



УКРАЇНА

(19) UA (11) 47094 (13) U  
(51) МПК (2009)  
A61F 9/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РЕЦИДИВУ ЕПІТЕЛІАЛЬНОЇ ПУХЛИНИ СЛІЗНОЇ ЗАЛОЗИ З ВИКОРИСТАННЯМ НАБОРУ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ CD 16, CD 25, CD 95**

1

2

(21) u200909526

(22) 17.09.2009

(24) 11.01.2010

(46) 11.01.2010, Бюл.№ 1, 2010 р.

(72) ПОЛЯКОВА СВІТЛАНА ІВАНІВНА, ВЕЛИЧКО  
ЛЮДМИЛА МИКОЛАЇВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ОЧНИХ  
ХВОРОБ І ТКАНИННОЇ ТЕРАПІЇ ІМ. В.П. ФІЛАТОВА  
АМН УКРАЇНИ"

(57) Спосіб прогнозування рецидиву епітеліальної  
пухлини слізної залози, за яким проводять імунно-

цитохімічний аналіз периферичної крові з використанням набору моноклональних антитіл CD 16, CD 25, CD 95 і визначають абсолютний рівень вмісту цих CD і, якщо  $CD\ 16 \leq 183$  кл/мкл,  $CD\ 25 \leq 218$  кл/мкл і  $CD\ 95 \leq 283$  кл/мкл, прогнозують рецидив пухлини і визначають групу ризику хворих на можливість розвитку рецидиву пухлини слізної залози епітеліального генезу.

Корисна модель відноситься до медицини, конкретно до офтальмоонкології і може бути використана для підвищення ефективності лікування пухлин слізної залози.

Новоутворення слізної залози у 50 % випадків є злоякісними пухлинами епітеліального генезу [А.Ф.Бровкина, 2002, 2008; С.И.Полякова, 1988; Chuo Ni et al., 1982; Rose Geoffrey E., Wright J.E., 1992, Henderson J., 1994]. Разом з тим як доброякісні (плеоморфна аденома), так і злоякісні (рак у плеоморфній аденомі, аденокарцинома, аденокістозна карцинома) пухлини слізної залози епітеліального генезу схильні до рецидивів та метастазів. За даними літератури рецидиви та метастази цих пухлин розвиваються от 26 до 61 % випадків в перші три роки після лікування. Переродження доброякісної пухлини (плеоморфної аденоми) у різні форми раку, аденокарциному, аденокістозний рак відбувається от 16,4 до 57,1 % випадків [А.Ф.Бровкина, 2002, 2008; С.И.Полякова, 1988; Chuo Ni et al., 1982; Rose Geoffrey E., Wright J.E., 1992]. Смерть від метастазів та продовженого росту пухлини у порожнину черепа складає 50 % у перші п'ять років після хірургічного лікування. У зв'язку з цим, дуже важливим є можливість прогнозування вірогідності розвитку рецидиву пухлини на ранньому доопераційному етапі обстеження, бо від цього залежить вибір найбільш правильної тактики лікування та кінцевий результат захворювання.

На цей час практично немає методів діагностики можливості розвитку рецидиву пухлини слізної залози.

На теперішній час відомо, що специфічна імунна реакція організму на чужорідні антигени, у тому числі і пухлинні, відбувається імункомпетентними клітинами - Т і В-лімфоцитами і макрофагами. Участь цих клітин та їх тісний функціональний зв'язок у відповідальній імунній реакції сумніву не викликає. Однак до теперішнього часу залишаються ще недостатньо вивченими конкретні механізми взаємовідносин між ними у процесі формування імунітету.

Антигени, які надходять в організм із зовні, або які утворюються у ньому самому під впливом біологічних та фізично-хімічних факторів, підлягають особливій переробці макрофагами, після чого продукти цієї обробки поступають до Т і В-лімфоцитів. Взаємодія між Т- і В-лімфоцитами і макрофагами відбувається молекулами специфічних імуноглобулінів, які локалізуються на поверхні їх зовнішніх мембран, а також іншими продуцируемими ними медіаторами. Крім функції розпізнання антигенів, Т-лімфоцитам присутній і другий захисний механізм. Вони можуть руйнувати клітини з локалізованими на їх поверхні чужорідними антигенами.

Цитотоксичну функцію імунні Т-лімфоцити проявляють і відносно клітин пухлини, якщо на їх оболонках присутні чужорідні для організму антигени. Вважається загально признаним що клітинні фактори імунітету і, насамперед Т-лімфоцити, натуральні кілери та макрофаги виконують основну функцію захисту організму від розвитку пухлинного процесу.

Антитіла, тобто специфічні продукти, які виро-

(19) UA (11) 47094 (13) U

бляються плазматичними клітинами під дією чужорідних антигенів, є одним з основних факторів придбаного імунітету. Специфічність антитіл - одне з важливіших їх якостей. Антитіла до одного з видів антигену з іншими видами не взаємодіють, якщо вони не мають загальних антигенних детермінант.

Завдяки своїй специфічності антитіла знайшли широке використання для аналізу антигенної подібності пухлинних і нормальних тканин, а також виявлення антигенної подібності і різниці між ними.

Вивчення клітинних і гуморальних імунних реакцій у процесі розвитку злоякісних новоутворень людини внесло суттєвий теоретичний і практичний внесок у цю проблему [Д.Ф.Глузман, 19935].

У теперішній час існують як відспецифічні антигени до різних тканин, так і до антигенів лейкоцитів людини, яких на теперішній час відомо біля 300 [Косяков П.Н., Косякова Н.П., 1985]. Імунофенотипування їх виконується за допомогою моноклональних антитіл (МкАТ), які використовуються не тільки для диференціальної діагностики пухлин, але й для вибору оптимальних схем лікування [Глузман Д.Ф., Склярєнко Л.М., Надгорная В.А., 2003].

Роботи з приводу використання моноклональних антитіл в диференціальній діагностиці пухлин слізної залози практично відсутні або носять характер одиничних повідомлень про використання

якогось конкретного CD [Hillman G.G., Puri R.K., Kukuruga M.A. et al., 1994; Hasegava M., Hagiwara S., Sato T. et al., 2007].

Робіт, присвячених вивчання можливості прогнозування рецидивів пухлин слізної залози за допомогою моноклональних антитіл, у доступних інформаційних джерелах авторами не знайдено.

Завданням корисної моделі є можливість використання набору моноклональних антитіл CD 16, CD 25, CD 95 для поліпшення ефективності лікування новоутворень слізної залози епітеліального генезу.

Пропонований спосіб заключається в тому, що виявлені значення рівня абсолютного вмісту у периферичній крові хворих епітеліальними пухлинами слізної залози CD 16, CD 25 і CD 95, при яких можливо прогнозувати вірогідність розвитку рецидиву пухлини слізної залози епітеліального генезу.

Технічний результат, який може бути отриманий при реалізації корисної моделі складається з того, що визначені порогові значення рівня абсолютного вмісту в периферичній крові хворих епітеліальними пухлинами слізної залози  $CD\ 16 \leq 183$  кл/мкл,  $CD\ 25 \leq 218$  кл/мкл і  $CD\ 95 \leq 283$  кл/мкл, при яких можливо прогнозувати вірогідність розвитку рецидиву пухлини і виділяти таких хворих у групу ризику ( $p = 0,001$ ).

Практична реалізація цього способу можлива в умовах як стаціонара, так і амбулаторно.

#### Причинно-наслідкові зв'язки:

Причина	Наслідок
Визначення абсолютного рівня вмісту $CD\ 16 \leq 183$ кл/мкл, $CD\ 25 \leq 218$ кл/мкл і $CD\ 95 \leq 283$ кл/мкл у периферичній крові хворих епітеліальними пухлинами слізної залози	дозволяє при значеннях $CD\ 16 \leq 183$ кл/мкл, $CD\ 25 \leq 218$ кл/мкл і $CD\ 95 \leq 283$ кл/мкл у периферичній крові хворих на епітеліальну пухлину слізної залози прогнозувати розвиток рецидиву і виділити цих хворих у групу ризику можливого розвитку рецидиву пухлини

Переваги розробленого способу прогнозування можливості розвитку рецидиву пухлини слізної залози епітеліального генезу складаються з того, що досягається можливість на ранньому етапі доопераційного обстеження визначити найбільш правильну тактику лікування, що дозволяє запобігти рецидиву пухлини, тим самим підвищити ефективність лікування хворих на епітеліальні пухлини слізної залози і вплинути на кінцевий результат пухлинного процесу.

Опис способу.

У хворого надшесерця з кубертальної вени за допомогою стерильного одноразового шприцу беруть 5 мл крові у стерильну пробірку з 1 мл розчину гепарину активністю 100 од. Із венозної крові отримують суспензію клітин, які виділяються в градієнті щільності фікол - верографіну ( $d = 1,076 - 1,078$ ) методом центрифугування. На предметне скло наносять по 25 - 30 мкм суспензії клітин у концентрації 2-4 млн/мл і готують сім мазків крові відповідно кількості використаних моноклональних антитіл. Далі отримані мазки крові фіксуються у камері для фіксації парами 10 % розчину формаліну. Після цього на мазки крові наносять моно-

специфічні сироватки моноклональних антитіл і інкубують їх у вологій камері один час при кімнатній температурі. Після цього струшують антитіла першого шару і промивають скло. Далі наносять антитіла другого шару - специфічні антитіла проти імуноглобулінів миші і інкубують у вологій камері 30 хвилин при кімнатній температурі. Далі струшують антитіла другого шару, промивають мазок та фільтрувальним папером видаляють зайву вологу. Після цього для візуалізації клітин наносять ПАП - комплекс і інкубують у вологій камері при кімнатній температурі 30 хвилин. Ядра клітин фарбують метиловим зеленим або гематоксиліном Майєра, висушують на повітрі. Під імерсійним світлооптичним мікроскопом проводять рахунок кількості клітин лімфоцитів з червоним обідком (клітини, які експрисуєють моноклональні антитіла) на 100 звичайних лімфоцитів, отримуючи таким чином відносну кількість клітин в %. Помножуючи отримане число на загальну кількість лімфоцитів, отримують абсолютну кількість клітин в кл/мкл.

Таким чином, як видно із проведеного аналізу, кінцева мета корисної моделі забезпечується су-

купністю істотних відмінних ознак.

Клінічні випробування проводилися у відділенні мікрохірургічного лікування хворих на новоутворення органа зору ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П.Філатова АМН України». Усього під спостереженням перебувало 28 пацієн-

тів з пухлинами слізної залози епітеліального генезу.

Таким чином, проведене дослідження дозволило поліпшити ефективність лікування хворих на пухлини слізної залози.