



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **77425** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 10117	(72) Винахідник(и): Мазур Анастасія Геннадіївна (UA), Миронова Олена Валеріївна (UA), Горяїнова Надія Валеріївна (UA), Ткаченко Михайло Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 23.08.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.02.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.02.2013, Бюл.№ 3	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ β_2 -МІКРОГЛОБУЛІНУ ЯК ПРОГНОСТИЧНОГО ФАКТОРА ПРИ ХРОНІЧНОМУ ЛІМФОЛЕЙКОЗІ

(57) Реферат:

Спосіб визначення β_2 -мікроглобуліну як прогностичного фактора при хронічному лімфолейкозі передбачає дослідження крові. Визначають рівень β_2 -МГ в сироватці крові до початку лікування та після завершення хіміотерапії, і при відсутності нормалізації вмісту β_2 -МГ у сироватці крові після завершення лікування прогнозують подальше прогресування захворювання в найближчі терміни, а зниження вмісту β_2 -МГ до нормальних значень (0,48 до 3,5 мг/л), як правило, відповідає наявності досягнутої ремісії.

UA 77425 U

UA 77425 U

Корисна модель що заявляється, належить до медицини, а саме: онкогематології, і може використовуватись як прогностичний фактор при хронічному лімфолейкозі.

В останні роки в усьому світі спостерігається ріст захворювань системи крові, в тому числі і В-клітинного хронічного лімфолейкозу (В-ХЛЛ). В-ХЛЛ - гетерогенна група пухлинних захворювань, що розвиваються в кістковому мозку з лімфоїдних клітин, які зберігають властивості диференціювання до зрілих форм. Зниження чутливості клітин до запуску програми фізіологічної загибелі (апоптозу) призводить до злоякісного збільшення як їх маси, так і тривалості життя. Аналіз літератури свідчить, що немає єдиної думки про лікувальну тактику та характер перебігу В-ХЛЛ у кожному окремому випадку. Не розроблені до кінця критерії прогнозу та оцінки ефективності лікування, що дозволило би вибрати оптимальну тактику хіміотерапії (ХТ) для окремого хворого, передбачити відповідь на неї та визначити терміни її припинення або відновлення [1, 2, 4, 8].

За даними літератури, з метою контролювання та прогнозування перебігу різних лімфопроліферативних захворювань, в тому числі і В-ХЛЛ, все частіше використовується онкомаркер β_2 -мікроглобулін (β_2 -МГ) [10]. Метою нашого дослідження було визначення рівня β_2 -МГ у сироватці крові хворих на В-ХЛЛ для оцінки активності лейкоемічного процесу, прогнозування перебігу та моніторингу ефективності лікування.

β_2 -МГ - низькомолекулярний білок з відносною молекулярною масою 11800 дальтон, який знаходиться на поверхні антигенів ядер клітин як легкий ланцюг антигену головного комплексу гістосумісності (HLA). До 98 % (β_2 -МГ в рідинах організму знаходиться у вільній, не пов'язаній з HLA, формі і тільки 2 % його зв'язано з молекулою HLA [9, 11]. Розміри молекули цього білка невеликі (радіус Стокса 16 Å) і при електрофорезі він мігрує в область β_2 -2 глобулінів (відки і назва (β_2 -мікроглобулін) [1].

Головним чином цей поліпептид виявляється в моно- та поліядерних лейкоцитах і лімфоцитах, його рівень в крові відображає клітинний оборот та проліферацію лімфоцитів, в яких він представлений в великій кількості [3, 7]. Біосинтез β_2 -МГ здійснюється практично всіма клітинами організму, однак найбільш високу здатність мають лімфоцити (до 50 %) та пухлинні клітини (6, 10, 13). У здорової людини швидкість синтезу β_2 -МГ складає в середньому 0,13 мг/год./кг (0,11-0,18 мг/год./кг), а це 100-150 мг на добу або 0,8-3,0 мг/л. Біологічна роль β_2 -МГ полягає в регуляції імунологічних реакцій організму [2, 3].

Найбільш близьким до способу, що заявляється, вибраний як прототип (5), є спосіб оцінки ефективності лікування хронічних лімфолейкозів, що передбачає дослідження крові, аналіз клінічних та гематологічних показників.

Недоліком цього способу є те, що він не дозволяє отримати достовірні дані про ефективність лікування, потребує ряд додаткових досліджень.

В основу корисної моделі поставлено задачу дослідити рівень β_2 -МГ у сироватці крові, який є незалежним маркером злоякісності перебігу та швидкості прогресування хронічного лімфолейкозу і дозволяє встановити групи ризику.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, який передбачає дослідження крові, згідно з корисною моделлю, в сироватці крові визначають рівень β_2 -МГ до початку лікування та після завершення хіміотерапії, і при відсутності нормалізації вмісту β_2 -МГ у сироватці крові після завершення лікування прогнозують подальше прогресування захворювання в найближчі терміни, а зниження вмісту β_2 -МГ до нормальних значень (0,48 до 3,5 мг/л), як правило, відповідає наявності досягнутої ремісії.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Обстежено 87 пацієнтів з В-клітинним хронічним лімфолейкозом у віці від 30 до 78 років (54 чоловіка та 33 жінки). Проведено аналіз клінічних та гематологічних показників, визначено рівень β_2 -МГ у сироватці крові методом РІА до початку лікування та після завершення хіміотерапії. Всі хворі перебували на лікуванні в гематологічному відділенні № 1 КМКЛ № 9, яке є клінічною базою відділення захворювань системи крові ДУ "Інститут гематології та трансфузіології НАМН України". Розподіл хворих за віком і статтю представлено у таблиці № 1

Таблиця 1

Розподіл хворих на В-ХЛЛ за віком і статтю

Кількість хворих	Вік хворих									
	30-39 років		40-49 років		50-59 років		60-69 років		70 і більше років	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Жінки n=33	1	1,5	7	8,0	8	9,2	15	17,3	2	2,3
Чоловіки n=54	5	5,7	11	12,6	24	27,6	10	11,5	4	4,6
Всього n=87	6	6,9	18	20,7	32	36,8	25	28,7	6	6,9

β_2 -МГ визначався методом радіоімунологічного аналізу (PIA) в радіологічному відділенні КМКЛ № 14, яке розташоване на базі кафедри радіології та радіаційної медицини НМУ імені О.О. Богомольця. Радіоімунологічне дослідження β_2 -МГ належить до конкурентних видів аналізу. Зразки, що досліджувалися, контрольні та калібрувальні проби проходили інкубацію з меткою ^{125}I - β_2 -МГ в пробірках, вкритих моноклональними антитілами. Потім видалявся вміст пробірок та вимірювалась пов'язана активність ^{125}I . Концентрацію β_2 -МГ, зворотно пропорційну зв'язаній активності, визначали методом інтерполяції по калібрувальній кривій [1, 4].

Набір для визначення β_2 -МГ в сироватці крові у хворих на В-ХЛЛ методом PIA дозволяє виявити концентрацію цього білка в діапазоні від 0,48 до 52,0 мг/л. В радіологічному відділенні КМКЛ № 14 було виявлене співпадіння норми, яка дається в інструкції до набору (0,48 до 3,5 мг/л) до показників β_2 -МГ у здорових 16 добровольців, у яких показники були від 1,4 до 2,5 мг/л.

Пацієнти з В-ХЛЛ, що увійшли у дослідження, були розподілені на групи в залежності від термінів захворювання з моменту встановлення діагнозу (табл. 2). Встановлено, що найбільша кількість хворих на В-ХЛЛ мала тривалість захворювання 3-5 років.

Таблиця 2

Розподіл хворих на В-ХЛЛ в залежності від термінів захворювання на момент дослідження

Давнина захворювання	Кількість хворих			
	чоловіків		жінок	
	Абс.	%	Абс.	%
До 1 року	2	2,3	3	3,4
1-3 роки	11	12,7	8	9,2
3-5 років	27	31,0	16	18,4
5-7 років	9	10,4	6	6,9
7 та більше	5	5,7	-	-
Всього: n=87	54	62,1	33	37,9

Клінічні прояви В-ХЛЛ стадіювали (А-С) за класифікацією Binet (1981). До стадії А відносили пацієнтів з рівнем гемоглобіну ≥ 100 г/л, тромбоцитів $\geq 100 \times 10^9$ /л; з зонами ураження (шийні, аксиллярні, пахові лімфатичні вузли, селезінка, печінка) < 3 . До стадії В відносились хворі з рівнем гемоглобіну ≥ 100 г/л, тромбоцитів $\geq 100 \times 10^9$ /л; з зонами ураження ≥ 3 . До стадії С належали пацієнти з рівнем гемоглобіну < 100 г/л та/або тромбоцитів $< 100 \times 10^9$ /л. Стадію А на момент обстеження мали 16 хворих на В-ХЛЛ, стадію В - 52, стадію С - 19 пацієнтів. Рівень β_2 -МГ у хворих на В-ХЛЛ визначався за стадіями захворювання. Результати дослідження представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Концентрація β_2 -МГ в сироватці крові у хворих на ХЛЛ в залежності від стадії захворювання

Стадія ХЛЛ за Binet (A-C) (1981)	Кількість досліджень (n)	Концентрація β_2 -МГ в мг/л ($M \pm m$)	Підвищення β_2 -МГ в порівнянні з контролем (в %)	P (в порівнянні із здоровими)
Контрольна група	16	1,6 \pm 0,8	-	-
A	16	4,8 \pm 1,4	50,0	<0,05
B	52	14,7 \pm 4,5	89,0	<0,01
C	19	19,6 \pm 4,6	92,5	<0,01
Всього: n=87				

Примітка. P<0,05 в порівнянні з контрольною групою, критерій достовірності процентів Стьюдента

Отримані дані свідчать про пряму залежність рівня (β_2 -МГ у сироватці крові від стадії захворювання. Найбільш низькі показники, які наближались до рівня β_2 -МГ у здорових людей і дуже рідко перевищували межу 10,0 мг/л, спостерігались у хворих в стадії А. В стадії В підвищення рівня β_2 -МГ знаходилось в діапазоні від 10,0 до 19,7 мг/л. У пацієнтів групи С концентрація цього поліпептиду у сироватці крові виявлялась тим вище, чим важчим був перебіг хвороби, але в усіх випадках його середні значення перевищували рівні у пацієнтів групи А та В. Так концентрація β_2 -МГ коливалась від 10,7 до 22,2 мг/л, а у хворих зі значною пухлинною масою (гепатоспленомегалія, конгломерати периферичних та абдомінальних лімфовузлів) рівень був набагато більше - від 21,2 до 29,2 мг/л. Особливо значне підвищення рівня β_2 -МГ (більше 32,6 мг/л) констатовано у хворих з порушеннями функції нирок внаслідок різних причин, що відображає не тільки ступінь розповсюдженості процесу та його активність, але й втягнення в пухлинний процес дистальних відділів сечовидільної системи.

Отримані дані значних коливань рівня β_2 -МГ у сироватці крові хворих на В-ХЛЛ в різних стадіях захворювання стали поштовхом до спроби встановити взаємозв'язки між вмістом цього пухлинного маркера та гематологічними показниками до початку лікування. Результати дослідження представлено в таблиці 4.

Таблиця 4

Гематологічні показники і концентрація β_2 -МГ у сироватці крові хворих на В-ХЛЛ в залежності від стадії захворювання до лікування

Стадія ХЛЛ за Binet (A-C) (1981)	Показники						
	β_2 -МГ мг/л	Hb г/л	Еритроцити $10^{12}/л$	Лейкоцити $10^9/л$	Тромбоцити $10^9/л$	Лімфоцити %	Гранулоцити %
A n=16	4,8 \pm 1,4	120 \pm 8,4	4,2 \pm 1,2	31,2 \pm 1,1	240 \pm 5,8	68 \pm 1,0	30,0 \pm 0,8
B n=52	14,7 \pm 4,5	112 \pm 7,8	3,6 \pm 1,1	150,0 \pm 3,4	180 \pm 5,6	98 \pm 2,8	31,0 \pm 1,1
C n=19	19,6 \pm 4,6	96 \pm 6,8	3,4 \pm 1,1	133,4 \pm 1,8	90 \pm 5,4	82 \pm 1,0	32,1 \pm 1
Контрольна група n=16	1,6 \pm 0,8	126 \pm 5,6	4,8 \pm 1,1	6,4 \pm 0,7	280 \pm 6,7	23 \pm 3,8	72,0 \pm 2,5

Представлені в таблиці 4 дані свідчать про слабку залежність показників периферичної крові від стадії В-ХЛЛ. На відміну від клініко-лабораторних даних, збільшення концентрації β_2 -МГ відбувається прямо пропорційно активності лейкомічного процесу.

Таким чином, проведення діагностичного тесту (визначення концентрації β_2 -МГ в сироватці крові) у хворих на В-ХЛЛ може бути підґрунтям для виділення груп ризику швидкого прогресування та високої активності лейкомічного процесу. Визначення рівня β_2 -МГ на момент встановлення діагнозу В-ХЛЛ та в динаміці спостереження допомагає обрати вірну стратегію лікування та вчасно скорегувати терапію. Так, при вмісті β_2 -МГ у сироватці крові хворих на В-ХЛЛ до 10,0 мг/л - встановлюється група низького ступеня ризику; при вмісті до 19,0 мг/л - середнього та при вмісті більше 22 мг/л - високого ступеня ризику.

Відомо, що оцінка ефективності лікування В-ХЛЛ й до теперішнього часу проводиться багатьма клініцистами за клініко-гематологічними параметрами, до яких відносяться зменшення

лімфовузлів, розмірів селезінки та печінки, покращення показників крові та загального самопочуття, усунення аутоімунних проявів. Ми намагалися виявити взаємозв'язок між відповіддю на лікування та концентрацією β_2 -МГ у сироватці крові. Лікування всім хворим, які увійшли в дослідження, проводилось за схемами FC (флударабін + циклофосфамід) або FC-R (флударабін + циклофосфамід + ритуксимаб).

Всі пацієнти, в залежності від отриманих результатів лікування, були розподілені на наступні групи:

I - хворі, у яких досягнута повна або часткова клініко-гематологічна ремісія після завершення лікування (нормалізація або зменшення в розмірах більше ніж в 2 рази розмірів периферичних лімфовузлів, печінки та селезінки, нормалізація або зниження кількості лейкоцитів від 30 до 50 %, збільшення гранулоцитів більше ніж в 2 рази, нормалізація показників червоної крові, тромбоцитів та зниження концентрації β_2 -МГ в 3 рази).

II - хворі, у яких досягнуто покращення після завершення ХТ (зменшення менше ніж в 2 рази лімфовузлів, печінки та селезінки, зниження кількості лейкоцитів на 20-30 %, ріст гранулоцитів менше ніж в 2 рази, нормалізації показників червоної крові, тромбоцитів та зниженні концентрації β_2 -МГ в 2 рази).

III - хворі, що виявилися резистентними до ХТ (не спостерігалось суттєвої позитивної динаміки в розмірах лімфовузлів, печінки, селезінки, в показниках периферичної крові та концентрації β_2 -МГ).

В таблиці 5 приводяться зміни концентрації β_2 -МГ у сироватці крові хворих на В-ХЛЛ в залежності від результатів лікування.

Таблиця 5

Концентрація β_2 -МГ у сироватці крові хворих на В-ХЛЛ в залежності від результатів лікування

Час обстеження	Концентрація (β_2 -МГ в мг/л в групах пацієнтів по результатам лікування, М \pm м								
	Стадія А (n=16)			Стадія В (n=52)			Стадія С (n=19)		
	I n=7	II n=15	III n=1	I n=12	II n=16	III n=4	I n=9	II n=18	III n=5
До лікування	4,8 \pm 1,4			14,7 \pm 4,5*			19,6 \pm 4,6**		
Після лікування	2,9 \pm 1,8	3,3 \pm 2,4	4,1 \pm 3,1	6,2 \pm 2,8	7,1 \pm 2,4	12,8 \pm 3,1	7,2 \pm 2,1	11,6 \pm 4,0	16,5 \pm 2,8
Через 2 місяці після лікування	3,1 \pm 2,6	3,8 \pm 2,8	4,7 \pm 2,1	6,5 \pm 2,4	7,8 \pm 1,8	13,7 \pm 2,5	7,9 \pm 3,0	12,9 \pm 2,4	17,9 \pm 4,8
Контрольна група n=16	1,6 \pm 0,8								

Примітки: 1. *p < 0,01 порівняно з А групою.

2. **p < 0,05 порівняно з А групою.

Як видно з наведених в таблиці даних, у випадках ефективного лікування хворих I групи зі стадією В-ХЛЛ А (Binet) рівень β_2 -МГ у сироватці крові знижувався майже у 2 рази (p<0,05), а зі стадіями В та С (Binet) - в 3 рази (p<0,01). При задовільних результатах лікування у 49 хворих II групи стадії В рівень β_2 -МГ у сироватці крові статистично достовірно знижувався також майже в 2 рази, а стадії С - в 1,5 рази. При відсутності ефекту зниження концентрації β_2 -МГ у пацієнтів III групи стадій В та С було не більше ніж на 17 %.

Результати визначення β_2 -МТ, які були отримані через 2 місяці після завершення лікування, продемонстрували, що у хворих I групи незалежно від стадії показники цього пухлинного маркера були стабільними в порівнянні з даними після лікування. У хворих II групи спостерігалось незначне збільшення рівня β_2 -МГ, а в III групі його концентрація сягала даних рівних до встановлених перед лікуванням.

β_2 -МГ сироватки крові є незалежним маркером злоякісності перебігу та швидкості прогресування В-ХЛЛ, що дозволяє ще на етапі проведення діагностики встановити групи ризику, а також є прогностичним чинником відповіді на хіміотерапію та важливим критерієм ефективності лікування.

Спосіб, що заявляється, був апробований на базі гематологічного відділення № 1 КМКЛ № 9, яке є клінічною базою відділення захворювань системи крові ДУ "Інститут гематології та трансфузіології НАМН України" та на базі радіологічного відділення КМКЛ № 14 і на базі

кафедри радіології та радіаційної медицини Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Джерела інформації:

1. Аметов А.С., Горицина Л.К., Гурьева И.В. Бета-2 микроглобулин в клинической практике // Мед. радиология.-1985. - № 3. - С. 83-87.
2. Васюкова Е.А., Гурьев Г.С., Герасимова Н.П. и др. Изменения уровня бета-2 микроглобулина в сыворотке крови больных с лимфопрлиферативными процессами // Мед. радиология.-1993. - № 7. - С. 59-63.
3. Воробьев В.Г., Сиднев В.И. Клиническое значение радиоиммунологического определения уровня бета-2 микроглобулина у больных острым лейкозом // Тер. Арх. - 1990. - № 7. - С. 20-23.
4. Камышников В.С. Клинические лабораторные тесты от А до Я и их диагностические профили. Спр. пособие. - Москва. "МЕДпресс-информ", 2007. - 3-е издание - 320 с.
5. Чеботарева Э.Д., Шишкина В.В., Славнов В.Н. Радиоиммунологический анализ в онкологии. - К.: Здоров'я, 1984. - с. 144.
6. Aviles A, Zepeda G, Diaz-Maqueo JC. et al. Beta 2 microglobulin level as an indicator of prognosis in diffuse large cell lymphoma // Leuk. Lymphoma. - 2008. - № 1-2. - P. 135-138.
7. Bauer SM, Williams MA, Howell AP. et al. Maximizing immune responses: the effects of covalent peptide linkage to beta-2-microglobulin // Oncol. Res.-2008. - № 5.-P. 205-216.
8. Canovas A, Alonso JJ, Barreiro G, Aguirre C. Prognostic factors in follicular lymphoma: the importance of beta-2 microglobulin // Tumori.-2010. - № 1. - P. 117-121.
9. Dammeyer P, Mwakigonja AR, Rethi B. et al. Vaccination with beta(2)-microglobulin-deficient dendritic cells protects against growth of beta(2)-microglobulin-deficient tumours // Scand. J. Tmmunol.-2009. - № 1. - P. 44-52.
10. Delgado J, Pratt G, Phillips N. et al. Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate // Br. J. Haematol.-2009. - № 6. - P. 801-805.
11. Gentile M, Cutrona G, Neri A. et al. Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages // Haematologica.-2009. - № 6. - P. 887-888.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення β_2 -мікроглобуліну як прогностичного фактора при хронічному лімфолейкозі, що передбачає дослідження крові, який **відрізняється** тим, що визначають рівень β_2 -МГ в сироватці крові до початку лікування та після завершення хіміотерапії, і при відсутності нормалізації вмісту β_2 -МГ у сироватці крові після завершення лікування прогнозують подальше прогресування захворювання в найближчі терміни, а зниження вмісту β_2 -МГ до нормальних значень (0,48 до 3,5 мг/л), як правило, відповідає наявності досягнутої ремісії.

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