



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41472 (13) U
(51) МПК (2009)
A01K 67/00
C12N 15/01
A61N 5/10

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ МОДЕЛІ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО ДЕФЕКТУ АНТИІНФЕКЦІЙНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ

1

(21) u200814367

(22) 15.12.2008

(24) 25.05.2009

(46) 25.05.2009, Бюл.№ 10, 2009 р.

(72) КОЛЯДА ТЕТЯНА ІВАНІВНА, UA, БРУСНИК СВІТЛАНА ВАСИЛІВНА, UA, КРЕСТЕЦЬКА СВІТЛАНА ЛЕОНІДІВНА, UA, КОЛЯДА ОЛЕГ МИКОЛАЙОВИЧ, UA, ЄГОШИНА ВІКТОРІЯ ОЛЕКСІВНА, UA, МИХАЙЛИЧЕНКО МАРИНА СЕРГІЙВНА, UA, ВОЛЯНСЬКИЙ АНДРІЙ ЮРІЙОВИЧ, UA, КУЧМА ІРИНА ЮРІЙВНА, UA, ВОЛКОВ АНДРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, UA, ШАТІЛО ЮЛІЯ ВІКТОРІВНА, UA

2

(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І.МЕЧНИКОВА АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ, UA

(57) 1. Спосіб отримання моделі радіаційно-індукованого дефекту антиінфекційної резистентності, що передбачає одноразовий вплив низької дози γ -випромінювання на щурів лінії Вістар, який **відрізняється** тим, що тварин опромінують в одномісячному віці в діапазоні 0,75-2 Гр та інфікують інтраперитонеально культурою *S.typhimurium* в дозі 5×10^8 КУО.

2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що доза опромінення переважно складає 1 Гр.

Корисна модель належить до радіаційної біології та медицини, а саме до експериментальної імунології, і може бути використана для дослідження закономірностей впливу низьких доз іонізуючого випромінювання на систему імунологічної резистентності та оцінки потенційної ефективності імунотропних засобів при корекції цих порушень.

Стандартом в галузі моделювання імунodefіцитних станів є лінійні миші з наслідуваними дефектами, що роблять їх неспроможними до розвитку ефективної імунної реакції на інфекцію (бактеріальну, вірусну, паразитарну), на зловиясно трансформовані клітини та/або на алогенний чи ксеногенний трансплантат. Відомі лінії CBA, C3H, AKR, NZB, DBA/2, SCID, rag-1(2), "beige-nude mice". 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 (nu - скорочення від nude, англ. - голий; nu-nu означає гомозиготність за геном nu) мають зчеплений з цим геном, наслідуваний дефект розвитку, що виявля-

ється у відсутності вовняного покриву та тимусу. Останнє зумовлює недостатність клітинної ланки імунітету внаслідок відсутності Т-залежних лімфоцитів. До інбредних належать лінії мишей DBA/2, дефектних по компоненту комплекменту C5; AKR зі схильністю до лейкозів, індукованих вірусом лейкозу Гросса; NZB, в яких спостерігається спонтанний розвиток аутоімунних захворювань; C3H та CBA, що характеризуються високою частотою виникнення спонтанних пухлин молочної залози.

Існує спосіб отримання модельних тварин шляхом штучного об'єднання ембріональних клітин тварин різних інбредних ліній (т.з. тетрапарентні миші), що дозволяє створювати бажані комбінації генетичних дефектів [1]. Найбільш популярною сучасною моделлю імунodefіциту є миші лінії SCID та її модифікації C.B-17-SCID-nod, C.B-17scid/scid, C.B-17-SCID-beige [2]. 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 дефектами окремих ланок імунітету є надзвичайно корисним інструментом у певних випадках (наприклад миші лінії SCID-beige - максимально зручна модель для ксенотрансплантації), але відтворити

(19) UA (11) 41472 (13) U

стан функціональної декомпенсації імунної системи в умовах геномної нестабільності, що індукується іонізуючим випромінюванням, шляхом добору ізольованих генетично-детермінованих дефектів не уявляється можливим.

Найближчим аналогом рішення, що заявляється, є спосіб отримання моделі радіаційно-індукованого імунodefіциту [3]. Саміць щурів лінії Вістар одноразово піддавали γ -випромінюванню в 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 прототип, є обраний біологічний об'єкт (вагітні самиці щурів лінії Вістар), загальна доза опромінення (0,5Гр), кратність опромінення (одноразове).

Ознаками, які збігаються з ознаками рішення, що заявляється, є: відтворення моделі на щурах лінії Вістар, застосування низьких доз γ -випромінювання та кратність впливу.

Причиною, що заважає отриманню бажаного технічного результату є відсутність у щурів лінії Вістар опромінених в дозі 0,5Гр в антенатальному періоді порушень резистентності, що мали б тенденцію до прояву на тлі інфекційного процесу. Крім того, ця модель не дозволяє досліджувати ранні ефекти, індуковані опроміненням.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб отримання моделі радіаційно-індукованого дефекту антиінфекційної резистентності у щурів лінії Вістар, в якому, за рахунок добору оптимальних умов опромінення та додаткового функціонального навантаження, забезпечити створення стандартної моделі з характерними ознаками функціональної декомпенсації системи антиінфекційної резистентності, придатної для оцінки ефектів імунотропних засобів.

Поставлена задача вирішується в наступний спосіб: щурів лінії Вістар на 30 добу після народження одноразово піддають γ -випромінюванню в дозовому діапазоні 0,75-2Гр та інфікують культурою *S.typhimurium* в дозі 5×10^8 КУО інтраперитонеально. Термін інфікування обирається відповідно до задач дослідження: при розробці цієї моделі вивчалися ранні ефекти опромінення, у зв'язку з чим інфікування проводили безпосередньо після радіаційного впливу.

Суттєвими ознаками, що характеризують спосіб отримання моделі, є обраний біологічний об'єкт (одномісячні щури лінії Вістар), доза опромінення (0,75-2Гр, переважно 1Гр), кратність опромінення (одноразове), використана модель інфекції (перитонеальний сепсис, викликаний введенням культури *S.typhimurium* в дозі 5×10^8 КУО).

Інтраперитонеальне введення культури *S.typhimurium* викликає у інтактних щурів лінії Вістар розвиток сальмонельозного перитоніту та септичного стану, що супроводжується генералізацією інфекції, гематогенною диссемінацією та персистенцією збудника в крові і внутрішніх орга-

нах (печінці, селезінці, товстому кишечнику). Клінічна симптоматика (озноб, зниження моторної активності та апетиту) спостерігається протягом 3-5 діб. При дослідженні показників неспецифічної резистентності виявляються характерні ознаки активації імунної системи: перерозподіл основних пулів імункомпетентних клітин із одночасною активацією відповідних гілок гемопоезу, стимуляція фагоцитарних функцій, підвищення рівня прозапальних цитокінів в сироватці крові, зниження рівня загального комплементу та підвищення концентрації ЦІК. Важкість перебігу та наслідки (тривалість персистенції *S.typhimurium* в організмі, ступінь ураження внутрішніх органів) визначається станом антиінфекційної резистентності піддослідної тварини, а також залежить від кількості збудника, введеного при зараженні.

Доза для інфікування підбиралася експериментальним шляхом таким чином, щоб забезпечити у одномісячних щурів лінії Вістар нульовий показник летальності при мінімальному відсотку тварин, в яких септичного стану не виникає внаслідок локалізації процесу. За результатами проведених досліджень, доза 5×10^8 КУО забезпечує 100-90% рівень генералізації процесу на 7 добу інфекції з позитивною динамікою елімінації збудника протягом другого тижня після інфікування (дані наведені в таблиці 1). Зменшення дози може призвести до підвищення відсотку тварин, в яких не відбувається генералізації інфекції, що зменшує можливості спостереження за динамікою процесу. Збільшення дози може призвести до підвищення рівня летальності.

Зміна збудника або типу лабораторної тварини потребує індивідуального добору дози, що забезпечувала би бажаний технічний результат. Зокрема це стосується і віку: підбір дози проводився на одномісячних щурах лінії Вістар, що мають певний, характерний для цього етапу онтогенезу, рівень чутливості до розробленої моделі інфекції та впливу застосованих доз іонізуючого опромінення.

Дозовий діапазон, що заявляється (0,75-2Гр, переважно 1Гр), обґрунтовується відсутністю бажаного технічного результату за його межами: доза нижча ніж 0,75Гр не забезпечує бажаного дефекту імунної системи, доза вища, ніж 2Гр не дозволяє мінімізувати індуковані дефекти резистентності, що має наслідком підвищення чутливості до застосованої моделі інфекції з відповідним підвищенням рівня летальності серед тварин. Це підтверджено результатами проведених експериментальних досліджень (таблиця 1).

Сальмонельозний перитоніт відтворювали на шості групах місячних щурів по 10 тварин в кожній:

- I група - неопромінені тварини;
- II група - опромінені антенатально в дозі 0,5Гр;
- III група - опромінені постнатально в дозі 0,75Гр;
- IV група - опромінені постнатально в дозі 1Гр;
- V група - опромінені постнатально в дозі 1,5Гр;
- VI група - опромінені постнатально в дозі 2Гр.

Дослідження ступеню обсіменіння внутрішніх органів проводили на 7 та 14 добу після заражен-

ня. Результати наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати бактеріологічного дослідження перебігу сальмонельозного сепсису у щурів лінії Вістар

Групи тварин	Термін дослідження	% тварин з генералізованою формою	Ступінь обсіменіння внутрішніх органів КУО/г			
			1-20	21-50	51-100	>100
1	2	3	4	5	6	7
I (n=10)	7 днів	90	0	0	20	80
	14 днів	60	0	40	60	0
II (n=10)	7 днів	90	0	0	20	80
	14 днів	70	0	40	60	0
III (n=10)	7 днів	100	0	0	0	100
	14 днів	70	0	40	60	0
IV (n=10)	7 днів	100	0	0	0	100
	14 днів	80	0	0	30	70
V (n=10)	7 днів	100	0	0	0	100
	14 днів	90	0	0	10	90
VI (n=10)	7 днів	100*	0	0	0	100
	14 днів	100	0	0	0	100

Примітки: * - дві тварини загинули протягом перших 5 діб після інфікування.

Як видно з наведених даних, у тварин, опромінених антенатально в дозі 0,5Гр (група II), так саме, як і у опромінених постнатально в дозі 0,75Гр (III група), достовірних відмінностей в характері перебігу інфекційного процесу за динамікою зниження рівня обсіменіння внутрішніх органів з інфікованими неопроміненими тваринами (група I) не виявлено.

Постнатальне опромінення в дозі 1Гр (IV група) впливає на чутливість щурів лінії Вістар до використаної моделі інфекції, однак не підвищує рівня летальності та дозволяє досліджувати динаміку процесу протягом 14 діб.

Збільшення дози опромінення до 2Гр у місячних щурів лінії Вістар в межах застосованої моделі інфекції, підвищує рівень летальності та звужує спектр можливостей дослідження динаміки інфекційного процесу: для двох тварин V групи інфекція мала летальні наслідки; тварини, що вижили, мали фізикальні ознаки більш важкого перебігу захворювання з тривалішим періодом клінічної маніфестації. Як видно з наведених даних, за показниками генералізації процесу та ступенем обсіменіння внутрішніх органів на 14 добу в жодній з тварин цієї групи позитивної динаміки не спостерігалось.

Кратність опромінення обрана мінімальна, оскільки, як свідчать наведені вище дані, вона дозволяє отримати бажаний технічний результат. Крім того, вважається, що варіювання кратності при застосуванні низькоінтенсивного іонізуючого випромінювання не доцільно у зв'язку з відсутністю принципових відмін в ефектах, характер яких, у цьому випадку, визначається лише загальною дозою опромінення.

Можливість здійснення корисної моделі, що заявляється, а саме, - можливість індукції функці-

онального дисбалансу в системі антиінфекційної резистентності опромінених в дозі 1Гр одномісячних щурів лінії Вістар на тлі сальмонельозного сепсису, ілюструють дані, наведені в Прикладі 1. Мінімальним набором маркерних ознак відтвореного типу функціонального дефекту в діяльності імунної системи є достовірне зниження фагоцитарної активності нейтрофілів периферійної крові, неадекватна реакція-відповідь на інфекцію моноцитарно-макрофагальної системи, а також наявність вираженого дисбалансу в цитокіновому профілі за показником співвідношення TNF- α /IL4.

Таким чином, використання обраного біологічного об'єкту (одномісячні щури лінії Вістар), режиму опромінення (одноразово у діапазоні 0,75-1,5Гр, переважно 1Гр), моделі інфекції (перитонеальний сепсис, викликаний введенням культури *S.typhimurium* в дозі 5×10^5 КУО) є необхідними та достатніми умовами отримання стандартної моделі радіаційно-індукованого дефекту антиінфекційної резистентності, що дозволяє оцінити наслідки опромінення на будь який момент після впливу.

Можливість використання моделі, що заявляється для оцінки ефективності імунотропних препаратів при корекції даного типу порушень антиінфекційної резистентності, наведені в Прикладі 2.

Приклад 1.

Порівняльний аналіз стану антиінфекційної резистентності у 1-місячних щурів лінії Вістар, опромінених в дозі 1Гр (група А), інфікованих інтраперитонеально культурою *S.typhimurium* (група В), опромінених в дозі 1Гр та інфікованих (група С), опромінених в дозі 0,5Гр антенатально (за способом відповідно до прототипу) та інфікованих (група D) і інтактних тварин (контроль), проводився на основі даних, наведених в таблиці 2.

Таблиця 2

Показники неспецифічної резистентності одномісячних щурів лінії Вістар.

Показники	МУ m	Група А (n=10)	Група В (n=10)	Група С (n=10)	Група D (n=10)	Контроль (n=10)
Загальний комплемент, г.о.	M	92,8	62,88**	36,75**	60,01**	96,61
	m	±3,41	±2,78	±1,75	±2,2	±2,2
ЦІК, о.о.щ	M	0,005	0,007**	0,009**	0,007**	0,005
	m	±0,0004	±0,0005	±0,0007	±0,0006	±0,0006
TNF-α, пг/мл	M	42,28	111,8**	94,07	100,3**	39,18
	m	±0,52	±3,64	±2,67	±3,33	±0,33
IL-4, пг/мл	M	21,11*	100,1**	17,9**	91,89**	35,89
	m	±0,29	±1,53	±0,54	±0,47	±0,3
Фагоцитарний індекс нейтрофілів, %	M	46,2*	71,1	62,3	69,8	67,1
	m	±1,8	±3,5	±1,8	±3,9	±3,2
Фагоцитарне число нейтрофілів, %	M	5,1*	9,8	6,8	7,1	8,7
	m	±0,1	±1,3	±0,1	±0,3	±0,3
Фагоцитарний індекс перитонеальних Мф	M	34,2**	69,4**	39,9*	61,3	52,8
	m	±2,3	±2,8	±1,4	±2,1	±2,5
Фагоцитарне число перитонеальних Мф	M	4,3**	12,7**	5,2**	7,3	9,5
	m	±0,2	±1,3	±0,3	±0,5	±0,2
Лейкограма периферійної крові						
Лейкоцити, 10 ⁹ /л	M	3,88*	8,73**	6,13	7,56*	5,94
	m	±0,12	±0,14	±0,27	±0,11	±0,66
Паличкоядерні нейтрофіли, %	M	1,3	3,5	2,1	3,1	2,2
	m	±0,3	±0,3	±0,4	±0,3	±0,3
Сегментоядерні нейтрофіли, %	M	30,3*	39,6**	32,7*	35,6**	24,2
	m	±1,2	±1,3	±1,3	±1,5	±1,1
Еозинофіли, %	M	3,1**	3,3**	4,6**	3,2**	1,1
	m	±0,3	±0,3	±0,4	±0,3	±0,1
Моноцити, %	M	2,9	4,4*	3,1	4,1	3,1
	m	±0,3	±0,3	±0,4	±0,56	±0,2
Лімфоцити, %	M	62,4	49,2	57,5	53,87	69,4
	m	±2,2	±3,1	±4,2	±3,5	±3,3

Примітки: * - достовірність відмінності від контрольної групи $p < 0,1$; ** - достовірність відмінності від контрольної групи $p < 0,05$.

В групі А стан досліджуваних показників неспецифічної резистентності можна оцінити, як цілком компенсований, однак наявність ознак тенденції до порушення балансу цитокінового профілю (за співвідношенням TNF-α/IL-4) та достовірне зниження показників фагоцитарної активності нейтрофілів периферійної крові і перитонеальних макрофагів (Мф) свідчать про імовірність декомпенсації системи на тлі функціонального навантаження.

Дослідження, проведені на 7 добу експериментальної інфекції *S.typhimurium* у неопромінених тварин (група В), виявило характерні для інфекційного процесу ознаки активації імунної системи: нейтрофільний лейкоцитоз із зсувом вліво, підвищення відсотку моноцитів периферійної крові, зростання фагоцитарної активності нейтрофілів периферійної крові та перитонеальних макрофагів, характерні зміни в цитокіновому профілі, зниження рівня загального комплементу та підвищення рівня ЦІК.

Постнатальне опромінення в дозі 1Гр (група С) викликає характерні зміни в реакції системи неспецифічної резистентності на інфекцію, при цьому у антенатально опромінених в дозі 0,5Гр тва-

рин (група D), суттєвих відмінностей від неопромінених тварин групи В, за досліджуваними показниками не спостерігалось. В лейкограмі постнатально опромінених тварин на фоні сальмонельозного сепсису ознаки активації мієлоїдного ростка гемопоезу та вираженість нейтрофільного лейкоцитозу мінімальні. Зростання фагоцитарної активності нейтрофілів периферійної крові відбувалось, однак кінцевий рівень не перевищував значень аналогічних показників в групі інтактних тварин. Явно недостатнє, з урахуванням важкості інфекційного процесу, зростання абсолютної кількості цієї популяції, низький рівень її функціональної відповіді на інфекцію може бути віднесений до причин, що знижують темпи елімінації збудника та сприяють його диссемінації.

Кількість моноцитів у відповідь на інфекцію суттєво не зросла, відносно незначним був і рівень досліджуваних функціональних параметрів макрофагів, що свідчить про недостатній рівень активації моноцитарно-макрофагальної системи тварин. Це не сприяє розвитку повноцінної специфічної імунної відповіді та, відповідно, негативно впливає на важкість клінічного перебігу захворювання.

До ознак дисбалансу в характері імунної відповіді у тварин групи С можна віднести і високий рівень еозинофілів, однак, слід відзначити, що досить суттєве підвищення відносної кількості еозинофілів спостерігалось і у неопромінених тварин, інфікованих *S.typhimurium*, так саме, як і у антенатально опромінених тварин групи D.

У всіх інфікованих тварин спостерігалися ознаки надмірно активного функціонування системи комплементу, однак в групі С ці ознаки були максимально виражені. Зокрема зафіксовано вдвічі більше, у порівнянні з групою неопромінених тварин на тлі аналогічної інфекції, падіння рівня загального комплементу, що, у сукупності з відносно низькими показниками фагоцитарної активності нейтрофілів периферійної крові у опромінених тварин, призводить до закономірного зростання концентрації циркулюючих імунних комплексів.

Суттєве поглиблення дисбалансу в цитокиновому профілі, що відбувалося на тлі інфекції, можна вважати одним з найбільш характерних та, ймовірно, ключових показників індукованої дестабілізації діяльності системи імунологічної резистентності: якщо у інтактних тварин на 5 добу після зараження співвідношення $TNF-\alpha/IL-4$ близько до одиниці, то в групі С в ці ж терміни концентрація $TNF-\alpha$ перевищує концентрацію $IL-4$ більш ніж в 5 разів. В групі антенатально опромінених тварин цього ефекту не спостерігалось.

Приклад 2.

Циклоферон® (міжнародна назва: N-(дезоксид-глюцитол-1-іл)-N-метиламоній - метиленакарбоксилат акриданону; виробник: ТОВ "Науково-технологічна фармацевтична фірма "Полісан", Російська Федерація) є низькомолекулярним індуктором альфа-, бета- та гама-інтерферону в органах і тканинах, багатих лімфоїдними елементами (слизова оболонка тонкого відділу кишечника, селезінка, печінка, легені), що визначає широкий спектр його біологічної активності та, не в останню чергу, потенціал в галузі підвищення ефективності терапії інфекційних захворювань. За своїми параметрами (низькою специфічністю впливу, не завжди передбачуваними ефектами та відсутністю жорсткого переліку показань і протипоказань) препарат відповідає технічному рівню минулого сторіччя, однак на території колишнього СРСР і досі пропонуються до застосування та застосовуються в клінічній практиці.

Найширший спектр імунотропних ефектів серед інтерферонів, продукцію яких стимулює Цик-

лоферон має $IFN-\gamma$: стимуляція бактерицидної активності фагоцитів та процесів МНС-залежної презентації антигену; регуляція взаємодій між лейкоцитами та ендотелієм; вплив на клітинну проліферацію та апоптоз, а також стимуляція або репресія різноманітних генів, функціональне призначення яких залишається незрозумілим. Реалізація такого широкого спектру різноманітних ефектів одним цитокином досягається завдяки комплексності системи клітинно-специфічної регуляції рівня експресії генів: відомо біля 200 генів, що регулюються $IFN-\gamma$, деякі з них самі є компонентами транскрипційних факторів. Отже, передбачити, яким саме чином буде реалізоватися цей імунотропний потенціал при застосуванні індукторів інтерферону доволі складно, однак серед ефектів, що вказує виробник, наявні: активація макрофагів, Т-цитотоксичних лімфоцитів та НК клітин; пригнічення активності В-лімфоцитів; активація простагландінової та котричестероїдної систем. Всі ці фактори, як зазначено в інструкції, підсилюють фагоцитарні та цитотоксичні реакції у вогнищі запалення та сприяють ефективній елімінації інфекційного агента.

Дослідження терапевтичної ефективності циклоферону проводили у наступних групах тварин:

- група I (n=11) - постнатально опромінені в дозі 1Гр тварини, що отримували Циклоферон (контроль - постнатально опромінені в дозі 1Гр тварини, що Циклоферон® не отримували - III група);

- група II (n=11) - інфіковані *S.typhimurium*, неопромінені тварини, що отримували циклоферон (контроль - інфіковані *S.typhimurium*, неопромінені тварини, що Циклоферон® не отримували - IV група);

- група III (n=11) - постнатально опромінені в дозі 1Гр та інфіковані *S.typhimurium*, що отримували циклоферон (контроль - постнатально опромінені в дозі 1Гр та інфіковані *S.typhimurium* тварини, що Циклоферон® не отримували - V група);

- група IV (n=11) - інтактні тварини, що отримували інтерферон (контроль - інтактні тварини, що Циклоферон® не отримували).

Об'єктивно, позитивного впливу на клінічний перебіг інфекції в групах тварин, що отримувала Циклоферон® не було, як не виявлено і достовірних відмінностей в динаміці процесу елімінації збудника з відповідними групами контролю (Таб.3).

Таблиця 3

Результати бактеріологічного дослідження перебігу сальмонельозного сепсису у щурів лінії Вістар

Групи тварин	Термін дослідження	% тварин з генералізованою формою	Ступінь обсіменіння внутрішніх органів КУО/г			
			1-20	21-50	51-100	>100
II (n=10)	7 днів	100	0	0	0	100
	14 днів	80	0		40	60
контроль (n=10)	7 днів	100	0	0	0	100
	14 днів	80	0	20	20	60
III(n=10)	7 днів	100	0	0	0	100
	14 днів	90	0	0	20	80
контроль	7 днів	100	0	0	0	100
	14 днів	80	0	0	20	80

В групі опромінених тварин, що отримували Циклоферон® (III), тенденції до зниження ступеню обміненія внутрішніх органів протягом першого тижня захворювання не спостерігалось. Протягом другого спостерігалось незначне зниження показників генералізації процесу, а щільність культури *S.typhimurium* в жодному з досліджуваних на 14 добу внутрішніх органів не була нижчою, ніж 51 КУО/г, при цьому в більшості тварин групи цей показник перевищував 100 КУО/г.

Достовірних змін в лейкограмі груп тварин що отримували Циклоферон^у у порівнянні з відповід-

ним контролем не спостерігалось (Таб. 4). За результатами дослідження показників неспецифічної резистентності, опромінені тварини, (групи I, III), мали певні позитивні відмінності (з мінімальним рівнем достовірності), однак за ступенем підвищення рівня сироваткового IFN-γ та стимуляції фагоцитарної активності найбільш виражений ефект спостерігався в групі інтактних тварин (IV). Недостатність досягнутого рівня стимуляції фагоцитарних функцій в обох групах інфікованих тварин підтверджує і стабільність концентрації циркулюючих імунних комплексів.

Таблиця 4

Вплив циклоферону на показники неспецифічної резистентності.

Показники	M/m	I	Контроль	II	Контроль	III	Контроль	IV	Контроль
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Лейкограма периферійної крові									
Лейкоцити, 10 ⁹ /л	M	4,23	3,88	8,91	8,73	6,33	6,13	6,82	5,94
	m	±0,18	±0,16	±0,28	±0,24	±0,63	±0,27	±0,86	±0,66
П/я	M	1,4	1,3	2,9	3,5	2,3	2,1	2,1	2,2
нейтрофіли, %	m	±0,6	±0,3	±0,6	±0,5	±0,4	±0,1	±0,3	±0,1
С/я нейтрофіли, %	M	30,2	30,3	38,1	39,6	33,3	32,7	27,1*	24,2
	m	±3,4	±1,2	±2,5	±1,3	±1,6	±1,3	±2,3	±1,1
Еозинофіли, %	M	3,2	3,1	3,1	3,3	4,6	4,6	1,5	1,1
	m	±0,3	±0,2	±0,6	±0,3	±0,4	±0,2	±0,5	±0,1
Моноцити, %	M	3,0	2,9	4,3	4,4	3,2	3,1	3,4	3,1
	m	±0,6	±0,3	±0,6	±0,6	±0,9	±0,4	±0,92	±0,2
Лімфоцити, %	M	62,2	62,4	51,6	49,2	56,6	57,5	65,9	69,4
	m	±5,8	±2,2	±4,3	±3,1	±5,38	±3,2	±4,1	±2,1
Показники неспецифічної резистентності									
Загальний комплемент, г.о.	M	93,1	92,8	65,12	62,88	39,77	36,75	95,17	96,61
	m	±3,67	±3,41	±1,94	±1,78	±1,83	±1,75	±4,13	±2,2
ЦІК, о.о.щ	m	0,005	0,005	0,007	0,007	0,009	0,009	0,005	0,005
	m	±0,0004	±0,0004	±0,0005	±0,0005	±0,0008	±0,0007	±0,0006	±0,0006
TNF-α, пг/мл	M	49,75	42,28	114,1	111,8	99,87	94,07	42,36	39,18
	m	±0,82	±0,52	±1,22	±0,64	±1,19	±0,67	±1,52	±0,33
IFN-γ, пг/мл	M	31,3	29,3	44,1	42,9	34,5	32,76	38,1*	26,1
	m	±0,82	±0,3	±1,42	±0,4	±1,11	±0,3	±0,71	±0,2
IL-4, пг/мл	M	19,23	21,11	91,07	100,1	14,05	17,9	30,27	35,89
	m	±0,41	±0,29	±1,53	±0,53	±0,94	±0,54	±2,83	±0,47
Фагоцитарний індекс нейтрофілів, %	M	51,4*	46,2	79,6	71,1	57,1	52,3	79,1*	67,1
	m	±1,9	±1,8	±3,8	±3,5	±2,1	±1,8	±4,4	±3,2
Фагоцитарне число нейтрофілів	M	6,3	5,1	9,87	9,8	6,3	6,8	9,91*	8,7
	m	±0,2	±0,1	±1,9	±1,3	±0,53	±0,1	±0,97	±0,3
Фагоцитарний індекс перитонеальних Мф, %	M	40,2*	34,2	64,9	65,4	41,3	39,9	60,8*	52,8
	m	±1,9	±2,3	±3,8	±2,8	±2,1	±1,4	±4,4	±2,5
Фагоцитарне число перитонеальних Мф	M	5,9*	4,3	11,1	12,7	6,4	5,2	10,2*	9,5
	m	±0,2	±0,2	±1,9	±1,3	±0,53	±0,3	±0,97	±0,2

Примітки: * - достовірність відмінності від контрольної групи p<0,1.

Відсутність ефекту в групах інфікованих тварин (II та III) може бути пов'язана з різноманітними процесами, які відбуваються в імунній системі на фоні важкого гострого інфекційного процесу та можуть мати наслідком як зниження функціональних можливостей та кількості клітин, що інтерферон продукують, так і зниження респонсивності клітин мішеней до інтерферону, - реалізація прин-

ципу «low-dose priming and high-dose anergy» характерна для клітинних реакцій на цитокини [4].

До однозначно негативних наслідків застосування циклоферону в групах опромінених тварин слід віднести поглиблення наявного дисбалансу в цитокиновому профілі: співвідношення TNFα/IL-4 в III групі зросло з 5,2 до 7. В I групі цей ефект був менш помітним, однак також спостерігався.

Вказане дозволяє зробити висновок щодо доцільності використання циклоферону для корекції досліджуваного типу порушень антиінфекційної резистентності, та підтверджує придатність розробленої моделі для оцінки ефективності імунотропних препаратів.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ:

1. 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.

2. Patent 6,284,239 (US); A61K049/00; A61K067/00; G01N033/00 Murine model for human carcinoma. Inventors: Subjeck; 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.

3. Патент: 76549С2(UA); СПОСІБ ОТРИМАННЯ МОДЕЛІ РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО ІМУНОДЕФІЦИТУ. Заявник /Власник охоронного документа: Коляда Т.І., Сидоренко Т.А., Ігумнова Н.І., Романова О.А., Божко М.Г., Лучків В.І., Волков Т.О., ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА АМН УКРАЇНИ. Винахідник: Коляда Т.І., Сидоренко Т.А., Ігумнова Н.І., Романова О.А., Божко М.Г., Лучків В.І., Волков Т.О.. Номер заявки: 20040605131. Дата подання заявки: 29.06.2004. Дата публікації патенту: 15.08.2006.

4. Wayne A. Tompkins. Immunomodulation and Therapeutic Effects of the Oral Use of Interferon-alpha: Mechanism of Action //Journal of Interferon & Cytokine Research. August 1, 1999, 19(8): 817-828/ISSN: 1079-9907.