

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 кремневой 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.Черенко, 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 карратинана (см. Ю.М.Гринзайд, Г.Г.Тер-Габриэлянц, М.И.Гринзайд, Пятигорск. НИИ курортот. и физиотер. - Мг 4735243/14. Заявл. 03.07.89., опубл. 30.09.91, бюл. № 36).

Однако данным способам присущи следующие недостатки;

- недостаточность макрофагального звена иммунитета, развивающаяся при использовании данных способов, носит преимущественно функциональный характер и сохраняется непродолжительное время (от 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, Й.С.Фрейдяйн. 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 дренажа не позволяют работать одновременно с большими группами животных.

Известен способ моделирования недостаточности макрофагального звена иммунитета *in vivo* путем однократного введения иригатора (крахмального геля) в брюшную полость экспериментального животного (см. Ю.Г.Осипов, Н.А.Матненко, Е.В.Грунтенко. Влияние вызванной крахмалом структурной и функциональной модификации популяции нефиксированных фагоцитов на индукцию антигеногенеза 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 воспалительная 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<sup>1</sup> 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 иригатора отмечается на 5-е сутки (см. Ю.Г.Осипов, Н.А.Матненко, Е.В.Грунтенко. Влияние вызванной крахмалом структурной и функциональной модификации популяции нефиксированных фагоцитов на индукцию антигеногенеза к эритроцитам барана у мышей //Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., 1993, № 11, с. 83-86) и повторное введение иригатора 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 степени выраженности макрофагальной недостаточности.

Опытным путем также установлено, что для угнетения профилирующего моноцитарно-макрофагального ростка кроветворения в костном мозге оптимальным является суточный интервал между повторным

введением ирританта и инъекцией цитостатика.

Способ осуществляют следующим образом.

В работе используют половозрелых мышей СВ А 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-са//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, рекомендации) 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 мышах 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 II 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 абсолютного и относительного содержания моноцитов в периферической крови, 4-8-кратным снижением концентрации макрофагов в перитонеальном экссудате, резким угнетением кислородзависимого 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.

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<br>(Г/л)                                     | 7,5±0,7         | 3,9±0,7*   | 6,4±1,4                 |
| Содержание моноцитов в крови,<br>%   | 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* <sup>о</sup> |
| Содержание макрофагов в перитонеальном экссудате<br>%                      | 71,0±4,6        | 64,2±4,1   | 9,3±2,6* <sup>о</sup>   |
| (Г/л)  | 1,17±0,18       | 1,08±0,09  | 0,24±0,03* <sup>о</sup> |
| 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* <sup>о</sup>   |
| Индекс массы тимуса  | 0,16±0,11       | 0,10±0,08  | 0,18±0,03               |
| Удельное содержание клеточных<br>элементов в тимусе 10 <sup>6</sup> /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<br>элементов в селезенке 10 <sup>6</sup> /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

о – разница показателя по сравнению с показателем прототипа достоверна.