



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **85577**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/53 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 06460**

(22) Дата подання заявки: **24.05.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.11.2013**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.11.2013, Бюл.№ 22**

(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)**

(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. Функціональну активність лімфоцитів периферичної крові визначають за інтенсивністю спонтанного та індукованого апоптозу.

UA 85577 U

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

Меланома шкіри за рівнем захворюваності посідає друге місце серед злоякісних пухлин шкіри та обумовлює 75 % випадків смерті від новоутворень цієї локалізації [1, 2]. Для меланоми шкіри характерні швидке прогресування, короткі періоди ремісії, здатність метастазувати практично в усі органи і тканини, низька чутливість пухлинних клітин до хіміопрепаратів. Проте саме хворі на меланому шкіри краще відповідають на біологічні методи терапії [3].

Особливості клінічного перебігу меланоми шкіри, включаючи випадки спонтанної регресії пухлини та розвиток паранеопластичних синдромів, а також чисельні факти виявлення у пацієнтів меланомоспецифічних імунних реакцій, вказують на важливу роль імунних механізмів в патогенезі цього захворювання [4-6].

Прогресування захворювання у хворих на меланому шкіри супроводжується розвитком дисфункції імунної системи, ступінь якої залежить від стадії пухлинного процесу та біологічних особливостей первинної пухлини [7].

У зв'язку з цим важливим є оцінка імунологічних показників в комплексному обстеженні хворих на меланому шкіри для визначення індивідуальних особливостей перебігу пухлинного процесу, прогнозування відповіді організму на біотерапію з метою оптимізації тактики лікування.

За прототип вибрано спосіб імунологічного дослідження у хворих на меланому шкіри, за яким хворим на меланому шкіри проводили дослідження імунного статусу з визначенням відносної кількості лімфоцитів периферичної крові за експресією диференційних антигенів ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD24^+$, $CD72^+$, $HLA-DR^+$, $CD38^+$, $CD45RA^+$, $CD50^+$, $CD5^+$, $CD7^+$, $CD71^+$, $CD25^+$, $CD95^+$, $CD16^+$) методом проточної цитофлуориметрії (Кадагидзе З.Г. Современные возможности использования иммунологических показателей при иммунотерапии онкологических больных / З.Г. Кадагидзе, Т.Н. Заботина, О.В. Короткова // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина. РАМН.-1998. - Т. 9, № 1. - С. 50-55).[8].

Перевагою прототипу є можливість оцінки імунологічних параметрів хворих на меланому шкіри, що може бути використано для прогнозування відповіді організму на біотерапію в комплексному лікуванні.

Недоліком прототипу є визначення у хворих на меланому шкіри лише популяційного складу лімфоцитів периферичної крові без урахування їх функціональної активності, що обмежує цілісну оцінку стану імунної системи.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб імунологічного дослідження у хворих на меланому шкіри шляхом визначення методом проточної цитофлуориметрії функціональної активності лімфоцитів периферичної крові за інтенсивністю спонтанного та індукowanego апоптозу, що дозволить розширити можливості моніторингу імунотерапії хворих та допоможе в розробці більш ефективних схем їх застосування.

Поставлена задача вирішується наступним чином:

Хворим з меланомою шкіри після клініко-рентгенологічного обстеження, що включає комп'ютерну томографію головного мозку, органів грудної та черевної порожнини, органів таза, УЗД регіонарних лімфатичних вузлів, до початку лікування проводять імунологічне дослідження. Імунологічне дослідження у хворих на меланому шкіри проводять за допомогою визначення інтенсивності спонтанного та індукowanego апоптозу лімфоцитів периферичної крові. Визначення інтенсивності спонтанного та індукowanego апоптозу лімфоцитів проводять методом проточної цитофлуориметрії з використанням пропідію йодиду ("Sigma", Німеччина), згідно методики [9]. Лімфоцити культивують *in vitro* упродовж 72 годин з фітогемаглютиніном (ФГА, "Sigma", Німеччина) в концентрації 20 мкг/мл або антитілами до $CD3$ (анти- $CD3$, "МедБіоСпектр", Російська Федерація) в концентрації 3 мкг/мл. Результати обчислюють на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Під час обліку результатів підраховують 10×10^3 лімфоцитів та визначають серед них відсоток апоптотичних клітин.

За заявленим способом імунологічне дослідження було проведено у 33 хворих з гістологічно підтвердженим діагнозом меланоми шкіри.

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

І. Хвора К., 1958 р. н., історія хвороби № 14107.

Звернулась у відділення пухлин шкіри та м'яких тканин Національного інституту раку зі скаргами на наявність пігментної пухлини на шкірі спини, що з'явилась в 2010 році і влітку 2011 року стала інтенсивно рости, мокнути та періодично кровити.

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.

27.12.2011 р. під внутрішньовенним наркозом виконано широке висічення меланоми шкіри спини та біопсія "сторожового" лімфатичного вузла лівої пахвової ділянки.

Патогістологічний висновок № 56628-35/11 від 05.01.2012 р.: вузлова форма злоякісної епітеліоїдноклітинної меланоми шкіри з поверхневим виразкуванням та некрозами тканин пухлини, IV рівень інвазії за Clark, товщина пухлини за Breslow більш ніж 6,0 мм. В "сторожовому" лімфатичному вузлі метастази меланоми не визначаються.

Встановлено заключний діагноз: меланома шкіри спини, T4bN0M0, стадія IIC, клінічна група II.

20.11.2011 р. хворій до початку лікування провели імунологічне дослідження з визначенням інтенсивності спонтанного та індукованого апоптозу лімфоцитів периферичної крові методом проточної цитофлуориметрії з використанням пропідію йодиду ("Sigma", Німеччина), згідно з методикою. Лімфоцити культивували in vitro упродовж 72 годин з ФГА ("Sigma", Німеччина) в концентрації 20 мкг/мл або анти-CD3 ("МедБіоСпектр", Російська Федерація) в концентрації 3 мкг/мл. Результати обчислювали на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Під час обліку результатів підраховували 10×10^3 лімфоцитів та визначали серед них відсоток апоптотичних клітин.

Інтенсивність анти-CD3-індукованого апоптозу була в межах норми (12,8 % проти $(12,1 \pm 1,1) \%$ у практично здорових людей (ПЗЛ)), рівень спонтанного та ФГА-індукованого апоптозу був нижчим за такий у ПЗЛ (відповідно 6,8 % проти $(9,9 \pm 0,7) \%$ та 12,6 проти $(31,8 \pm 1,4) \%$).

За період спостереження (17 міс.) рецидиву або метастазів пухлини у хворої не виявлено.

II. Хворий С, 1955 р. н., історія хвороби № 7033.

Звернувся у відділення пухлин шкіри та м'яких тканин Національного інституту раку зі скаргами на наявність пігментної пухлини на шкірі спини, що з'явилась 1 рік тому та швидко збільшувалась у розмірах.

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.

19.06.2012 р. під внутрішньовенним наркозом виконано широке висічення меланоми шкіри спини та біопсія "сторожового" лімфатичного вузла лівої пахвової ділянки.

Патогістологічний висновок № 28835-42/12 від 26.06.2012 р.: вузлова форма злоякісної епітеліоїдноклітинної меланоми шкіри, III рівень інвазії за Clark, товщина пухлини за Breslow більш ніж 2,3 мм. В "сторожовому" лімфатичному вузлі метастази меланоми не визначаються.

Встановлено заключний діагноз: меланома шкіри спини, T3aN0M0, стадія IIA, клінічна група II.

14.06.2012 р. хворому до початку лікування провели імунологічне дослідження з визначенням інтенсивності спонтанного та індукованого апоптозу лімфоцитів периферичної крові методом проточної цитофлуориметрії з використанням пропідію йодиду ("Sigma", Німеччина), згідно з методикою. Лімфоцити культивували in vitro упродовж 72 годин з ФГА ("Sigma", Німеччина) в концентрації 20 мкг/мл або анти-CD3 ("МедБіоСпектр", Російська Федерація) в концентрації 3 мкг/мл. Результати обчислювали на проточному цитофлуориметрі FACScan ("Becton Dickinson", США) з використанням програми "Cell Quest". Під час обліку результатів підраховували 10×10^3 лімфоцитів та визначали серед них відсоток апоптотичних клітин.

Інтенсивність ФГА-індукованого апоптозу була в межах норми (32 % проти $(31,8 \pm 1,4) \%$ у ПЗЛ), рівень спонтанного та анти-CD3-індукованого апоптозу був вищим за такий у ПЗЛ (відповідно 13 % проти $(9,9 \pm 0,7) \%$ та 22,8 проти $(12,1 \pm 1,1) \%$).

За період спостереження (12 міс.) рецидиву або метастазів пухлини у хворого не виявлено.

Джерела інформації:

1. Проблема меланоми в Україні / С.И. Коровин, Л.О. Гулак, З.П. Федоренко [и др.] // Онкология. - 2010. - Т. 12, № 1(спец. выпуск). - С. 46-52.

2. Имянитов Е.Н. Эпидемиология и биология опухолей кожи / Е.Н. Имянитов // Практическая онкология. - 2012. - Т. 13, № 2. - С. 61-68.

3. Биологические методы лечения онкологических заболеваний: Пер. с англ. / Под ред. В.Т. ДеВита, С. Хеллмана, С.А. Розенберга. - М.: Медицина, 2002. - 936 с.

4. Romero P. The human T cell response of cancer to melanoma antigens / P. Romero, J.C. Cerottini, D.E. Speiser // Adv. Immunol.-2006. - Vol. 92. - P. 187-224.

5. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens / E. Stockert, E. Jager, Y. Chen [et al.] // J. Exp. Med.-1998. - Vol. 187, № 8. - P. 1349-1354.

6. Antibody responses on melanoma/melanocyte autoantigens in melanoma patients / S.K. Huang, T. Okamoto, D.L. Morton [et al.] // J. Invest. Dermatol.-1998. - Vol. 111, № 4. - P. 662-667.
7. Клинико-лабораторные критерии диагностики иммунной дисфункции у больных меланомой кожи / Ф.В. Фильчаков, С.Н. Кукушкина, Е.С. Шумилина [и др.] // Онкология. - 2012. - Т. 14, № 2. - С. 139-144.
8. Кадагидзе З.Г. Современные возможности использования иммунологических показателей при иммунотерапии онкологических больных / З.Г. Кадагидзе, Т.Н. Заботина, О.В. Короткова // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина. РАМН.-1998. - Т. 9, № 1. - С. 50-55 (прототип).
9. 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.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 15 Спосіб імунологічного дослідження у хворих на меланому шкіри, що включає виявлення змін імунної системи методом проточної цитофлуориметрії, який **відрізняється** тим, що функціональну активність лімфоцитів периферичної крові визначають за інтенсивністю спонтанного та індукованого апоптозу.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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