



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60778 (13) U
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РЕЦИДИВУ В-КЛІТИННОЇ ХРОНІЧНОЇ ЛІМФОЦИТАРНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ

1

(21) u201015267

(22) 17.12.2010

(24) 25.06.2011

(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.

(72) ГОРДІЄНКО АЛЛА ІВАНІВНА, ІСАКОВА ЛЮДМИЛА МИХАЙЛІВНА, ТРЕТЯК НАТАЛІЯ МИКОЛАЇВНА, ПЕРЕХРЕСТЕНКО ТЕТЯНА ПЕТРІВНА, ШОРОП ЄВГЕН ВАЛЕРІЙОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ"

2

(57) Спосіб прогнозування рецидиву хронічної лімфоцитарної лейкемії шляхом дослідження стану протипухлинного імунітету, який відрізняється тим, що в периферичній крові хворих в стадії ремісії визначають кількість моноцитів та лімфоцитів і, при граничному значенні $CD33^+CD80^+$ -моноцитів менше 10 %, $CD33^+CD86^+$ -моноцитів - менше 20%, $CD3^+CD28^+$ -лімфоцитів - менше 20 %, прогнозують рецидив В-клітинної хронічної лімфоцитарної лейкемії.

Запропонований спосіб відноситься до галузі медицини і може бути використаний для раннього прогнозування розвитку рецидиву у хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію (В-ХЛЛ).

В-ХЛЛ являє собою клональне захворювання, при якому пухлинні клітини мають лімфоїдне походження. При цій патології відбувається накопичення в периферичній крові довго живучих, зрілих, але функціонально неповноцінних пухлинних клітин, що мають імунофенотипічний профіль $CD19^+CD5^+$. Це захворювання супроводжується характерними для нього клініко-гематологічними змінами, а також численними імунними порушеннями. Відомо, що порушення імунітету вносять вагомий внесок в патогенез цієї лімфопролиферативної патології. З позиції підвищення якості життя й виживаності хворих на В-ХЛЛ важливе значення має, зокрема, пошук імунологічних показників, які можуть бути використані для раннього прогнозування рецидиву, коли ще не спостерігаються клініко-гематологічні ознаки захворювання. Незважаючи на використання стандартних протоколів лікування хворих, які дозволяють досягнути ремісії, залишається достатньо високим ризик розвитку рецидиву цього захворювання.

Відомим способом прогнозування рецидиву захворювання є клінічні та гематологічні ознаки [1]. Про розвиток рецидиву у хворих на В-ХЛЛ свідчать поява втомлюваності, пітливість, втрата маси тіла, тривале підвищення температури тіла, анемія та/або тромбоцитопенія, значні лімфоденопатія та/або гепатоспленомегалія, виражений лейкоцитоз в периферичній крові, подвоєння абсолютної кількості лімфоцитів, висока лімфоцитарна інфільтрація кісткового мозку.

Однак, клітинно-гематологічні ознаки захворювання відносяться до пізніх провісників рецидиву, що є суттєвим недоліком. У зв'язку з цим, актуальним видається пошук ранніх провісників рецидиву для своєчасного призначення специфічної терапії.

Найбільш близьким аналогом заявленої корисної моделі є дослідження з вивчення ролі коstimуляторних молекул родини В7 ($B7.1/CD80$, $B7.2/CD86$) в розвитку В-ХЛЛ. Головною задачею був пошук факторів, що впливають на експресію коstimуляторних молекул. Так, для модуляції експресії коstimуляторних молекул пропонувалося проведення хворим імунотерапії інтерфероном-гама. Автори вважають, що підвищення рівня експресії коstimуляторних молекул позитивно впливає на інтенсивність протипухлинної Т-клітинної імунної відповіді [2].

Недоліки найближчого аналога:

У хворих на В-ХЛЛ до початку лікування визначали кількість пухлинних В-лімфоцитів, які експресували коstimуляторні молекули. Для підвищення рівня експресії коstimуляторних молекул хворим призначали імунотерапію з використанням інтерферону-гама. Результати підтвердили роль коstimуляторних молекул $CD80$, $CD86$ в підсиленні Т-клітинної протипухлинної відповіді у пацієнтів з В-ХЛЛ.

В цих дослідженнях відсутні дані, що характеризують особливості експресії коstimуляторних молекул на моноцитах. Відомо, що моноцити (предендритні клітини мієлоїдного походження) приймають участь в реакціях протипухлинного імунітету. У зв'язку з чим, має значення аналіз експресії цими клітинами коstimуляторних молекул. Крім того, не вивчалася експресія $CD3^+$ -Т-лімфоцитами

(19) UA (11) 60778 (13) U

ліганду CD28⁺, що здійснює трансдукцію сигналу активації в клітину. Відомості про зміни експресії вказаних молекулярних структур можуть бути використані для раннього прогнозування рецидиву у хворих на В-ХЛЛ, що знаходяться в ремісії.

Задача запропонованого способу полягає у підвищенні тривалості, а також якості життя хворих на В-ХЛЛ, що досягалось шляхом оцінки в периферичній крові кількості CD33⁺CD80⁺-, CD33⁺CD86⁺- моноцитів та CD3⁺CD28⁺-лімфоцитів (відсотковий вміст).

Для імунофенотипічного дослідження мононуклеари периферичної крові фарбували в прямому двоколірному імунофлуоресцентному тесті відповідними моноклональними антитілами (МКА) фірми Becton Dickinson, міченими флуоресцеїнізотіаціанатом (FITC) та фікоеретрином (PE). Детально методика підготовки зразків крові наведена в статті [3]. Для контролю рівня неспецифічного зв'язування кон'югатів МКА зразки крові фарбували мишачими МКА проти гемоціанину фісурели (Keyhole limpet) субкласів IgG1 IgG2a, міченими відповідно FITC та PE. Антигенний профіль мононуклеарів периферичної крові вивчали на проточному лазерному цитофлуориметрі FACScan (Becton Dickinson, USA). Збір даних та статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програмного забезпечення LYSYS-П Ver. 1.1 (Becton Dickinson), WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA) та Microsoft Excel 2000 з пакету Microsoft Office 2000.

Спосіб прогнозування рецидиву В-клітинної хронічної лімфоцитарної лейкемії характеризується конкретними прикладами його виконання.

При цьому наводяться приклади індивідуального цифрового значення розподілу в периферичній крові CD33⁺CD80⁺-, CD33⁺CD86⁺-моноцитів та CD3⁺CD28⁺-лімфоцитів у пацієнтів з тривалістю ремісії 12-18 місяців. Так у хворого Г-рук кількість CD33⁺CD80⁺-моноцитів становила 22,1%, CD33⁺CD86⁺-моноцитів -31,6 %, CD3⁺CD28⁺-лімфоцитів - 33,5 %. У хворого К-йди кількість CD33⁺CD80⁺-моноцитів дорівнювала 28,1 %, CD33⁺CD86⁺-моноцитів - 33,1 %, CD3⁺CD28⁺-лімфоцитів - 38,2 %. Виявлено, що в середньому кількість CD33⁺CD80⁺-, CD33⁺CD86⁺- моноцитів і CD3⁺CD28⁺ лімфоцитів у цих хворих на В-ХЛЛ

(n=7) дорівнювала відповідно (26,1±1,0) %, (32,1±1,0) % і (35,1±1,1) %.

Поряд з цим наведені індивідуальні значення кількості CD33⁺CD80⁺-, CD33⁺CD86⁺-, CD3⁺CD28⁺-моноцитів у хворих на В-ХЛЛ з тривалістю ремісії 2-3 місяці. Так, у хворого Р-мова кількість CD33⁺CD80⁺-моноцитів становила 12,8 %, CD33⁺CD86⁺-моноцитів - 22,6 %, CD3⁺CD28⁺-лімфоцитів - 20,4 %. У хворої П-ко кількість CD33⁺CD80⁺ моноцитів дорівнювала 15,4 %, CD33⁺CD86⁺-моноцитів -20,7 %, CD3⁺CD28⁺-лімфоцитів - 25,5 %. У даної категорії пацієнтів (n=7) кількість позитивних моноцитів, які експресують CD33⁺CD80⁺, CD33⁺CD86⁺ в середньому відповідно становила (12,7±0,6) %, (21,8±0,6) %, а CD3⁺CD28⁺-лімфоцитів -(22,2±0,9) %.

Із аналізу результатів витікає, що у хворих спостерігається різна кількість в крові CD33⁺CD80⁺-, CD33⁺CD86⁺- моноцитів. З урахуванням цього хворі на В-ХЛЛ були розподілені на дві групи. У першій були хворі з більш високою кількістю CD80⁺CD33⁺-, CD86⁺CD33⁺- моноцитів і CD3⁺CD28⁺-лімфоцитів. В другій групі хворих були більш низькі показники. Спостереження свідчать, що у пацієнтів з В-ХЛЛ у першій групі тривалість ремісії становила 12-18 місяців, тоді як у другій - 2-3 місяці.

Виходячи з цього, вміст в крові хворих на В-ХЛЛ CD33⁺CD80⁺- моноцитів менше 10,0 %, CD33⁺CD86⁺- моноцитів - менше 20,0 %, CD3⁺CD28⁺-лімфоцитів - менше 20,0 % є раннім прогностичним критерієм рецидиву цього захворювання. Це дає можливість своєчасного призначення специфічної терапії пацієнтам з В-ХЛЛ.

Джерела інформації:

1. Лекції з гематології / П.М. Перехрестенко, Л.М. Ісакова, Н.М. Третьак [и др.], К.: Нора-принт.-2005.-125 с.

2. Dai Z.S. Defective expression and modulation of B7-2/CD86 in B cells chronic lymphocytic leukemia /Z.S. Dai, Q.F. Chen, Y. Xie// Int. J. Hematol. - 2009. - Vol. 89, №5. - P. 656-663.

3. Иммунологический мониторинг больных хроническим миелолейкозом в стадии клинко-гематологической компенсации на фоне иммуномодулирующей терапии /Ал. И. Гордиенко, Л.М. Ісакова, Н.Н. Третьак [и др.] // Имунологія та алергологія. -1998.- №3.- с.44-47.