



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **1281**
(51) **МПК: A61B 5/00;**
G01N 33/48;

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения**

К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

1

(21)2001409
(22) 03.03.2020
(46) Бюл. 185, 2022
(71)(73) Мустафокулова Н.И. (TJ); Мирзокаримова Н.С. (TJ)
(72) Мустафокулова Н.И. (TJ); Мирзокаримова Н.С. (TJ)
(54) **СПОСОБ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ НОВЫХ БИОМАРКЕРОВ И ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ В РАЗВИТИИ И ТЕЧЕНИИ ЛЕЙКЕМИИ**
(57) Изобретение относится к медицине, а точнее к клинической гематологии и паразитологии, и может быть использовано как новые биомаркеры его мутагенное действие в развитии и течении лейкемии, для ранней диагностики поражений костного мозга гель-

2

минтами и своевременное противогельминтное лечение лейкемии на фоне базисной терапии. Способ удобен, прост и дешевый для выявления гельминтной инвазии на ранних стадиях, задолго до того, как происходит процесс мутации в костном мозге, заменяя небезопасные методы исследования. Биомаркеры ранней диагностики имеют большие возможности для обследования лиц, страдающих лейкемией.

Проведенный иммуноферментный анализ у пациентов с лейкемией позволил нам установить, что гельминты как новый биомаркер в развитии лейкемии, встречаются не только в желудочно-кишечном тракте, но также обнаруживаются в сыворотке крови, костном мозге и ликворе.

Изобретение относится к медицине, а точнее к клинической гематологии и паразитологии, и может быть использовано как новые биомаркеры его мутагенное действие в развитии и течении лейкемии, для ранней диагностики поражений костного мозга гельминтами и своевременное противогельминтное лечение лейкемии на фоне базисной терапии. Способ удобен, прост и дешевый для выявления гельминтной инвазии на ранних стадиях, задолго до того, как происходит процесс мутации в костном мозге, заменяя небезопасные методы исследования. Биомаркеры ранней диагностики имеют большие возможности для обследования лиц, страдающих лейкемией.

Проведенный иммуноферментный анализ у пациентов с лейкемией позволил нам установить, что гельминты как новый биомаркер в развитии лейкемии, встречаются не только в желудочно-кишечном тракте, но также обнаруживаются в сыворотке крови, костном мозге и ликворе.

На современном этапе иммуноферментный анализ крови позволяет с высокой точностью определить тип и численность гельминтов в организме и является результативным и верным анализом, где обнаруживают антитела к присутствующим паразитам. Анализ кала на яйца гельминтов не всегда дает достоверный ответ.

С другой стороны, на современном этапе не вызывает сомнения, что наличием лишь общеизвестных факторов риска нельзя объяснить весь спектр лейкогенеза. Последние научные исследования показали главенствующую роль в развитии лейкемии некоторых факторов риска развития (ионизирующее облучение, наследственность, химиопрепараты), однако значимость большинство из них к настоящему времени полностью не доказана.

Цель изобретения установить влияния костномозговых гельминтов на тяжесть течения лейкемии как фактор высокого риска развития заболевания.

Способ осуществляется следующим образом: пациентам помимо общеклинических анализов проводят исследования миелограммы с морфологическим и цитохимическим исследованием костного мозга: маркерные реакции на миелопероксидазу, содержание фосфолипидов - в реакции с Суданом черным. Далее проводят компьютерную томографию высокого разрешения или МРТ затем иммунологические анализы. Для проведения исследования на гельминтов у пациентов с лейкемией одновременно проводили забор сыворотки крови и костного мозга и после тестировали иммуноферментным анализом (ИФА).

Исследование проводилось на кафедре внутренних болезней №3 ГОУ «ТГМУ имени Абуали ибни Сино», в гематологическом отделении, базиру-

ющимся в ГУ НМЦ РТ за период 2019 год. Диагноз острый и хронический лейкоз ставился согласно утверждённой ВОЗ МКБ (X пересмотра).

Объектом исследования явились 73 пациентов с различными формами лейкемии (РФЛ), в возрасте от 23 до 67 лет, среди них мужчин было 47, женщин 26. Из 73 пациентов с РФЛ у 25 (34,2%) пациентов оказалась острая лейкемия (ОЛ) и у 48 (66,0%) хроническая форма лейкемии (ХЛ). Среди острых лейкозов острой лимфоидной лейкозией (ОЛЛ) оказались 15(60,0%) и острой миелоидной (ОМЛ) 10 (40,0%) пациентов, тогда как среди хронических лейкозов множественная миелома (ММ) занимала главенствующую роль - у 23(48,0%), хронической лимфоидной лейкозией (ХЛЛ) – у 15 (31,1%) и хронической миелоидной лейкозией (ХМЛ) составили лишь 10(21,0%) пациентов. В свою очередь пациенты с острой и хронической формой лейкемии были распределены на 2 подгруппы: в IА подгруппу входили пациенты с ОЛ, ассоциированной с глистной инвазией (АГИ) (n=15) и IА группа пациентов лейкозией, без ассоциации с глистной инвазией (БАГИ) (n=10) и в IБ подгруппу входили пациенты с ХЛ, АГИ (n=25) и IБ группу пациенты с ХЛ лейкозией, БАГИ (n=23). Контрольную группу составили 30 относительно здоровых добровольцев.

Как видно на фиг. 1 среди пациентов с хронической лейкозией ММ, АГИ лидировала в более половины случаев (56,5%) по отношению других форм, что диктует дальнейшего глубокого изучения этой проблемы.

Методы исследования. Всем пациентам помимо общеклинических анализов проводили исследования миелограммы с морфологическим и цитохимическим исследованием костного мозга: маркерные реакции на миелопероксидазу (методом Кваглино в модификации Р.П. Нарцисова), содержание фосфолипидов - в реакции с Суданом черным (по Shechan и Storey). Из рентгенологических методов исследования проводили компьютерную томографию высокого разрешения или МРТ; иммунологические анализы.

Для проведения исследования на гельминтов у пациентов с лейкозией одновременно проводили забор сыворотки крови и костного мозга и после тестировали иммуноферментным анализом (ИФА).

Результаты исследования. Всего под наблюдением были 73 пациентов с РФЛ. После проспективного анализа клинко-лабораторных и инструментальных методов обследования нами установлено, что из 73 пациентов с острой и хронической лейкозией микст-инвазия антител к *Toxocara canis* и *Ascaris lumbricoides* обнаружены как в сыворотке крови, так и в костном мозге (36,0% и 28,0%; 39,5 и 20,8%) у одних и тех же пациентов, антитела только к *Ascaris lumbricoides* в сыворотке крови и костном

мозге обнаружены почти в 2,5 раза меньше по отношению с микст-инвазией (16,0% и 12,0%; 18,7% и 10,4%). При острой лейкемии в копрограмме 3,3 раза больше были обнаружены яйца *Ascaris lumbricoides* по отношению особей *Ascaris lumbricoides* (40,0% и 12,0%), тогда как у больных с хронической лейкемией статистически различий между этими показателями не было (12,5% и 10,4%) (таб. 1).

Анализ влияния гельминтов на тяжесть течение лейкемии и, как фактор высокого риска развития, показал статистически значимые различия как в клиническом течении заболевания, так и лабораторных показателей, отличаясь от соответствующих показателей группы сравнения и в контрольной группе.

Как видно из таблицы 2, у пациентов с лейкемией, АГИ, гиперпластический, анемический, геморрагический, интоксикационный и иммунодефицитный синдромы были более выражены по отношению к пациентам с лейкемией без ассоциации с глистной инвазией.

Сравнительный анализ гематологических показателей у пациентов с лейкемией, АГИ, показал, что степень тяжести анемического синдрома, тромбоцитопении, лейкопении и лимфопении была выражена по отношению к пациентам без такового, тогда как лейкоцитоз и лимфоцитоз в основном встречались у пациентов с лейкемией без ассоциации с гельминтами. Выраженность бластемии у пациентов с лейкемией АГИ был более выраженным по отношению пациентов с ОЛ без таковых сочетаний (таб. 3).

Таким образом, согласно нашим исследованиям, гельминты являются возможными предикторами развития лейкемии. Нематоды (токсокар и аскарида) и психоневрологические расстройства, несомненно, влияют на тяжесть течения заболевания, что необходимо учитывать при выборе тактики лечения и определения прогноза.

Для раннего выявления, своевременной профилактики и терапии токсокароза инвазионных яиц токсокара у человека необходимо повысить уровень санитарно-просветительской работы среди населения и проводить регулярные санитарно-паразитологические исследования с использованием диагностической тест-системы на основе ИФА.

Среди пациентов с хронической лейкемией множественная миелома, АГИ лидировала в более половины случаев по отношению других форм, что диктует дальнейшего глубокого изучения этой проблемы.

Поиск новых прогностических биомаркеров, играющих роль в развитии лейкемии, может существенно повысить эффективность ранней диагностики. Противогельминтная и психокоррекционная терапия на фоне базисной терапии лейкемий может

снизить риск развития как инфекционных, так и неинфекционных осложнений.

Пример. Больная И., 1953 г. рождения, жительница района Хатлонской области. Жалобы на прогрессирующую слабость, повышение температуры тела, головокружение, похудание, головные боли, зуд кожных покровов, тошнота, рвота, сердцебиение, боли в проекции желчного пузыря, поджелудочной области и в поясничной области, появление геморрагий и отёков на нижних конечностях.

Из анамнеза заболевания: болеет с марта 2019 года. Заболевание началось зуда кожных покровов, недомогания, снижения аппетита, тошноты. Обратилась семейному врачу, где после комплексного обследования и в кале были обнаружены яйца и особи аскариды и картина холецистита, панкреатита. Был выставлен диагноз: Хронический холецистит в стадии обострения и реактивный панкреатит. Хронический колит. Аскаридоз. Пациентка получила соответствующую терапию и дважды курс противогельминтной терапии. Через год общая слабость прогрессировала и в общем анализе крови выявлено анемия тяжелой степени, после она была направлена в гематологическое отделение ГУ НМЦ РТ шахраки «Шифобахш». После дообследования и стеральной пункции был выставлен диагноз: ОМЛ. Больная в сопровождении родственников обратилась в НИИ гематологии Российской Федерации, где был подтверждён диагноз: ОМЛ. И с этим диагнозом пациентка находилась на стационарном лечении.

Диагноз выставлен на основании гемограммы миелограммы - 89,0% бласты 90,0%.

Общее состояние тяжёлое. Сознание ясное. В пространстве и во времени ориентировано. Положение горизонтальное. Видимые слизистые оболочки и кожные покровы бледные, геморрагии на коже нижних конечностей. Дыхание через нос свободное. Границы легких в пределах нормы. Аускультативно на фоне ослабления везикулярного дыхания в нижних долях обеих легких выслушиваются мелкопузырчатые влажные хрипы. ЧД 23 в минуту. Область сердца в пределах нормы. Аускультативно тоны сердца приглушены, ритмичные. АД 130/90 мм.рт.ст. Пульс 88 ударов в минуту. Язык – бледно - розовый, сухой, обложен белым налётом. Живот мягкий болезненный в проекции жёлчного пузыря и панкреаса. Печень у края реберной дуги. Селезёнка выступает на 3,0 см из-под края левой реберной дуги. Симптом поколачивания отрицателен с двух сторон.

В общем анализе крови эритроциты - 1, 63; гемоглобин - 55,0; цветной показатель - 0,9; тромбоциты -25,0 тыс.; лейкоциты 25000, палочкоядерные - 8; сегментоядерные - 30; эозинофилы - 7; лимфоциты - 44; моноциты - 3;

В биохимическом анализе крови от 20.11.2017: общий белок 73,0 г/л; общий билирубин 10,1 мкмоль/л; прямой билирубин -3,2 мкмоль/л; непрямой билирубин – 20 мкмоль/л; ALAT – 18,1; мочевины 8,7.

Коагулограмма– ККВ -33 сек, ПТИ -83%, ПГКГ – 18, фибриноген – 2,5 г/л, ретракция кровяного сгустка – 0,15; кальций – 3,3 ммоль/л.

В общем анализе мочи: белок – 0,033%, плотность – 1015, лейкоциты – 4-5 в поле зрения, эритроциты – 10-15.

Проведено лечение: курс ПХТ, сопроводительная терапия, водно-солевая нагрузка до 2,0 литра в сутки; дезинтоксикационная терапия; аскарбиновая кислота 5%-4,0 в/в; аллопуринол 200; симптоматическая терапия.

После проведенной терапии общее состояние больной несколько улучшилось. Общий белок – 65 г/л; эритроциты - 2,87; гемоглобин 90,0; лейкоциты – 15,0; тромбоциты– 95,0 тыс;

Больная поздно, через 7 месяца вновь в тяжёлом состоянии обратилась к гематологу анемическим, интоксикационным, геморрагическими синдромами.

Жалобы при поступлении: прогрессирующая слабость, недомогание, кровоподтеки на коже живото-

та, спины и рук, зуд кожных покровов. отёки на лице и нижних конечностях, боли в пояснично-крестцовом, шейном и грудном отделе позвоночника и в рёбрах.

В ОАК – эритроциты – 1,56, гемоглобин 53,0 г/л; тромбоциты 27,0; лейкоциты – 179,0 тыс.; эозинофилы – 2; п/я – 18; с/я -27; лимфоциты – 30; моноциты – 1. СОЭ – 75 мм/ч.

От 17.04.18 – общий белок 3,0 г/л; мочевины 14,2 ммоль/л; креатинин – 488,0 мкмоль/л; общий билирубин – 13,5; ALAT – 0,24; AsAT – 0,16; глюкоза – 6,0; фосфор – 2,5; кальций – 3,5 ммоль/л.

Был заподозрен ассоциирования лейкоза с гельминтной инвазией, учитывая то, что в анамнезе был аскаридоз. Были исследованы кал на яйца глист, анализ крови, костного мозга и ликвор на ПЦР и ИФА исследования и были обнаружены антитела токсокары и аскариды в костном мозге.

Способ ранней диагностики новых биомаркеров и их прогностическая значимость в развитии и течении лейкемии

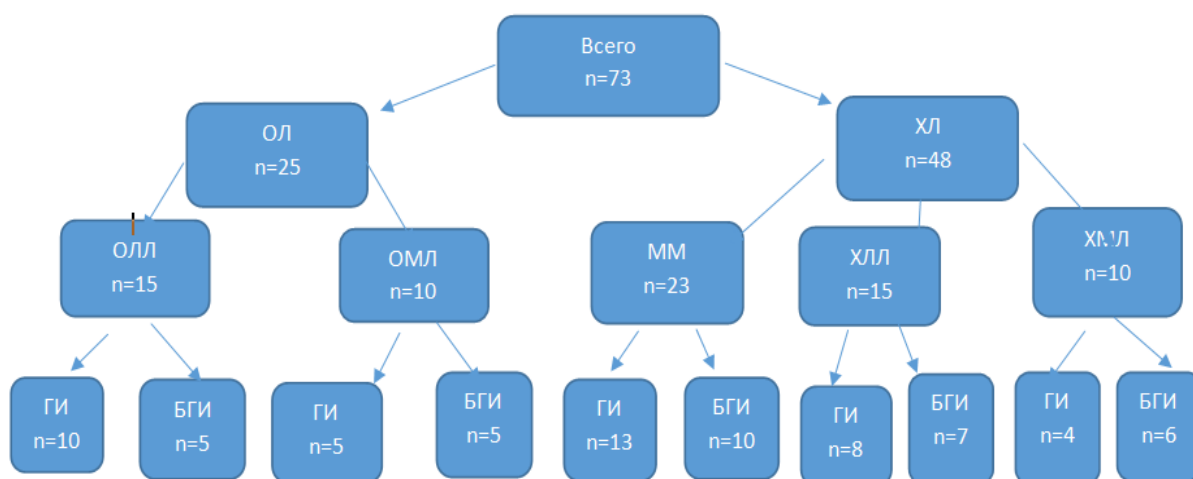


Таблица 1

Обнаруженные гельминты в биологических жидкостях и в копрограмме у пациентов с лейкемией

Вид гельмин- тов	Всего обследованные пациенты с лейкемией n=73											
	Острая лейкемия n=25						Хроническая лейкемия n=48					
	Сыво- ротка крови		Костный мозг		Копро- грамма		Сыво- ротка кро- ви		Костный мозг		Копро- Грамма	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Тохосара canis и Ascaris lumbricoides	9	36,0	7	28,0*	-	-	19	39,5	10	20,8**	-	-
Ascaris lum- bricoi- Des	4	16,0	3	12,0*	3	12,0	9	18,7	5	10,4	6	12,5
Яйца Ascaris lumbricoides	-	-	-	-	10	40,0	-	-	-	-	5	10,4**

Примечание: P* - при $p < 0,05$ - статистически значи-
мые различия по содержанию Тохосара canis и As-
caris lumbricoides в сыворотке крови и костного мозга
при острой лейкемии; P** - при $p < 0,01$ статистически
значимые различия по содержанию Тохосара canis

и Ascaris lumbricoides в сыворотке крови и костного
мозга при хронической лейкемии и яиц Ascaris lum-
bricoides в копрограмме у пациентов с острой и хро-
нической лейкемией.

Таблица 2

Сравнительный анализ клинических синдромов у пациентов с лейкемией, ассоциированной гельминтной инвазией, в костном мозге и без таковых сочетаний

Основные клинические синдромы	ОЛ n=15 P1		ХЛ n=25 P2		ОЛ n=10 P3		ХЛ n=23 P4	
	АГИ				БАГИ			
	абс	%	абс	%	абс	%		
Гиперпластический: ЯНС	15	100,0	25	100,0 P1-2>0,01	8	80,0 P1-3<0,01	12	52,1 P2-4<0,001
Ангина	10	66,6	12	48,0 P1-2<0,05	-	-	-	-
Увеличение лимфатических узлов	15	100,0	25	100,0 P1-2>0,01	7	70,0 P1-3<0,001	15	65,2 P2-4<0,001
Гепатомегалия	10	66,6	25	100,0 P1-2<0,01	3	30,0 P1-3<0,001	15	65,2 P2-4<0,001
Спленомегалия	5	33,3	25	100,0 P1-2<0,001	4	40,0 P1-3<0,01	14	60,8 P2-4<0,001
Геморрагический: петехиальные высыпания	-	-	19	76,0	6	60,0 P2-3<0,05	11	48,0 P2-4<0,05
Кровотечения	10	66,6	25	100,0 P1-2<0,001	3	30,0 P1-3<0,01	15	65,2 P2-4<0,001
Анемический: Прогрессирующая слабость	15	100,0	25	100,0 P1-2>0,05	3	30,0 P1-3<0,01	13	56,5 P2-4<0,001
бледность кожных покровов	15	100,0	25	100,0 P1-2>0,05	4	40,0 P1-3<0,001	23	100,0 P2-4>0,001
головокружение	15	100,0	19	76,0 P1-2<0,01	1	10,0 P1-3<0,001	15	62,5 P2-4<0,05
Тахикардия	15	100,0	25	100,0 P1-2>0,05	10	100,0 P1-3>0,05	23	100,0 P2-4>0,001
Гипотония	10	66,6	19	76,0 P1-2<0,01	10	100,0 P1-3<0,01	10	43,4 P2-4<0,05
Инттоксикационный: гипертермия	15	100,0	25	100,0 P1-2>0,05	2	20,0 P1-3<0,001	12	52,1 P2-4<0,01
Оссалгия	10	66,6	15	60,0 P1-2<0,05	1	10,0 P1-3<0,01	7	30,4 P2-4<0,05
Проливная потливость	15	100,0	2	50,0 P1-2<0,05	10	100,0 P1-3>0,05	6	26,0 P2-4<0,05
Похудание	10	66,6	4	100,0 P1-2<0,05	6	60,0 P1-3>0,05	6	26,0 P2-4<0,001
Головная боль	3	100,0	3	75,0 P1-2<0,01	2	66,6 P1-3<0,05	11	48,0 P2-4<0,001
Отсутствие аппетита	3	100,0	3	75,0 P1-2<0,01	1	33,3 P2-3<0,05	6	26,0 P2-4<0,05
Тошнота	3	100,0	4	100,0 P1-2<0,01	2	66,6 P1-310,05	3	13,0 P2-4<0,001
Иммунодефицитный: инфекционно-воспалительные пневмонии	3	100,0	3	75,0 P1-2<0,05	1	33,3 P1-3<0,05	9	39,1 P2-4<0,05
септическое состояние	1	33,3	1	25,0 P1-2<0,05	-	-	-	-
висцеральные поражения внутренних органов	3	100,0	4	100,0 P1-2>0,05	2	66,6 P1-3<0,05	11	48,0 P2-4<0,01

Примечание: P_{1-2} - статистически значимые различия между острой и хронической лейкемией, ассоциированными с глистной инвазией; P_{1-3} - статистически значимые различия между острой лейкемией,

ассоциированной глистной инвазией, и без таковой; P_{2-4} - статистически значимые различия между хроническими лейкемиями, ассоциированными глистной инвазией, и без таковой

Таблица 3

Сравнительный анализ гематологических показателей у пациентов с лейкемией, ассоциированной гельминтной инвазией, в костном мозге и без таковых сочетаний

Примечание: P ₁₋₂ - статистически значимые различия между острой и хронической лейкемией, ассоциированной глистной инвазией, и без таковой; P ₂₋₄ - статистически значимые различия между хронической лейкемией, ассоциированной глистной инвазией, и без таковой					
Гематологические показатели	ОЛ n=15 P1	ХЛ n=25 P2	ОЛ n=10 P3	ХЛ n=23 P4	p (ANOVA)
	С гельминтной инвазией		Без гельминтной инвазии		
Эритроциты (×10 ¹²)	1,735±0,035	1,237±0,09 p ₁₋₂ <0,05	2,973±0,3 p ₁₋₃ <0,001	2,289±0,07 P ₂₋₄ <0,001	< 0,001
Гемоглобин (г/л)	49,1±0,4	33,6±0,7 p ₁₋₂ <0,05	58,0±0,4 p ₁₋₃ <0,001	68,0±0,4 P ₂₋₄ <0,001	< 0,001
Тромбоциты (×10 ⁹)	43,33±0,07	27,03±0,05 p ₁₋₂ <0,001	107,0±2,37 p ₁₋₃ <0,001	130,0±3,33 p ₁₋₄ <0,001	< 0,001
Лейкоциты (×10 ⁹)	3,17±0,33	2,500±0,09 p ₁ <0,05	27,49±0,09 p ₁₋₃ <0,001	10,37±0,07 P ₂₋₄ <0,001	< 0,001
П/я (%)	2,179±0,015	2,315±0,002 p ₁₋₂ >0,05	7,168±0,030 p ₁₋₃ <0,001	5,127±0,030 P ₂₋₄ <0,05	< 0,001
С/я (%)	2,011±0,001	1,800±0,012 p ₁₋₂ >0,05	39,33±0,037 p ₁₋₃ <0,001	25,27±0,09 P ₂₋₄ <0,001	< 0,001
Миелоциты	-	1,912±0,005 p ₁₋₂ >0,001	-	2,399±0,06 P ₂₋₄ <0,001	< 0,001
Метамиелоциты	-	1,715±0,07	-	3,57±0,03 P ₂₋₄ <-0,01	< 0,001
Лимфоциты (%)	11,43±0,04	8,32±0,01 p ₁ <0,001	48,09±0,07 p ₁ <0,001	18,09±0,06 P ₂₋₄ <0,001	< 0,001
Моноциты (%)	2,300±0,01	1,300±0,001 p ₁ >0,05	15,145±0,01 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	5,365±0,07 P ₂₋₄ <0,001	< 0,001
СОЭ (мм/ч)	67,3±0,5	78,8±0,5 p ₁₋₂ <0,001	55,3±0,3 P ₁₋₃ <0,001	45,3±0,3 P ₂₋₄ <0,001	< 0,001
Бласты	87,0±0,5		67,0±0,09 P ₁₋₃ <0,001		

ванной с глистной инвазией; P₁₋₃ - статистически значимые различия между острой лейкемией, ассо-

цированной глистной инвазией, и без таковой; P₂₋₄ - статистически значимые различия между хронической лейкемией, ассоциированной глистной инвазией, и без таковой

Формула изобретения

Применение гельминтов, присутствующих в сыворотке крови, костном мозге и ликворе в качестве биомаркера ранней диагностики лейкемии.

Компьютерный набор: Нигораи А.

Заказ	Тираж	Подписное
Национальный патентно-информационный центр РТ 734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а		