



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75749** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
G01N 33/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 06936	(72) Винахідник(и): Бебешко Володимир Григорович (UA), Мінченко Жанна Миколаївна (UA), Дягіль Ірина Сергіївна (UA), Дмитренко Олена Олександрівна (UA), Шляхтиченко Тетяна Юріївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 06.06.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.12.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.12.2012, Бюл.№ 23	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ НАМН УКРАЇНИ", вул. Мельникова, 53, м. Київ-50, 04050 (UA)

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РИЗИКУ РОЗВИТКУ ОНКОГЕМАТОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ У ОСІБ, ЩО ЗАЗНАЛИ РАДІАЦІЙНОГО ОПРОМІНЕННЯ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування ризику розвитку онкогематологічних захворювань у осіб, що зазнали дії радіаційного опромінення включає дослідження факторів ризику у складі крові та здійснення прогнозування ризику розвитку онкогематологічних захворювань у осіб, що зазнали радіаційного опромінення. Як фактори ризику застосовуються імуногенетичні маркери HLA системи і, при наявності алелей та їх сполучень або комбінацій: HLA-A*24; HLA-A*02; HLA-A*11; HLA-B*35; HLA-B*51; HLA-C*07; HLA-DRB1*11 та гаплотипу HLA-DQA1*0101, DQB1*0501, у сукупності з маркерами підвищеної чутливості організму до радіації HLA-A*26; HLA-B*38; HLA-B*35; HLA-DRB1*04 - прогнозують підвищений ризик розладів в певних ланках гемопоезу, що сприяє реалізації кістковомозкового синдрому та онкогематологічної патології при опроміненні.

UA 75749 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до імуногенетики, і може бути використана в гематології та радіобіології при прогнозуванні ризику виникнення онкогематологічних захворювань у осіб, які працюють з джерелами іонізуючого випромінювання, або зазнали впливу факторів Чорнобильської катастрофи.

Актуальність: в основі розвитку мультифакторіальної патології лежить спадкова схильність, однак безпосередньо патологічний процес є результатом взаємодії певних генетично обумовлених характеристик індивідуума та чинників навколишнього середовища [1, 2].

На фоні несприятливих екзогенних чинників певна комбінація генетичних факторів може виступати в ролі ініціаторів розвитку патології. Оскільки серед комплексу факторів Чорнобильської катастрофи переважаючим є радіаційний, то велике значення набуває можливість реалізації захворювань, які можуть бути причинно пов'язані з іонізуючим опроміненням. До таких, перш за все, належить онкогематологічна патологія.

Існує певна кількість клініко-лабораторних ознак, що корелюють з ризиком виникнення захворювань, які причинно можуть бути пов'язані з впливом іонізуючого випромінювання, однак на сьогодні питання індивідуального прогнозування ризику реалізації конкретного патологічного процесу залишається невирішеним. Труднощі в прогнозуванні обумовлені варіабельністю клінічних проявів та перебігом захворювання. Генетично детерміновані характеристики є стійкими і мають найбільшу прогностичну цінність у клінічному аспекті [3, 4]. Серед генетичних маркерів схильності до захворювань у людини визначальним чинником індивідуального варіювання імунологічних реакцій є поліморфізм імуногенетичних структур, а саме генів головного комплексу гістосумісності (HLA-Human Leukocyte Antigen), що може бути використано для прогнозування розвитку онкогематологічної патології.

Безумовно, в даному аспекті переважною складовою є дослідження індивідуальної чутливості індивіду до радіаційного опромінення. Результати наших попередніх наукових досліджень впливу радіаційного чинника на різні системи організму людини свідчать про наявність такої індивідуальної чутливості [5, 6, 7].

Ми визначили загальні імуногенетичні механізми формування індивідуальної радіочутливості і з цих позицій дослідили ризик реалізації генетичної схильності до захворювань, які можуть бути причинно пов'язані з іонізуючим опроміненням, зокрема розвиток онкогематологічної патології.

Відомо декілька способів прогнозування ризику розвитку онкогематологічних захворювань. Існує рішення щодо використання досліджень результатів реагування біологічної рідини людини з певним кристалоутворюючим розчином і діагностичним показником є утворення певного малюнку отриманої кристалограми, при наявності в малюнку ділянок зі структурою "равлик" діагностують у обстежуваного наявність прогресуючої форми лімфобластної лейкемії [8].

Представлений спосіб може використовуватися для ранньої діагностики розвитку лейкемічного процесу, в тому числі і при відсутності клінічних проявів захворювань, але суттєвим недоліком винаходу є високий ступінь суб'єктивності діагностичного критерію, а також відсутність сучасних молекулярно-генетичних підходів до клінічної діагностики.

Застосування способу визначення хромосомних мутацій значно підвищує прогностичний рівень диференційної діагностики. Наявність хромосомних мутацій в каріотипі хворих на онкогематологічну патологію є диференційним показником і прогностичною ознакою щодо розвитку рецидиву захворювання [9]. Але спосіб на основі такого твердження є достатньо трудомістким і вимагає тривалих динамічних спостережень.

Відомий спосіб прогнозування розвитку лейкемій у дітей [10]. Досліджувались поодинокі нуклеотидні поліморфізми (SNP - Single nucleotide polymorphisms) як форми генетичних поліморфізмів, що можуть впливати на функції генів. Було доведено, що SNP впливають на функції генів, та обумовлюють вразливість індивідуумів до захворювань. Визначено 200 мільйонів SNP присутніх в геномі людини. У зв'язку з цим наведений винахід забезпечує метод визначення мінімум одного SNP в специфічних генах, що сприяє запобіганню ризику виникнення дитячих лейкемій.

Наведені рішення мають конкретні недоліки: виключно обмежені діагностичні можливості застосування, недостатність комплексних підходів до клінічної діагностики а також відсутність прогнозу ризику розвитку онкогематологічних захворювань з урахуванням індивідуальної чутливості організму людини до впливу екзогенних факторів, а саме іонізуючого випромінювання.

Запропонований нами спосіб дозволяє уникнути цих недоліків і підняти рівень діагностико-прогностичних можливостей на новий ступінь.

Технічною задачею корисної моделі є розробка способу прогнозування ризику виникнення онкогематологічної патології для індивідів, які зазнали впливу факторів Чорнобильської

катастрофи або працюють з джерелами іонізуючого випромінювання, на основі визначення імуногенетичних маркерів генетичної схильності HLA комплексу.

Поставлена технічна задача вирішується за рахунок визначення асоціативного зв'язку імуногенетичних маркерів з ризиком виникнення захворювання з урахуванням присутності в генотипі маркерів підвищеної радіочутливості організму.

Задачею розробки є вдосконалення існуючого засобу за рахунок підвищення точності диференційної діагностики, введення можливостей до клінічного прогнозування ризику реалізації онкогематологічної патології у осіб, що зазнали дії радіаційного опромінення на основі визначення імуногенетичних маркерів HLA комплексу. Завдяки даному методичному підходу досягається висока достовірність і надійність результатів, що сприяє індивідуалізації в прогнозуванні ризику реалізації та діагностиці розвитку онкогематологічної патології.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі прогнозування ризику розвитку онкогематологічних захворювань у осіб, що зазнали дії радіаційного опромінення, згідно з корисною моделлю, на основі визначення імуногенетичних маркерів HLA системи аналізують генотип хворого, і при наявності алелей та їх сполучень або комбінацій: HLA-A*24; HLA-A*02 ; HLA-A*11; HLA- B*35; HLA-B*51; HLA-C*07; HLA-DRB1*11 та гаплотипу HLA-DQA1*0101, DQB1*0501, у сукупності з маркерами підвищеної чутливості організму до радіації HLA-A*26; HLA-B*38; HLA-B*35; HLA-DRB1*04 - прогнозують підвищений ризик розладів в певних ланках гемопоезу, що сприяє реалізації кістковомозкового синдрому та онкогематологічної патології при опроміненні.

Клінічне, інструментальне та клініко-лабораторне обстеження пацієнтів з визначенням ефективності терапії проводилось у співставленні з імуногенетичним паспортом хворого, з визначенням асоціативного зв'язку імуногенетичних маркерів з розвитком онкогематологічної патології.

За цим принципом для аналізу були виділені групи хворих в залежності від наявності або відсутності онкогематологічної патології та впливу іонізуючого опромінення.

Для вирішення поставленої задачі спочатку проводили генотипування алельних варіантів HLA I класу (локуси A, B, C), II класу (локуси DRB1, DQA1, DQB1), що було здійснено на ДНК, яку вилучали з периферичної крові хворого на ЕДТА стандартним методом висолювання [11]. Алелі визначали методом алель-специфічної ампліфікації з сіквенс-специфічними праймерами (SSP) фірми PROTRANS (Німеччина) [12].

На основі вищезазначених показників прогнозували розвиток онкогематологічної патології.

На основі статистичного розрахунку коефіцієнта імуногенетичного ризику розвитку онкогематологічної патології підтвердили високу інформативність маркерів - алелей: HLA-A*24; HLA-A*02 ; HLA-A*11; HLA- B*35; HLA-B*51; HLA-C*07; HLA-DRB1*11 та гаплотипу HLA-DQA1*0101, DQB1*0501, у сукупності з маркерами підвищеної чутливості організму до радіації HLA-A*26; HLA-B*38; HLA-B*35; HLA-DRB1*04 - прогнозують підвищений ризик розладів в певних ланках гемопоезу, що сприяє реалізації кістковомозкового синдрому та онкогематологічної патології при опроміненні.

Прогностична ефективність дослідження була статистично підтверджена на групі хворих з онкогематологічною патологією - 32 особи, що зазнали впливу радіаційного опромінення та 28 хворих, у яких не підтвердився розвиток онкогематологічної патології. Термін спостереження склав 20 років. При цьому популяційним контролем дослідження служила група здорових неспоріднених донорів крові (150 осіб).

Спосіб прогнозування ризику розвитку онкогематологічних захворювань у осіб, що зазнали радіаційного опромінення ілюструється прикладами конкретного виконання.

Приклад 1: Хворий Ш., реконвалесцент гострої променевої хвороби (ГПХ) 1-го ступеня, 53 роки, історія хвороби № 1831. Діагноз: гостра мієлобластна лейкемія. Діагноз встановлений на підставі морфологічного, цитохімічного, імунофенотипового дослідження кісткового мозку та периферичної крові, клінічної картини. У зв'язку з розвитком панцитопенії, яка супроводжує прогресування захворювання, хворий отримував малі дози цитозару. В об'єктивному статусі відмічалися симптоми загально-інтоксикаційного, анемічного та геморагічного синдромів. Перші прояви захворювання з'явилися на восьмому році після гострого опромінення.

Імуногенетичний паспорт хворого: 0(I), Rh(+), HLA-A*03,26; B*17,38; C*07,12; DRB1*04,11; DQB1*0302, 0502; DQA1*0101, 0505. Наявність в генотипі хворого алелей HLA-A*26; B*38; C*07; DRB1*04, 11 дозволила прогнозувати подальший розвиток онкогематологічної патології з негативним прогнозом для лікування, що і було підтверджено перебігом захворювання. У хворого на восьмому році після опромінення розвинулися гематологічні порушення, які проявлялися анемією, тромбоцитопенією, сублейкемічним лейкоцитозом, бластемією в периферичній крові. При поглибленому гематологічному обстеженні в аспіраті кісткового мозку

було виявлено 68 % бластів, а цитохімічне та імунофенотипове обстеження дозволило встановити діагноз гострої мієлобластної лейкемії.

Приклад 2: Хвора Б., ГПХ 2-го ст., 55 років, історія хвороби № 1495. Діагноз: мієлодиспластичний синдром (МДС). Виразений геморагічний синдром. Діагноз МДС було верифіковано на підставі морфологічного і імунофенотипового дослідження крові та кісткового мозку. Через 7 років після гострого опромінення у хворої з'явилися перші ознаки порушень з боку кровотворної системи у вигляді зниження основних показників периферичної крові, геморагічний синдром, інфекційні ускладнення. Хвора отримувала симптоматичну терапію, яка не дала позитивної динаміки. Проведене поглиблене гематологічне обстеження виявило порушення на рівні кісткового мозку, що дало можливість підтвердити розвиток МДС радіасоційованого характеру. Оскільки специфічного лікування для цього захворювання не існує, пацієнт отримував гемотрансфузії еритромаси та іншу симптоматичну терапію. За результатами лікування було досягнуто незначного покращення загального стану хворого, хоча показники периферичної крові залишалися на попередніх рівнях. Через деякий час, незважаючи на вищезазначену терапію, хвора померла.

Імуногенетичний паспорт хворої: 0(I), Rh(+), HLA-A*02,26; B*27,35; C*04,07; DRB1*04,16; DQB1*0302, 0501; DQA1*0101, 0501. Наявність в генотипі хворої алелей HLA-A*26; B*35; C*07, DRB1*04, DQA1*0101, DQB1*0501 дозволила прогнозувати подальший розвиток патології кровотворної системи з негативним прогнозом для лікування, що і було підтверджено перебігом захворювання. У хворої на сьомому році після опромінення розвинулася панцитопенія в периферичній крові, а при поглибленому обстеженні в кістковому мозку виявлено зниження його клітинності із звуженням еритроїдного паростка, що в сукупності даних дало можливість встановити діагноз мієлодиспластичного синдрому. Це захворювання належить до передлейкемічних станів, основною причиною розвитку є радіаційне опромінення і в більшості випадків трансформується в гостру лейкемію.

Приклад 3: Хворий Д., ГПХ 3-го ст., 59 років, історія хвороби № 2524. Діагноз: рефрактерна анемія з надлишком бластів (РАНБ). Діагноз РАНБ було встановлено на підставі клінічної картини, морфологічного і імунофенотипового дослідження крові та кісткового мозку через дванадцять років після опромінення. У хворого після довгого періоду відносного благополуччя, розвинулися симптоми загально-інтоксикаційного синдрому, помірна цитопенія і він не звертався за медичною допомогою впродовж року. Поява глибокої анемії (гемоглобін 46,2 г/л) стала приводом до госпіталізації. При поглибленому гематологічному обстеженні в аналізах периферичної крові зсув до незрілих гранулоцитів та появою поодиноких бластів. Дослідження кісткового мозку підтвердило попередній діагноз МДС (РАНБ). У подальшому проводилися тільки малі дози цитозару та симптоматична терапія. Проведення лікування супроводжувалося розвитком тяжких тривалих цитопеній, а також численними інфекційними ускладненнями. Через деякий час хворий помер.

Імуногенетичний паспорт хворого: A(II), Rh(+), HLA-A*11,24; B*08,38; C*04,06; DRB1*04,15; DQB1*0101,0602; DQA1*0103, 0501. Наявність алелей HLA-A*11, HLA-B*38 та HLA-DRB1*04 дозволила прогнозувати подальший розвиток онкогематологічної патології з негативним прогнозом для лікування, що і було підтверджено перебігом захворювання. У пацієнта на дванадцятomu році після опромінення з'явився виразений геморагічний синдром, що призвів до розвитку глибокої анемії. В аналізі периферичної крові була також виявлена глибока тромбоцитопенія. Кістковий мозок гіпопластичний із звуженням всіх паростків кровотворення, підвищення вмісту бластних клітин до 12 %. Всі ці дані дали можливість встановити хворому діагноз мієлодиспластичного синдрому, рефрактерна анемія з надлишком бластів (РАНБ).

У представлених випадках відмічався агресивний короткотривалий перебіг захворювання, який закінчився летально.

Приклад 4: Хворий К., 59 ГПХ 1-го ст., історія хвороби № 3411. Діагноз: імунна панцитопенія. Діагноз було встановлено на підставі поглибленого клініко-гематологічного обстеження, морфологічного і імунофенотипового дослідження крові та кісткового мозку в 2004 р. В анамнезі у хворого відмічалися періодичні зниження числа лейкоцитів та тромбоцитів, помірна анемія. Хворий знаходився під диспансерним наглядом у гематолога, однак після проведення декількох курсів гепатропної та симптоматичної терапії стан його значно покращився, відновилися показники крові, в кістковому мозку патологічних відхилень не відмічалось. Щороку пацієнт проходив повне обстеження і стан його залишався задовільним. У подальшому специфічної терапії не отримував, так як перебіг захворювання характеризувався доброякісністю. Пацієнт зберігає активність, працює.

Імуногенетичний паспорт хворого: A(II), Rh(+), HLA-A*01,03; B*14,18; C*01,06; DRB1*02,15; DQB1*0101,0602; DQA1*0103, 0501. Відсутність алелей : HLA-A*24; HLA-A*02; HLA-A*11; HLA-

B*35; HLA-B*51; HLA-C*07; HLA-DRB1*11 та гаплотипу HLA-DQA1*0101, DQB1*0501, у сукупності з маркерами підвищеної радіочутливості організму HLA-A*26; - HLA-B*38; HLA-B*35; HLA-DRB1*04 свідчить про позитивний результат лікування, що було підтверджено перебігом захворювання.

Таким чином, наведені приклади підтверджують високу інформативність запропонованих генетичних маркерів, що дає можливість надійно прогнозувати ризик виникнення онкогематологічної патології у опромінених осіб, та осіб, які професійно пов'язані з джерелами іонізуючого випромінювання, що сприяє підвищенню ефективності та індивідуалізації профілактичних заходів щодо попередження розвитку захворювань кровотворної системи.

Використані джерела інформації:

1. Молекулярные и клеточные последствия аварии на ЧАЭС/ И.И. Пелевина, Г.Г. Афанасьев, А.В. Алещенко и др. // Радиационная биология. Радиоэкология, 2011. - Т. 51, № 1. - С. 154-161.

2. Minna J.D., Roth J.A., Gazdar A.F. Exogenous factors of carcinogenesis. - Cancer Cell. - 2005. - Vol. 4(1). - P. 49-52.

3. Chokkalingam A.P., Buffler P.A. Genetic susceptibility to leukemia. - Radiat. Prot. Dosimetry. - 2008. - V.132 (2). - P. 119-129.

4. Бондарь Г.В., Седаков И.Е., Кайряк О.В. Опухолевая болезнь - элемент эволюции органического мира // Онкология, 2010. - Т. 12, № 3. - С. 213-218.

5. Zh. Minchenko, I. Dyagil, V. Bebeshko, D.A. Afanasiev. Immune factors role in hemopoietic malignancies origin in persons exposed to radiation after the Chernobyl NPP accident // Abstract book 13th Congress EHA, Copenhagen, Denmark, June 12-15, 2008. - P. 477.

6. Ж.М. Минченко, О.О. Дмитренко, Д.А. Базика, І.С. Дягіль, А.А. Чумак, В.Г. Бебешко. Імуногенетичні чинники в механізмах радіочутливості організму людини і ризику реалізації пострадіаційних ефектів на рівні дисфункцій і імуноепізів та формуванні соматичної патології у опромінених осіб внаслідок аварії на ЧАЕС/ в монографії "Медичні наслідки аварії на Чорнобильській атомній електростанції"//. - ДІА. - К., 2007. - С. 413-422.].

7. Минченко, Ж.Н. Генетические системы крови и радиочувствительность организма человека / Ж.Н. Минченко // Международный журнал радиационной медицины. - 2006. - №5. - С. 128-138.

8. ИЗОБРЕТЕНИЕ. Патент Российской Федерации RU 2242004 (2004.12.10) Способ дифференциальной диагностики доброкачественной и прогрессирующей форм хронического лимфолейкоза.

9. Jeong Ho Yoon et al. Cytogenetic markers for the diagnosis of AML, B-ALL and T-ALL. Pub. No.:US 2012/0015845 A1. Pub. Date: Jan. 19, 2012 (US).

10. M.T. Dorak et al. Single nucleotide polymorphisms as genetic markers for childhood leukemia. Pub. No.:US 2010/0092959 A1. Pub. Date: Apr. 15, 2010 (US).

11. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell //Nucleic Acid Res. - 1988. - Vol. 16. - P. 1216-1218.

12. Bunce, O'Neill, Barnado, Krausa, Morris. Comprehensive DNA Typing for HLA-A,B, CDRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQB1, DQA1, by PCR with mixes utilizing sequence-specific primers (PSR-SSP) // Tissue Antigens. - 1995. - V. 45. - P. 355-367.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування ризику розвитку онкогематологічних захворювань у осіб, що зазнали дії радіаційного опромінювання, який включає дослідження факторів ризику у складі крові та здійснення прогнозування ризику розвитку онкогематологічних захворювань у осіб, що зазнали радіаційного опромінювання, який **відрізняється** тим, що як фактори ризику застосовуються імуногенетичні маркери HLA системи і, при наявності алелів та їх сполучень або комбінацій: HLA-A*24; HLA-A*02; HLA-A*11; HLA-B*35; HLA-B*51; HLA-C*07; HLA-DRB1*11 та гаплотипу HLA-DQA1*0101, DQB1*0501, у сукупності з маркерами підвищеної чутливості організму до радіації HLA-A*26; HLA-B*38; HLA-B*35; HLA-DRB1*04 - прогнозують підвищений ризик розладів в певних ланках гемопоезу, що сприяє реалізації кістковомозкового синдрому та онкогематологічної патології при опроміненні.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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