



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **44804** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
G01N 33/52МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**  
**ДО ПАТЕНТУ**  
**НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) СПОСІБ ОЦІНКИ РАНЬОГО ПОРУШЕННЯ ІМУНОЛОГІЧНОГО СТАНУ ХВОРИХ НА ДИФЕРЕНЦІЙОВАНИЙ РАК ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ПІСЛЯ РАДІОЙОДОТЕРАПІЇ**

1

2

(21) u200905481

(22) 01.06.2009

(24) 12.10.2009

(46) 12.10.2009, Бюл.№ 19, 2009 р.

(72) ЗАМОТАЄВА ГАЛИНА АНАТОЛІЇВНА, ЗАХАРЧЕНКО ТАМАРА ФЕДОРІВНА, СТЕПУРА НАТАЛІЯ МИКОЛАЇВНА, ТРОНЬКО МИКОЛА ДМИТРОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ЕНДОКРИНОЛОГІЇ ТА ОБМІНУ РЕЧОВИН ІМ. В.П. КОМІСАРЕНКА АМН УКРАЇНИ"

(57) Спосіб оцінки раннього порушення імунологічного стану хворих на диференційований рак щитоподібної залози після радіойодотерапії, який включає визначення кількісних імунологічних показників, який **відрізняється** тим, що визначають імунофенотипічні характеристики - вміст активованих HLA-DR<sup>+</sup>-клітин та CD38<sup>+</sup>-Т-лімфоцитів, вміст CD19<sup>+</sup>-В-лімфоцитів - показників адаптивного імунітету, кількість CD95<sup>+</sup>-клітин крові - маркера апоптозу лімфоцитів, визначають функціональні

показники клітин периферичної крові - проліферативну активність Т-лімфоцитів, активність ІЛ-2-продукції лімфоцитів крові - функціональні показники адаптивного імунітету, цитотоксичну активність природних кілерних клітин та нейтрофілів - показників вродженого імунітету, рівень циркулюючих імунних комплексів в сироватці крові як ланку гуморального імунітету і при зниженні експресії маркерів HLA-DR<sup>+</sup>-клітин, CD38<sup>+</sup>-Т-лімфоцитів, CD19<sup>+</sup>-В-лімфоцитів, проліферативної активності Т-лімфоцитів та активності ІЛ-2-продукції лімфоцитів роблять висновок про недостатність адаптивного імунітету, при зниженні цитотоксичної активності природних кілерних клітин і нейтрофілів - про пригнічення вродженого імунітету, при підвищенні рівня експресії маркера CD95<sup>+</sup>-клітин - про збільшення апоптозу лімфоцитів, при збільшенні ж рівня циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові роблять висновок про порушення гуморальної ланки імунітету.

Корисна модель стосується медицини, зокрема ендокринології та імунології і може бути використана для визначення порушення стану імунної системи у прооперованих хворих на диференційований рак щитоподібної залози (ДРЩЗ) після радіойодотерапії (РІТ).

Лікування ДРЩЗ передбачає комплексний підхід, який включає тиреоїдектомію, РІТ та супресивну гормонотерапію. РІТ є найбільш ефективним засобом променевої терапії залишкової тканини щитоподібної залози і регіонарних метастазів, а за наявності віддалених метастазів найчастіше виявляється єдиним методом лікування. Інформація щодо побічних наслідків впливу РІТ на інші органи і системи вкрай обмежена. Стан імунної системи належить до чинників, що в значній мірі впливають на прогноз захворювання і якість життя хворих на рак. До того ж, потрібно враховувати, що клітини імунної системи є надзвичайно радіочутливими.

Відомі способи оцінки цитогенетичного ушкодження лімфоцитів (хромосомних аберацій) пери-

феричної крові після зовнішнього опромінення [Пат. 2089904 RU, МПК 6 G01N33/48. Способ диагностического воздействия малых доз радиации на организм человека путем цитологического анализа; Кочан Э.М. Жукоцкий А.В. Копылов В.Ф., Ломакин Е.Б. - 95104687/14; Заявл. 31.03.1995; Оpubл. 10.09.1997, Бюл. №25.; Пат. 6039 U, МПК 7 G01N33/49. Способ детекції генетичної нестабільності в лімфоцитах крові онкологічних хворих під час променевої терапії / Інститут медичної радіології ім. С.П.Григор'єва АМН України; Вінніков В.А., Мазник Н.О. - 20040705938; Заявл. 19.07.2004; Оpubл. 15.04.2005, Бюл. №4.]; а також відомі способи визначення цитогенетичних ушкоджень лімфоцитів крові хворих на рак щитоподібної залози, які пройшли лікування радіоактивним йодом [Gutierrez S, Carbonell E, Galofre P. Cytogenetic damage after 131-iodine treatment for hyperthyroidism and thyroid cancer. A study using the micronucleus test // Eur. J. Nucl. Med.- 1999.- 26, №12.- P. 1589-96.; Billardin N, Gemignani F, Bodei L. et al. Formation of micronuclei and of clastogenic

(13) **U**(11) **44804**(19) **UA**

factor (s) in patients receiving therapeutic doses of iodine-131 // *Mutat Res.*-2002.-514, №1-2.-P.77-85].

Однак, цитогенетичні ушкодження лімфоцитів (утворення мікроядер, хромосомні аберації, зміна експресії та транскрипції генів) свідчать тільки про ймовірність функціональної неповноцінності клітин імунної системи або ж про можливість інтерфазної загибелі (апоптозу) лімфоцитів. При цьому клітини з абераціями можуть елімінуватися з крові шляхом апоптозу. Клітини, що вижили, передають мутації нащадкам. Це може призвести до порушення функції або до малигнізації клітини.

Відомі також способи оцінки порушення стану імунної системи після опромінення [Пат. 2106634 RU, МПК 6 G01N33/53. Способ оценки нарушений иммунного статуса при воздействии радиации. / Государственный НИИ курортологии Пятигорска; Гринзайд Ю.М., Денешко Н. И. - 95115190/14; Заявл. 25.08.1995; Оpubл. 10.03.1998, Бюл. №7; Пат. 74321A UA, МПК 7 G01N33/53. Спосіб діагностики стану імунної системи. / Науковий центр радіаційної медицини АМН України; Бази́ка Д.А., Беля́ева Н.В., Голя́рник НА. - 2003119896; Заявл. 04.11.2003; Оpubл. 15.11.2005, Бюл. №11]. Відомі способи оцінки порушення стану імунної системи у онкохворих після комбінованого променевого лікування [Кузьмина Е. Г., Гусева М.И., Дорошенко Л.Н. и др. Иммунный статус больных раком тела матки после комбинированного и сочетанного лучевого лечения. // *Рос. онкологический журнал.*-1998, №4. - С.19-23].

Також відомий і спосіб визначення радіоїодіндукованих змін лімфоцитів хворих на ДРЩЗ [Tofani A, Sciuto R, Cioffi RP et all. Radioiodine-induced changes in lymphocyte subsets in patients with differentiated thyroid carcinoma // *Eur. J. Nucl. Med.* - 1999.- 26, №8.- P.824-829].

Однак, у перших трьох вказаних способах визначається вплив зовнішнього або комбінованого опромінення на імунологічні показники, що не є тотожним до внутрішнього опромінення йодом-131 прооперованих хворих на ДРЩЗ. Крім того, в усіх наведених способах оцінюється імунний статус тільки з позиції кількісної характеристики популяцій і субпопуляцій лімфоцитів і не визначається їх функціональна здатність.

За прототип взятий спосіб визначення імунного статусу у дітей, хворих на ДРЩЗ, які отримували гормональне лікування тироксином та РІТ. В даному способі визначаються кількісні імунологічні показники: кількість Т- і В-лімфоцитів, Т-активних лімфоцитів, теофілін-чутливих (Т-супресори) та теофілін-резистентних (Т-хелпери) субпопуляцій лімфоцитів у тесті розеткоутворення (Е-РУК та ЕАС-РУК), вміст комплементу, сироваткових імуноглобулінів (IgA, IgG, IgM), рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), лізоциму [Воронцова Т. В., Шаврова Е.Н., Кучинская С.В. и др. Состояние иммунной системы детей больных раком щитовидной железы, получающих гормональное лечение и радиойодтерапию // *Иммунопатология, аллергология, инфектология.*" 2001, №2.- С.38-45]. Після виявлення кількісних змін наведених популяцій та субпопуляцій клітинного імунітету робиться висновок про додозалежний вплив на дані показники

радіоїодного лікування, в той час як з боку гуморального імунітету істотних відхилень не відзначено.

Однак, і в даному прототипі імунологічні показники визначаються тільки кількісно і не визначаються імунофенотипічні та функціональні показники, що має вирішальне значення у виявленні наслідків радіаційного ушкодження клітин. Визначення кількісного складу лімфоцитів не повністю відображає їх функціональну спроможність. Не завжди напрямок зміни кількості клітин збігається з напрямком зміни їхньої функції, що може зумовлюватись компенсаторними реакціями організму. До того ж визначення імунологічних показників, проведене авторами, здебільшого, за допомогою малоінформативних та застарілих методик і з використанням суб'єктивного методу підрахунку одержаних результатів.

В основу даної корисної моделі поставлено задачу вдосконалити спосіб оцінки раннього порушення імунологічного стану хворих на ДРЩЗ після РІТ шляхом визначення певних показників імунофенотипу та функціональної здатності клітин периферичної крові хворих. Це дозволить підвищити ефективність аналізу і визначити найбільш інформативні показники, які найбільше відображають вплив радіоїоду на клітини імунної системи та вказують на можливість розвитку вторинного імунодефіциту. А також дозволить визначити доцільність застосування засобів імунокорекції в комплексному лікуванні хворих на ДРЩЗ для поліпшення якості їхнього життя.

Поставлена задача досягається тим, що в способі, який включає визначення кількісних імунологічних показників, згідно з даною корисною моделлю, визначають імунофенотипічні характеристики - вміст активованих HLA-DR<sup>+</sup>-клітин та CD38<sup>+</sup>-Т-лімфоцитів, вміст CD19<sup>+</sup>-В-лімфоцитів - показників адаптивного імунітету, кількість CD95<sup>+</sup>-клітин крові - маркеру апоптозу лімфоцитів, визначають функціональні показники клітин периферичної крові - проліферативну активність Т-лімфоцитів, активність ІЛ-2-продукції лімфоцитів крові - функціональні показники адаптивного імунітету, цитотоксичну активність природних кілерних клітин та нейтрофілів - показників вродженого імунітету, рівень циркулюючих імунних комплексів в сироватці крові як ланку гуморального імунітету і при зниженні експресії маркерів HLA-DR<sup>+</sup>-клітин, CD38<sup>+</sup>-Т-лімфоцитів, CD19<sup>+</sup>-В-лімфоцитів, проліферативної активності Т-лімфоцитів та активності ІЛ-2-продукції лімфоцитів роблять висновок про недостатність адаптивного імунітету, при зниженні цитотоксичної активності природних кілерних клітин і нейтрофілів - про пригнічення вродженого імунітету, при підвищенні рівня експресії маркеру CD95<sup>+</sup>-клітин - про збільшення апоптозу лімфоцитів, при збільшенні ж рівня циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові роблять висновок про порушення гуморальної ланки імунітету.

До даного рішення автори прийшли, досліджуючи імунологічні показники у прооперованих хворих на ДРЩЗ до та через місяць після курсу РІТ. Враховуючи те, що імунологічні показники характеризуються високою індивідуальною варіа-

бельністю, вибирали ті з них, які змінювались у більшості хворих цих груп.

В результаті встановлено, що у хворих на ДРШЗ через місяць після курсу  $^{131}\text{I}$ -терапії в порівнянні з початковим значенням достовірно знижений вміст HLA-DR<sup>+</sup>-клітин ((24,5±1,3) % проти (28,1±1,0) %,  $p<0,01$ ), CD38<sup>+</sup>-Т-лімфоцитів ((27,6±2,1) % проти (47,3±2,9) %,  $p<0,001$ ), що свідчить про зниження експресії активаційних маркерів, яке може призвести до функціональної недостатності лімфоцитів; достовірно знижений вміст CD19<sup>+</sup>-В-лімфоцитів ((7,6±0,9) % проти (11,6±0,6) %,  $p<0,001$ ), що свідчить про недостатню експресію маркера В-лімфоцитів; знижена на 31 % проліферативна активність Т-лімфоцитів ((IC - 2,55±0,12 проти IC -2,95±0,10,  $p<0,05$ ), знижена в 2,2 раза активність IL-2- продукції лімфоцитів крові ((IC - 0,89±0,03 проти IC - 1,97±0,03,  $p<0,05$ ), що свідчить про зниження функції показників адаптивного (набутого) імунітету, зокрема Т-лімфоцитів та субпопуляції Th1 (Т-хелперів); знижена в 1,3 раза цитотоксична активність природних кіперних клітин (ПКК) - (16,9±1,0) % проти (21,6±1,3) %,  $p<0,01$ ) та знижена в 1,5 раза цитотоксична активність нейтрофілів (НФ) - (18,1±0,9) % проти (24,0±1,0) %,  $p<0,01$ ), що свідчить про пригнічення функції показників вродженого імунітету; підвищений на 19 % рівень CD95<sup>+</sup>-клітин - (66,6±2,6) % проти (53,9±2,6) %,  $p<0,001$ ), що свідчить про збільшення експресії маркера апоптозу, який може призвести до зниження чисельності лімфоцитів у крові хворого, а також підвищений на 40 % рівень ЦІК у сироватці крові - (95,9±2,3) у. о. проти (68,7±1,7) у. о.,  $p<0,01$ ), що свідчить про порушення гуморального імунітету. Все це дає можливість виявити ранній ефект опромінення йодом-131 імунної системи, а також оцінити порушення імунологічного стану, яке може призвести до розвитку інфекційних ускладнень, виникнення рецидиву, метастазування та погіршення прогнозу хвороби.

Отже, даний спосіб виявляє високу чутливість клітин різних ланок адаптивного та вродженого, клітинного та гуморального імунітету до йоду-131 у ранній термін після РІТ, наслідком чого може бути посилення порушення функцій клітин периферичної крові, розвиток вторинного імунodefіциту.

Спосіб здійснюється таким чином.

Пацієнту до та після курсу РІТ за експресією поверхневих маркерів визначають імунотип лімфоцитів периферичної крові - HLA-DR<sup>+</sup>-клітин, CD38<sup>+</sup>-Т-лімфоцитів, кількість CD19<sup>+</sup>-В-лімфоцитів та CD95<sup>+</sup>-клітин крові на проточному цитофлуориметрі (FACScan "Becton Dickinson") з використанням панелі прямо мічених моноклональних антитіл ("BD Pharmingen", США); проліферативну відповідь Т-лімфоцитів периферичної крові на дію мітогену фітогемаглютинін (ФГА) в концентрації - 10мкг/мл у реакції бласттрансформації з використанням радіоізотопного методу для підрахунку індексу стимуляції (IC); активність IL-2-продукції лімфоцитів крові у костимуляційному тесті проліферації тимоцитів мишей за методом De Vos et al. з використанням радіоізотопного методу для підрахунку IC; цитотоксичну активність ПКК та НФ периферичної крові проти клітин K-562 за допомо-

гою проточної цитофлуориметрії (FACScan "Becton Dickinson") з використанням 2 флуорохромів - PI "Sigma" (мертві клітини) та FITC "Sigma" (живі клітини-мішені K-562); рівень ЦІК у сироватці крові за методом Гашкової Г. та ін. і при зниженні вмісту HLA-DR<sup>+</sup>-клітин, CD38<sup>+</sup>-Т-лімфоцитів, кількості CD19<sup>+</sup>-В-лімфоцитів, зниженні проліферативної активності Т-лімфоцитів у відповідь на ФГА, зниженні активності IL-2-продукції лімфоцитів крові, зниженні цитотоксичної активності ПКК та НФ та підвищенні рівня CD95<sup>+</sup>-клітин крові, рівня ЦІК у сироватці крові після курсу радіойодтерапії визначають наявність порушень імунологічного стану, спричиненого  $^{131}\text{I}$ .

Приклад 1. Хворий Р.Ю.Г., 1974 року народження, діагноз - фолікулярний РЩЗ, регіонарні метастази в лімфовузлі шийї справа, стадія T2N1M0. Після оперативного лікування отримав курс  $^{131}\text{I}$ -терапії. Активність лікувальної дози йоду-131 становила 4730 МБк. Через місяць після РІТ імунологічні показники хворого у порівнянні з початковим значенням були такими: вміст HLA-DR<sup>+</sup>-клітин - 12,0 % проти 21,0 % (знизився у 1,75 раза), CD38<sup>+</sup>-Т-лімфоцитів - 25,0 % проти 54,0 % (знизився у 2,2 раза), CD19<sup>+</sup>-В-лімфоцитів - 7,0 % проти 9,0 % (знизився у 1,3 раза), рівень CD95<sup>+</sup>-клітин - 62,0 % проти 55,0 % (підвищився на 11 %); проліферативна активність Т-лімфоцитів у відповідь на ФГА (IC) - 3,04 проти 3,63 (знижилась на 16 %), активність IL-2-продукції лімфоцитів крові (IC) - 0,92 проти 1,91 - (знижилась у 2,1 раза); цитотоксична активність ПКК - 16,5 % проти 20,3 % (знижилась на 19%), цитотоксична активність НФ -19,7 % проти 27,6 % (знижилась на 29 %); рівень ЦІК у сироватці крові - 106,0 у.о проти 72,0 у.о. (підвищився у 1,5 раза). Все це свідчить про ранні зміни імунотипу лімфоцитів, порушення функції різних ланок клітинного та гуморального, адаптивного та вродженого імунітету після курсу йоду-131 у порівнянні з їх початковим значенням у даного хворого, що може призвести до розвитку інфекційних ускладнень, виникнення рецидиву та пролонгації хвороби, і обфунтовує доцільність застосування засобів імункорекції.

Приклад 2. Хвора Р.Н.П., 1950 року народження, діагноз папілярний РЩЗ, віддалені метастази в легені з 2-х сторін, стадія T4N1M1, після оперативного лікування отримала 4 курси  $^{131}\text{I}$ -терапії. Активність лікувальної дози йоду-131 1-го курсу становила 6000 МБк, 2-го - 3400 МБк, 3-го - 4360 МБк, 4-го - 4403,6 МБк. Через місяць після останнього курсу РІТ імунологічні показники хворої у порівнянні з початковим значенням були такими: вміст HLA-DR<sup>+</sup>-клітин - 26,0 % проти 30,0 % (знизився у 1,2 раза), CD38<sup>+</sup>-Т-лімфоцитів - 38,0 % проти 52,0 % (знизився у 1,4 раза), CD19<sup>+</sup>-В-лімфоцитів - 7,0 % проти 14,0 % (знизився у 2,0 раза), рівень CD95<sup>+</sup>-клітин - 64,0% проти 43,0% (підвищився у 1,5 раза); проліферативна активність Т-лімфоцитів у відповідь на ФГА (IC) - 3,67 проти 3,99 (знижилась на 8 %), активність IL-2-продукції лімфоцитів крові (IC) - 0,97 проти 2,11 (знижилась у 2,2 раза); цитотоксична активність ПКК - 16,7 % проти 18,2 % (знижилась на 8,3 %), цитотоксична активність НФ - 14,8 % проти 19,8 % (знижилась на 25 %); рівень

ЦІК у сироватці крові - 125,0 у.о. проти 70,0 у.о. (підвищився у 1,8 раза). Зазначені зміни свідчать про порушення імунотипу лімфоцитів, функції різних ланок клітинного та гуморального, адаптивного та вродженого імунітету після курсу йоду-131 у порівнянні з початковим значенням цих показників у даної хворої і вказують на можливість розвитку інфекційних ускладнень, виникнення рецидиву

та погіршення прогнозу хвороби а також на необхідність застосування засобів імункорекції.

Таким чином, спосіб оцінки раннього порушення показників імунотипу стану хворих на ДРЦЗ після РІТ є ефективним та інформативним. Це дозволяє рекомендувати даний спосіб для впровадження в медичних закладах ендокринологічного та онкологічного профілю.