



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 76549

(13) C2

(51) МПК (2006)

A01K 67/00

C12N 15/01

A61N 5/10

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ МОДЕЛІ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО ІМУНОДЕФІЦИТУ

1

(21) 20040605131

(22) 29.06.2004

(24) 15.08.2006

(46) 15.08.2006, Бюл. № 8, 2006 р.

(72) Коляда Тетяна Іванівна, Сидоренко Тетяна Адіковна, Ігумнова Наталія Іванівна, Романова Олена Анатоліївна, Божко Марина Генадіївна, Лучків Віктор Іванович, Волков Тарас Олександрович
(73) Коляда Тетяна Іванівна, Сидоренко Тетяна Адіковна, Ігумнова Наталія Іванівна, Романова Олена Анатоліївна, Божко Марина Генадіївна, Лучків Віктор Іванович, Волков Тарас Олександрович, ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І. І. МЕЧНИКОВА АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

(56) Москалев Ю.И. Отдаленные последствия воздействия ионизирующих излучений.- М.: Медицина, 1991.- 464 с.

Upton A.C. Evolving perspectives on the concept of dose in radiobiology and radiation protection.- 1988, Vol.55, N.4, P.605-614.

2

WO A2 9944583 02.03.99.

RU C1 2061968 10.06.96.

Пальга Г.Ф., Домбровский А.В., Лепехин Н.Н. Состояние потомства первого поколения, зачатого в различные сроки после облучения самок в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. - 1999. - Т.39. - №4. - С.384-387.

Нефедов И.Ю., Нефедова И., Пальга Г.Ф. Генетические последствия облучения одного и обоих родителей (результаты экспериментов на крысах линии Вистар) // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2001. - Т.41. - №2. - С.133-136.

(57) 1. Спосіб отримання моделі радіаційно-індукованого імунodefіциту шляхом одноразового γ-опромінення щурів лінії Вистар у дозі 0,5Гр, який відрізняється тим, що опромінення тварин здійснюють в доімплантаційний період ембріогенезу.

2. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що опромінення здійснюють на третю добу вагітності самок.

Винахід відноситься до радіаційної біології та медицини, а саме до експериментальної імунології і може бути використаний при випробуванні нових засобів імункорекції, дослідженні загальних закономірностей розвитку патологічних процесів на тлі імунodefіциту, зокрема таких, що виникають внаслідок впливу малих доз іонізуючого випромінювання.

Питання реальності феномену радіаційно-індукованої нестабільності в організмі людини в умовах низькоінтенсивного опромінення, при всій суперечливості результатів чисельних клініко-лабораторних, медико-соціальних та епідеміологічних досліджень, імовірно ще тривалий час належатиме до сфери державних інтересів України. Загальні уявлення про перебіг радіаційно-індукованих біологічних процесів що покладено в основу винаходу полягають в наступному: іонізуюче випромінювання пошкоджує структуру нуклеїнових кислот, що об'єктивно виявляється у підви-

щенні частоти цитогенетичних дефектів та геномній нестабільності; вказані дефекти мають максимально виражені функціональні наслідки для клітин із високою швидкістю ділення, зокрема таких що належать до органів гемопоєзу та імуногенезу; радіаційно-індукована нестабільність геному не визначається копіюванням у нащадків радіаційних пошкоджень первинної структури ДНК батьківських клітин, не має клонального характеру і може виникати у клітинах, які не піддавалися опроміненню безпосередньо, при цьому тривале зберігання потомства таких клітин підвищує частоту онкогенної трансформації [1]. Однією з ключових функцій імунної системи, що забезпечує підтримку біологічного гомеостазу, є своєчасне виявлення та елімінація власних дефектних, потенційно злоякісних клітин. В організмі клінічно здорової людини рівень цитогенетичних змін варіює та може суттєво зростати під впливом різноманітних фізичних, хімічних або біотичних факторів, в першу чергу таких, що

(13) C2

(11) 76549

(19) UA

порушують структуру нуклеїнових кислот. І, якщо адекватна реакція імунної системи на спонтанний мутагенез лежить в межах її фізіологічного навантаження, то реакція на індукований (зокрема опроміненням), по досягненні певного рівня кількості нерепарованих пошкоджень, призводить до функціональної декомпенсації із відповідними наслідками для організму. Крім того, імунокомпетентні клітини, які виконують складні, генетичнодетерміновані інформаційні функції, надзвичайно чутливі до впливу факторів, що сприяють генетичній нестабільності.¹ Такий характер причинно-наслідкових зв'язків зумовлює тенденцію до поглиблення дисфункції імунної системи та розвитку імунодефіциту.

Доведено факт залежності функціональних властивостей лімфоцитів від рівня хромосомних порушень в них на тлі вірусних та бактерійних інфекцій, а сумарний рівень аберацій статистично достовірно впливає на важкість клінічних проявів ОРЗ ($F=3,551$, $p=0,05$), частоту виникнення ОРЗ і грипу ($F=3,551$, $p=0,036$), тривалість загострень хронічного бронхіту ($F=4,941$; $P=0,015$) [11].

Відомі моделі імунодефіциту *ex vivo*: лінійні тварини з наслідкованими дефектами, що роблять їх неспроможними до розвитку ефективної імунної реакції на інфекцію (бактеріальну, вірусну, паразитарну), на злякано трансформовані клітини та/або на алогенний чи ксеногенний трансплантат. Це миші ліній CBA, C3H, AKR, NZB, DBA/2, SCID, *rag-1(2)*, "beige-nude mice" [2, 3, 4]. Суттєвими ознаками, що характеризують ці моделі є спосіб їх отримання, характер генетичного дефекту та форми функціональної неспроможності імунної системи, які виникають в його наслідок. За способом отримання переважна більшість з них інбредні лінії (наслідок черги послідовних близькородинних схрещувань на протязі 18-20 генерацій, до досягнення гомозиготності по дефектному локусу). Наприклад миші *nu-nu* (скор, від *nude*, англ. - голий; *nu-nu* означає гомозиготність за геном *nu*) мають зчеплений з цим геном, наслідкований дефект розвитку, що виявляється у відсутності шерстяного покриву та тимуса. Останнє обумовлює недостатність клітинної ланки імунітету внаслідок відсутності Т-залежних лімфоцитів. До інбредних належать лінії мишей C3H та CBA, що характеризуються високою частотою виникнення спонтанних пухлин молочної залози, AKR (зі схильністю до лейкозів, індукованих вірусом лейкозу Гросса), NZB (в яких спостерігається спонтанний розвиток аутоімунних захворювань), DBA/2 (із відсутністю компонента комплементу C5). Існує спосіб отримання модельних тварин шляхом штучного об'єднання ембріональних клітин тварин різних інбредних ліній (т.з. тетраparentні миші), що дозволяє створювати бажані комбінації генетичних дефектів.

Найбільш популярною сучасною моделлю імунодефіциту є миші лінії SCID та її модифікації C.B-17-SCID-nod, C.B-17scid/scid, C.B-17-SCID-beige) [5,6]. Ці тварини мають дефектну рекомбіназу та неспроможні до специфічної імунної відповіді внаслідок нездатності В-лімфоцитів до продукції імуноглобулінів а Т - до експресії антигенних рецепторів.

Тварини із фіксованими генетичними дефек-

тами окремих ланок імунітету є надзвичайно корисним інструментом у певних випадках (наприклад миші лінії SCID-beige - максимально зручна модель для ксенотрансплантації). Але, відтворити стан функціональної декомпенсації імунної системи в умовах геномної нестабільності добром ізольованих генетично-детермінованих дефектів не уявляється можливим.

Відомі способи радіаційної індукції розвитку лімфому мишей RFH [7] та мієлоїдної лейкемії у мишей CBA/H [8] хронічним опроміненням тварин у дозі не менш 25сГр. Суттєвими ознаками, що характеризують ці моделі є: обрані біологічні об'єкти, кратність опромінення, дозовий діапазон, характер отриманого дефекту. Ці моделі, так саме, як і рішення, що заявляється, надають можливість спостерігати за розвитком радіаційно-індукованого імунопатологічного процесу, що характеризується втратою однієї з ключових функцій імунної системи (здатності розпізнавати клітини, в яких індуковані цитогенетичні пошкодження надбали неприйнятне морфологічне і функціональне вираження). Але в їх основі лежить феномен індукції бласттрансформації, що обґрунтовує обрання відмінного від застосованого в заявленому рішенні дозового діапазону та режиму опромінення. Це забезпечує фіксацію на кінцевих стадіях патогенезу та не дозволяє, на відміну від рішення, що заявляється, відобразити імунодефіцитний стан в умовах відсутності морфологічно-детермінованого патологічного процесу.

Найближчим аналогом можна вважати спосіб отримання моделі, використаної для дослідження ролі стадії розвитку статевих клітин шурів лінії Вістар у момент опромінення в ході реакції пост-радіаційних ефектів у нащадків [9, 10]. Тварин (самиць та/або самців) перед спаруванням опромінювали одноразово в дозах 0,25 та 0,5Гр. Дослідження ембріогенезу та пістнатального онтогенезу отриманого потомства виявили морфологічні та функціональні відхилення в розвитку, які свідчать про ранню декомпенсацію регуляторних систем.

Ознаками, що збігаються з ознаками заявляемого рішення є: відтворення моделі на щурах лінії Вістар, дозовий діапазон та режим опромінення. Суттєвою ознакою, що відрізняє патентуєме рішення, є стадія онтогенезу об'єкта опромінення: ранній етап пренатального розвитку, а саме - третя доба після утворення зиготи. Причиною, що заважає отриманню бажаного технічного результату за прототипним способом є залежність наслідків опромінення від ступеню диференціювання клітин. В наведених дослідженнях Пальга Г.Ф. з співавторами показано, що при опроміненні незрілих ооцитів або статевих клітин самців на стадії сперматогенів загибель зародків перевищувала контроль у 3-11 разів, що у 2-2,5 рази більше, ніж при опроміненні дозрілих статевих клітин. На користь цього висновку свідчать і результати, отримані:

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб отримання моделі радіаційно-індукованого імунодефіциту, за рахунок добору оптимальних умов, а саме стадії онтогенезу та параметрів променевого впливу, забезпечити відтворення імунодефіцитного стану, що характери-

зується функціональними дефектами імунної системи на тлі надмірного навантаження адаптаційно-компенсаторних механізмів в умовах генетичної нестабільності.

Поставлену задачу вирішено в такий спосіб.

Самиць щурів лінії Вістар одноразово піддавали γ -випромінюванню у дозі 0,5Гр на ранній стадії вагітності, а саме на третю добу після запліднення. Отримане потомство, внаслідок радіаційного впливу в доімплантаційний період ембріогенезу, мало характерні порушення лімфогемопоетичного гомеостазу, підвищений рівень геномної нестабільності та достовірні функціональні дефекти як специфічної так і неспецифічної ланок імунітету.

Суттєвими ознаками, що характеризують спосіб отримання моделі є обраний біологічний об'єкт опромінення (вагітні самиці щурів лінії Вістар), загальна доза опромінення (0,5Гр), кратність опромінення (одноразове).

Застосування вагітних самок на третю добу після запліднення оптимальне для отримання потомства, опроміненого на ранній стадії ембріогенезу - в доімплантаційний період, оскільки на четверту добу відбувається імплантація, а наслідки опромінення на протязі першої - другої доби вагітності не мають суттєвих відмінностей від наслідків опромінення статевих клітин щурів лінії Вістар перед заплідненням.

Застосування дози 0,5Гр обумовлено відсутністю бажаного технічного результату за її межами нащадки самиць, що були опромінені в дозі 0,25Гр не мали достовірних відхилень в імуногенезі, тоді як тварини, опромінені в дозовому діапазоні 0,75-1Гр мали високий рівень ембріональної загибелі плода та низьку життєздатність отриманого потомства.

Варіювання кратності при застосуванні низькоінтенсивного впливу малих доз іонізуючого випромінювання не доцільно у зв'язку з відсутністю

принципових відмін в ефектах, характер яких, у цьому випадку, визначається лише загальною дозою опромінення.

Маркерними характеристиками отриманої моделі є наведені нижче показники лімфогемопоетичного гомеостазу та імунного статусу тварин.

Клітинний склад кісткового мозку, свідчить про виражений дисбаланс утворення, визрівання та диференціювання гемопоетичних та лімфоїдних клітин усіх паростків кровотворення. Загальний відсотковий вміст клітин мієлоїдного ряду опромінених тварин на всіх етапах дослідження поступається їх вмісту у інтактного потомства, головним чином за рахунок нейтропенії, яка має стійку тенденцію до зростання. При цьому відзначається надпродукція еозинофільних гранулоцитів, яка у 1,3-4,4 рази перевищує їх нормальне утворення в органі. Післянатальне формування лімфомоноцитарного паростку кісткового мозку характеризується підвищенням продукції моноцитарних та плазматичних клітин. Цитогенетичне дослідження метафазних клітин кісткового мозку виявило достовірне підвищення частки клітин з абераціями хромосом у порівнянні з контролем ($5,6 \pm 0,3$)%, тоді як у нормальних новонароджених тварин вона коливалась від ($1,0 \pm 0,06$) до ($1,4 \pm 0,08$)%. Тип виявлених у опромінених тварин хромосомних аберацій являв собою міжхромосомні обміни, делеції, одиничні фрагменти, а також поліплоїдні клітини.

Кількісний склад популяцій імунокомпетентних клітин периферійної крові (таблиця 1) має достовірні відмінності від контролю за вмістом сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів, плазматичних клітин та незрілих форм лімфоцитів, зокрема, звертає на себе увагу присутність суттєвої кількості лімфобластів у опромінених 30-добових щурят при тому, що у інтактних тварин цього ж віку бластні форми зникають з циркуляції вже на 14 добу.

Таблиця 1

Лейкограма периферійної крові тижневих та місячних щурят дослідної та контрольної груп

Показники	Групи тварин	7		30	
		Частка (%)	Абс кількість клітин, $10^9/\text{л}$	Частка (%)	Абс. кількість клітин, $10^9/\text{л}$
Лейкоцити	Д		($2,3 \pm 0,1$)		($7,6 \pm 0,6$)
	К		($2,7 \pm 0,2$)		($8,1 \pm 0,6$)
Паличкоядерні нейтрофіли	Д	($4,2 \pm 0,3$)*	($0,09 \pm 0,007$)*	($5,1 \pm 0,3$)	($0,38 \pm 0,01$)*
	К	($8,1 \pm 0,6$)	($0,21 \pm 0,01$)	($6,2 \pm 0,5$)	($0,50 \pm 0,02$)
Сегментоядерні нейтрофіли	Д	($20,1 \pm 1,6$)	($0,46 \pm 0,03$)	($13,0 \pm 1,0$)*	($0,98 \pm 0,06$)*
	К	($21,1 \pm 1,9$)	($0,56 \pm 0,02$)	($18,0 \pm 1,4$)	($1,45 \pm 0,08$)
Еозинофіли	Д	($2,0 \pm 0,1$)*	($0,04 \pm 0,002$)*	($5,1 \pm 0,3$)*	($0,38 \pm 0,02$)*
	К	($1,0 \pm 0,08$)	($0,02 \pm 0,001$)	($1,0 \pm 0,09$)	($0,08 \pm 0,005$)
Базофіли	Д	($0,39 \pm 0,02$)*	($0,009 \pm 0,0005$)*	($0,23 \pm 0,01$)	($0,01 \pm 0,006$)*
	К	($0,02 \pm 0,05$)	($0,02 \pm 0,001$)	($0,27 \pm 0,01$)	($0,02 \pm 0,0008$)
Лімфоцити	Д	($39,0 \pm 3,1$)*	($0,89 \pm 0,04$)*	($65,2 \pm 5,2$)	($4,95 \pm 0,2$)
	К	($50,0 \pm 4,0$)	($1,35 \pm 0,07$)	($67,1 \pm 6,0$)	($5,43 \pm 0,2$)
Проліфферуючі	Д	($3,1 \pm 0,2$)	($0,07 \pm 0,04$)*	($4,1 \pm 0,2$)*	($0,31 \pm 0,002$)*
	К	($4,0 \pm 0,3$)	($0,11 \pm 0,05$)	($3,0 \pm 0,2$)	($0,24 \pm 0,001$)
Лімфобласти	Д	($9,4 \pm 0,7$)*	($0,21 \pm 0,01$)*	($4,0 \pm 0,3$)*	($0,30 \pm 0,02$)*
	К	($1,1 \pm 0,09$)	($0,02 \pm 0,001$)	-	-
Моноцити	Д	($13,0 \pm 1,0$)	($0,29 \pm 0,01$)	($4,2 \pm 0,3$)	($0,31 \pm 0,01$)*
	К	($12,0 \pm 0,9$)	($0,32 \pm 0,01$)	($5,1 \pm 0,4$)	($0,41 \pm 0,02$)
Плазматичні клітини	Д	($8,0 \pm 0,6$)*	($0,18 \pm 0,09$)*	($0,04 \pm 0,01$)*	($0,003 \pm 0,001$)*
	К	($4,1 \pm 0,3$)	($0,11 \pm 0,06$)	-	-

Вираженими та стабільними ознаками імунodefіцитного стану отриманої моделі є недостатність неспецифічних клітинних та гуморальних факторів резистентності (Таблиця 2) суттєве зни-

ження функціональної активності фагоцитуючих клітин та концентрації комплементу в сироватці антенатально опромінених тварин, що не мають тенденції до компенсації.

Таблиця 2

Показники імунореактивності пренатально опромінених та контрольних щурів

Показники	Групи тварин	Вік тварин (доба)		
		7	14	30
1	2	3	4	5
ЦІК, умови, од	Д	(0,028±0,001	(0,050±10,003)*	(0,058±10,003)*
	К	(0,030±0,001))	(0,041±0,002)	(0,045±0,002)
Комплемент, умовн.од.	Д	(0,11±0,006)*	(0,25±0,01)*	(0,95±10,05)*
	К	(0,14±0,007)	(0,37±10,02)	(1,25±10,07)
Фагоцитарний індекс нейтрофілів, %	Д	(24,0±11,4)*	(22,6±1,2)*	(47,3±12,1)*
	К	(30,1±1,7)	(31,3±1,7)	(64,0±3,4)
Фагоцитарне число нейтрофілів, %	Д	(3,5±0,2)*	(4,0±0,2)*	(5,6± 0,3)*
	К	(4,9±0,3)	(5,5±10,3)	(7,2±10,4)
НСТ спонт. нейтрофілів, од. екстінкції	Д	(0,017±0,0012)*	(0,020±0,0012)*	(0,025±10,0014)*
	К	(0,023±0,0016)	(0,027±0,0016)	(0,033±0,0017)
НСТ інд. нейтрофілів, од. екстінкції	Д	(0,024±0,0015)*	(0,030±0,0016)*	(0,036±0,0024)*
	К	(0,035±0,0018)	(0,046±0,0024)	(0,051±0,0026)
Індекс стимуляції нейтрофілів	Д	(1,41±0,08)	(1,50±0,08)	(1,44±0,08)
	К	(1,52±0,08)	(1,70±0,09)	(1,54±0,08)
Функціональна активність макрофагів перитонеальної порожнини				
Фагоцитарний індекс, %	Д	(17,4±0,9)*	(30,4±1,6)*	(36,0±1,9)*
	К	(31,4±1,6)	(48,7±2,6)	(52,6±2,8)
Фагоцитарне число, %	Д	(3,8±0,2)*	(5,0±0,2)*	(5,5±0,3)*
	К	(6,4±0,4)	(7,8±0,4)	(9,1±0,5)
НСТ спонт., од. екстінкції	Д	(0,015±0,0010)*	(0,023±0,0013)*	(0,024±0,0013)*
	К	(0,026±0,0014)	(0,033±0,0017)	(0,039±0,0020)

Наявність імунного дисбалансу відображує підвищений вміст циркулюючих імунних комплексів, а також достовірне зростання кількості активованих лімфоцитів, про що свідчить зростання індексу Еа/Е-РУК та вмісту аутореактивних клітин (за тес-

том ауторозеткоутворення), кількість яких сягає $(28,7\pm4,7)\times10^6$, що майже втричі більше, ніж у інтактних тварин. (таблиця 3).

Таблиця 3

Вміст субпопуляцій лімфоцитів у селезінці антенатально опромінених щурів

Вік тварин	Групи тварин	Кількість спленоцитів, $\times 10^6$	Ауто-РУК		Індекс Е/ЕАС-РУК	Індекс Еа/Е-РУК
			частка Ауто-РУК, %	абс. кількість Ауто-РУК, $\times 10^6$		
7	Д	(30,2±2,4)	(10,8±2,1)*	(3,2±0,6)*	(1,09±0,1)*	(0,62±0,05)
	К	(31,2±2,8)	(5,3±1,5)	(0,9±0,2)	(0,62±0,05)	(0,53±0,04)
14	Д	(47,8±4,3)	(14,9±4,7)*	(7,09±2,3)*	(0,37±0,02)*	(0,65±0,05)
	К	(39,8±2,8)	(5,3±2,6)	(2,1±1,0)	(0,52±0,04)	(0,54±0,04)
30	Д	(140,07±12,6)	(20,4±3,2)*	(28,7±4,7)*	(1,72±0,1)*	(0,73±0,06)*
	К	(127,2±10,2)	(8,6±1,0)	(10,9±1,2)	(0,75±0,05)	(0,53±0,04)

Дисбаланс в регуляції диференціювання попередників імункомпетентних клітин має наслідком хвилеподібні диспропорції в кількісному складі основних популяцій лімфоцитів, низьку ефективність процесів кооперації Т- та В-лімфоцитів, та,

відповідно, низький рівень специфічної імунної відповіді, яку оцінювали по здатності до накопичення антитілоутворюючих клітин (АУК) у селезінці, визначаючи його через 5-ть діб після ін'єкції Т-залежного та Т-незалежного антигену (Таблиця 4).

Таблиця 4

Динаміка імунної відповіді на Т-залежний і Т-незалежний антиген

Антиген	Групи тварин	Число АУК	1 у селезінці у відповідь	на імунізацію
		7-ми добові тварини	14-ти добові тварини	30-ти добові тварини
Еритроцити барана	Д	$(0,5 \pm 0,03) \times 10^{4*}$	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^{4*}$	$(2,7 \pm 0,1) \times 10^{4*}$
	К	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^4$	$(3,8 \pm 0,2) \times 10^4$	$(4,9 \pm 0,3) \times 10^4$
Полівініл-піролідон 350	Д	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{3*}$	$(3,8 \pm 0,2) \times 10^3$	$(3,9 \pm 0,2) \times 10^{3*}$
	К	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^3$	$(4,6 \pm 0,3) \times 10^3$	$(5,5 \pm 0,3) \times 10^3$

Таким чином, отримана модель має достовірні відмінності за наведеними параметрами від тварин контрольної групи, що підтверджує наявність причинно-наслідкового зв'язку між застосуванням радіаційним впливом та виникненням імунodefіциту, а наведені суттєві ознаки рішення, що заявляється, є необхідними та достатніми для досягнення бажаного технічного результату в усіх випадках, на який поширюється запитуваний об'єм правової охорони.

Відомості, що підтверджують можливість здійснення винаходу, а саме спосіб отримання антенально опромінених тварин із викладеними вище ознаками імунodefіциту, наведено в прикладі.

ПРИКЛАД.

Для одержання нащадків відбирали самиць щурів лінії Вістар двохмісячного віку, першонароджених, з масою 200-250г, та самців цієї лінії, ваги та віку, яких тримали у віварії на стандартному харчуванні. Самиць на стадії циклу, що відповідає пізньому проєструсу або ранньому еструсу, підсаджували до самців у співвідношенні 2:1 в кінці робочого дня, а вранці наступного дня досліджували піхвовий мазок. Мазок брали злегка зволожений водою ватним тампоном на пристосованому для цього мандрені. На знежирене предметне скло наносили краплю дистильованої води, а потім вміст тампона. Препарат відразу ж досліджували під малим збільшенням мікроскопа, не піддаючи спеціальному забарвленню. Якщо піхвовий мазок містив сперматозоїди, то день їх виявлення вважали першим днем вагітності. На третю добу вагітності самок одноразово опромінювали (γ-променями на установці РУМ-17 дозою 0,25-1Гр на протязі 20-80 секунд при шкірно-фокусній відстані 40см, силі току мА, напруженні у трубі 160кВ. Після опромінення тварин повертали до віварію і тримали у звичайних умовах.

Перелік посилань:

1. Бычковская И.Б., Степанов Р.П., Федоровцев Р.Ф. //Радиационная биология Радиоэкология. - 2002. - Т.42. - №1. - С.20-35.
2. Chen et al., Curr. Opin. Immunol. 6:313-319 (1994).
3. Guidas et al., J Exp. Med. 181:1187-1195(1995).
4. Kollmann et al., J. Exp. Med. 177:821-832 (1993).
5. Patent 6,248,721 (US) Intern'l Class: A61K031/713; A61K048/00; C12N015/867, A01K067/027 Method of using mouse model for evaluation of HIV vaccines. Chang, Lung-Ji Appl. No.: 848760 Filed: May 1, 1997; June 19, 2001.
6. Patent 6,284,239 (US); A61K049/00; A61K067/00; G01N033/00 Murine model for human carcinoma. Inventors: Subject; Elizabeth Repasky (Williamsville, NY), Sechrist; Heather (Seattle, WA); Bumpers; Harvey L. (Stone Mountain, GA) Assignee Corixa Corporation (Seattle, WA) Appl. No.: 078207 Filed: May 13, 1998. Publ Date September 4, 2001.
7. Upton A.C. // Health Phys. - 1988. - V.55. - N 44. - P.605-614.
8. Mole R.H., Rapworth D.G., Korp M.J.// Br. J. Cancer. - 1983. - V.47.-# 2. - P.285-291.
9. Г.Ф Пальга, А.В.Домбровский, Н.Н. Лепёхин //Рад.биол.Радиоэкология -2001. - Т.39. - №4. - С.384-387;
10. И.Ю.Нефёдов, И.Нефёдова, Т.Ф. Пальга // Рад. биол. Радиоэкология . - 2001 -/Т.41.-№2. - С.133-136.
11. Суховой Ю.Г. Функциональное состояние иммунной системы при воспалительных заболеваниях: Дисс. ... докт.мед.н.: 14.00.36/Сибирское отделение институт клинической иммунологии.- Новосибирск - 1998. - 186с.