



УКРАЇНА

(19) UA (11) 12382 (13) A

(51) G 09 B 23/28

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23 XII. 1993 р.Публікується
в редакції заявника

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ НЕДОСТАТНОСТІ МАКРОФАГАЛЬНОЇ ЛАНКИ ІМУНІТЕТУ IN VIVO

1

(21) 94107322
(22) 21.10.94
(24) 02.12.96
(46) 28.02.97. Бюл. № 1
(47) 02.12.96

(56) Осипов Ю.Г. и др. Влияние вызванной крахмалом структурной и функциональной модификации популяции нефиксированных фагоцитов на индукцию антителогенеза к эритроцитам барана у мышей. — Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., № 11, 1993, с. 83-86 (прототип).

2

(72) Круглова Ірина Федорівна, Кадан Людмила Папівна, Підгайка Олена Анатоліївна
(73) Інститут фізіології і пульмонології ім. Ф.Г.Яновського Академії медичних наук України (UA)
(57) Способ моделирования недостаточности макрофагального звена иммунитета in vivo, путем введения крахмального геля в брюшную полость экспериментальному животному, отличающийся тем, что крахмальный гель вводят двухкратно с 5-дневным интервалом между инъекциями, после чего вводят цитостатик.

Изобретение относится к биологии и медицине, а именно к экспериментальной иммунологии и может найти применение при изучении патогенеза различных заболеваний, протекающих на фоне недостаточности макрофагального звена иммунитета, в исследовании иммуотропных свойств лекарственных препаратов.

Известны способы моделирования недостаточности макрофагального звена иммунитета in vivo, основанные на временной блокаде мононуклеарных фагоцитов легко фагоцитируемым материалом, например кремниевой пылью (см. Г.Я.Бережная, С.Ю.Пчелинцев, С.С.Афанасьев. Роль фагоцитарного звена иммунитета в антиинфекционной устойчивости животных к возбудителю туляремии // Тез. докл. I съезда иммунологов России. — Новосибирск,

1992, с. 46), инъекциями кортикостероидных препаратов (см. О.Д.Черненко, Ю.А.Гриневич. Возможность восстановления интерферонообразования биологически активными факторами тимуса в условиях экспериментально вызванной иммунодепрессии // Вопр. вирусологии, 1991, т. 36, № 4, с.309-310), введением каррагинана (см. Ю.М.Гринзайд, Г.Г.Тер-Габриэлянц, М.И.Гринзайд, Пятигорск. НИИ курортот. и физиотер. — № 4735243/14. Заявл. 03.07.89., опублик. 30.09.91, Бюл. № 36).

Однако данным способом присущи следующие недостатки:

— недостаточность макрофагального звена иммунитета, развивающаяся при использовании данных способов, носит преимущественно функциональный характер и сохраняется непродолжительное время (от

(19) UA (11) 12382 (13) A

4 до 24 ч), что не позволяет использовать эти модели в хроническом опыте;

– отсутствует избирательность действия в отношении клеток системы мононуклеарных фагоцитов, например, при гидрокортизоновом иммунодефиците отмечаются нарушения и со стороны лимфоидных клеток.

Известен способ моделирования недостаточности макрофагального звена иммунитета *in vivo*, заключающийся в 12-кратном ежедневном дренировании брюшной полости экспериментальных животных, приводящем к истощению моноцитарно-макрофагального ростка кроветворения (см. В.Д.Кравцов, Т.Д.Зорина, Г.Е.Аркадьева, И.С.Фрейдлин. Новая модель недостаточности системы мононуклеарных фагоцитов // Иммунология, 1985, № 5, с.48–50).

Однако данный способ имеет следующие недостатки:

– значительная травматичность приводит к снижению воспроизводимости способа вследствие гибели большого количества животных;

– методическая сложность и длительность выполнения процедуры ежедневного дренижа не позволяют работать одновременно с большими группами животных.

Известен способ моделирования недостаточности макрофагального звена иммунитета *in vivo* путем однократного введения irritанта (крахмального геля) в брюшную полость экспериментального животного (см. Ю.Г.Осипов, Н.А.Матненко, Е.В.Груntenko. Влияние вызванной крахмалом структурной и функциональной модификации популяции нефиксированных фагоцитов на индукцию антителогена к эритроцитам барана у мышей // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., 1993, № 11, с. 83–86), что приводит к перераспределению популяции нефиксированных фагоцитов в брюшную полость с истощением этих клеток в лимфоидных органах и тканях.

Однако этот способ имеет ряд недостатков:

– недостаточность макрофагального звена иммунитета в данном случае является относительной, так как на фоне истощения макрофагальных элементов в лимфоидных органах и тканях образуется их относительный избыток в брюшной полости, повышается функциональная активность этих клеток, что свидетельствует о недостаточной степени выраженности иммунодефицитного состояния;

– недостаточность макрофагального звена иммунитета сохраняется непродолжительное время (до 5 сут), так как воспали-

тельная реакция в брюшной полости инициирует к 5 дню пролиферацию моноцитов костным мозгом, в результате чего на 7 день течения стерильного перитонита происходит компенсаторное увеличение (по сравнению с исходными данными) содержания моноцитов в крови, макрофагов в перитонеальном экссудате, в лимфоидных органах и тканях.

В основу изобретения поставлена задача усовершенствования способа моделирования недостаточности макрофагального звена иммунитета *in vivo*, в котором экспериментальному животному крахмальный гель вводят двукратно с 5-дневным интервалом между инъекциями, затем на следующие сутки после повторного введения крахмального геля внутрибрюшинно вводят цитостатик, вызывающий угнетение моноцитарно-макрофагального кроветворения в костном мозге, в результате чего увеличивается степень выраженности и продолжительности иммунодефицитного состояния.

Поставленная задача решается тем, что в способе моделирования недостаточности макрофагального звена иммунитета *in vivo* путем введения крахмального геля в брюшную полость экспериментальному животному, согласно изобретению, крахмальный гель вводят двукратно с 5-дневным интервалом между инъекциями, после чего вводят цитостатик.

Опытным путем установлено, что крахмальный гель необходимо вводить двукратно, т.к. однократная его инъекция не обеспечивает достаточной степени выраженности макрофагального иммунодефицита, а трехкратное введение крахмального геля уже не сопровождается дальнейшим углублением макрофагальной недостаточности. 5-дневный интервал между инъекциями крахмального геля обусловлен тем, что максимальное раздражение моноцитарно-макрофагального ростка кроветворения после однократного введения irritанта отмечается на 5-е сутки (см. Ю.Г.Осипов, Н.А.Матненко, Е.В.Груntenko. Влияние вызванной крахмалом структурной и функциональной модификации популяции нефиксированных фагоцитов на индукцию антителогена к эритроцитам барана у мышей // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., 1993, № 11, с. 83–86) и повторное введение irritанта именно в этот срок способствует поддержанию на максимальном уровне пролиферации предшественников макрофагов в костном мозге на весь период последующего действия цитостатика, что усиливает его цитостатический эффект в костном мозге и приводит к увеличению сте-

пени выраженности макрофагальной недостаточности.

Опытным путем также установлено, что для угнетения профилирующего моноцитарно-макрофагального роста кроветворения в костном мозге оптимальным является суточный интервал между повторным введением ирританта и инъекцией цитостатика.

Способ осуществляют следующим образом.

В работе используют половозрелых мышей СВА весом 18–22 г, которые содержатся в обычных условиях вивария на стандартном рационе питания. Из химически чистого крахмала на кипящей водяной бане готовят 4% гель на физиологическом растворе. Животному внутрибрюшинно вводят 0,5 мл 4% свежеприготовленного крахмального геля, охлажденного до комнатной температуры. Через 5 дн делают повторную инъекцию крахмального геля в аналогичной дозе. Через сутки после повторного введения крахмального геля внутрибрюшинно вводят цитостатик – циклофосфан в дозе 200 мг/кг (разведение цитостатика осуществляют в стерильной апиrogenной воде для инъекций). Иммунодепрессивное действие цитостатика на моноцитарно-макрофагальное кроветворение проявляется уже через 24 ч после инъекции циклофосфана, и сохраняется на протяжении не менее 10 дн, что подтверждается результатами исследования состояния макрофагального звена иммунитета: уменьшением абсолютного и относительного содержания моноцитов в крови, макрофагов в перитонеальном экссудате, снижением их метаболической активности.

Приводит конкретные примеры осуществления способа.

Пример 1. У мыши СВА весом 21 г вызвана недостаточность макрофагального звена иммунитета описанным выше способом. Через 24 часа оценивали степень выраженности макрофагального иммунодефицита. Мышь умерщвляли передозировкой эфирного наркоза. Кровь забирали капилляром из ретро-бульбарного синуса и определяли содержание моноцитов (Мц) в ней, исходя из общего количества лейкоцитов и результатов подсчета лейкоцитарной формулы. Макрофаги перитонеального экссудата (Мф) получали путем однократного дренирования брюшной полости 5 мл стерильной среды 199, содержащей 10 ЕД/мл гепарина и определяли относительное и абсолютное содержание перитонеальных макрофагов, их поглотительную активность (ПФ – процент фагоцитоза) с частицами латекса по методу С.Г.Потаповой и соавт., 1977

(С.Г.Потапова, В.С.Хрустиков, Н.В.Демидова и др. Изучение поглотительной способности нейтрофилов крови с использованием инертных частиц латекса//Пробл. гематологии, 1977, №9, с.58–59)

и уровень кислородзависимого метаболизма – НСТ-тест (Унифицированные иммунологические методы обследования больных на стационарном и амбулаторном этапах лечения: Метод. рекомендаций Киевский НИИ фтизиатрии и пульмонологии, Киев: 1988. – 18 с.). Содержание Мц в периферической крови составило 0,08 Г/л (контрольный показатель – 0,14–0,21 Г/л); концентрация макрофагов в перитонеальном экссудате – 0,15 Г/л (контроль – 0,80–1,50 Г/л), ПФ – 34% (контроль – 40–60%), НСТ-тест – 9% (контроль – 30–40%). Таким образом, через 24 ч после применения циклофосфана у животных отмечается резкое снижение количества и функциональной активности клеток моноцитарно-макрофагального ряда, т.е. имеются все признаки глубокого макрофагального иммунодефицитного состояния.

Пример 2. У мыши СВА весом 29 г вызвана макрофагальная недостаточность предлагаемым способом. Состояние макрофагального звена иммунитета было изучено через 10 дней по аналогичной схеме. Концентрация моноцитов крови составила 0,04 Г/л, а содержание Мф в перитонеальном экссудате – 0,12 Г/л, ПФ – 44,0%, НСТ-тест – 4%. Следовательно, иммунодефицитное состояние системы моноцитов/макрофагов сохраняется на протяжении 10 дн.

Эксперимент проведен на 30 половозрелых мышях СВА весом 18–22 г. Всех животных разделили на 3 группы. Контрольную группу составили 10 интактных мышей. У 10 животных II группы недостаточность макрофагального звена иммунитета была вызвана по способу-прототипу, у 10 мышей III группы – предлагаемым способом. Иммунологические исследования проводили во всех трех группах на 10 день после введения цитостатика мышам III группы. Изучали показатели, характеризующие состояние моноцитарно-макрофагального звена иммунитета по приведенным выше методикам, а также оценивали состояние лимфоидной системы по индексам массы тимуса и селезенки, содержанию клеточных элементов в этих органах (Miche D. A simple method for estimation of total lymphoid organ proliferation//Hand-book of exp. Immunol. – Black-well. – Oxford, 1967. – p. 969–970).

Полученные данные приведены в таблице.

Как видно из представленных данных, у мышей III группы на фоне отсутствия существенных изменений со стороны лимфоидных органов отмечается резкое уменьшение содержания моноцитов в крови, макрофагов в перитонеальном экссудате, снижается метаболическая активность Мф. В то же время у животных II группы в аналогичные сроки исследования абсолютное содержание моноцитов в крови резко увеличивается, что косвенно свидетельствует о компенсаторном усилении пролиферации предшественников макрофагов в костном мозге, а остальные показатели восстанавливаются до контрольных величин.

Следовательно, двукратное введение крахмального геля в брюшную полость экспериментальному животному с 5-дневным интервалом между инъекциями и последующим введением цитостатика приводит к увеличению степени выраженности недостаточности системы макрофагов, которая проявляется двукратным уменьшением

Сравнительная характеристика состояния фагоцитирующих клеток и лимфоидной системы у животных с различными вариантами моделирования недостаточности макрофагального звена иммунитета

Показатели	Группы животных		
	I	II	III
Содержание лейкоцитов в крови (Г/л)	7,5±0,7	3,9±0,7*	6,4±1,4
Содержание моноцитов в крови, %	2,8±0,2	1,8±0,6	1,3±0,06*
(Г/л)	0,19±0,05	0,74±0,03*	0,08±0,01* ^o
Содержание макрофагов в перитонеальном экссудате %	71,0±4,6	64,2±4,1	9,3±2,6* ^o
(Г/л)	1,17±0,18	1,08±0,09	0,24±0,03* ^o
ПФ, %	38,7±3,6	39,7±3,4	41,2±4,8
НСТ-тест, %	35,5±3,0	29,5±3,1	5,5±0,8* ^o
Индекс массы тимуса	0,16±0,11	0,10±0,08	0,18±0,03
Удельное содержание клеточных элементов в тимусе 10 ⁶ /мл	17,3±3,8	17,9±0,3	16,8±3,5
Индекс массы селезенки	0,69±0,04	0,77±0,09	1,09±0,23
Удельное содержание клеточных элементов в селезенке 10 ⁶ /мл	249,5±49,0	188,0±17,9	135,2±29,4

Примечание: I – контрольная группа животных

II – животные с макрофагальным иммунодефицитом, созданным по способу-прототипу

III – животные с макрофагальным иммунодефицитом, созданным предлагаемым способом

x – разница показателя по сравнению с контролем достоверна

o – разница показателя по сравнению с показателем прототипа достоверна.

абсолютного и относительного содержания моноцитов в периферической крови, 4–8-кратным снижением концентрации макрофагов в перитонеальном экссудате, резким угнетением кислородозависимого метаболизма этих клеток при отсутствии существенных изменений лимфоидной системы иммунитета. Макрофагальный иммунодефицит у экспериментальных животных сохраняется в течение 10 дн.

Таким образом, использование предлагаемого способа моделирования недостаточности макрофагального звена иммунитета *in vivo* приводит к развитию макрофагального иммунодефицитного состояния, более выраженного и длительного по сравнению с известными способами. Способ легко воспроизводим, доступен и не требует применения дорогостоящих реактивов. Может найти широкое применение в научно-исследовательских учреждениях биологического и медицинского профиля.

Упорядник	Техред М.Моргентал	Коректор О. Кравцова
-----------	--------------------	----------------------

Замовлення 4063	Тираж	Підписне
	Державне патентне відомство України, 254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8	

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101

