



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **39714** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 33/50МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ОЦІНКИ СПЕЦИФІЧНОЇ КЛІТИННОЇ ВІДПОВІДІ ЗА ДОПОМОГОЮ РЕАКЦІЇ ГАЛЬМУВАННЯ МІГРАЦІЇ ЛЕЙКОЦИТІВ У ОНКОЛОГІЧНИХ ХВОРИХ ПІСЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ДЕНДРИТНОКЛІТИННОЇ ВАКЦИНОТЕРАПІЇ**

1

2

(21) u200811614

(22) 29.09.2008

(24) 10.03.2009

(46) 10.03.2009, Бюл.№ 5, 2009 р.

(72) ХРАНОВСЬКА НАТАЛЯ МИКОЛАЇВНА, UA,
СКАЧКОВА ОКСАНА ВОЛОДИМИРІВНА, UA,
СІТЬКО ВАЛЕНТИНА ВІТАЛІЇВНА, UA(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАЦІОНАЛЬНИЙ
ІНСТИТУТ РАКУ", UA

(57) Спосіб оцінки формування специфічної клітинної відповіді у онкологічних хворих після проведення дендритноклітинної вакцинотерапії, що

включає визначення відсотка гальмування міграції лейкоцитів периферичної крові за допомогою поліклонального активатора фітогемаглютиніну як позитивного контролю, який **відрізняється** тим, що додатково використовують аутологічний пухлинний антиген, яким навантажують дендритні клітини, і при збільшенні відсотка гальмування міграції лейкоцитів в порівнянні із контрольними значеннями визначають наявність формування специфічної клітинної відповіді і прогнозують позитивну відповідь на вакцинотерапію.

Корисна модель відноситься до експериментальної медицини, а саме - онкології і може бути використана для спостереження за станом імунної системи хворих на злоякісні новоутворення.

Вакцинотерапія з використанням дендритних клітин (ДК) інтенсивно досліджується з метою використання в схемах лікування онкологічних хворих. ДК здатні специфічно активувати функції імунної системи організму з метою попередження розвитку рецидивів та метастазів. Перевагами цього методу терапії є висока специфічність дії і відсутність значних побічних ефектів [1].

При проведенні ДК-вакцинотерапії важливе значення мають лабораторні тести, за результатами яких можливо прогнозувати клінічний ефект при проведенні вакцинотерапії. Матеріалом для таких тестів можуть служити периферична кров, пухлинні клітини, лімфоцити, отримані з периферичних лімфатичних вузлів [2].

Для визначення імунного стану у хворих оцінюють загальну кількість лімфоцитів, зміни в субпопуляційному складі лімфоцитів, визначають кількість циркулюючих імунних комплексів, імуноглобулінів, фагоцитарну активність нейтрофілів, макрофагів [3]. Важливе значення мають тести, які можуть визначити формування специфічної імунної відповіді на пухлинний антиген.

За найближчий аналог нами обрано метод проведення адаптивної імунотерапії шляхом переносу активованих *in vitro* лімфоїдних клітин хворих на рак легені [Адоптивная иммунотерапия при

хирургическом лечении больных раком легкого /Ю.А. Гриневич., Ф.В. Фильчаков., В.Л. Ганул, И.И. Смоланка //Онкология. - 2000. - Т.2. - №1-2. - С.68-71], де визначали титр тимічного сировоточного фактора, основні популяції лімфоцитів за допомогою реакції спонтанного розеткоутворення, цитотоксичну активність, використовували реакцію гальмування міграції лейкоцитів в присутності ФГА.

Позитивним в найближчому аналозі є те, що за допомогою проведених тестів можливо дослідити формування імунної відповіді на проведення адаптивної терапії.

Недоліком даного способу є те, що він не дозволяє оцінити формування специфічної імунної відповіді на аутологічний пухлинний антиген після проведення ДК-вакцинотерапії.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб оцінки специфічної клітинної відповіді за допомогою реакції гальмування міграції лейкоцитів у онкологічних хворих після проведення дендритноклітинної вакцинотерапії шляхом проведення реакції гальмування міграції лейкоцитів (РГМЛ) з фітогемаглютиніном (ФГА) в якості позитивного контролю та аутологічним пухлинним антигеном (ПА), який використовується для навантаження ДК, що дасть можливість оцінити ефективність формування специфічної імунної відповіді при проведенні ДК-вакцинотерапії.

Поставлена задача вирішується наступним чином:

(13) **U**
(11) **39714**
(19) **UA**

Для проведення РГМЛ використовується периферична гепаринезована кров отримана з ліктьової вени. В 3 лунки планшету вносять по 100мкл крові: в першу лунку додають 10мкл середовища RPMI-1640 (Біотест лабораторія), в другу - 10мкл ФГА, в третю - 10мкл пухлинного антигену. Запаюють капіляри з нижнього кінця. Капіляри центрифугують 5хв. при 1000об/хв., потім закривають капіляри з іншого кінця, інкубують при 37°C 24 години. Оцінюють відсоток гальмування міграції за формулою:

$$\frac{\text{Дослід}}{\text{Контроль}} \times 100\%$$

Цей метод базується на тому факті, що сенсибілізовані лімфоцити при повторній взаємодії з антигенами продукують в середовище різноманітні цитокіни (МИФ, ТНФ- α , ИФН- γ) та хемокини, які впливають на міграцію гранулоцитів, лімфоцитів [5]. Якщо спостерігається збільшення відсотка гальмування міграції лімфоцитів при взаємодії з ПА по відношенню до відсотка гальмування міграції лімфоцитів у контролі ми можемо говорити про

формування специфічної імунної відповіді після проведення ДК-вакцинотерапії.

Переконливими прикладами ефективності запропонованого способу є представлені функціональні тести двох хворих.

I. Хворий С.М.М. 1946 року народження (історія хвороби №734) поступив у відділення торакальної онкології з діагнозом Са верхньої долі правої легені, ПГЗ №2301-8/07: залозистий Са, TNM: T₂N₂M₀, 2 клінічна група, проведена операція - верхня білобектомія. Після операції хворому було проведено 4 курси ДК-вакцинотерапії, з перервою між вакцинами терміном в 1 місяць. Після 1-ї та 4-ї вакцинації проведено дослідження на РГМЛ.

Для проведення РГМЛ використовувалась периферична гепаринезована кров хворого отримана з ліктьової вени. В 3 лунки планшету вносять по 100мкл крові: в першу лунку додають 10мкл середовища RPMI-1640, в другу - 10мкл ФГА, в третю - 10мкл ПА. Запаюють капіляри з нижнього кінця. Капіляри центрифугують 5хв. при 1000об/хв., потім закривають капіляри з іншого кінця, інкубують при 37°C 24 години. Результати досліджень представлені в табл.1.

Таблиця 1

Визначення формування клітинної відповіді на ПА в реакції РГМЛ

	Нормальні показники, %	Після 1-ї вакцинації	Після 4-ї вакцинації
ФГА	47,48±8,25	49,10	84,00
ПА	-	0	42,00

Збільшення відсотку гальмування міграції лімфоцитів в присутності ПА проти контрольних показників свідчить про формування специфічної клітинної відповіді після проведення ДК-вакцинотерапії.

II. Хворий У.І.А. 1938 року народження (історія хвороби №542) поступив у відділення торакальної онкології з діагнозом Са нижньої долі правої легені, ПГЗ №1805-8/07: плоскоклітинний Са, TNM: T₂N₂M₀, 2 клінічна група, проведена операція - нижня лобектомія. Після операції хворому було проведено 4 курси ДК-вакцинотерапії, з перервою між

вакцинами терміном в 1 місяць. Після 1-ї та 4-ї вакцинації проведено дослідження на РГМЛ.

Для проведення РГМЛ використовувалась периферична гепаринезована кров отримана з ліктьової вени. В 3 лунки планшету вносять по 100мкл крові: в першу лунку додають 10мкл середовища RPMI-1640, в другу - 10мкл ФГА, в третю - 10мкл пухлинного антигену. Запаюють капіляри з нижнього кінця. Капіляри центрифугують 5хв. при 1000об/хв., потім закривають капіляри з іншого кінця, інкубують при 37°C 24 години. Результати досліджень представлені в табл.2.

Таблиця 2

Визначення формування клітинної відповіді на ПА в реакції РГМЛ

	Нормальні показники, %	Після 1-ї вакцинації	Після 4-ї вакцинації
ФГА	47,48±8,25	31,00	64,30
ПА	-	0	54,80

Збільшення відсотку гальмування міграції лімфоцитів в присутності ПА проти контрольних показників свідчить про формування специфічної клітинної відповіді після проведення ДК-вакцинотерапії.

Проведення РБТЛ у онкологічних хворих після ДК-вакцинотерапії дозволяє оцінити стан імунологічних чинників та формування специфічної імунної відповіді на аутологічний ПА, який використовується для навантаження ДК при проведенні вакцинотерапії.

Джерела інформації:

1. Роль пухлинного антигену в модифікації фенотипових властивостей дендритних клітин //Н.М. Храновська, Ю.Я. Гріневич, Ю.В. Швець, Г.В. Ковтонюк. - XI з'їзд онкологів України. - 29 травня - 02 червня 2006р.- Судак, АР Крим.

2. Вакцины на основе дендритных клеток в лечении злокачественных опухолей //И.А. Балдуева - V Российской онкологическая конференция, 27-29 ноября 2001г., г.Москва.

3. Особенности иммунного статуса больных раком предстательной железы //А.Н. Бедняков, А.Т. Токтошев, З.П. Камарли //Вестник КРСУ.- 2003.- №7.- С.24-29.

4. Адоптивная иммунотерапия при хирургическом лечении больных раком легкого //Ю.А. Гриневич, Ф.В. Фильчаков, В.Л. Ганул, И.И. Смоланка.

- Онкология.- Т.2. - №1-2. - 2000. - С.68-71 (наиближчий аналог).

5. Оценка специфического клеточного иммунитета с помощью современной модификации реакции торможения миграции лейкоцитов //Н.Е. Калашников, В.В. Муругин, Е.А. Чирвон, Б.В. Пинегин, А.В. Симонова. - Вестник РГМУ. - 2006.- №2/49. С.378.