



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **79751** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
G01N 33/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 13699	(72) Винахідник(и): Кукушкіна Світлана Миколаївна (UA), Фільчаков Феодосій Вікторович (UA), Шуміліна Катерина Станіславівна (UA), Льон Ганна Даріївна (UA), Коровін Сергій Ігорович (UA), Кукушкіна Марія Миколаївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 30.11.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2013, Бюл.№ 8	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ, вул. Ломоносова, 33/43, м. Київ, 03022 (UA)

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ У ХВОРИХ НА ПЕРВИННО-ЛОКАЛІЗОВАНУ МЕЛАНОМУ ШКІРИ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри включає виявлення у хворих змін імунореактивності організму в динаміці інтерферонотерапії. У периферичній крові хворих визначають абсолютну кількість CD25⁺-лімфоцитів і в разі її збільшення через 3 міс. від початку проведення ад'ювантної інтерферонотерапії прогнозують сприятливий перебіг захворювання.

UA 79751 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме - онкології, і може бути використана в комбінованому лікуванні хворих на меланому шкіри.

Меланома шкіри вважається одним з найбільш агресивних онкологічних захворювань, для якого характерні короткі терміни ремісії та здатність метастазувати практично в усі органи та тканини. Тому запобігання розвитку метастазів є головною проблемою в терапії цієї категорії хворих. На теперішній час стандартом профілактики метастазів у хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри залишається імунотерапія з використання препаратів інтерферону (ІФН) [1]. Незважаючи на проведення багатьох рандомізованих контрольованих досліджень з використанням ІФН як ад'ювантної терапії хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри, результати щодо його терапевтичної ефективності є суперечливі [2], крім того інтерферонотерапія супроводжується суттєвою токсичністю та є економічно обтяжливою [3]. Існує необхідність визначення лабораторних критеріїв ефективності інтерферонотерапії на ранніх етапах лікування для відбору пацієнтів, які отримають від цього найбільшу користь.

За прототип вибрано спосіб імунологічної оцінки ефективності комбінованого лікування хворих на меланому шкіри [Химиотерапия диссеминированной меланомы кожи с включением ингарона (γ -ИФН). Клинико-иммунологическое исследование / М.Е. Абрамов, С.Л. Гуторов, Е.Г. Славина [и др.] // Рос. биотер. журн.-2009. - Т. 8, № 1. - С. 64-74], за яким в динаміці комбінованого лікування із застосуванням поліхіміо- та інтерферонотерапії у 39 хворих на дисеміновану меланому шкіри проводили багатопараметричний аналіз імунного статусу в залежності від загальної виживаності хворих. Імунологічне дослідження, що включало оцінку відносної кількості лімфоцитів периферичної крові ($CD3^+$, $CD5^+$, $CD7^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $HLA-DR^+$, $CD38^+$, $CD25^+$, $CD50^+$, $CD16^+$, $CD20^+$, $CD11b^+$, $CD45RA^+$, $CD95^+$, $CD71^+$), цитотоксичної активності природних кілерних клітин та рівня сироваткових імуноглобулінів, показало, що збільшення цитотоксичності природних кілерних клітин асоційоване із значним підвищенням загальної виживаності хворих.

Позитивним в прототипі є оцінка імунологічних параметрів хворих в процесі лікування, що може бути використано для прогнозування його ефективності.

Недоліком прототипу є визначення у периферичній крові відносної кількості $CD25^+$ -лімфоцитів без урахування їх абсолютної кількості, що обмежує оцінку стану імунної системи, оскільки відомо, що прогресування захворювання у хворих на меланому шкіри супроводжується зміною загального вмісту лімфоцитів периферичної крові та їх популяцій [5].

Задачею корисної моделі є вдосконалення способу прогнозування перебігу захворювання у хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри (ПЛМ) шляхом визначення змін абсолютної кількості $CD25^+$ -лімфоцитів в периферичній крові в динаміці ад'ювантної інтерферонотерапії, що дасть можливість виявити групу пацієнтів, чутливих до імунотерапії, та допоможе в розробці більш ефективних схем її застосування.

Поставлена задача вирішується наступним чином:

Хворим з гістологічно підтвердженим діагнозом меланоми шкіри IB-IIС стадії на 8-10 день після висічення первинної пухлини призначають курс ІФН- $\alpha 2b$ ("Лаферобіон", Україна) підшкірно в дозі 3 млн МО 3 рази на тиждень упродовж 12 міс. або ІФН- γ ("Ингарон", Російська Федерація) підшкірно в сумарній дозі 2500 тис МО (5 ін'єкцій через день) з подальшим курсом ІФН- $\alpha 2b$ за вищеописаною схемою. Прогнозування перебігу захворювання на тлі інтерферонотерапії у хворих на ПЛМ проводять на основі визначення змін у периферичній крові абсолютної кількості лімфоцитів, що експресують $CD25$ -антиген, в терміни до хірургічного лікування та через 3 міс. від початку імунотерапії ІФН- $\alpha 2b$. Визначення відносної кількості $CD25^+$ -лімфоцитів у периферичній крові проводять методом проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл до $CD25$ -антигенів, мічених фікоеритрином (PE) ("Becton Dickinson", США), згідно з методикою [6]. Результати обчислюють на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Під час обліку результатів підраховують 1×10^3 лімфоцитів. Для обчислення абсолютної кількості $CD25^+$ -лімфоцитів підраховують вміст лейкоцитів в периферичній крові та лейкоцитарну формулу загальноприйнятим методом [7]. Збільшення абсолютної кількості $CD25^+$ -лімфоцитів у хворих на ПЛМ через 3 міс. від початку проведення ад'ювантної імунотерапії ІФН- $\alpha 2b$ свідчить про сприятливий перебіг захворювання.

За заявленим способом прогнозування перебігу захворювання у хворих на ПЛМ було проведено 40 хворим з гістологічно підтвердженим діагнозом меланоми шкіри IB-IIС стадії.

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

І. Хворий Х., 1940 р. н., історія хвороби № 2420.

Звернувся у відділення пухлин шкіри та м'яких тканин Національного інституту раку зі скаргами на наявність пігментного новоутворення на шкірі спини, що з'явилося 4 роки тому, поступово збільшувалось в розмірах та почало свербіти.

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

23.03.2010 р. під внутрішньовенним наркозом виконано широке висічення меланоми шкіри спини.

Патогістологічний діагноз: Злоякісна епітеліоїдноклітинна меланома шкіри, III-IV рівень інвазії за Clark, 1,5 мм товщина за Breslow, без поверхневого виразкування (патогістологічне дослідження № 9593-9600/10 від 02.04.2010 р.).

Встановлено заключний діагноз: Меланома шкіри спини, T2aN0M0, стадія IB, клінічна група II.

З 06.04.2010 р. розпочато лікування ІФН- $\alpha 2b$ ("Лаферобіон", Україна) підшкірно в дозі 3 млн МО 3 рази на тиждень упродовж 12 міс. Абсолютну кількість CD25⁺-лімфоцитів визначали до хірургічного лікування (16.03.2010 р.) та через 3 міс. від початку ад'ювантної імунотерапії ІФН- $\alpha 2b$ (08.07.2010 р.). Для цього досліджували відносну кількість CD25⁺-лімфоцитів у периферичній крові методом проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл до CD25-антигенів, мічених PE ("Becton Dickinson", США). Результати обчислювали на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Під час обліку результатів підраховували 1×10^3 лімфоцитів. Для обчислення абсолютної кількості CD25⁺-лімфоцитів підраховували вміст лейкоцитів в периферичній крові та лейкоцитарну формулу загальноприйнятим методом. До лікування абсолютна кількість CD25⁺-лімфоцитів в периферичній крові була значно нижчою за показник у практично здорових людей (відповідно $0,07 \times 10^9/\text{л}$ та $(0,42 \pm 0,04) \times 10^9/\text{л}$). Через 3 міс. від початку курсу ІФН- $\alpha 2b$ досліджуваний показник збільшився в 3,3 разу при порівнянні із вихідним значенням і складав $0,23 \times 10^9/\text{л}$, що свідчило про сприятливий перебіг захворювання.

За період спостереження (30 міс.) рецидиву або метастазів пухлини у хворого не виявлено.

II. Хвора П., 1966 р. н., історія хвороби № 6452.

Звернулася у відділення пухлин шкіри та м'яких тканин Національного інституту раку зі скаргами на наявність пігментного новоутворення на шкірі лівої гомілки, яке з'явилося 5 років тому і поступово збільшувалось у розмірах, а за останній місяць змінило забарвлення та стало шорстким.

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

06.07.2010 р. під внутрішньовенним наркозом виконано широке висічення меланоми шкіри лівої гомілки.

Патогістологічний діагноз: Вузлова форма злоякісної переважно веретенноклітинної меланоми з виразкуванням, III-IV рівень інвазії за Clark, товщина за Breslow 1,8 мм (патогістологічне дослідження № 24552-59/10 від 13.07.2010 р.).

Встановлено заключний діагноз: Меланома шкіри лівої гомілки, T2vN0M0, стадія IIA, клінічна група II.

З 15.07.2010 по 23.07.2010 р. проведено курс ІФН- γ ("Ингарон", Російська Федерація) підшкірно в сумарній дозі 2500 тис МО (5 ін'єкцій через день), з 25.07.2010 р. розпочато курс ІФН- $\alpha 2b$ ("Лаферобіон", Україна) підшкірно в дозі 3 млн. МО 3 рази на тиждень упродовж 12 міс. Абсолютну кількість CD25⁺-лімфоцитів визначали до хірургічного лікування (05.07.2010 р.) та через 3 міс. від початку ад'ювантної терапії ІФН- $\alpha 2b$ (28.10.2010 р.). Для цього досліджували відносну кількість CD25⁺-лімфоцитів у периферичній крові хворої методом проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл до CD25-антигенів, мічених PE ("Becton Dickinson", США). Результати обчислювали на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Під час обліку результатів підраховували 1×10^3 лімфоцитів. Для обчислення абсолютної кількості CD25⁺-лімфоцитів підраховували вміст лейкоцитів в периферичній крові та лейкоцитарну формулу загальноприйнятим методом. До лікування абсолютна кількість CD25⁺-лімфоцитів в периферичній крові була нижчою за показник у практично здорових людей (відповідно $0,23 \times 10^9/\text{л}$ та $(0,42 \pm 0,04) \times 10^9/\text{л}$). Через 3 міс. від початку курсу ІФН- $\alpha 2b$ досліджуваний показник збільшився у 2,2 рази і складав $0,50 \times 10^9/\text{л}$, що свідчило про сприятливий перебіг захворювання.

За період спостереження (27 міс.) рецидиву або метастазів меланоми у хворої не виявлено.

Джерела інформації:

1. Adjuvant therapy with high-dose interferon alpha 2b in patients with high-risk stage IIB/III melanoma / J.M. Kirkwood, A.A. Tarhini, S.J. Moschos, M.C. Panelli // Nat. Clin. Pract. Oncol.-2008. - Vol. 5, № 1. - P. 2-3.
- 5 2. Prospective, randomized, multicenter, double-blind placebo-controlled trial comparing adjuvant interferon alfa and isotretinoin with interferon alfa alone in stage IIA and IIB melanoma: European Cooperative Adjuvant Melanoma Treatment Study Group / E. Richtig, H.P. Soyer, M. Posch [et al.] // J. Clin. Oncol.-2005. - Vol. 23, № 34. - P. 8655-8663.
3. Eggermont A.M. Management of melanoma: a European perspective / A.M. Eggermont, C. Voit // Surg. Oncol. Clin. Am.-2008. - Vol. 17, № 3. - P. 635-648.
- 10 4. Химиотерапия диссеминированной меланомы кожи с включением интерферона (γ-ИФН). Клинико-иммунологическое исследование / М.Е. Абрамов, С.Л. Гуторов, Е.Г. Славина [и др.] // Рос. биотер. журн.-2009. - Т. 8, № 1. - С. 64-74 (прототип).
5. Особливості імунного статусу у хворих на меланому шкіри на різних стадіях пухлинного процесу / Ф.В. Фільчаков, С.М. Кукушкіна, К.С. Шуміліна [та ін.] // Клиническая онкология.-2011. - № 2 (2). - С. 36-40.
- 15 6. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека / Б.В. Пинегин, А.А. Ярилин, А.В. Симонова [и др.]: пособие для врачей-лаборантов. - М., 2001.-55 с.
7. Руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2-х ч. / под ред. Базарновой М.А. - К.: Вища школа, 1982.-2 ч.-175 с.
- 20

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 25 Спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на первинно-локалізовану меланому шкіри, що включає виявлення у хворих змін імунореактивності організму в динаміці інтерферонотерапії, який **відрізняється** тим, що у периферичній крові хворих визначають абсолютну кількість CD25⁺-лімфоцитів і в разі її збільшення через 3 міс. від початку проведення ад'ювантної інтерферонотерапії прогнозують сприятливий перебіг захворювання.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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