

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2577705

СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ СТРОНЦИЕМ

Патентообладатель(ли): *Федеральное бюджетное учреждение науки
"Федеральный научный центр медико-профилактических
технологий управления рисками здоровью населения" (ФБУН
"ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками
здоровью населения") (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2015113110

Приоритет изобретения **09 апреля 2015 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации **16 февраля 2016 г.**

Срок действия патента истекает **09 апреля 2035 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ивлиев



Автор(ы): *Долгих Олег Владимирович (RU), Зайцева Нина Владимировна (RU), Кривцов Александр Владимирович (RU), Бубнова Ольга Алексеевна (RU), Дианова Дина Гумяровна (RU), Вдовина Надежда Алексеевна (RU), Лучникова Виктория Александровна (RU), Старкова Ксения Геннадьевна (RU), Пирогова Елена Алексеевна (RU), Безрученко Надежда Владимировна (RU)*



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21)(22) Заявка: 2015113110/15, 09.04.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.04.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.04.2015

(45) Опубликовано: 20.03.2016 Бюл. № 8

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2003130421 A 10.04.2005. US 2010330549 A1 30.12.2010. MELISA E. "Т-клеточные иммунодефициты", перевод, опубликовано 02.02.2006. найдено 20.11.2015, найдено из Интернет: <http://www.medlinks.ru/article.php?sid=24136>. BIRKELAND SA. "The immunosuppressive effect of extracorporeal irradiation of the blood using a portable 90Sr-90Y source and small (см. прод.)

Адрес для переписки:

614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82, ФБУН "ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения", директору Н.В. Зайцевой

(72) Автор(ы):

Долгих Олег Владимирович (RU),
Зайцева Нина Владимировна (RU),
Кривцов Александр Владимирович (RU),
Бубнова Ольга Алексеевна (RU),
Дианова Дина Гумаровна (RU),
Вдовина Надежда Алексеевна (RU),
Лучникова Виктория Александровна (RU),
Старкова Ксения Геннадьевна (RU),
Пирогова Елена Алексеевна (RU),
Безрученко Надежда Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки "Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения" (ФБУН "ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения") (RU)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ СТРОНЦИЕМ**(57) Формула изобретения**

1. Способ диагностики клеточного иммунодефицита у экспериментальных животных в условиях экспозиции стронцием, характеризующийся тем, что создают экспериментальную модель стронциевого иммунодефицита путем внутрижелудочного введения в течение 45 суток экспериментальному животному водного раствора хлорида стронция из расчета 1 мг/кг веса животного, далее производят забор у этого животного пробы крови и последующее извлечение селезенки, затем извлекают иммунокомпетентные клетки из крови и клетки-спленоциты из гомогенизированного материала селезенки, определяют на мембранах указанных клеток уровень экспрессии CD62L⁺, рассчитывают критериальный коэффициент экспрессии, равный отношению CD62L⁺ кровь/CD62L⁺ селезенка, и при его значении, равном 8 и менее, диагностируют клеточный иммунодефицит у экспериментальных животных в условиях экспозиции стронцием.

2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что при создании экспериментальной

модели стронциевого иммунодефицита используется водный раствор хлорида стронция с концентрацией 10 мг/л.

(56) (продолжение):

transit doses". Scand.J.Immunol. 1976;5(4):323-9, реферат, найдено 20.11.2015, найдено из PubMed PMID: 781796.

R U 2 5 7 7 7 0 5 C 1


 ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015113110/15, 09.04.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.04.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.04.2015

(45) Опубликовано: 20.03.2016 Бюл. № 8

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2003130421 А 10.04.2005. US 2010330549 А1 30.12.2010. MELISA E. "Т-клеточные иммунодефициты", перевод, опубликовано 02.02.2006. найдено 20.11.2015, найдено из Интернет: <http://www.medlinks.ru/article.php?sid=24136>. BIRKELAND SA. "The immunosuppressive effect of extracorporeal irradiation of the blood using a portable 90Sr-90Y source and small (см. прод.)

Адрес для переписки:

 614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82, ФБУН
 "ФНЦ медико-профилактических технологий
 управления рисками здоровью населения",
 директору Н.В. Зайцевой

(72) Автор(ы):

 Долгих Олег Владимирович (RU),
 Зайцева Нина Владимировна (RU),
 Кривцов Александр Владимирович (RU),
 Бубнова Ольга Алексеевна (RU),
 Дианова Дина Гумяровна (RU),
 Вдовина Надежда Алексеевна (RU),
 Лучникова Виктория Александровна (RU),
 Старкова Ксения Геннадьевна (RU),
 Пирогова Елена Алексеевна (RU),
 Безрученко Надежда Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

 Федеральное бюджетное учреждение науки
 "Федеральный научный центр медико-
 профилактических технологий управления
 рисками здоровью населения" (ФБУН "ФНЦ
 медико-профилактических технологий
 управления рисками здоровью населения")
 (RU)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ СТРОНЦИЕМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной биологии, экологии, токсикологии, и касается диагностики клеточного иммунодефицита у экспериментальных животных в условиях экспозиции стронцием. Для этого создают экспериментальную модель стронциевого иммунодефицита путем внутрижелудочного введения в течение 45 суток экспериментальному животному водного раствора хлорида стронция преимущественно концентрацией 10 мг/л, из расчета 1 мг/кг веса животного. Затем производят забор у этого животного пробы крови и последующее извлечение селезенки, извлекают

иммунокомпетентные клетки из крови и клетки-спленоциты из гомогенизированного материала селезенки и определяют на мембранах указанных клеток уровень экспрессии CD62L⁺. Рассчитывают критериальный коэффициент экспрессии, равный отношению CD62L⁺ кровь/CD62L⁺ селезенка, и при его значении, равном 8 и менее, диагностируют клеточный иммунодефицит у экспериментальных животных в условиях экспозиции стронцием. Способ обеспечивает возможность изучения патогенетических механизмов токсического действия стронция на иммунную систему. 1 з.п. ф-лы, 1 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

transit doses". Scand.J.Immunol. 1976;5(4):323-9, реферат, найдено 20.11.2015, найдено из PubMed PMID: 781796.

R U 2 5 7 7 7 0 5 C 1

R U 2 5 7 7 7 0 5 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2015113110/15, 09.04.2015**(24) Effective date for property rights:
09.04.2015

Priority:

(22) Date of filing: **09.04.2015**(45) Date of publication: **20.03.2016** Bull. № 8

Mail address:

614045, g. Perm, ul. Monastyrskaja, 82, FBUN
"FNTS mediko-profilakticheskikh tekhnologij
upravlenija riskami zdorovju naselenija", direktoru
N.V. Zajtsevoj

(72) Inventor(s):

**Dolgikh Oleg Vladimirovich (RU),
Zajtseva Nina Vladimirovna (RU),
Krivtsov Aleksandr Vladimirovich (RU),
Bubnova Olga Alekseevna (RU),
Dianova Dina Gumjarovna (RU),
Vdovina Nadezhda Alekseevna (RU),
Luchnikova Viktorija Aleksandrovna (RU),
Starkova Ksenija Gennadevna (RU),
Pirogova Elena Alekseevna (RU),
Bezruchenko Nadezhda Vladimirovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe bjuzhethnoe uchrezhdenie nauki
"Federalnyj nauchnyj tsentr mediko-
profilakticheskikh tekhnologij upravlenija
riskami zdorovju naselenija" (FBUN "FNTS
mediko-profilakticheskikh tekhnologij
upravlenija riskami zdorovju naselenija") (RU)**

(54) **METHOD FOR DIAGNOSING CELLULAR IMMUNE DEFICIENCY IN EXPERIMENTAL ANIMALS IN CASE OF EXPOSURE TO STRONTIUM**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to diagnostic cell immunodeficiency in experimental animals under conditions of exposure strontium. This experimental model of strontium immunodeficiency is created by intragastric administration for 45 days of experimental animals aqueous solution of strontium chloride, preferably 10 mg/l, 1 mg/kg animal body weight. Then it is extracted from animal blood sample and then removing the spleen responder cells recovered from the blood cells and splenocytes of the spleen and

homogenized material is determined on the membranes of said cells the level of expression of CD62L⁺. Calculate the ratio of criterial expression equal to the ratio CD62L⁺ Blood/CD62L⁺ spleen, and its value is equal to 8 and less diagnosed cellular immune deficiency in experimental animals under conditions of exposure strontium.

EFFECT: method allows the study of pathogenetic mechanisms of the toxic effect of strontium on the immune system.

2 cl, 1 tbl, 2 ex

Изобретение относится к медицине, экспериментальной биологии, экологии, токсикологии и может быть использовано для изучения патогенетических механизмов токсического действия тяжелых металлов, в частности стронция, на иммунитет, в том числе в условиях проведения клинических испытаний препаратов, содержащих металлы.

В последнее десятилетие возникла проблема воздействия стабильного стронция на здоровье в связи с вовлечением в питьевое водоснабжение больших объемов артезианской воды водоносных горизонтов, где содержание стабильного стронция в 5-20 раз превышает предельно допустимое - 7 мг/л. Стронций, будучи изоформен кальцию и обладая высокой подвижностью, способен блокировать ионные каналы для последнего, воздействовать на кальцийзависимые рецепторы и конкурировать за активные участки белков, не выполняя физиологической функции, что может определить ингибирующее влияние стронция на иммунную реакцию.

На сегодняшний день недостаточно изучено иммунотоксическое действие стронция на медиаторы, клетки и органы иммунной системы. Согласно литературным данным [Synhaeve N.. Inuence of a chronic 90Sr contamination by ingestion on the hematopoietic, immune and bone systems. Agricultural sciences. Universite Paris Sud - Paris XI, 2011] длительное поступление с питьевой водой малых доз стронция изменяет способность иммунной системы экспериментальных животных - мышей, отвечать на антигенную стимуляцию.

Поступление в эксперименте в организм животных малых доз Sr^{2+} вызывает изменения в ранней клеточной дифференцировке Т-лимфоцитов, в частности значительное увеличение количества клеток, оказывающих супрессорный эффект. В связи с этим возникла необходимость глубоко изучить и расширить представления о патогенетических механизмах развития клеточного иммунодефицита на примерах экспериментальных животных, определить параметры их чувствительности при внутрижелудочном поступлении стронция на основе моделирования стронциевого иммунодефицита.

Из уровня техники известны подобные, проводимые с научной точки зрения на экспериментальных животных, технические решения, касающиеся диагностики различных заболеваний при хроническом отравлении тяжелыми металлами.

Так, из заявки РФ №2003118544 известен способ определения параметров чувствительности экспериментальных животных к токсическому действию водорастворимых ксенобиотиков, согласно которому проводят регистрацию гибели животных под действием ксенобиотика, причем регистрируют изменение среднего времени гибели (T_L) гидробионтов в зависимости от концентрации токсиканта (С) с последующим графическим определением константы летальности (K_L), минимального времени наступления гибели ($T_{L(min)}$) и расчетом показателя чувствительности биообъекта к токсическому действию ксенобиотика (tg^{α}) по формуле $tg^{\alpha} = K_L \cdot T_{L(min)}$.

Его недостатком является то, что в качестве экспериментальных животных используют гидробионты - дафнии, у которых невозможно установить наличие клеточного иммунодефицита из-за отсутствия лимфоидных органов, обеспечивающих воспроизводство главных иммунокомпетентных клеток иммунной системы - Т-лимфоцитов - клеточных популяций, отвечающих за адаптивный иммунитет.

Также из патента РФ №2404431 известен способ диагностики никелевой нефропатии у экспериментальных животных при хроническом отравлении, при котором у животных в эритроцитах и почечной ткани определяют концентрацию малонового диальдегида (МДА) и одновременно активность Na^{+} , K^{+} -АТФ-азы почечной ткани. При значениях МДА $4,88 \pm 0,03$ нмоль/мл эритроцитарной массы и более, а в клетках коркового и

мозгового вещества почечной ткани соответственно $2,18 \pm 0,03$ и $3,57 \pm 0,06$ нмоль/мг белка и более и значениях активности Na^+ , K^+ -АТФ-азы коркового и мозгового вещества почечной ткани $2,21 \pm 0,08$ и $5,39 \pm 0,13$ мкмоль Рн/мг белка/час и менее соответственно диагностируют нефропатию. При диагностике никелевой нефропатии данным способом учитывают нарушения водо- и электролитовыделительной функции почек, а также патогенетические механизмы этих нарушений.

Еще из патента РФ №2449280 известен способ диагностики кадмиевой ангиопатии у экспериментальных животных при хроническом отравлении. Известный способ заключается в том, что у животных в эритроцитах определяют концентрацию малонового диальдегида (МДА), активность каталазы в сыворотке крови и супероксиддисмутазы (СОД) и одновременно определяют показатели гемодинамики: брюшную аорту (БА), нижнюю полую вену (НПВ) и почечную артерию (ПА левую, ПА правую), среднюю скорость кровотока - М; упругоэластические свойства сосудов - PI; общее периферическое сосудистое сопротивление - RI. При значениях МДА $5,15 \pm 0,157$ нмоль/мл эритроцитарной массы и более, значениях СОД - $1,73 \pm 0,07$ ед/мг белка и менее, каталазы - $308,04 \pm 17,83$ мкат/л и более, а также данных гемодинамики в макрососудах: БА (М - $14,83 \pm 1,12$ см/с и более, PI - $2,01 \pm 0,24$ см/с и менее, RI - $0,89 \pm 0,02$ у.ед. и менее), НПВ (М - $7,82 \pm 0,27$ см/с и менее, PI - $2,49 \pm 0,23$ см/с и более, RI - $1,157 \pm 0,038$ у.ед. и более), ПА лев (М - $6,19 \pm 0,62$ см/с и более, PI - $3,83 \pm 0,37$ см/с и менее, RI - $1,12 \pm 0,034$ у.ед. и менее), ПА пр (М - $5,77 \pm 0,43$ см/с и более, PI - $3,61 \pm 0,48$ см/с и менее, RI - $1,09 \pm 0,031$ у.ед. и менее) и в микрососудах: М - $1,068 \pm 0,103$ см/с и менее, PI - $17,42 \pm 1,28$ см/с и более, RI - $1,78 \pm 0,07$ у.ед. и более соответственно диагностируют кадмиевую ангиопатию. Способ позволяет оценить патогенетические механизмы токсического действия кадмия на формирование функциональных и патоморфологических изменений сосудистой стенки.

Однако подходы, указанные в этих известных способах, не могут быть использованы при диагностике иммунодефицита у лабораторных животных, т.к. подобранные для оценки патогенетических механизмов токсического действия металлов тесты отражают исключительно состояние эндотелия сосудов и выделительную функцию почек и не относятся к показателям иммунной системы.

Недостатком описываемого известного способа является и то, что металл вводится парентерально (подкожно), что, во-первых, не является естественным способом попадания элемента в организм и искажает результаты моделирования формирования патологического процесса, во-вторых иммунная система в отличие от почечной (мочевыделительной) системы, является более чувствительной к интоксикации и отражает более ранние нарушения в состоянии организма подопытных животных и человека.

Кроме того, эти известные способы не позволяют судить о патогенетических механизмах развития именно клеточного иммунодефицита.

Из уровня техники известно еще одно решение, описанное в авторском свидетельстве СССР №1698681 «Способ определения клеточной пролиферативной активности животных после введения канцерогенных веществ». При реализации этого способа извлекают у лабораторных животных надпочечники и измеряют их массу. И по величине соответствующего соотношения массы левого к массе правого надпочечника менее 1,0 определяют наличие клеточной пролиферативной активности.

Это решение, скорее, направлено на изучение канцерогенного эффекта, чем иммунотоксического и представляет интерес исключительно в области экспериментальной онкологии.

При этом из уровня техники не были выявлены известные способы диагностики у экспериментальных животных клеточного иммунодефицита, ассоциированного с воздействием стронция, поэтому сделать выбор ближайшего аналога к заявляемому объекту не представляется возможным.

Технический результат, достигаемый предлагаемым изобретением, заключается в обеспечении возможности диагностики клеточного иммунодефицита у экспериментальных животных, ассоциированного с воздействием стронция.

Это позволяет расширить представление о патогенетической роли L-селектина, в частности CD62L⁺-рецептора, в формировании иммунодефицитных состояний в условиях экспозиции действующими дозами тяжелых металлов (стронция), сопровождающихся нарушениями активационных процессов в норме, происходящих в селезенке.

Указанный технический результат достигается предлагаемым способом диагностики клеточного иммунодефицита у экспериментальных животных в условиях экспозиции стронцием, согласно которому создают экспериментальную модель стронциевого иммунодефицита путем внутрижелудочного введения в течение 45 суток экспериментальному животному водного раствора хлорида стронция из расчета 1 мг/кг веса животного, далее производят забор у этого животного пробы крови и последующее извлечение селезенки, затем извлекают иммунокомпетентные клетки из крови и клетки-спленциты из гомогенизированного материала селезенки, определяют на мембранах указанных клеток уровень экспрессии CD62L⁺, рассчитывают критериальный коэффициент экспрессии, равный отношению CD62L⁺кровь/CD62L⁺селезенка, и при его значении равном 8 и менее диагностируют клеточный иммунодефицит у экспериментальных животных в условиях экспозиции стронцием.

При создании экспериментальной модели стронциевого иммунодефицита используется водный раствор хлорида стронция с концентрацией 10 мг/л.

Заявляемое изобретение направлено на решение задачи, заключающейся в определении параметров чувствительности лабораторных животных к интоксикации стронцием, на основе создания экспериментальной модели стронциевого иммунодефицита.

Решение этой задачи позволяет более глубоко изучить и расширить представления о патогенетических механизмах развития клеточного иммунодефицита, определить параметры чувствительности экспериментальных животных при внутрижелудочном поступлении стронция (что является естественным способом попадания элемента в организм) и созданной при этом экспериментальной модели стронциевого иммунодефицита, благодаря чему повышается воспроизводимость и точность, удобство для тиражированного проведения экспериментов на животных при оценке иммунотропных эффектов других токсикантов или лекарственных препаратов, касающихся клеточного иммунодефицита, при их клинических испытаниях.

Для понимания существа патогенетических механизмов развития клеточного иммунодефицита следует пояснить следующее.

Рядом авторов установлено, что под влиянием стронция происходят изменение клеточного состава иммунокомпетентных клеток и нарушение их функциональной активности в костном мозге, селезенке, тимусе, лимфатических узлах и периферической крови опытных животных [Synhaeve N.. Inuence of a chronic 90Sr contamination by ingestion on the hematopoietic, immune and bone systems. Agricultural sciences. Universite Paris Sud-Paris XI, 2011]. Селезенка является местом антигензависимой дифференцировки, активации Т-лимфоцитов и запускает реакции на антигены, попадающие в кровь. Важная функция

в регуляции кинетики пула иммунокомпетентных клеток принадлежит L-селектину: CD62L, Ly-22, LAM-1, LECAM, MEL-14, [Trinité B. Chan C.N., Lee C.S., Mahajan S., Luo Y., Muesing M.A., Folkvord J.M., Pham M., Levy D.N. // PLOS ONE 2014; 9(10): doi: 10.1371/journal.pone.0110719]. Также CD62L может функционировать как рецептор сигнализации, изменяя транслокацию ряда генов. Снижение экспрессии L-селектина и, как следствие, повышение уровня растворимых форм молекул клеточной адгезии описано в патогенезе многих заболеваний и является маркером клеточной активации.

Пул периферических Т-лимфоцитов включает в себя две большие группы Т-клеток, идентифицируемых по наличию на их поверхности активационного поверхностного маркера CD62L - это наивные Т-клетки и Т-клетки памяти. CD62L является конституциональной молекулой, экспрессируется на 50%-78% неактивированных циркулирующих лимфоцитах, обеспечивает селективную адгезию клеток к стенке сосуда, необходимую для их экстравазации и дальнейшего проникновения в очаг поражения. Известно, что при оптимальной антигенной стимуляции не более 10% Т-клеток дифференцируются в центральные клетки памяти, имеющие высокую экспрессию CD62L и обеспечивающие проявление феномена иммунологической памяти на системном уровне, пул которых во взрослом организме не изменяется даже после многократных симуляций антигеном.

Шеддинг (слищивание, потеря рецептора мембраной) чаще всего является следствием активационных процессов, затрагивающих различные популяции клеток. Шеддинг CD62L возможен в результате внеклеточного накопленного Аденозинтрифосфата (АТФ) и повышения ядерной транслокации NF- κ B (ядерный фактор «каппа-би»). АТФ, стимулируя пуриnergические рецепторы P2Y, модулирует активность фосфолипазы C и повышает активность NF- κ B. Изменение экспрессии CD62L также может осуществляться при активации PI3K/Akt-зависимого сигнального пути. Стронций способен трансформировать компоненты клеточных сигнальных путей и модифицировать активность фактора транскрипции NF- κ B, и тем самым изменять экспрессию поверхностных антигенов клетки. Механизм действия стронция в значительной степени связан с изменением концентрации АТФ во внеклеточной среде. Кальций и стронций могут воздействовать на один кальцийчувствительный рецептор, но при этом вызывать активацию различных сигнальных путей. Так, в системе *in vivo* стронций вызывает транслокацию NF- κ B из цитоплазмы в ядро через активацию DAG-РКСβII сигнального пути, а кальций - через PI₃-зависимый путь. Эта разница в

соответствующих сигнальных каскадах позволяет Sr²⁺ усиливать Ca²⁺ индуцированный ответ клетки, и наоборот. На клеточной линии RAW 264.7 установлено, что с увеличением дозы Sr²⁺ происходит снижение RANKL-индуцированной ядерной транслокации NF- κ B и AP-1, а эффект, оказываемый стронцием на активационные процессы клетки, является зависимым от типа клетки и дозы стронция [Caudrillier A., Hurtel-Lemaire A.-S., Wattel A., Cournarie F., Godin C., Petit L., Petit J.-P., Terwilliger E., Kamel S., Brown E. M., Mentaverri R., Brazier M. // Mol Pharmacol. 2010. V. 78, №4, 569-576].

Один из возможных молекулярных механизмов снижения активации лимфоцитов под влиянием стронция может быть, по видимому, объяснен изменением активности транскрипционного фактора NF- κ B. Сложность устройства и особенности ядерной транслокации NF- κ B позволяют клетке различным образом реагировать на всевозможные стимулы, что ведет к неодинаковым последствиям. Молекулярный механизм торможения шеддинга CD62L в присутствии действующей дозы стронция (т.е. для экспериментальной модели стронциевого иммунодефицита) не исключает

действие Sr^{2+} на уровне плазматической мембраны, вызывая конформационные изменения рецептора, что требует дальнейшего изучения.

В ходе настоящего исследования по предлагаемому способу установлено модифицирующее влияние Sr^{2+} на активационные процессы в клетке.

Очевидно, что стронций при концентрации 10 мг/л ингибирует шеддинг CD62L на спленоцитах (на клетках селезенки), не изменяя экспрессию L-селектина на периферических лимфоцитах (на клетках крови). Стабильный стронций оказывает воздействие на активационную способность клеток, что обусловлено способностью металла модифицировать экспрессию L-селектина, тем самым трансформировать следующим за этим каскад молекулярных событий, характерных для иммуносупрессии. Отражением этих событий и служит установленный в ходе эксперимента критериальный коэффициент селективной экспрессии: $\text{CD62L}^+ \text{кровь} / \text{CD62L}^+ \text{селезенка}$, снижение которого до 8 и менее единиц может являться ранним критерием иммунотоксического эффекта стронция.

Таким образом, все отличительные признаки предлагаемого решения направлены не только на доказательства патогенетических механизмов клеточного иммунодефицита, но и позволяют их конкретизировать как проявление именно стронциевого иммунодефицита. На эту цель работает и создание на лабораторном животном экспериментальной модели иммунодефицита в условиях внутрижелудочного поступления стронция с питьевой водой, и выбор в качестве чувствительного индуктора процесса иммунодефицита CD62L^+ - периферийной крови и материала селезенки, и предложенное в качестве критериального коэффициента отношение $\text{CD62L}^+ \text{кровь} / \text{CD62L}^+ \text{селезенка}$, а также числовое значение этого коэффициента.

Индукционное воздействие на иммунную систему лабораторных животных осуществлялось минимально действующей концентрацией стронция (10 мг/л), умеренно превышающей принятую предельно допустимую концентрацию (ПДК) стронция в воде (7 мг/л).

Выбор в качестве рабочей концентрации стронция 10 мг/л для индукции иммунотропных изменений основывался на следующих рассуждениях. По данным научной литературы в концентрациях 10 и более мг/л хлорид стронция, вводимый самкам крыс с питьевой водой во время беременности, оказывал эмбриотоксическое действие (Сергеев Е.П., Кучма Н.Ю. // Гигиена и санитария. 1979. №6. С. 11-13). Поэтому использование в качестве действующей концентрации стронция выше 10 мг/л может привести к возникновению более грубых, чем иммунотоксические, функциональных и морфологических изменений в тканях. Тогда как применение концентрации ниже чем 10 мг/л может не сопровождаться инициацией возникновением иммунотропных эффектов, так как она будет сопоставима с недействующей концентрацией.

Перечень операций предлагаемого способа будет проиллюстрирован примером конкретного осуществления.

1. Эксперименты выполнены на 24 здоровых 8-10-недельных (масса 18-24 г) мышах линий Balb/c, разделенных на две группы: 1 - контрольная (количеством $n=8$) (без введения стронция), 2 - опытная группа (количеством $n=16$), т.е. животные с моделированной интоксикацией хлоридом стронция;

2. Для эксперимента был приготовлен водный раствор хлорида стронция в концентрации 10 мг/л.

3. С использованием мышей опытной группы создавали экспериментальную модель стронциевого иммунодефицита путем однократного внутрижелудочного введения

каждые сутки в течение 45 суток экспериментальному животному указанного раствора хлорида стронция из расчета 1 мг/кг веса животного. Средний объем вводимой жидкости - 2 мл. При внутрижелудочном введении использовали специальный зонд, позволяющий осуществить доставку указанного раствора в желудок через пищевод. Контрольной

группе животных вводился аналогичный объем дистиллированной воды также в течение 45 суток.

4. Далее у подготовленных мышей опытной и контрольной групп производили забор пробы крови в количестве 1 мл путем надреза подъязычной вены.

5. Затем опытную и контрольную мышь забивали путем декапитации, производили вскрытие брюшной полости и извлекали селезенку, которая для последующих опытов помещалась в ступки со льдом. Затем проводили щадящую гомогенизацию лимфоидного органа - селезенки (с помощью гомогенизатора «Miltenyi Biotec», Германия).

6. Из клеток селезенки производили выделение суспензии клеток селезенки (спленоцитов) стандартными методами (<http://www.miltenybiotec.com/en/products-and-services/macs-sample-preparation/sample-dissociation/tissue-dissociation-kits/spleen-dissociation-kit-mouse.aspx>) - ссылка на инструкцию производителя набора Spleen Dissociation Kit, mouse (кат. №130-095-926, Miltenyi Biotec, Германия) или Jungblut, M., Oeltze, K., Zehnter, I., Hasselmann, D., Bosio, A. Preparation of Single-Cell Suspensions from Mouse Spleen with the gentleMACS Dissociator. J. Vis. Exp. (22), e1029, doi: 10.3791/1029 (2008).

7. Для получения иммунокомпетентных клеток из крови использовали метод позитивной иммуноселекции с помощью магнитных частиц («Miltenyi Biotec», Германия), покрытых антителами крысы к CD62L мыши («Becton Dickinson», США). Эксперименты проводились в соответствии с требованиями приказов №1179 МЗ СССР от 11.10.1983 г., №267 МЗ РФ от 19.06.2003 г., а также международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

8. Затем на поверхности указанных выделенных клеток определяют уровень экспрессии CD62L⁺.

9. На основе полученных результатов рассчитывают критериальный коэффициент, равный отношению CD62L⁺кровь/CD62L⁺селезенка.

10. И при его значении, равном 8 и менее, диагностируют клеточный иммунодефицит у экспериментальных животных в условиях экспозиции стронцием.

Данные, полученные в ходе испытаний, приведены в таблице.

Таблица. Данные, полученные предлагаемым способом, по критериальному коэффициенту для установления диагностики клеточного иммунодефицита у экспериментальных животных в условиях экспозиции стронцием

№ п/п	Уровень экспрессии CD62L ⁺ , %		Критериальный коэффициент: CD62L ⁺ кровь/CD62L ⁺ селезен ка
	в иммунокомпетентных клетках крови	в клетках спленоцитов селезенки	
Контрольная группа			
1	21	2	10,5
2	19	1,5	12,7
3	26	2	13
4	22,5	2,5	9
Опытная группа			
5	24	3	8
6	20,5	3	6,8
7	26	5	5,2
8	20	3	6,7
9	23	4	5,75
10	24	6	4

Данные, приведенные в таблице, показывают, что большинство клеток

периферической крови демонстрируют более высокую по сравнению с клетками селезенки экспрессию CD62L⁺. Исследование экспрессии CD62L на лимфоцитах периферической крови у мышей опытной группы не выявило статистически значимых различий по сравнению с контрольной группой. Цитофлуориметрический анализ экспрессии CD62L-маркера на спленоцитах показал, что у мышей опытной группы статистически значимо ($p < 0,05$) повышается количество CD62L⁺ по сравнению с результатами, идентифицированными у интактных животных.

Установлено, что при поступлении в организм животных стронция статистически значимо ($p < 0,05$) снижается критериальный коэффициент CD62L⁺кровь/CD62L⁺селезенка, что является отражением иммунодефицитного состояния у животных. Процентное содержание в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих поверхностный фенотип CD62L⁺, зависит от активационных процессов в периферических лимфоидных органах (селезенка). Таким образом, проведенные исследования показали, что действующая концентрация раствора хлорида стронция 10 мг/л вызывает снижение процессов активации иммунокомпетентных клеток на уровне вторичных лимфоидных органов.

Для обоснования пороговости критериального коэффициента экспрессии, который бы характеризовал иммунные нарушения у экспериментального животного, исходили из следующего принципа. У всех животных, получавших действующую концентрацию стронция, величина критериального коэффициента не превышала 8, в то же время все интактные по отношению к поступлению стронция животные характеризовались уровнем критериального коэффициента более 8 (9 и выше) (см. таблицу).

Приведенные данные показывают, что идентификация снижения коэффициента селективной экспрессии (CD62L⁺кровь/CD62L⁺селезенка) менее чем в 8 раз позволяет диагностировать иммуотоксический эффект стронция, заключающийся в торможении (угнетении) процесса формирования клеточной иммунной защиты.

Для иллюстрации реализации предлагаемого способа приведены два примера по конкретным лабораторным животным, выступающим в качестве экспериментальной модели стронциевого клеточного иммунодефицита, созданной путем внутрижелудочного введения в течение 45 суток раствора хлорида стронция из расчета 1 мг/кг веса животного.

Пример 1. Мышь №1. Не получала стронций с питьевой водой. Значение клеточного фенотипа CD62L⁺ в крови 21 %, в селезенке - 2%. Критериальный индекс=10,5 (т.е. выше 8). Таким образом, анализ клеточных фенотипов, отвечающих за активационные механизмы и их физиологический уровень, указывает на нормальное функционирование лимфоидных клеток в системе кровь-селезенка.

Пример 2. Мышь №7. Получала стронций в питьевой воде в дозе 1 мг/кг в течение 45 суток. Значение клеточного фенотипа CD62L⁺ в крови 26%, в селезенке - 5%. Критериальный индекс=5,2 (т.е. меньше 8). Таким образом, анализ клеточных фенотипов, отвечающих за активационные механизмы и их пониженный уровень, указывает на наличие дефицитного состояния в иммунной системе, обусловленного действием стронция.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет более глубоко изучить и расширить представления о патогенетических механизмах развития клеточного иммунодефицита, определить параметры чувствительности экспериментальных животных при внутрижелудочном поступлении стронция и созданной при этом экспериментальной

модели стронциевого иммунодефицита, благодаря чему повышается воспроизводимость и точность, удобство для тиражированного проведения экспериментов на животных при оценке иммуотропных эффектов других токсикантов или лекарственных препаратов, касающихся клеточного иммунодефицита, при их клинических испытаниях.

Преимущества заявляемого способа состоят в том, что эксперимент производят *in vivo*, т.е. на организме лабораторного животного, в условиях неинвазивного внутрижелудочного поступления токсиканта (стронция), что, во-первых, повышает возможности его воспроизводимости, а также позволяет моделировать естественные условия его иммутоксического действия, изучить механизмы взаимосвязи различных компартментов иммунной системы, таких как иммунные клетки периферической крови и клетки лимфоидных органов, что в дальнейшем позволяет провести корректный качественный и количественный анализ их взаимодействия или кооперации (кровь-селезенка).

Преимуществом заявляемого способа является и то, что лежащий в его основе диагностический алгоритм позволяет идентифицировать состояние клеточного иммунодефицита по изменению показателей клеток селезенки (спленоцитов), в то время как аналогичный показатель, указывающий на иммунодефицит клеток периферической крови (лимфоцитов), остается неизменным. Таким образом, диагностика с использованием только клеток крови не может обеспечить достоверную идентификацию клеточного иммунодефицита, тогда как заявляемым способом на клетках селезенки диагностируются более ранние его проявления.

Заявляемый способ повышает точность изучения параметров иммунодефицита, так как на этапе оценки результатов эксперимента, производимого *in vitro*, используется высокотехнологическое тестирование, заключающееся в выборе чувствительного

маркера - $CD62L^+$, изменение содержания которого является ранним признаком иммунодефицита, а также в использовании высокочувствительного метода его идентификации - проточной цитометрии на полуавтоматическом лазерном цитометре с современным программным обеспечением. Тем не менее, использование современных подходов к идентификации стронциевого иммунодефицита и параметров чувствительности к стронциевой интоксикации не приводит к его усложнению. Он прост в исполнении, что позволяет его тиражировать, например, при оценке иммуотропных эффектов других токсикантов или лекарственных препаратов при их клинических испытаниях.

Формула изобретения

1. Способ диагностики клеточного иммунодефицита у экспериментальных животных в условиях экспозиции стронцием, характеризующийся тем, что создают экспериментальную модель стронциевого иммунодефицита путем внутрижелудочного введения в течение 45 суток экспериментальному животному водного раствора хлорида стронция из расчета 1 мг/кг веса животного, далее производят забор у этого животного пробы крови и последующее извлечение селезенки, затем извлекают иммунокомпетентные клетки из крови и клетки-спленоциты из гомогенизированного материала селезенки, определяют на мембранах указанных клеток уровень экспрессии $CD62L^+$, рассчитывают критериальный коэффициент экспрессии, равный отношению $CD62L^+$ кровь/ $CD62L^+$ селезенка, и при его значении, равном 8 и менее, диагностируют клеточный иммунодефицит у экспериментальных животных в условиях экспозиции стронцием.

2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что при создании экспериментальной модели стронциевого иммунодефицита используется водный раствор хлорида стронция с концентрацией 10 мг/л.

5

10

15

20

25

30

35

40

45