



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 107891

(13) U

(51) МПК

G01N 33/55 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 12668**

(22) Дата подання заявки: **21.12.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **24.06.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **24.06.2016, Бюл.№ 12**

(72) Винахідник(и):

**Барілка Віра Анатоліївна (UA),
Матлан Володимир Львович (UA),
Шалай Ольга Олексіївна (UA),
Примає Софія Василівна (UA),
Логінський Володимир Євстахович (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ПАТОЛОГІЇ КРОВІ ТА ТРАНСФУЗІЙНОЇ
МЕДИЦИНИ НАМН УКРАЇНИ",
вул. Генерала Чупринки, 45, м. Львів, 79044
(UA),
Барілка Віра Анатоліївна,
вул. Івана Пулюя, 8/29, м. Львів, 79071 (UA),
Матлан Володимир Львович,
вул. Кишиця, 7/30, м. Львів, 79058 (UA),
Шалай Ольга Олексіївна,
вул. О. Довженка, 11/46, м. Львів, 79070
(UA),
Примає Софія Василівна,
вул. Антоновича, 24, м. Львів, 79013 (UA),
Логінський Володимир Євстахович,
вул. Бойчука, 3/22, м. Львів, 79053 (UA)**

**(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ НЕХОДЖКІНСЬКИХ ЛІМФОМ ЗА РІВНЕМ
ТРАНСФОРМУЮЧОГО ФАКТОРА РОСТУ БЕТА 1 ТА СТАНОМ АКТИВНОСТІ ПРИРОДНИХ КІЛЕРІВ У
КРОВІ**

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування неходжкінських лімфом з метою підвищення ефективності прогнозу та перебігу хвороби, крім оцінки клінічного стану пацієнтів за критеріями Міжнародного Прогностичного Індексу, проводиться визначення загальної концентрації, латентної та активної форм трансформуючого фактора росту бета 1 у плазмі крові та живильних середовищах мононуклеарів периферичної крові у взаємозв'язку з цитотоксичною активністю природних кілерів перед та після лікування пацієнтів.

UA 107891 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до онкогематології, і може застосовуватися для прогнозування, перебігу та оцінки відповіді на лікування пацієнтів з неходжкінськими лімфомами (НХЛ). Запропонований спосіб стосується вперше виявлених та лікованих пацієнтів з НХЛ, незалежно від застосованих схем поліхіміотерапії, у клініках гематологічного профілю. НХЛ належать до поширених летальних неоплазій лімфоїдної тканини, з переважаючим В-клітинним пухлинним субстратом на різних стадіях онтогенезу, і характеризуються значними імунними порушеннями та тривалістю безрецидивного виживання. На початку 2014 р. захворюваність на НХЛ становила 3,20 на 100 тис. дорослого населення України.

Відомими способами для діагностики і клінічного перебігу НХЛ виступають критерії Міжнародного Прогностичного Індексу (ІРІ). Однак застосування лише критеріїв ІРІ не завжди дозволяють прогнозувати перебіг НХЛ. Поки що не виділено генетичних і фенотипових ознак субстратних пухлинних клітин, які дали б можливість чітко ідентифікувати групи хворих на НХЛ. До важливих прогностичних маркерів НХЛ, включених до переліку Міжнародного Прогностичного Індексу (ІРІ), належать секретовані цитокіни [1]. Прогресування НХЛ супроводжується порушенням виробленням трансформуючого фактора росту бета 1 (TGFβ1), ізомеру з одноїменної родини цитокінів, TGFβs. Важливим джерелом вироблення TGFβ1 у кров виступають мононуклеари периферичної крові (МНПК) у відповідь на патологічний процес, а також лімфоїдна тканина лімфатичних вузлів, селезінки, уражених НХЛ. TGFβ1 - потужний інгібітор росту клітин епітеліального, ендотеліального і гематопоетичного походження, стимулятор росту сполучної тканини, продукції протеїнів позаклітинного матриксу, супресор імунної протипухлинної активності природних кілерів (NK) [2, 3]. Активність NK у протипухлинному захисті організму надзвичайно важлива. NK здатні першими впізнавати та знищувати вірусифіковані та неопластичні клітини. TGFβ1β1 - неглікозильований димерний протеїн з мол.м. 25 kDa, який, на відміну від інших цитокінів, виробляється тканинами в активній і неактивній, латентній, формах, в комплексі з маскувальними протеїнами (latency-associated peptide-LAP). Останні захищають TGF β1 і забезпечують тривале депонування фактора в організмі. Біологічні властивості має лише активна форма TGFβ1, яка аутокринно виробляється клітинами у середовищі або активується після обробки фізіологічними активаторами [4]. В умовах *in vivo* активація TGFβ1 здійснювалася, переважно, протеїном, тромбоспондином-1, у середовищі клітин хронічної лімфоцитарної лейкемії (ХЛЛ), з чим пов'язують млявий перебіг ХЛЛ та фолікулярних індолентних НХЛ [2]. Природа багатьох інших активаторів до тепер остаточно не встановлена. Відомо, що латентний фактор LTBP-TGFβ1 депонується у тромбоцитах, кістках, позаклітинному матриксі і нагромаджується у плазмі крові, що дає можливість визначати концентрацію протеїну при різних патологічних станах [2-4]. Звільнення активного поліпептиду у дослідних зразках здійснюють концентрованими кислотами, лугами, після чого вони стають придатними для визначення загальної концентрації TGFβ1 в умовах *in vitro*. Активний TGFβ1 визначається у середовищі без попередньої обробки від латентних протеїнів. Не дивлячись на високу продукцію TGFβ1 у пухлинному мікрооточенні та нагромадженні фактора у крові, клітини НХЛ втрачають чутливість до ростового інгібування TGFβ1 на розгорнутих стадіях хвороби, стають резистентними до хіміотерапії і цитотоксичного впливу NK [2-6].

Найближчим за сукупністю ознак, подібних до сукупності суттєвих ознак даної корисної моделі, є спосіб прогнозування НХЛ за показниками лише загальної концентрації TGFβ1 у сироватці крові пацієнтів, без урахування продукції цитокіну у вільній, активній та латентній, неактивній формах [2, 3].

Поряд з цим, недоліком існуючих способів прогнозування НХЛ є відсутність оцінки секреторних властивостей TGFβ1 у кров з боку МНПК, у відповідь на патологічний процес. В існуючих способах загальний рівень TGFβ1 визначений імунологічними методами, з використанням фірмових наборів ELISA, які можуть виявляти неактивні епітопи молекул TGFβ1, що спотворює уяву про реальну поведінку TGFβ1 в організмі [2, 3]. Кількість NK у крові пацієнтів з НХЛ, визначена методом проточної цитофлюориметрії, була достовірно нижчою, ніж у здорових осіб, і відновлювалася до нормальних показників після курсу хіміотерапії [5]. Однак за допомогою цього методу не врахована функціональна, цитотоксична активність NK при дії на пухлинні клітини [5]. Активність NK при неоплазіях намагаються відновити різними способами, зокрема трансфекцією генів прозапальних цитокінів, TNF, IL-2, обробкою аутологічних пухлинних антигенів до появи лімфокінактивованих кілерів (LAK) у культурі *in vitro*. Останні мали більшу протипухлинну активність в культурі *in vitro*, ніж аутологічні NK. Однак такі підходи не

давали бажаних результатів. Ці клітини інактивувалися після введення LAK дослідним тваринам у кров з високою концентрацією TGF β 1 [7].

В основу корисної моделі поставлено задачу створити спосіб прогнозування НХЛ, мішенню якої будуть не безпосередньо неопластичні клітини НХЛ, а фактор пухлинного мікрооточення, TGF β 1.

Поставлена задача вирішується тим, що у запропонованому способі, згідно з корисною моделлю, проводять визначення загальної, латентної та активної форм TGF β 1 у плазмі крові і в кондиціонованих живильних середовищах (КЖС) МНПК на різних етапах лікування пацієнтів з різними гістологічними типами НХЛ. Отримані результати порівнюють з цитотоксичною активністю NK. Такі зміни досягаються застосуванням певних методів лабораторного дослідження. У запропонованому способі дослідження пацієнтів з НХЛ ми вибрали біологічні методи визначення загальної, активної, латентної форм TGF β 1, а також цитотоксичної активності NK у периферичній крові пацієнтів з НХЛ. Вони ґрунтуються, у випадку визначення TGF β 1, на проліферативній відповіді клітин-мішеней трансформованого ендотелію легенів норки лінії CCL64 (Mv.1.Lu), на які TGF β 1 чинить дозозалежний рістінгібіторний вплив [8]. Цитотоксичну активність NK у периферичній крові пацієнтів пропонується визначати після спільної інкубації МНПК пацієнтів з НХЛ з клітинами еритробластної лейкемії людини лінії K562 [9].

Спосіб прогнозування перебігу НХЛ здійснюють таким чином: на момент прийняття пацієнта у клініку проводять ретельну оцінку анамнезу хвороби та диференціальну діагностику НХЛ, відповідно до критеріїв IPI Національного інституту раку (NCI, США). Після підтвердження діагнозу НХЛ, та перед проведенням курсу хіміотерапії рекомендовано отримувати матеріал для дослідження (периферичну кров) у пацієнтів. Забір периферичної крові проводять натще, в стерильних умовах, в окрему стерильну пробірку з додаванням гепарину (5 од/мл), в об'ємі 10,0 мл. Після центрифугування плазму відбирають в окремі віали і зберігають при мінус 20 °С (не більше 1 року). Осад клітин крові нашаровують на градієнт щільності верографін-фіколу ($\rho=1,077$) для отримання моноклеарів периферичної крові (МНПК). Одну порцію МНПК інкубують у поживному середовищі (в концентрації 500 тис./мл впродовж 24 год., в атмосфері CO $_2$ за 37 °С) для отримання живильних середовищ МНПК, а іншу порцію МНПК використовують для визначення цитотоксичної активності NK [9]. Надосадову рідину 24-годинних культур МНПК збирають в окремі віали і зберігають до моменту визначення концентрації TGF β 1. Вищезазначені показники пропонують визначати біологічними методами, які ґрунтуються на дозозалежній проліферативній відповіді клітин-мішеней трансформованого ендотелію легенів норки лінії CCL64 (Mv.1.Lu) в присутності дослідних зразків [8]. Природну цитотоксичність NK визначають після спільної інкубації МНПК пацієнтів з НХЛ з клітинами еритробластної лейкемії людини лінії K562 (у співвідношенні 1:20) [9].

Статистичну обробку результатів проводили за критерієм різниці тесту Стюдента (t); вірогідність різниці між середніми величинами двох сукупностей приймалося за $p < 0,05$. Взаємозв'язок між концентрацією TGF β 1 у дослідних зразках плазми крові, КЖС МНПК та показниками цитотоксичності NK на різних етапах лікування пацієнтів з НХЛ встановлювали за коефіцієнтом кореляції (r), який обчислювали у програмі Excel.

Запропонована корисна модель застосована 106-ти пацієнтів з різними типами НХЛ, які були прийняті у клініку ДУ "Інституту патології крові та трансфузійної медицини НАМН України" для надання медичної допомоги. Встановлено, що рівень TGF β 1 у плазмі крові пацієнтів з агресивними гістологічними типами НХЛ був вищим і становив $5,53 \pm 1,06$ нг/мл, ніж у пацієнтів з індолентними типами НХЛ ($3,42 \pm 0,62$ нг/мл), і вірогідно статистично вищим, ніж у плазмі крові здорових осіб ($2,11 \pm 0,38$ нг/мл; $p < 0,001$).

Загальний вміст TGF β 1 у КЖС МНПК, нестимульованих міогенами, був статистично нижчим ($5,82 \pm 0,42$ нг/мл), ніж у здорових осіб ($7,85 \pm 0,08$ нг/мл; $p < 0,05$). Питома частка секреції TGF β 1, яка відображала співвідношення між концентрацією TGF β 1 у живильних середовищах МНПК до загального вмісту TGF β 1 у плазмі крові пацієнтів з НХЛ, виявилася статистично нижчою ($1,86 \pm 0,24$ нг/мл), ніж у здорових осіб ($3,22 \pm 0,44$ нг/мл; $p < 0,01$). Показник питомої частки секреції TGF β 1 у живильних середовищах МНПК був найнижчим у пацієнтів з агресивними типами НХЛ ($1,15 \pm 0,27$ нг/мл) в порівнянні з пацієнтами з індолентними формами хвороби ($p < 0,001$), що вказує на недостатню продукцію TGF β 1 у відповідь на патологічний процес.

У плазмі крові та живильних середовищах МНПК пацієнтів з НХЛ переважала латентна форма TGF β 1. Результати наведені у табл. 1.

У плазмі крові цей показник був достовірно вищим ($5,06 \pm 1,38$ нг/мл) порівняно з рівнем активної форми цитокіну ($0,65 \pm 0,3$ нг/мл; $p < 0,001$). У живильних середовищах МНПК рівень

латентної форми також був достовірно вищим ($6,86 \pm 1,42$ нг/мл), ніж вміст активної форми TGF β 1 ($0,42 \pm 0,20$ нг/мл; $p < 0,001$). При цьому рівень активної форми TGF β 1 у КЖС МНПК пацієнтів з НХЛ був достовірно нижчим, ніж у пацієнтів з ХЛЛ ($p < 0,001$), що може бути важливою умовою млявого перебігу ХЛЛ, ніж швидкоплинних агресивних НХЛ. Слід зазначити, що у 70 % зразків КЖС МНПК пацієнтів з агресивними типами НХЛ активна форма TGF β 1 не визначалася взагалі.

Таблиця 1

Вміст латентної і активної форми TGF β 1 у плазмі крові та КЖС МНПК хворих на НХЛ та ХЛЛ

Показники	Концентрація TGF β 1 (нг/мл)		
	Латентна форма	Активна форма	% активної форми
У плазмі крові хворих на НХЛ	$5,06 \pm 1,38^*$	$0,65 \pm 0,3$	$30,62 \pm 14,7^{**}$
У КЖС МНПК хворих на НХЛ	$6,86 \pm 1,42^*$	$0,42 \pm 0,2$	$5,62 \pm 3,56$
У плазмі хворих на ХЛЛ	$5,4 \pm 1,02^{****}$	$0,65 \pm 0,3^{**}$	$12,0 \pm 5,3$
У КЖС МНПК хворих на ХЛЛ	$4,09 \pm 0,9^*$	$2,306 \pm 0,8^*, ***$	$56,4 \pm 7,0^*, ***, \Delta$

Примітки:

* Вірогідно вищий рівень латентної форми, ніж активної форми у плазмі крові і КЖС МНПК порівняно з КЖС МНПК, в обох випадках, ($p < 0,001$)

** Вірогідно вищий рівень активної форми у плазмі крові порівняно з КЖС МНПК, ($p < 0,02$);

*** вірогідні зміни у КС МНПК порівняно до вмісту активної форми у плазмі, $p < 0,001$;

**** вірогідні зміни у КС МНПК порівняно до вмісту латентної форми у плазмі, $p < 0,001$;

Δ - вірогідно вищий рівень активної форми TGF β 1 у КЖС МНПК пацієнтів з ХЛЛ, ніж у КЖС МНПК пацієнтів з НХЛ; $p < 0,001$

Цитотоксична активність природних кілерів (NK) периферичної крові хворих на НХЛ становила $14,50 \pm 1,53$ % і була вірогідно нижчою, ніж у здорових осіб ($22,24 \pm 0,84$ %; $p < 0,001$). Найнижчими показники цитотоксичності NK були у пацієнтів з агресивними формами НХЛ ($9,75 \pm 1,76$ %), які вірогідно відрізнялися від показників пацієнтів з індолентними типами хвороби ($15,7 \pm 1,80$ %; $p < 0,05$) і здорових осіб ($p < 0,001$). Активність NK перебувала у негативній кореляції з концентрацією TGF β 1 у КЖС МНПК ($r = -0,620$), що вказувало на роль TGF β 1 у гальмуванні активності NK.

Таким чином, секреція TGF β 1 при НХЛ порушена. Рівень секреції TGF β 1 МНПК пацієнтів з НХЛ виявився недостатнім для гальмування росту субстратних клітин та негативно корелював з активністю NK при агресивних НХЛ. Достовірно вища аутокринна секреція TGF β 1 пухлинним клоном при агресивних НХЛ, ніж при індолентних типах хвороби чи у здорових осіб, вказувала на причетність TGF β 1 до прогресування НХЛ і зумовлена порушенням механізму активації латентної форми TGF β 1 та супроводжувалася зниженою активністю NK. Отже, для отримання більш ґрунтовних даних у прогнозуванні, перебігу НХЛ та індивідуальному підборі тактики лікування пацієнтів з різними типами НХЛ, важливе значення має визначення концентрації активної і латентної форм TGF β 1 у периферичній крові у взаємозв'язку з цитотоксичною активністю NK у крові. Такий спектр та алгоритм проведення досліджень рекомендовано для прогнозування перебігу НХЛ та індивідуального підбору тактики лікування пацієнтів. Запропонований спосіб дозволяє покращити прогнозування, перебіг та чутливість до лікування пацієнтів з НХЛ і таким чином доповнити перелік діагностичних і терапевтичних маркерів при НХЛ, загальної, латентної та активної форм TGF β 1 у плазмі крові та КЖС МНПК у взаємозв'язку з цитотоксичною активністю NK.

Джерела інформації:

1. Vaidya R. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X) CHOP era / R. Vaidya, T. E. Witzig // Annals of Oncology. - 2014. - Vol. 25. - P. 2124-2133.

2. Serum cytokines in follicular lymphoma. Correlation of TGF- β and VEGF with survival /S. I. Labidi, C Menetrier-Caux, S. Chabaud [et al.] // Ann Hematol. - 2010. - Vol. 89. - P. 25-33.

3. Prognostic utility of transforming growth factor beta-1 in diffuse large cell non-Hodgkin lymphoma /A. M. El-Hefnia, Nshwa A. Azzazi, Samar M. Sharaf// J Hematol. - 2015 - Vol. 4(1). P. 131-136.

5 4. Saha P. S. Different in Vitro activation methods for latent transforming growth factors (TGF) β : considerable exogenous factors to promote higher mesenchymal-origin cell proliferation in a bioprocessing platform / P. S. Saha, M. Doran // Biomedical Science and Engineering. - 2014. - Vol. 2, N.1. - P. 5-12.

10 5. Clinical significance of T cell subgroups and NK cells' detection in peripheral blood of diffuse large B-cell lymphoma patients / Q. Wen-bin, J.I.A. Cun-dong, G. Xia [et al.] // J Leuk. Lymph. - 2012. - Vol. 21, Is. 09. - P. 534-536.

6. Involvement of transforming growth factor leta-1 (TGF β 1) cytokine and FOXP3 transcription factor genetic polymorphisms in hematological malignancies /G. Akelington, F. Vitiello, R. L. Guembarovski [et al.] / Braz. Arch. Biol. Technol. - 2015. Vol. 58, N.4. - P. 553-561.

15 7. Cancer-induced alterations of NK-mediated target recognition: current and investigational pharmacological strategies aiming at restoring NK-mediated anti-tumor activity / A.-S. Chretien, A. le Roy, N. Vey [et al.] // Frontiers in Immunology/ NK Cell Biology. - 2014. - Vol. 5. - Article 122. - Режим доступу до журн.: www.frontiersin.org

20 8. Визначення концентрації трансформуючого фактора росту бета 1 у плазмі крові онкологічних та гематоонкологічних хворих біологічним методом / В.А. Барілка, В.Л.Матлан, Н.А. Володько [та ін.] // Лабораторна діагностика. - 2004. - № 3. - С. 15-20.

9. Продукція інтерлейкіну-2 і активована ним цитотоксичність моноклеарних клітин хворих із злоякісними лімфомами / В.Л. Матлан, В.А. Барілка, С.В. Новак [та ін.] // Онкологія. - 2002. - 4, № 1. - С. 25-29.

25

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування неходжкінських лімфом, який **відрізняється** тим, що з метою підвищення ефективності прогнозу та перебігу хвороби, крім оцінки клінічного стану пацієнтів за критеріями Міжнародного Прогностичного Індексу, проводиться визначення загальної концентрації, латентної та активної форм трансформуючого фактора росту бета 1 у плазмі крові та живильних середовищах моноклеарів периферичної крові у взаємозв'язку з цитотоксичною активністю природних кілерів перед та після лікування пацієнтів.

30