



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76752** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 08844	(72) Винахідник(и): Замотасєва Галина Анатоліївна (UA), Степура Наталія Миколаївна (UA), Тронько Микола Дмитрович (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.07.2012	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ЕНДОКРИНОЛОГІЇ ТА ОБМІНУ РЕЧОВИН ІМ. В.П. КОМІСАРЕНКА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.01.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.01.2013, Бюл.№ 1	

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ УШКОДЖЕННЯ КЛІТИН ІМУННОЇ СИСТЕМИ У ХВОРИХ НА ДИФЕРЕНЦІЙОВАНИЙ РАК ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ, ЯКІ ПРОЙШЛИ ЛІКУВАННЯ РАДІОАКТИВНИМ ЙОДОМ

(57) Реферат:

Спосіб виявлення ушкодження клітин імунної системи у хворих на диференційований рак щитоподібної залози, які пройшли лікування радіоактивним йодом, включає дослідження субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові. Визначають відносну кількість CD19+-лімфоцитів та рівень експресії Fas-рецептора (CD95) напередодні радіойодотерапії та на 6 добу після прийому ізотопу. За зниженою, відносно вихідних показників, кількістю В-лімфоцитів (CD 19) та підвищеним вмістом CD95+-лімфоцитів визначають ушкодження клітин системи імунітету та можливість розвитку вторинного імунodefіциту в ранні строки після радіойодотерапії.

UA 76752 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до ендокринології та імунології, і може бути використана для виявлення ушкодження клітин імунної системи у хворих на диференційований рак щитоподібної залози (ДРЩЗ), які пройшли лікування радіоактивним йодом.

Стандартом лікування ДРЩЗ є тиреоїдектомія, радіойодтерапія (РЙТ) та супресивна гормонотерапія. Застосування радіойоду показане як для післяопераційної абляції залишкової тканини щитоподібної залози (ЩЗ), так і для девіталізації регіонарних та віддалених метастазів. За наявності останніх РЙТ найчастіше виявляється єдиним засобом їх лікування. Хворим, які мають віддалені метастази, призначається декілька (до 10 і більше) курсів радіойодтерапії, при цьому сумарні активності йоду-131 можуть сягати 20-40 ГБк. За таких рівнів радіаційного навантаження цілком імовірні структурні і функціональні пошкодження клітин системи імунітету, оскільки лімфоцити, попри невеликі темпи проліферації, мають дуже високу радіочутливість. Застосування цитогенетичних методів виявило значний генотоксичний ефект ¹³¹I: в лімфоцитах крові хворих на РЩЗ після РЙТ виявлені різноманітні хромосомні пошкодження, що зберігаються протягом багатьох років [The radiotoxicity of ¹³¹I therapy of thyroid cancer: assessment by micronucleus assay of B lymphocytes / N. Matanabe, H. Kanegane, S. Kinuya [et al.] // J. Nucl. Med.-2004. - V. 45, № 4. - P. 608-611].

Відомий спосіб детекції генетичної нестабільності в лімфоцитах крові онкологічних хворих при променевої терапії (хромосомні аберації, утворення мікроядер та ін.) після зовнішнього опромінення [Пат. 6039 U UA, МПК G01N 33/49, опубл. 15.04.05, бюл. № 4] та після лікування радіоактивним йодом [Formation of micronuclei and of clastogenic factor(s) in patients receiving therapeutic doses of iodine-131 / M. Ballardin, F. Gemignani, L. Bodei [et al.] // Mutat. Res.-2002. - V. 514, № 1-2. - P. 77-85.; Cytogenetic damage after 131-iodine treatment for hyperthyroidism and thyroid cancer. A study using the micronucleus test / S. Gutierrez, E. Carbonell, P. Galofre [et al.] // Eur. J. Nucl. Med.-1999. - V. 26, № 12. - P. 1589-1596]. Слід зазначити, що цитогенетичні зміни лімфоцитів свідчать лише про ймовірність функціональної неповноцінності клітин імунної системи, проте, такі клітини можуть гинути шляхом апоптозу та елімінуватися з крові.

Відомі також способи визначення порушень в системі імунітету у онкохворих після зовнішнього опромінення [Пат. 74321A UA, МПК G01N 33/533, опубл. 15.11.05, бюл. № 11]; після зовнішнього опромінення та комбінованого променевого лікування [Иммунный статус больных раком тела матки после комбинированного и сочетанного лучевого лечения / Е.Г. Кузьмина, М.И. Гусева, Л.Н. Дорошенко [и др.] // Рос. онкологический журнал, 1998. - № 4. - С. 19-23; Вплив супровідної терапії на імунний статус та якість життя хворих на рак тіла матки при променевому лікуванні / П.П. Сорочан, О.М. Сухіна, Н.Е. Прохач [та ін.] // Український радіологічний журнал, 2009. - № 3. - С. 343-345]. Однак, у вказаних вище способах досліджуються зміни імунологічних показників під впливом зовнішнього та комбінованого опромінення, що суттєво відрізняється від внутрішнього опромінення, яке отримують хворі на рак ЩЗ в результаті проведення лікування радіоактивним йодом.

Стосовно стану імунної системи хворих на рак щитоподібної залози за дії йоду-131, в літературі відомі способи визначення радіаційно індукованих змін лімфоцитів у хворих на диференційований рак щитоподібної залози [Radioiodine-induced changes in lymphocyte subsets in patients with differentiated thyroid carcinoma / A. Tofani, R. Sciuto, R. P.Cioffi [et al.] // Eur. J. Nucl. Med.-1999. - V.26, № 8, - P. 824-829; Воронцова Т.В. Состояние иммунной системы детей больных раком щитовидной железы, получающих гормональное лечение и радиойодтерапию / Т. В. Воронцова, О. О. Янович, Е. П. Демидчик // Иммунология, аллергология, инфектология.- 2001. - № 2. - С. 38-45]. Проте, наведені у вищезгаданих способах результати суперечливі та важко порівняні, насамперед, через використання малоінформативних методів оцінки імунологічного статусу, різноманітність та малочисельність груп хворих.

За прототип взятий спосіб визначення імунної депресії за зміною імунологічних показників у хворих на рак щитоподібної залози в ранні строки після терапії радіойодом. В способі визначається стимульована *in vitro* мікробними антигенами проліферативна відповідь лімфоцитів периферичної крові в реакції бласттрансформації та рівень про- та протизапальних цитокинів (інтерферон-гамма та інтерлейкін-10) у сироватці крові 21 хворого на рак ЩЗ на 1 та 7 добу після радіойодотерапії [Barsegian V., Muller S.P., Horn P.A., Bockisch A., Lindemann M. Lymphocyte function following radioiodine therapy in patients with thyroid carcinoma // Nuklearmedizin.-2011. - V. 50, № 5. - P. 195-203]. За отриманими результатами, а саме: достовірним збільшенням через 1 добу після радіойодтерапії проліферативної відповіді лімфоцитів і продукції інтерферону-гамма відносно до вихідних значень та повернення їх до вихідного рівня на 7 добу, значним зниженням рівня інтерлейкіну-10, робиться висновок про відсутність суттєвих ознак імунодепресії у хворих на РЩЗ, які отримували йод-131.

В даному прототипі досліджувалась в реакції бласттрансформації проліферативна відповідь лімфоцитів периферичної крові, яка відображає лише один аспект функціональних можливостей лімфоцитів периферичної крові, що є малоінформативним і не дозволяє виявити ушкодження клітин імунної системи у хворих на ДРЩЗ, які пройшли лікування радіоактивним йодом, оскільки, адекватна і ефективна імунна відповідь потребує взаємодії різних типів імунокомпетентних клітин.

В основу даної корисної моделі поставлено задачу вдосконалити спосіб виявлення ушкодження клітин імунної системи у хворих на ДРЩЗ, які пройшли лікування радіоактивним йодом шляхом дослідження субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові та рівня експресії на їх поверхні активаційних маркерів. Це дозволить значно підвищити інформативність способу та визначити радіочутливість лімфоцитів різного імунофенотипу, що відображають вплив радіоїоду на клітини імунної системи та вказують на можливість розвитку вторинного імунодефіциту. Крім того, спосіб дозволить в ранні строки після радіоїодотерапії визначити доцільність застосування імунотерапії в комплексному лікуванні хворих на рак щитоподібної залози з метою поліпшення якості їх життя.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі, який включає дослідження субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові, згідно з корисною моделлю, визначають відносну кількість CD19+ -лімфоцитів та рівень експресії Fas-рецептора (CD95) напередодні радіоїодотерапії та на 6 добу після прийому ізотопу і за зниженою, відносно вихідних показників, кількістю В-лімфоцитів (CD 19) та підвищеним вмістом CD95-лімфоцитів визначають ушкодження клітин системи імунітету та можливість розвитку вторинного імунодефіциту вже у ранні строки після радіоїодотерапії.

Це стало можливим завдяки виконаним авторами дослідженням вивчення субпопуляційного складу лімфоцитів периферичної крові у хворих на рак щитоподібної залози до та на 6 день після застосування радіоїодотерапії. В результаті дослідження встановлено, що у хворих, прооперованих з приводу карциноми щитоподібної залози, після проведення радіоїодотерапії спостерігаються зміни вмісту лімфоцитів у порівнянні з вихідними значеннями. Так, вміст CD3+ лімфоцитів становив $((64,22 \pm 1,30) \%)$ проти $((68,54 \pm 1,50) \%)$, $P < 0,05$; CD4+ лімфоцитів - $((34,83 \pm 1,41) \%)$ проти $((40,29 \pm 1,46) \%)$, $P < 0,05$; CD8+ лімфоцитів - $((32,17 \pm 2,07) \%)$ проти $((29,42 \pm 2,01) \%)$; IPI - $((1,26 \pm 0,13) \%)$ проти $((1,63 \pm 0,11) \%)$, $P < 0,05$; CD19+ - В - лімфоцитів - $((6,27 \pm 0,50) \%)$ проти $((9,04 \pm 0,73) \%)$, $P < 0,001$; HLA-DR+ - клітин - $((11,03 \pm 1,09) \%)$ проти $((16,22 \pm 1,41) \%)$, $P < 0,05$; CD16+ - клітин - $((22,76 \pm 2,13) \%)$ проти $((19,24 \pm 2,34) \%)$; CD4+CD25^{bright} - $((21,40 \pm 0,86) \%)$ проти $((15,94 \pm 0,98) \%)$, $P < 0,05$; CD95+ $((73,09 \pm 2,48) \%)$ проти $((54,56 \pm 2,23) \%)$ ($P < 0,001$). Як видно з наведених даних, змін зазнають майже всі субпопуляції лімфоцитів та активаційні маркери. Доведено, що вміст В-лімфоцитів (CD 19) та CD95+ -лімфоцитів за дії радіоїоду набуває найбільших змін практично у всіх обстежених хворих. Рівень CD19+ - В - лімфоцитів знижується у 89,2 % пацієнтів, а рівень спонтанної експресії CD95 підвищується у 94,3 % хворих, достовірність цих даних підтверджена на 48 пацієнтах. Виявлені зміни субпопуляційного складу лімфоцитів периферичної крові та експресії на їх поверхні активаційних маркерів у хворих під впливом терапевтичних активностей йоду-131, свідчать про порушення їх функціональних можливостей, що може призвести до розвитку вторинного імунодефіциту та реалізуватися на рівні організму у вигляді соматичної патології - захворювань травної, нервової, серцево-судинної, дихальної систем, аутоімунних та інфекційних хвороб. Крім того, наявність імунних порушень за умов опромінення йодом-131 у обстежених хворих дозволяє обґрунтувати доцільність застосування засобів імунокорекції.

Спосіб здійснюється таким чином.

У хворих на рак щитоподібної залози за допомогою методу проточної цитометрії досліджували відносну кількість CD19+ - В-лімфоцитів та рівень експресії Fas-рецептора (CD95) напередодні радіоїодотерапії та на 6 добу після прийому ізотопу. Дослідження проводили на проточному цитофлуориметрі (FACSscan "Becton Dickinson"), оснащеному аргонним лазером з довжиною хвилі 488 нм, з використанням комерційної програми "CellQuest". Для вимірювання флуоресценції за ФІТЦ використовували вузькосмугові фільтри розміром 530/30 нм, ФЕ - 650/30 нм, потужність лазера складала 100 мВт. Для імунофенотипування (визначення експресії поверхневих маркерів) лімфоцитів використовували панель прямо мічених моноклональних антитіл (виробництва "BD Pharmingen", США та "Сорбент", Москва). При виявленні у хворих зниженої, відносно вихідних показників, кількості В-лімфоцитів (CD 19) та збільшеного вмісту CD95+ -лімфоцитів визначають ушкодження клітин системи імунітету.

Приклад 1. Хвора Б.О.В., 1989 року народження, діагноз - інкапсульована папілярна карцинома, метастази в лімфовузлах ший, стадія пухлинного процесу T3N0Mx. Після оперативного лікування 16.02.2010 року пацієнтка отримала 1 курс радіоїодотерапії, активність

йоду-131 становила 3205 МБк. На 6 добу після введення радіойоду пацієнтці виконано дослідження з виявлення ушкодження клітин імунної системи за розробленим способом. Результати дослідження у порівнянні з вихідними значеннями були такими: відносна кількість CD 19+ -В-лімфоцитів становила 2,0 % проти 6,0 % (зменшилася на 66,7 %); рівень експресії Fas-рецептора (CD95+) клітинами периферичної крові становив 86,0 % проти 65,0 % (збільшення на 32,3 %), що свідчить про те, що вже після першого курсу радіойодотерапії спостерігаються ушкодження клітин імунної системи, що, в свою чергу, потребує подальшого проведення імунореабілітації.

Приклад 2. Хвора Б.О.В., 1989 року народження, діагноз - папілярний рак щитоподібної залози, метастази в лімфовузлах ший, середостіння та легені. Після оперативного лікування 24.05.2007 року пацієнтка отримала 4 курси радіойодотерапії: 1-й курс - 27.06.2007 р., активність йоду-131 становила 1962 МБк; 2-й курс - 14.12.2007 р., активність йоду-131-2700 МБк; 3-й курс - 15.10.2008 р., активність ізотопу - 3278 МБк; 4-й курс - 21.09.2011 р., активність йоду-131-4360 МБк. На 6 добу після введення лікувальної дози радіойоду пацієнтці виконано дослідження з виявлення ушкодження клітин імунної системи за розробленим способом. Результати дослідження у порівнянні з вихідними значеннями були такими: відносна кількість CD 19+ -В-лімфоцитів становила 7,0 % проти 13,0 % (знизилося на 46,2 %); рівень експресії Fas-рецептора (CD95) клітинами периферичної крові становив -57,0 % проти 37,0 % (зріс на 54,1 %), що свідчить про суттєві розлади в імунній системі, що може проявитися розвитком аутоімунних та лімфопроліферативних захворювань, вторинних імунodefіцитів.

Таким чином, спосіб виявлення ушкодження клітин імунної системи у хворих на диференційований рак щитоподібної залози, які пройшли лікування радіоактивним йодом, є ефективним та інформативним, що дозволяє рекомендувати даний спосіб для впровадження в медичних закладах ендокринологічного та онкологічного профілю.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виявлення ушкодження клітин імунної системи у хворих на диференційований рак щитоподібної залози, які пройшли лікування радіоактивним йодом, що включає дослідження субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові, який **відрізняється** тим, що визначають відносну кількість CD19+-лімфоцитів та рівень експресії Fas-рецептора (CD95) напередодні радіойодотерапії та на 6 добу після прийому ізотопу і за зниженою, відносно вихідних показників, кількістю В-лімфоцитів (CD 19) та підвищеним вмістом CD95+-лімфоцитів визначають ушкодження клітин системи імунітету та можливість розвитку вторинного імунodefіциту в ранні строки після радіойодотерапії.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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

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