



УКРАЇНА

(19) UA (11) 39026 (13) U  
(51) МПК (2009)  
A61B 10/00  
G01N 33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ЕКСПРЕСНОЇ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ІМУНІЗАЦІЇ

1

(21) u200809004

(22) 09.07.2008

(24) 26.01.2009

(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 2009 р.

(72) ВОЛЯНСЬКИЙ АНДРІЙ ЮРІЙОВИЧ, UA, СИ-  
МИРЕНКО ЛЮДМИЛА ЛЬВІВНА, UA, КУЧМА ІРИ-  
НА ЮРІВНА, UA, ЦЕЙТЛІН НАТАН АБРАМОВИЧ,  
UA, КРЕСТЕЦЬКА СВІТЛАНА ЛЕОНІДІВНА, UA  
(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МІКРО-  
БІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА  
АМН УКРАЇНИ", UA

(57) Спосіб експресної оцінки ефективності імуні-  
зації, що включає дослідження сироваткових рівнів  
тиреοїдних гормонів в індуктивній фазі імуногене-

2

зу, який відрізняється тим, що в індуктивній  
та/або на початку продуктивної фази імуногенезу  
визначають концентрації тироксину та трийодоти-  
роніну з інтервалом в 7 діб, отримані результати  
використовують для розрахунку очікуваного рівня  
антитілогенезу за формулою:

$$AT^n = -1,098 - 0,306T_3^{n-7} + 0,0335T_4^{n-14},$$

де  $AT^n$  - очікувана сироваткова концентрація спе-  
цифічних антитіл МО/мл на  $n$  добу після імунізації;  
 $T_4^{n-14}$  - сироваткова концентрація тироксину за 14  
діб до терміну прогнозу антитілогенезу, нмоль/л;  
 $T_3^{n-7}$  - сироваткова концентрація трийодотироніну  
за 7 діб до терміну прогнозу, нмоль/л.

Корисна модель належить до експеримента-  
льної біології і медицини та може бути використа-  
на при розробці імунобіологічних препаратів, зок-  
рема вакцин.

Одним з етапів розробки вакцини є оцінка імун-  
огенності антигенів в експериментах на лабора-  
торних тваринах, що здійснюється шляхом визна-  
чення титрів сироваткових антитіл через 4 тижня  
після вакцинації. Тривалість процедури суттєво  
відображається на собівартості дослідження. Екс-  
прес-методів оцінки ефективності імунізації, наскі-  
льки нам відомо, не існує.

Загальновідомим фактом є наявність функціо-  
нальної взаємодії між імунною та нейроендокрин-  
ною системами в процесі формування імунної від-  
повіді [1, 2]. Гормональна регуляція функцій  
імунної системи здійснюється в значній мірі через  
систему гіпоталамус-гіпофіз-кора наднирників та  
гіпоталамус-гіпофіз-щитоподібна залоза. Глюкостер-  
оїди регулюють експресію цитокінів, адгезивних  
молекул, хемоатрактантів, а також впливають на  
міграцію, дозрівання й диференціювання імунних  
клітин. Тиреоїдні гормони необхідні для нормаль-  
ного розвитку В-лімфоцитів і впливають на гумо-  
ральну імунну реакцію, однак механізми цього  
впливу остаточно не визначено.

Найближчим аналогом рішення, що заявля-  
ється є спосіб визначення резервів імуногенезу [3],  
що включає дослідження динаміки зміни концент-

рацій тиреотропіну, тироксину та трийодотироніну  
в індуктивній фазі імуногенезу. За інтенсивністю  
реакції тиреоїдних гормонів на щеплення (через 2  
години після введення антигену) робляться висно-  
вки щодо функціонального стану імунної системи,  
зокрема її здатності до повноцінної гуморальної  
відповіді, що, з іншого боку, можна розцінювати як  
можливість отримання достатньо раннього про-  
гнозу ефективності імунізації.

Спільними ознаками цього способу та рішен-  
ня, що пропонується є використання сироваткових  
рівнів тиреоїдних гормонів в індуктивній фазі імун-  
огенезу для оцінки імунної функції на тлі імуніза-  
ції. Причиною, що заважає отриманню бажаного  
технічного результату є невизначеність кількісних  
параметрів зв'язку між досліджуваним функціо-  
нальним станом щитоподібної залози та рівнем ан-  
титілогенезу у відповідь на імунізацію.

В основу корисної моделі поставлено задачу:  
розробити спосіб експресної оцінки ефективності  
імунізації, в якому за рахунок використання мето-  
дів лінійного регресійного аналізу динаміки імун-  
огормональних взаємодій в процесі імунізації, за-  
безпечити можливість розрахунку очікуваного  
рівня антитілогенезу за результатами дослідження  
сироваткових рівнів гормональних показників в  
індуктивній та/або на початку продуктивної фази  
імуногенезу.

Поставлена задача вирішено у наступний спо-

(13) U

(11) 39026

(19) UA

сіб.

Самцям щурів лінії Wistar вводили різні типи антигенів. Результати дослідження динаміки змін сироваткових рівнів гормональних показників (тиреотропного гормону, тироксину, трийодотироніну та кортикостерону) та динаміки формування гуморальної імунної використано для побудови математичної моделі, що відтворює кількісні параметри залежності рівня антитілогенезу від характеру реакції вказаних гормональних показників на імунізацію (докладніше в прикладі 1).

Використання методів лінійного регресійного аналізу з виключенням недостовірних коефіцієнтів регресії дозволило одержати наступну емпіричну функцію регресії (ЕФР):

$$AT^n = -1,098 - 0,306T_3^{n-7} + 0,0335T_4^{n-14}; \quad (1)$$

$$R^2 = 81\%; S_{AT} = 0,032;$$

де:  $AT^n$  - сироваткова концентрація специфічних антитіл МО/мл на  $n$  добу після імунізації;  $T_3^{n-7}$  - сироваткова концентрація трийодотироніну за 7 діб до терміну прогнозу, нмоль/л;  $T_4^{n-14}$  - сироваткова концентрація тироксину за 14 діб до терміну прогнозу, нмоль/л;  $R^2$  - коефіцієнт детермінації;  $S_{AT}$  - середньоквадратичне відхилення залишкової помилки ЕФР.

Всі коефіцієнти рівняння високо достовірні ( $P < 0,001$ ); якість отриманої ЕФР характеризується високим значенням коефіцієнту детермінації  $R^2$ . Таким чином, застосування способу, що заявляється, дозволяє отримати перший прогноз очікуваного на 14 добу рівня антитілогенезу за результатами дослідження сироваткової концентрації тироксину до імунізації та трийодотироніну на 7 добу після імунізації. Розрахувати очікуваний рівень гуморальної відповіді наприкінці продуктивної фази імуногенезу (28 доба) можна за результатами дослідження концентрації тироксину на 14 добу після імунізації та трийодотироніну на 21 добу після імунізації.

Суттєвими ознаками рішення що заявляється є використання кількісних параметрів, що характеризують сироваткові рівні тироксину ( $T_4$ ) та трийодотироніну ( $T_3$ ) в індуктивній та/або на початку продуктивної фази імуногенезу, дослідження яких проводять з інтервалом в 7 діб. Цифрові значення коефіцієнтів в ЕФР мають достовірну прогностичну цінність виключно за цієї умови. Комплекс тироксин та трийодотиронін, відповідно до рішення, що заявляється, є необхідним та достатнім комплексом гормональних показників, що дозволяють прогнозувати рівень антитілогенезу. Це підтверджено емпіричними даними, отриманими при перевірці адекватності побудованої математичної моделі на експериментальному матеріалі (Приклад 2).

Приклад 1. Одержання емпіричної функції регресії (ЕФР).

Імуногормональні взаємодії в процесі формування гуморальної імунної відповіді моделювали з використанням поліномів з лаговими змінними. Лаговими є будь-які впливові зміни, які спостерігаються «у минулому». Вони позначаються, наприклад,  $T^t$ ,  $T_3^t$ ,  $T_4^t$  і т.п., де  $t$  - лаг, що означає кількість діб, що пройшло до того, як концентрація антитіл прийме значення у час прогнозу. Оскільки метою дослідження було виявлення прогностично-

го значення гормонального впливу на специфічний антитілогенез на 14, 21 та 28 добу після щеплення, то як лаги було прийнято концентрації гормонів за 7 й 14 діб до строку прогнозу. У цьому випадку структура нашого поліному з лаговими змінними набуває виду:

$$AT = E(V_{AT}); V_{AT} = b_0 + b_1T^{-7} + b_2T_4^{-7} + b_3T_3^{-7} + b_4K^{-7} + b_5T^{-14} + b_6T_4^{-14} + b_7T_3^{-14} + b_8K^{-14}, \quad (2)$$

де  $AT$  - концентрація антитіл,  $E(V_{AT})$  - не негативна функція аргументу  $V_{AT}$ , що приймає значення:  $E(V_{AT}) = 0$ , коли поліном  $V_{AT} < 0$  та  $E(V_{AT}) = V_{AT}$ , коли  $V_{AT} \geq 0$ ;  $b_i$  - емпіричні коефіцієнти регресії;  $T$  - сироваткова концентрація тиреотропного гормону (ТТГ), мМО/л;  $T_4$  - сироваткова концентрація тироксину, нмоль/л;  $T_3$  - сироваткова концентрація трийодотироніну, нмоль/л;  $K$  - сироваткова концентрація кортикостерону, нмоль/л.

Для розрахунку коефіцієнтів використано експериментальний матеріал, отриманий на самцях щурів лінії Wistar 3- та 20-місячного віку в процесі формування імунної відповіді на АДП-вакцину. Препарат вводили підшкірно, о 10 годині ранку в дозі 15 ЛФ дифтерійного та 5 ОЗ правцевого анатоксинів у 0,25мл препарату відповідно моделі імунної відповіді, що було розроблено раніш [4]. В експерименті було 14 груп по 3 тварини в кожній. Кров для аналізів відбирали після декапітації щурів до імунізації та у динаміці розвитку імунної відповіді через 3, 7, 14, 21 та 28 діб після щеплення. Тварин, що отримували фізіологічний розчин, забивали на третю добу після імунізації.

Концентрацію тиреотропіну, тироксину та трийодотироніну визначали радіоімунологічним методом з використанням стандартних наборів реактивів "TSH IRMA", "Total T4 RIA", "Total T3 RIA" виробництва IMMUNOTECH (Чеська республіка) та установки для радіоімунохімічних досліджень "НАРКОТЕСТ". Специфічні антитіла визначали у сироватці крові в реакції пасивної гемаглютинації за допомогою стандартного комерційного "Діагностикума еритроцитарного правцевого антигенного рідкого", серія 44-608 з активністю 1:1280, 1:2800, виготовлених АОБТ "Біомед" ім. І.І. Мечникова. Статистичну обробку результатів дослідження виконували на ПК за допомогою пакету прикладних програм "Statistika V.6".

Обробка експериментальних даних методом лінійного регресійного аналізу з виключенням недостовірних коефіцієнтів регресії в гіпотетичному поліномі (2) дозволила отримати ЕФР (1).

$$AT = -1,098 - 0,306T_3^{-7} + 0,0335T_4^{-14}; \quad (1)$$

$$R^2 = 81\%; S_{AT} = 0,032;$$

де:  $AT$  - сироваткова концентрація специфічних антитіл МО/мл;  $T_4^{-14}$  - сироваткова концентрація тироксину за 14 діб до терміну прогнозу антитілогенезу, нмоль/л;  $T_3^{-7}$  - сироваткова концентрація трийодотироніну за 7 діб до терміну прогнозу, нмоль/л;  $R^2$  - коефіцієнт детермінації;  $S_{AT}$  - середньоквадратичне відхилення залишкової помилки ЕФР.

Позначення лагових змінних для зручності представлено у вигляді:  $AT^n$  - сироваткова концентрація специфічних антитіл МО/мл на  $n$  добу після імунізації;  $T_3^{n-7}$  - сироваткова концентрація трийодотироніну за 7 діб до терміну прогнозу, нмоль/л;

$T_4^{n-14}$  - сироваткова концентрація тироксину за 14 діб до терміну прогнозу, нмоль/л. В результаті формула набуває вигляду:

$$AT^n = -1,098 - 0,306T_3^{n-7} + 0,0335T_4^{n-14}$$

Приклад 2. Розрахунок рівня протиправцевих антитіл.

Для розрахунку рівня протиправцевих антитіл на 21 добу після щеплення використовували концентрацію трийодотироніну на 14 добу після щеплення ( $T_3^{21-7}$ ), що становила 1,72 нмоль/л та концентрації тироксину на 21 добу після щеплення ( $T_4^{21-14}$ ), що становила 82,96 нмоль/л. Очікуваний

рівень антитілогенезу (АТр) розраховуємо за ЕФР (1):

$$ATr = -1,098 - 0,306T_3^{21-7} + 0,0335T_4^{21-14} = -1,098 - 0,306 \times 1,72 + 0,0335 \times 82,96 = -1,098 - 0,53 + 2,779 = 1,15 \text{ (3)}$$

Емпіричні дані  $AT = 1,30$  МО/мл.

Погрішність розрахунку  $\Delta AT = AT - ATr = -0,15$  МО/мл.

Нижче наведені результати порівняння прогнозів та реальних рівнів протиправцевих антитіл, отриманих в експериментальних умовах.

Таблиця

Аналіз погрешностей розрахунків прогнозів рівнів протиправцевих антитіл при імунізації щурів АДП-анатоксином (МО/мл)

№ досліду	Термін (доба)	Рівень протиправцевих антитіл (МО/мл)		Погрішність розрахунку ( $\Delta AT$ )
		Емпіричні дані (AT)	Результат розрахунку (АТр)	
1	2	3	4	5
1	14	0,150	0,280	-0,13
2	14	0,150	0,328	-0,1528
3	14	0,150	0,170	-0,02
4	14	0,030	0	0,03
5	14	0,150	0,170	-0,02
6	14	0,030	0,093	-0,063
7	21	1,000	1,154	-0,154
8	21	1,000	0,821	0,179
9	21	1,000	0,775	0,225
10	21	1,000	1,376	-0,376
11	21	1,000	1,328	-0,328
12	21	0,250	0,983	-0,733
13	28	2,000	1,870	0,13
14	28	2,000	1,506	0,494
15	28	2,000	1,778	0,222
16	28	1,000	0,565	0,435
17	28	0,500	0,543	-0,043
18	28	0,750	0,626	0,124

Дані, наведені в таблиці дозволяють скласти уявлення про прогностичну цінність способу, що заявляється та підтверджують можливість його здійснення.

Перелік посилань:

1. Role of thymic peptides as transmitters between the neuroendocrine and immune systems. Dardenne M. // Ann. Med. - 1999. Oct; 31 Suppl 2:34-9.

2. Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. Stenberg E.M. // J. Endocrinol. - 2001. - V. 169, №3. - P. 429-435.

3. Патент №59798 А(UA); МКВ: G01N33/48;

А61K31/00 СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РЕЗЕРВІВ ІМУНОГЕНЕЗУ. Заявник: ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ. Винахідник: Бабкін Михайло Валерійович, Стегній Борис Тимофійович, Симиренко Людмила Львівна, Стеценко Володимир Іванович, Кучерявенко Роман Олексійович. Номер заявки: 20021210247. Дата подання заявки: 18.12.2002. Дата набрання чинності: 15.09.2003.

4. Волянський А.Ю. та ін. Моделювання процесу специфічного антитілогенезу за умов імунізації щурів АДП-анатоксином // Інфекційні хвороби. - 2007. - №4. - С. 62-66.