



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **111776**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/53 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 04466**

(22) Дата подання заявки: **22.04.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.11.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.11.2016, Бюл.№ 22**

(72) Винахідник(и):

**Фільчаков Феодосій Вікторович (UA),
Кукушкіна Світлана Миколаївна (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ,
вул. Ломоносова, 33/43, м. Київ, 03022 (UA)**

(54) СПОСІБ ІМУНОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ У ХВОРИХ НА МЕЛАНОМУ ШКІРИ

(57) Реферат:

Спосіб імунологічного дослідження у хворих на меланому шкіри включає виявлення змін імунної системи методом проточної цитофлуориметрії. Склад Т-лімфоцитів периферичної крові визначають за субпопуляціями CD3⁺CD4⁺CD8⁺-, CD3⁺CD4^{dim}CD8^{bright}-TaCD3⁺CD4^{bright}CD8^{dim}-клітин.

UA 111776 U

Заявка належить до галузі медицини, а саме - клінічної онкології, і може бути використана при комбінованому лікуванні хворих на меланому шкіри.

Меланому шкіри відносять до пухлин з високою імуногенністю і розглядають як одну з найбільш перспективних пухлин для імунотерапевтичного впливу. Проте з прогресуванням захворювання у хворих на меланому шкіри спостерігається розвиток дисфункції імунної системи, ступінь якої залежить від стадії пухлинного протікання і біологічних особливостей пухлини. Показано, що в периферичній крові хворих на меланому шкіри відбуваються зміни основних популяцій лімфоцитів (В-лімфоцитів, Т-лімфоцитів та природних кіперних клітин), які можуть виникати вже на початку захворювання. Крім того, у таких хворих відмічають зміни з боку міnorних субпопуляцій Т-лімфоцитів, зокрема $\gamma\delta$ T- та NKT-клітин [1,2].

Розвиток меланоми шкіри хоча і супроводжується посиленням експресії маркерів активації (CD25, CD71, CD95, HLA-DR та ін.) на лімфоцитах периферичної крові, призводить до зниження цитотоксичної активності та проліферативної відповіді клітин-ефекторів імунної системи [3] і зростання рівня апоптозу цих клітин [4]. Відбувається порушення балансу між ефекторними та регуляторними клітинами імунної системи, що пов'язано зі збільшенням кількості регуляторних Т-лімфоцитів і клітин-супресорів мієлоїдного походження та посиленням їх супресорних властивостей [5, 6].

Таким чином, важливим є оцінка імунологічних показників в комплексному обстеженні хворих на меланому шкіри для визначення індивідуальних особливостей перебігу пухлинного процесу, прогнозування відповіді організму на імунотерапію з метою оптимізації тактики лікування.

За прототип вибрано спосіб імунологічного дослідження у хворих на меланому шкіри (Олейник Е.К. Маркеры активации лимфоцитов крови (CD25, CD71, CD95, HLA-DR) у онкологических больных / Е.К. Олейник, М.И. Шибяев, В.М. Олейник // Гематология и трансфузиология. - 2006. -Т. 51, № 1. - С. 18-22), за яким у онкологічних хворих, у тому числі хворих на меланому шкіри, проводили дослідження імунного статусу з визначенням відносної кількості лімфоцитів периферичної крові за експресією антигенів (CD3, CD4, CD8, CD16, CD 19, CD25, CD71, CD95, HLA-DR) методом проточної цитофлуориметрії та проводили аналіз змін цих показників в залежності від стадії захворювання.

Перевагою прототипу є можливість оцінки імунологічних параметрів хворих на меланому шкіри, що може бути використано для прогнозування ефективності імунотерапії.

Недоліком прототипу є визначення у хворих на меланому шкіри субпопуляційного складу Т-лімфоцитів за експресією лише одного з антигенів CD4 або CD8, що обмежує оцінку стану імунної системи.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити спосіб імунологічного дослідження у хворих на меланому шкіри шляхом визначення методом проточної цитофлуориметрії складу Т-лімфоцитів периферичної крові за субпопуляціями $CD3^+CD4^+CD8^-$, $CD3^+CD4^{dim}CD8^{bright}$ та $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ -клітин, що дасть можливість покращити моніторинг хворих в процесі імунотерапії та допоможе розробити більш ефективні схеми її застосування.

Поставлена задача вирішується наступним чином:

Хворим на меланому шкіри після клініко-рентгенологічного обстеження, що включає комп'ютерну томографію головного мозку, органів грудної та черевної порожнини, органів таза, ультразвукове дослідження регіонарних лімфатичних вузлів, до початку лікування проводять імунологічне дослідження, для цього вранці натщесерце з ліктьової вени відбирають периферичну кров в об'ємі 2 мл в пробірку з гепарином. Методом проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл CD3-PC5/CD4-RD1/CD8-FITC ("Beckman Coulter", США) в крові визначають відносний вміст $CD3^+CD4^+CD8^-$, $CD3^+CD4^{dim}CD8^{bright}$ та $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ -клітин серед популяції лімфоцитів. Результати обчислюють на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Під час обліку результатів підраховують 10×10^6 лімфоцитів. Абсолютну кількість $CD3^+CD4^+CD8^-$, $CD3^+CD4^{dim}CD8^{bright}$ та $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ -клітин визначають виходячи із вмісту лейкоцитів у периферичній крові та відсотка лімфоцитів в лейкоцитарній формулі.

За заявленим способом імунологічне дослідження було проведено у 70 хворих з гістологічно підтвердженим діагнозом меланоми шкіри з I-IV стадією захворювання.

Прикладами реалізації заявленого способу є витяги з історій хвороб наступних пацієнтів.

І. Хвора К., 1952 р. н., історія хвороби № 6106.

Звернулась у відділення пухлин шкіри та м'яких тканин Національного інституту раку зі скаргами на наявність пігментної пухлини на шкірі правого передпліччя, що з'явилась 3 роки тому і останні півроку стала кровить.

Після обстеження, що включало рентгенографію органів грудної клітки, ультразвукове дослідження органів черевної порожнини та загальноклінічні дослідження, встановлено клінічний діагноз: меланома шкіри правого передпліччя, II клінічна група.

28.05.2012 р. хворій до початку лікування провели імунологічне дослідження, для цього вранці натщесерце з ліктьової вени відібрали периферичну кров в об'ємі 2 мл в пробірку з гепарином. Методом проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл CD3-PC5/CD4-RD1/CD8 FITC ("Beckman Coulter", США) в крові визначили відносний вміст CD3⁺CD4⁺CD8⁺-, CD3⁺CD4^{dim}CD8^{bright}- та CD3⁺CD4^{bright}CD8^{dim}-клітин серед популяції лімфоцитів. Результати обчислювали на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Під час обліку результатів підраховували 10×10^3 лімфоцитів. Абсолютну кількість CD3⁺CD4⁺CD8⁺-, CD3⁺CD4^{dim}CD8^{bright}- та CD3⁺CD4^{bright}CD8^{dim}-клітин визначали виходячи із вмісту лейкоцитів у периферичній крові та відсотка лімфоцитів в лейкоцитарній формулі. Абсолютна кількість Т-лімфоцитів досліджуваних субпопуляцій в периферичній крові була в межах нормальних значень: вміст CD3⁺CD4⁺CD8⁺-клітини складав $0,031 \times 10^9$ /л проти $(0,020-0,032) \times 10^9$ /л у практично здорових людей (ПЗЛ), CD3⁺CD4^{dim}CD8^{bright}-клітин $0,006 \times 10^9$ /л проти $(0,004-0,006) \times 10^9$ /л у ПЗЛ, CD3⁺CD4^{bright}CD8^{dim}-клітин - $0,013 \times 10^9$ /л проти $(0,012-0,016) \times 10^9$ /л у ПЗЛ.

06.06.2012 р. під внутрішньовенним наркозом виконано широке висічення меланоми шкіри правого передпліччя та біопсія "сторожового" лімфатичного вузла правої пахової ділянки.

Після хірургічного лікування хвора упродовж 12 місяців отримувала рекомбінантний $\alpha 2b$ -інтерферон (лаферобіон, виробництво Україна) по 3 млн ОД тричі на тиждень підшкірно.

Патогістологічний висновок № 26686-93/12 від 14.06.2012 р.: епітеліоїдноклітинна меланома шкіри, що поверхнево розповсюджується, з наявністю вузлового компоненту, III-IV рівень інвазії за Clark, товщина пухлини за Breslow більш 1,0 мм. В "сторожовому" лімфатичному вузлі пухлина не визначається.

Встановлено заключний діагноз: меланома шкіри правого передпліччя, T1bN0M0, стадія IB, клінічна група II.

За період спостереження (46 місяців) рецидиву або метастазів пухлини у хворої не виявлено.

II. Хвора Д., 1941 р. н., історія хвороби № 1495.

Звернулась у відділення пухлин шкіри та м'яких тканин Національного інституту раку зі скаргами на наявність пігментної пухлини на шкірі правої гомілки, що з'явилась в 2010 році, стала швидко збільшуватись в розмірах та періодично кровити.

Після обстеження, що включало рентгенографію органів грудної клітки, ультразвукове дослідження органів черевної порожнини та загальноклінічні дослідження, встановлено клінічний діагноз: меланома шкіри правої гомілки, II клінічна група.

17.02.2011 р. хворій до початку лікування провели імунологічне дослідження для цього вранці натщесерце з ліктьової вени відібрали периферичну кров в об'ємі 2 мл в пробірку з гепарином. Методом проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл CD3-PC5/CD4-RD1/CD8-FITC ("Beckman Coulter", США) в крові визначили відносний вміст CD3⁺CD4⁺CD8⁺-, CD3⁺CD4^{dim}CD8^{bright}- та CD3⁺CD4^{bright}CD8^{dim}-клітин серед популяції лімфоцитів. Результати обчислювали на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Під час обліку результатів підраховували $1,0 \times 10^3$ лімфоцитів. Абсолютну кількість CD3⁺CD4⁺CD8⁺-, CD3⁺CD4^{dim}CD8^{bright}- та CD3⁺CD4^{bright}CD8^{dim}-клітин визначали виходячи із вмісту лейкоцитів у периферичній крові та відсотка лімфоцитів в лейкоцитарній формулі. Абсолютна кількість CD3⁺CD4⁺CD8⁺-лімфоцитів в периферичній крові була підвищена і складала $0,040 \times 10^9$ /л проти $(0,020-0,032) \times 10^9$ /л у ПЗЛ; кількість CD3⁺CD4^{dim}CD8^{bright}-клітин була в межах нормальних значень - $0,005 \times 10^9$ /л проти $(0,004-0,006) \times 10^9$ /л у ПЗЛ; CD3⁺CD4^{bright}CD8^{dim}-клітин була знижена - $0,009 \times 10^9$ /л проти $(0,012-0,016) \times 10^9$ /л у ПЗЛ.

22.02.2011 р. під внутрішньовенним наркозом виконано широке висічення меланоми шкіри правої гомілки та біопсія "сторожового" лімфатичного вузла правої пахової ділянки.

Після хірургічного лікування хвора упродовж 12 місяців отримувала рекомбінантний $\alpha 2b$ -інтерферон (лаферобіон, виробництво Україна) по 3 млн ОД тричі на тиждень підшкірно.

Патогістологічний висновок № 7840-46/1 від 01.03.2011 р.: вузлова форма злоякісної меланоми шкіри з поверхневим виразкуванням, IV рівень інвазії за Clark, товщина пухлини за Breslow більш ніж 6,0 мм. Метастази меланоми в "сторожовому" лімфатичному вузлі.

Встановлено заключний діагноз: меланома шкіри правої гомілки, T4bN1aM0, стадія IIIB, клінічна група II.

За період спостереження (60 місяців) рецидиву або метастазів пухлини у хворої не виявлено.

Джерела інформації:

1. Circulating y5T cells in young/adult and old patients with cutaneous primary melanoma / F. Re, A. Donnini, B. Bartozzi [et al.] // Immun. Ageing. -2005. - Vol. 2. - P. 2.
2. Effects of the administration of high-dose interleukin-2 on immunoregulatory cell subsets in patients with advanced melanoma and renal cell cancer / H.J.J. van der Vliet, Ы.В. Koon, S.C. Yue [et al.] // Clin. Cancer Res. - 2007. - Vol. 13, № 7. - P. 2010-2018.
3. Impaired perforin-dependent NK cell cytotoxicity and proliferative activity of peripheral blood T cells is associated with metastatic melanoma / V. Jovic, G. Konjevic, S. Radulovic [et al.] // Tumori. - 2001. - Vol. 87, № 5. - P. 324-329.
4. Spontaneous apoptosis of CD8⁺T lymphocytes in peripheral blood of patients with advanced melanoma / T. Saito, G. Dworacki, W. Gooding [et al.] // Clin. Cancer Res. - 2000. - Vol. 6, № 4. - P. 1351-1364.
5. Strauss L. Functional and phenotypic characteristics of CD4⁺CD25^{high}Foxp3^f Treg clones obtained from peripheral blood of patients with cancer / L. Strauss, Ch. Bergmann, Th.L. Whiteside // Int..1. Cancer. -2007.-Vol. 121, № 11.-P. 2473-2483.
6. Immature immunosuppressive CD14⁺HLA-DR⁺ cells in melanoma patients are Stat3^{hi} and overexpress CD80, CD83, and DC-Sign / I. Poschke, D. Mougiakakos, J. Hansson [et al.] // Cancer Res. - 2010. - Vol. 70, № 11. -P. 4335-4345.
7. Олейник Е.К. Маркеры активации лимфоцитов крови (CD25, CD71, CD95, HLA-DR) у онкологических больных / В.К. Олейник, М.И. Шибяев, В.М. Олейник // Гематология и трансфузиология. - 2006. - Т. 51, № 1. - С. 18-22 (прототип).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб імунологічного дослідження у хворих на меланому шкіри, що включає виявлення змін імунної системи методом проточної цитофлуориметрії, який **відрізняється** тим, що склад Т-лімфоцитів периферичної крові визначають за субпопуляціями CD3⁺CD4^{dim}CD8^{bright}- та CD3⁺CD4^{bright}CD8^{dim}-клітин.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601