



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 83862

(13) U

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2013 09889	(72) Винахідник(и):	Дяченко Марія Володимирівна (UA), Білько Денис Іванович (UA), Дягіль Ірина Сергіївна (UA), Перехрестенко Тетяна Петрівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	09.08.2013	(73) Власник(и):	НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ "КИЄВО- МОГИЛЯНСЬКА АКАДЕМІЯ", вул. Григорія Сковороди, 2, м. Київ, 04070 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.09.2013	(74) Представник:	Ломаковська Тетяна Романівна, реєстр. №272
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.09.2013, Бюл.№ 18		

## (54) СПОСІБ ОЦІНКИ ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ ПРИ ХРОНІЧНІЙ МІЄЛОЇДНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ

### (57) Реферат:

Спосіб оцінки перебігу захворювання при хронічній мієлоїдній лейкемії включає отримання суспензії клітин кісткового мозку пацієнта, її культивування in vitro у живильному середовищі RPMI-1640 та аналіз морфо-функціональних особливостей культивованих клітин. Додатково здійснюють аналіз проліферативного потенціалу клітин-попередників отриманої суспензії клітин кісткового мозку пацієнта, для чого з неї виділяють фракцію моноклеарних клітин. Підраховують загальну кількість отриманих клітин та відсоток життєздатних клітин у суспензії із використанням барвника для селективного забарвлення мертвих клітин. Доводять клітинність суспензії до необхідної концентрації, яку визначають емпірично, і здійснюють її культивування у напіврідкому агарі з додаванням колонієстимулюючого фактора гранулоцитарно-макрофагального впродовж не менше чотирнадцяти діб. Після цього, за допомогою інвертованого мікроскопа, підраховують кількість утворених в результаті культивування клітинних агрегатів. Під час подальшої статистичної обробки отриманих результатів визначають рівень проліферативного потенціалу як співвідношення між гранулоцитарними колоніями і кластерами та надають висновок про настання ремісії захворювання.

UA 83862 U



Корисна модель належить до галузі клітинної біології, біотехнології та медицини, і може бути використана у лабораторіях клінічної діагностики та у гематологічних відділеннях для прогнозування ймовірності прогресії захворювання пацієнтів із хронічною мієлоїдною лейкемією. Зокрема, стосується методів аналізу стану кісткового мозку пацієнта для оцінки ефективності лікування та встановлення індивідуальної чутливості кожного пацієнта до вибраної терапії.

На сьогодні аналіз клітинного складу кісткового мозку та периферійної крові залишається базовим методом, що використовується як для первинного встановлення діагнозу, так і для визначення ефективності лікування при гематологічних порушеннях різного ґенезу. Так, у публікації *Diagnosis and management of chronic myeloid leukemia: a survey of American and European practice patterns* / H. M. Kantarjian, J. Cortes, F. Guilhot, et al. // *Cancer*.-2007. - Vol. 109. - № 7. - P. 1365-1375, аналіз морфо-функціональних особливостей клітин кісткового мозку пацієнтів із хронічною мієлоїдною лейкемією (надалі - ХМЛ) названо надійним та відтворюваним методом, що може використовуватись для оцінки стану кісткового мозку пацієнта під час лікування.

Проте, у публікації *Chronic myeloid leukemia: current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment* / A. Tefferi, G. W. Dewald, M. L. Litzow [et al.] // *Mayo Clin Proc.*-2005. - Vol. 80. - № 3. - P. 390-402 показано, що метод диференційного підрахунку клітин кісткового мозку є якісним методом, що дозволяє лише встановлювати стан кісткового мозку на момент дослідження, а не робити прогноз щодо ризику прогресії захворювання. Відтак, для більш достовірної оцінки відповіді пацієнтів на вибрану терапію, автори встановлювали деякі додаткові параметри, серед яких виявлення хромосомних аномалій клітин кісткового мозку.

Хронічна мієлоїдна лейкемія - це клональне захворювання системи кровотворення, що характеризується наявністю хромосомної трансформації між 9 та 22 хромосомами із утворенням Філадельфійської хромосоми (Ph-хромосоми). Згідно із відомим способом визначення стану кісткового мозку при ХМЛ, описаним у Assouline S., Lipton J.H. *Monitoring response and resistance to treatment in chronic myeloid leukemia* // *Current Onco logy*.-2011. - Vol. 18. - No. 2. - P. 152-159, саме за відсотком клітин, які містять химерну хромосому на сьогодні визначається ефективність лікування пацієнтів при ХМЛ. Так, успішним вважають лікування, за якого після перших 6 місяців настає цитогенетична ремісія (відсутність у кістковому мозку клітин із Філадельфійською хромосомою).

Відповідно до відомого способу, вибраного заявниками як прототип, моноклеарні клітини вилучались із кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ та культивувались *in vitro* із додаванням живильного середовища RB-Max та препарату, що блокує клітинний цикл з метою блокування мітозу на стадії метафази. Надалі клітини інкубували із гіпотонічним розчином 0,55 М KCl з метою відособлення хромосом, після чого клітини обробляли фіксуючою сумішшю, до складу якої входили метиловий спирт та крижана оцтова кислота у співвідношенні 3:1. Етап фіксування повторювали принаймні тричі, після чого виготовляли препарати за допомогою нанесення на предметне скло осаду з зафіксованими клітинами.

Авторами відомого способу встановлено, що після 6 місяців лікування у 15,5 % пацієнтів Філадельфійська хромосома виявляється у більш ніж 95 % клітин кісткового мозку, ще у 12,7 % пацієнтів - у 36-95 % клітин, а у 71,7 % випадків Ph-позитивні клітини виявлено не було.

Отримані таким чином показники дозволяють робити висновки про індивідуальну чутливість пацієнтів із ХМЛ до вибраної терапії, проте не дають змоги прогнозувати зміни стану кісткового мозку пацієнтів у віддалені періоди часу.

В основу корисної моделі поставлено задачу підвищення ефективності цитогенетичного дослідження стану кісткового мозку при хронічній мієлоїдній лейкемії за рахунок забезпечення можливості додаткового прогнозування прогресії захворювання.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі оцінки перебігу захворювання при хронічній мієлоїдній лейкемії, що включає отримання суспензії клітин кісткового мозку пацієнта, її культивування *in vitro* у живильному середовищі RPMI-1640 та аналіз морфо-функціональних особливостей культивованих клітин, згідно з корисною моделлю, що заявляється, додатково здійснюють аналіз проліферативного потенціалу клітин-попередників отриманої суспензії клітин кісткового мозку пацієнта. Для чого з неї виділяють фракцію моноклеарних клітин; підраховують загальну кількість отриманих клітин та відсоток життєздатних клітин у суспензії із використанням барвника для селективного забарвлення мертвих клітин; доводять клітинність суспензії до необхідної концентрації, яку визначають емпірично, і здійснюють її культивування у напіврідкому агарі з додаванням колонієстимулюючого фактора гранулоцитарно-макрофагального впродовж не менше 14-ти діб.

Після чого, за допомогою інвертованого мікроскопа, підраховують кількість утворених в результаті культивування клітинних агрегатів, які визначають як колонії (скупчення більше сорока клітин) і кластери (скупчення 10...40 клітин).

Під час подальшої статистичної обробки отриманих результатів визначають рівень проліферативного потенціалу (надалі - ПП) як співвідношення між гранулоцитарними колоніями і кластерами та надають висновок про настання ремісії захворювання, якщо рівень проліферативного потенціалу менший від 1, і про факт прогресії захворювання у разі, якщо рівень проліферативного потенціалу більший від 1.

При цьому:

- виділення фракції мононуклеарних клітин проводять шляхом нашаровування клітин кісткового мозку пацієнта на градієнт фіколу, центрифугування протягом 30 хвилин при 300 g, та подальшого подвійного відмивання мононуклеарних клітин у фосфатно-буферному фізіологічному розчині;

- як барвник, який використовується для селективного забарвлення мертвих клітин, використовують трипановий синій або метиленовий синій, або еритрозин В, або нігрозин, або пропідіум йодид.

З метою встановлення індивідуальної чутливості кожного пацієнта до вибраної терапії, додатково встановлюють кореляційну залежність між значенням рівня проліферативного потенціалу клітин кісткового мозку пацієнта та динамікою вмісту відсотка клітин кісткового мозку цього ж пацієнта, які містять Ph-хромосому, яку оцінюють на момент обстеження і повторно, через 1-1,5 місяця.

Жоден із сучасних підходів до моніторингу індивідуальної відповіді на терапію для пацієнтів із гематологічними захворюваннями не може використовуватись як самостійний прогностичний метод. Для прогресії ХМЛ характерним є заміщення нормальних клітин крові на клітини, що містять мутацію та характеризуються змінами у здатності до поділу та диференціювання. Механізм накопичення такого заміщення нормальних клітин трансформованими мієлоїдними клітинами при ХМЛ залишається остаточно не встановленим.

Відомо, що збільшення чисельності клітин мієлоїдного ряду, найбільш імовірно, відбувається за рахунок зміни здатності до проліферації саме гемопоетичних клітин-попередників. Такі зміни проявляються при культивуванні клітин-попередників кісткового мозку пацієнтів їх ХМЛ у напіврідкому агарі. Відтак, саме аналіз проліферативного потенціалу клітин-попередників може слугувати достовірним методом оцінки імовірності прогресії захворювання.

Для підтвердження ефективності запропонованої методики, отримані дані порівнювали із результатами цитогенетичного дослідження. При цьому, за можливості цитогенетичне дослідження кісткового мозку проводили не лише у час початку культивування клітин-попередників у напіврідкому агарі, а й повторно у віддалені періоди часу задля встановлення можливості застосування способу, що заявляється, із прогностичною метою.

Додатково з'ясовано, що запропонований спосіб оцінки проліферативного потенціалу клітин кісткового мозку може бути застосованим для визначення прогнозу розвитку захворювання. Так, було встановлено, що у разі, якщо у пацієнтів показник проліферативної активності гемопоетичних клітин-попередників був нижчим від 1, а у кістковому мозку на момент проведення культурального дослідження виявлялись Ph-позитивні клітини, у 80 % випадків під час повторного цитогенетичного дослідження Ph-позитивні клітини у кістковому мозку цих пацієнтів не виявлялись.

Таким чином, зазначені суттєві ознаки заявленого способу є необхідними і достатніми для досягнення поставленої мети корисної моделі.

Матеріалом дослідження був кістковий мозок осіб із ХМЛ віком від 20 до 46 років, які отримували лікування інгібіторами тирозинкіназ від 5 до 36 місяців. Загалом було досліджено 32 зразки кісткового мозку. Пацієнти були обстежені на базі Національного наукового центру радіаційної медицини НАМІ України на етапі встановлення діагнозу та на різних етапах під час лікування за загальноприйнятими цитогенетичними методами із визначенням відсотку Ph-позитивних клітин кісткового мозку.

Забір матеріалу відбувався за інформованої згоди пацієнтів шляхом стерильної пункції груднини за допомогою голки Касирського та стерильного шприца після локальної анестезії зони проколу. Усі маніпуляції проводили із дотриманням умов стерильності.

Далі кістковий мозок у об'ємі 1 мл відбирався у 15 мл пластикову стерильну круглодонну пробірку (Delta, Данія), що містила 100 мкл середовища RPMI-1640 (Sigma, США) із додаванням 2500 ОД/мл гепарину (Львівтехнофарм, Україна). З метою збереження життєздатності клітин, усі отримані зразки в короткий термін транспортувались із дотриманням відповідного температурного режиму.

Дослідження кісткового мозку проводили у лабораторії Центру молекулярних та клітинних досліджень Національного університету "Києво-Могилянська академія". Усі подальші маніпуляції із клітинами кісткового мозку виконувались із дотриманням умов асептики у стерильній ламінарній шафі 1 класу біобезпеки (Airflow, США).

5       Задля зменшення густини кісткового мозку проводили його розведення фосфатним буфером (PBS) (Invitrogen, Німеччина) у співвідношенні 3:1.

3 метою отримання фракції клітин, багатой на мононуклеари, отриману раніше суспензію розділяли центрифугуванням протягом 30 хвилин при 1500 об/хв у градієнті щільності Hystopaque. Для цього використовувався Hystopaque (Sigma, США) щільністю 1,077 г/мл. Після сепарації мононуклеари відбирались у 15 мл пластикову стерильну конічну пробірку (Becton Dickenson Biosciences, США), що містила 5 мл фосфатного буферу та повторно осаджували центрифугуванням протягом 10 хвилин при 1000 об/хв. Таке відмивання клітин кісткового мозку повторювали двічі.

Життєздатність клітин кісткового мозку визначали за включенням трипанового синього. 15       Оптимальна кількість клітин, що додавалась до культуральної суспензії визначалась емпірично. Для цього суспензія мононуклеарів додавалась у трьох концентраціях: 1, 2 та  $5 \times 10^5$  клітин на 1 мл (або 50.000, 100.000 та 250.000 клітин на одну лунку 24-лункового планету відповідно). Під час застосування першої концентрації у значній частки зразків відбувалось пригнічення утворення клітинних агрегатів. В той же час, при додаванні клітин у третій концентрації облік результатів значно ускладнювався через надмірну кількість отриманих клітинних агрегатів.

20       Мононуклеари культивували при температурі 37 °C, за умов абсолютної вологості та 5 % CO<sub>2</sub>. Для цього у лунку 24-лункового планшету вносили по 500 мкл культуральної суспензії, що складалась із середовища RPMI-1640 (Invitrogen, Німеччина), 20 % фетальної сироватки бика (Invitrogen, Німеччина), бакто-агару (Difco, США), гранулоцитарно-макрофагального ростового фактору (Sigma, США), антибіотиків (пеніциліну та стрептоміцину; Sigma, США), а також 100.000 мононуклеарних клітин.

Обрахунок результатів культивування проводили через 14 днів із використанням інвертованого мікроскопа Olympus-CD2.

30       За колонію (колонієутворююча одиниця гранулоцитарно-макрофагальна, КУО-ГМ) приймали скупчення більше 40 клітин. Клітинні агрегати у 20-40 клітин вважали кластером (кластероутворююча одиниця, КлУО).

Особливості проліферативної активності клітин-попередників кісткового мозку визначали за співвідношенням між гранулоцитарними колоніями та кластерами, отриманими в результаті культивування суспензії мононуклеарів у напіврідкому агарі у культурах *in vitro*.

35       Після відповідного статистичного опрацювання отриманих результатів за показником проліферативної активності усі зразки було поділено на дві групи. До першої групи входили пацієнти, рівень ПП яких складав не вище 1. Відповідно, другу групу формували пацієнти, ПП клітин кісткового мозку котрих був вищим від 1.

Всі дані про пацієнтів були кодовані з метою:

40       а) конфіденційності;

б) більшої достовірності отриманих результатів, для чого, забір зразка кодувався і подальший його аналіз проводився іншими дослідниками, задля уникнення суб'єктивної оцінки.

Встановлено, що для першої групи середнє значення відсотку Ph-позитивних клітин у кістковому мозку було достовірно нижчим від середнього показника рівня Ph-позитивних клітин у другій групі пацієнтів (5,5 та 66,07 % для першої та другої групи відповідно).

45       Проте, у випадку пацієнтів під кодами 0.5, 0.7 та 1.2 спостерігалась невідповідність між показником ПП, який складав від 0,4 до 1,07 та високим показником Ph-позитивних клітин кісткового мозку (від 20 до 37 відсотків). Однак під час проведення повторного цитогенетичного дослідження Ph-позитивних клітин виявлено не було.

50       У випадку пацієнтів під кодами 1.14, 1.42 та 1.43 показано, що підвищення показника ПП асоціюється із прогресією захворювання або розвитком резистентності до вибраного типу терапії (відсоткові показники Ph-позитивних клітин зростали з часом, що було підтверджено даними повторного цитогенетичного дослідження).

55       Дані щодо проліферативного потенціалу клітин-попередників кісткового мозку наведено у таблиці:

Таблиця

Кількість пацієнтів		Проліферативний потенціал (ПП)	Відсоток Ph-позитивних клітин		Клінічна маніфестація
			На момент культивування	У віддалені терміни	
15	4	<1	20±3,5*	0*	Ремісія
	1		37*	0*	Ремісія
	10		0±4,2	0	Ремісія
17	11	>1	100±5,7	100±2,1	Прогресія
	4		45±2,3*	75±4,2*	Прогресія
	2		75±2,75*	100±3,4*	Прогресія

\* Різницю визначали за коефіцієнтом Стюдента і вважали достовірною на рівні значущості 5 % ( $p < 0,05$ )

Таким чином, як показано у таблиці, коли кількість колонієутворюючих одиниць більша від кількості кластероутворюючих одиниць (ПП > 1), прогноз розвитку захворювання негативний, що підтверджується не тільки наявністю Філадельфійської хромосоми в клітинах, але і збільшенням їх кількості у віддалений період.

У випадку, коли показник ПП менший від 1, можна говорити про позитивний прогноз. Через 1-3 місяці після проведення дослідження наставала ремісія захворювання. І навіть, коли у момент проведення культурального дослідження Ph-позитивні клітини у кістковому мозку визначаються, вони зникають у подальшому, що підтверджувалось експериментальними даними.

При цьому ефективність використання пропонованого способу з метою встановлення індивідуальної відповіді пацієнта на терапію загалом складає 91,0 % (у 29 пацієнтів із 32-х зростання рівня ПП відповідало прогресія захворювання, що визначалось за підвищенням відсотка Ph-позитивних клітин у кістковому мозку).

Таким чином, зміни проліферативної активності клітин-попередників при ХМЛ віддзеркалюють процеси лейкемічної трансформації, а описаний метод може слугувати методом моніторингу індивідуальної чутливості відповіді на терапію, оцінки ефективності лікування та прогностичним критерієм щодо розвитку резистентності.

Результати проведених досліджень згідно з заявленим способом показали, що:

- показник проліферативного потенціалу гемопоетичних клітин-попередників співставний із відсотком Ph-позитивних клітин кісткового мозку;

- виявлено, що підвищення рівня проліферативного потенціалу (вище 1.0) пов'язане із прогресією захворювання;

- ефективність визначення індивідуальної чутливості пацієнтів до терапії склала 91,0 %;

- показано можливість застосування способу, що заявляється, для прогнозування процесу розвитку захворювання (прогресія захворювання чи настання ремісії).

Отримані результати підтвердили перевагу заявленого способу, що забезпечує не лише можливість оцінки індивідуальної чутливості пацієнтів із ХМЛ на лікування, а також і прогнозування прогресії захворювання за допомогою визначення проліферативного потенціалу клітин-попередників кісткового мозку.

Отримані результати також показали, що зміни проліферативної активності клітин кісткового мозку, визначеної як співвідношення між кількістю колоній та кластерів, можуть мати прогностичне значення та використовуватись як додаткове дослідження з метою оцінки рівня прогресії захворювання та імовірності розвитку резистентності.

Потенційно оцінка проліферативного потенціалу гемопоетичних клітин-попередників може слугувати допоміжним способом визначення відповіді пацієнтів на вибрану терапію та прогнозу прогресії захворювання не лише при ХМЛ, але і для інших онкологічних захворювань кровеносної системи, що дозволить не лише постійно відслідковувати функціональний стан кісткового мозку пацієнта, але і забезпечить можливість вчасно корегувати вибраний терапевтичний підхід.

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб оцінки перебігу захворювання при хронічній мієлоїдній лейкемії, що включає  
 5 отримання суспензії клітин кісткового мозку пацієнта, її культивування *in vitro* у живильному  
 середовищі RPMI-1640 та аналіз морфо-функціональних особливостей культивованих клітин,  
 який **відрізняється** тим, що додатково здійснюють аналіз проліферативного потенціалу клітин-  
 попередників отриманої суспензії клітин кісткового мозку пацієнта, для чого з неї виділяють  
 фракцію моноклеарних клітин; підраховують загальну кількість отриманих клітин та відсоток  
 10 життєздатних клітин у суспензії із використанням барвника для селективного забарвлення  
 мертвих клітин; доводять клітинність суспензії до необхідної концентрації, яку визначають  
 емпірично, і здійснюють її культивування у напіврідкому агарі з додаванням  
 колонієстимулюючого фактора гранулоцитарно-макрофагального впродовж не менше  
 15 чотирнадцяти діб; після чого, за допомогою інвертованого мікроскопа, підраховують кількість  
 утворених в результаті культивування клітинних агрегатів, які визначають як колонії (скупчення  
 більше сорока клітин) і кластери (скупчення 10...40 клітин), а під час подальшої статистичної  
 обробки отриманих результатів визначають рівень проліферативного потенціалу як  
 співвідношення між гранулоцитарними колоніями і кластерами та надають висновок про  
 настання ремісії захворювання, якщо рівень проліферативного потенціалу менший від одиниці, і  
 20 про факт прогресії захворювання у разі, якщо рівень проліферативного потенціалу більший від  
 одиниці.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що виділення фракції моноклеарних клітин  
 проводять шляхом нашаровування клітин кісткового мозку пацієнта на градієнт фіколу,  
 центрифугування протягом 30 хвилин при 300 g та подальшого подвійного відмивання  
 25 моноклеарних клітин у фосфатно-буферному фізіологічному розчині.
3. Спосіб за пп. 1, 2, який **відрізняється** тим, що як барвник, який використовується для  
 селективного забарвлення мертвих клітин, використовують трипановий синій або метиленовий  
 синій, або еритрозин В, або нігрозин, або пропідіум йодид.
4. Спосіб за пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що додатково встановлюють кореляційну  
 30 залежність між значенням рівня проліферативного потенціалу клітин кісткового мозку пацієнта  
 та динамікою вмісту відсотка клітин кісткового мозку цього ж пацієнта, які містять Ph-хромосому,  
 яку оцінюють на момент обстеження і повторно, через 1-1,5 місяця, на підставі чого надають  
 висновок про індивідуальну чутливість кожного пацієнта до вибраної терапії.

---

Комп'ютерна верстка С. Чулій

---

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