

Для встановлення точної форми лімфоми та ідентифікації лімфомних клітин в кістковому мозку виготовлені клітинні препарати крові та підготовлені мазки-препарати кісткового мозку були досліджені за допомогою імуноцитохімічного методу.

Імуноцитохімічну реакцію проводили в клітинних препаратах крові і мазках-препаратах кісткового мозку із застосуванням панелі специфічних моноклональних антитіл до лінійно-специфічних та диференціювальних антигенів В-лімфоцитів та АВС-комплексу з лужною фосфатазою як ферментною міткою.

Патологічні лімфоїдні клітини експресували наступні антигени В-лімфоцитів: CD19, CD20, CD22. Результати з використанням МКАТ до антигенів CD5, CD 10, CD23, CD43, CD25, CD 103 і цикліну D1 були негативними.

Таким чином, за результатами імуноцитохімічного дослідження клітин лімфоми у хворої був встановлений діагноз: В-НХЛ з клітин маргінальної зони селезінки на початковій стадії лейкомізації кісткового мозку.

Приклад 2. Хвора П., 1964 р.н., попередній діагноз - пухлина лімфатичної залози на шийї справа. Для встановлення нозологічної форми НХЛ застосовували імуноцитохімічний метод діагностичних досліджень.

Імуноцитохімічну реакцію проводили в клітинних препаратах крові і мазках-препаратах кісткового мозку із застосуванням панелі специфічних моноклональних антитіл до лінійно-специфічних та диференціювальних антигенів В-лімфоцитів та АВС-комплексу з лужною фосфатазою як ферментною міткою.

Патологічні лімфоїдні клітини в клітинних препаратах крові і препаратах-мазках кісткового мозку експресували наступні антигени В-лімфоцитів: CD19, CD20, CD22, CD5, CD43 і циклін D1. Реакція при визначенні антигенів CD10, CD23, CD25, CD103 була негативною.

За результатами проведеного імуноцитохімічного дослідження у хворої був встановлений діагноз: В-клітинна НХЛ з клітин мантіїної зони.

Приклад 3. Хворий В., 1944 р.н. Попередній діагноз - фолікулярна лімфома в стадії лейкомізації. Діагноз був встановлений на основі гістологічного дослідження ураженого патологічним процесом лімфатичного вузла за нормальної лейкограми периферичної крові і відсутності будь-яких морфологічних особливостей лімфоцитів.

Для верифікації нозологічної форми НХЛ і встановлення лейкомізації кісткового мозку застосовували імуноцитохімічний метод діагностичних досліджень.

Імуноцитохімічну реакцію проводили в клітинних препаратах крові і мазках-препаратах кісткового мозку із застосуванням панелі специфічних моноклональних антитіл до лінійноспецифічних та диференціювальних антигенів В-лімфоцитів та АВС-комплексу з лужною фосфатазою як ферментною міткою.

Патологічні лімфоїдні клітини в клітинних препаратах крові і мазках-препаратах кісткового мозку експресували наступні антигени В-лімфоцитів: CD19, CD20, CD22, CD10. Реакція з антигенами CD5, CD23, CD43, CD25, CD 103 і циклін D1 була негативною. Позитивні на діагностичні антигени субстратні клітини відмічалися в крові (в кількості 55 %) та на 28 % клітин кісткового мозку, що свідчить про лейкомізацію фолікулярної лімфоми.

За результатами проведеного імуноцитохімічного дослідження у хворого був встановлений діагноз: фолікулярна лімфома, стадія лейкомізації кісткового мозку.

Перевагою способу, що заявляється, є можливість ідентифікації лімфомних клітин в пунктатах кісткового мозку або периферичній крові, що дозволяє діагностувати ту чи іншу форму неходжкінських лімфом у хворих з лейкомізацією процесу за відсутності чітко визначених первинних вогнищ ураження, при підозрі на лімфому або при відсутності ознак вираженої гіперплазії лімфатичних вузлів. Наведені приклади підтверджують дієвість способу, що заявляється, оскільки він дозволяє верифікувати діагноз при підозрі на лімфому та ідентифікувати певний тип лімфоми за даними імуноцитохімічного дослідження, яке виконується в препаратах пунктатів кісткового мозку або периферичної крові та може широко використовуватись в клінічній практиці.

Джерела інформації:

1. Feller A.C., Diebold J. Histopathology of nodal and extranodal non-Hodgkin lymphomas. Berlin etc.: Springer-Verlag, 2004, 464 p.

2. Canellos G.P., Lister T.A., Young B. (eds). The lymphomas, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2006. 581 p.

3. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J. W. (eds). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press, 2008. 439 p.

4. Bain B.J. Lukaemia diagnosis. 4th ed. London: Wiley-Blackwell, 2010. 377 p.

5. Глузман Д.Ф., Скляренко Л.М., Надгорная В.А., Крячок И.А. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей. - Киев: Морион, 2003. - 156 с.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб імуноцитохімічного визначення патологічних В-клітин в кістковому мозку і крові хворих на неходжкінські лімфоми, який **відрізняється** тим, що визначення клітин лімфоми проводять в клітинних препаратах крові (типу "висушеної краплі") та в мазках-препаратах із пунктату кісткового мозку за допомогою спеціально відібраної панелі МКАТ (моноклональних антитіл), який дозволяє ідентифікувати злоякісно трансформовані клітини при різних формах В-клітинних неходжкінських лімфом на стадії лейкомізації або при підозрі на лімфому при відсутності ознак вираженої гіперплазії лімфатичних вузлів.

---

Комп'ютерна верстка М. Мацело

---

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