

**ВАЖНОСТЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЛЯ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ПРИ
ПОМОЩИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТОДА**

ТМАТФ преподаватель анатомии Пардаев Эркин Соатович

Студент ТМАТФ Салимов Саидаминбек Мадаминович

Студент ТМАТФ Рашидов Самандар Обид угли

Студентка ТМАТФ Рузиева Озода Икром кизи

Введение. Для исследования были выбраны беспородные белые крысы мужского пола в возрасте 2-3 месяца, вес которых на момент начала эксперимента составлял 150-180 гр., а также аналогично мыши белого цвета без определённой породы, возраст которых составлял аналогично 2-3 месяца, а масса идентифицировалась на начало эксперимента как 18-22 гр. Также для исследования были использованы куры на ювенильной стадии развития в возрасте 7-10 дней с момента вылупления, вес которых составлял на момент проведения исследования 60-90 гр. В составе контрольной и экспериментальных групп нами было подобрано оптимальное количество животных для репрезентативности экспериментальных данных, равное 8-10 особям.

Кормовая база для контрольной и экспериментальных групп были подобраны в соответствии с правилами содержания экспериментальных животных в условиях вивария. Аналогично, исследовательские действия над представителями указанных видов проводились по правилам, обозначенным в рамках Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986) [2].

В целях получения комплемента для исследования были отобраны представителя морских свинок, вес которых на момент первичного измерения составлял 300-400 г. Первично для извлечения комплемента проводилась процедура декапитации животного, после которой производился забор плазмы крови, лишённой фибриногена. В последствие её закладывали в специальную камеру для сохранения постоянной температуры на уровне стабильного значения, равного -20° С. Непосредственно во время проведения активных манипуляций с веществом его смешивали с изотоничным для плазмы крови

МЕДИЦИНА, ПЕДАГОГИКА И ТЕХНОЛОГИЯ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

Researchbib Impact factor: 11.79/2023

SJIF 2024 = 5.444

Том 2, Выпуск 6, 30 Июнь

раствором пропорционально равно 1:20. Применительно же к ювенильным курам использовалась в качестве антигена соответственный препарат, забранный из кровеносного русла цыплят.

В роли корпускулярного антигена в череде исследовательских манипуляций применялись красные кровяные клетки копытных, а именно эритроциты барана (ЭБ), представляющие собой антиген, зависимый от вилочковой железы. Предварительно с целью иммунизации красные кровяные клетки подвергали процессу центрифугирования первично и вторично при использовании среды 199 и режиме центрифугирования, равном 1000 оборотам за промежуток времени в 600 секунд. Экспериментальные объекты подвергались процедуре иммунизации единожды в пропорциях вводимого вещества, равных 10^8 или 2×10^8 при помощи введения препарата интроперитонеально в объеме 0,5 мл изотонического для вещества раствора.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали активное вещество- крем Azamzar его состав:

Elsenia andrei-1 г; лавр-1 г; липид- 1.5 г. алоэ-15г; растительные экстракты 2 г. Амдир – 2г, ланолин-2г. цинк-0.1г. вазелин-15 г. Вода очищенная, глицерин, диметикон. Цетиловый спирт, полиакрилат натрия и изотретинол изонаноат и тридецит. Моноглицерид глицерина, изопропилпальмитат. активный ингредиент из морских водорослей (Phycosaccharide AIP) карбамид, стеариновая кислота, диметикон и ПЭГ/ППГ 18/18 диметикон. Д-пантенол. воск пчелиный. бисаболол. экстракты чайного дерева лаванды, череды, эфирное масло лаванды, экстракт березовых почек, экстракт софоры японской, трилон Б. бензиловый спирт, метилхлороизотиазолинон. метилизотиазолинон

Препаратами сравнения или референс-препаратами с целью фиксации эффективности иммуностимулирующего эффекта экспериментального препарата использовались уже успешно введёнными в клиническую практику иммуностимулирующие препараты, такие как Т-активин и иммунал, поставляемые из Словении и производимые в качестве лекарственного и терапевтического средства фармацевтической компанией Лек д.д. Данные препараты аналогично исследуемому вводились в экспериментальных животных в дозировках, равных 0,5 и 50 мг/ кг. При наличии у экспериментальных

МЕДИЦИНА, ПЕДАГОГИКА И ТЕХНОЛОГИЯ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

Researchbib Impact factor: 11.79/2023

SJIF 2024 = 5.444

Том 2, Выпуск 6, 30 Июнь

животных условий повышенной мышечной активности в качестве референса нами применялся бемитил. В случае же регистрации признаков острой формы воспаления ткани печени, вызванной отравлением химическими веществами также применялся препарат, призванный снизить токсическое действие на орган- гепатопротектор легалон.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Методика регистрации антител продуцирующих клеток в спленуме экспериментальных объектов.

Представителей рода *Mus* подвергали процедуре иммунизации при помощи красных кровяных телец копытного и по истечению пятидневного срока проводилась их немедленная декапитация. Из тела экспериментального животного происходило изъятие спленума и подсчет в его составе соответственно клеток, способных к продукции антител (АОК) при помощи технологии прямого местного разрушения клеток крови в агарозе по Jerne и Nordin (1963) [11]. Так, по данной технологии в указанном научном труде спленум животного подвергали процедуре дробления в силикатном гомогенизаторе в среде номер 199 объемом равном 5 мл и проводили процедуру отцеживания и осаждения при помощи фильтровального устройства с капроновым двухкомпонентным покрытием. Агарозу, производимую компанией «Serva», в расчетном соотношении, равном 600 мг на 100 мл раствора Хэнкса доводили до полного состояния вываривания на протяжении 60 минут при температурном режиме в пределах 50°C при вываривании в чаше с водой. Для экспериментальных целей также подготавливали заранее 20% раствор красных кровяных телец копытного. В микробиологическую посуду диаметром 40 мм переливали 100 мкл целлюлярного препарата из спленума представителей *mus*, 1 мл препарата из агарозы и 40 мкл 20% препарата из красных кровяных телец копытного. Получившееся в результате этих манипуляций вещество было гомогенно разложили по всему диаметру посуды, после чего на срок 90 минут размещали в термостате при стабильной температуре, равной 37 °С. Далее в рамках экспериментальных манипуляций в состав полученного вещества докладывали по 1 мл компонента извлечённого из *Cavia porcellus*, предварительно смешанного с изотоническим раствором в пропорциональном отношении, равном 1:20. Следом специальную посуду снова подвергали

МЕДИЦИНА, ПЕДАГОГИКА И ТЕХНОЛОГИЯ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

Researchbib Impact factor: 11.79/2023

SJIF 2024 = 5.444

Том 2, Выпуск 6, 30 Июнь

процедурам с использованием термостата в течение 60 минут. Следом в полученном в результате этого веществе измеряли и фиксировали участки с выраженным гемолизом («бляшки»), на относительно удаленном от каждой стороны конце специализированной посуды которого располагались АОК. Числовое соотношение АОК определяли на целостный спленум как абсолютный показатель и на 1 млн целлюлярного состава спленума как относительный показатель. С целью определения точного значения относительного показателя первично проводили манипуляции по расчёту количественного состава нуклеосодержащих клеток спленума (ЯСКС) применительно к раствору из этановой кислоты со значением 0,4 мл 5%. Затем производилось определение общего количественного состава ЯСКС и в соответствии с полученными данными производили также и количественное измерение АОК на 1 млн. клеток селезёнки по формуле:

$$X = A/B,$$

где А - количество АОК на всю селезенку,

Б - число ЯСКС в млн.

Технология расчета антитело продуцирующих клеток в спленуме ювенильных кур

Количественный состав АОК в спленуме ювенильных кур рассчитывали по технологии, которая указывалась в научных работах И.А. Болотникова и Ю.В. Конопатова (1987) [1]. Для этих целей спленум ювенильных кур измельчали и смешивали с 2 мл среды 199 при помощи специального аппарата и аналогично отфильтровывали при помощи фильтра из полиамида 6. Следующим этапом было добавление 0,1 мл препарата из спленума к 1 мл 0,6% раствора агарозы, а также 0,04 мл 20% препарата из красных кровяных телец копытных. Следом проводилась манипуляция над Чашками Петри использованием термостата в течении 90 минут при стабильном температурном режиме равном +30⁰С. В заключение в лабораторную посуду с данным веществом также вносили и 1 мл комплемента, выделенного и извлечённого из ювенильных кур, которую предварительно смешали в пропорции 1:1. Затем проводились последние манипуляции с веществом – помещение в термостат на 60 минут и определение числового состава АОК в спленуме.

Методика определение гематологических показателей

МЕДИЦИНА, ПЕДАГОГИКА И ТЕХНОЛОГИЯ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

Researchbib Impact factor: 11.79/2023

SJIF 2024 = 5.444

Том 2, Выпуск 6, 30 Июнь

С целью определения гематологических показателей у всех испытуемых животных также рассчитывались числовые составы целлюлярного компонента вилочковой железы и костного мозга, как центральных иммунных органов, а также спленума и лимфатических узлов брыжейки как периферических иммунных органов по технологии, описанной в научных работах Р.В.Петрова, Ю.М.Зарецкой (1965). У испытуемой группы в составе периферической крови производилось количественное определение целлюлярного состава красных и белых кровяных телец. С целью исследования количества красных кровяных клеток в посуду добавляли 4 мл нормального раствора, а также 20 мкл гематической жидкости. В свою очередь для определения числовых показателей белых кровяных клеток смешивали пропорционально 20 мкл гематической жидкости и 0,4 мл 5% раствора этановой кислоты. Затем в процедуре подсчета применялся метод исследования количественного состава с использованием камеры Горяева.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фиксация наличия антител к красным кровяным тельцам копытных в периферической гематической жидкости

Для определения наличия и количественного состава антител к эритроцитам барана в 96-ти луночные планшеты добавляли по 50 мкл нормального изотонического раствора [6]. Следующим этапом в одну из лунок лунку доливали 50 мкл плазмы без фибрина от экспериментального объекта, проводили процедуру перемешивания, а затем проводили титрование последовательным переносом в остальные лунки. Так необходимо было сделать вплоть до того, что необходимо было оставить лишь 2 последних ряда лунок. Одна из лунок в своем составе содержала в качестве контроля лишь нормальный изотонический раствор для крови млекопитающих. Следом к уже имеющимся растворам вливали 50 мкл 1% раствора красных кровяных клеток копытных. Лабораторную посуду располагали внутри термостата на 60 минут при температурном режиме, равном 37°C. Следом вели подсчет титра антител в реакции склеивания и осаждения эритроцитов. В качестве титра антител условно засчитывали окончательное смешение препарата, обозначаемое реакцией, по форме напоминающей зонтик, то есть взаимодействием с красными кровяными

МЕДИЦИНА, ПЕДАГОГИКА И ТЕХНОЛОГИЯ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

Researchbib Impact factor: 11.79/2023

SJIF 2024 = 5.444

Том 2, Выпуск 6, 30 Июнь

клетками копытных млекопитающих. Результаты демонстрировались в виде логарифмов с основанием 2 (\log_2)

Фиксация наличия конкуренции антигенов в лимфоцитарном ответе

С целью провоцирования явления антигенной конкуренции представителям рода *mus* на начальном этапе как доминантный антиген внедряли красные кровяные тельца лошади (ЭЛ) в соотношении 1×10^9 и спустя 4-ро суток внедряли красные кровяные тельца барана в объемах 2×10^8 (иммунизирующий антиген). По истечению 4-рех суток производился непосредственно подсчет АОК в спленуме [7].

Для исследования нами были выбраны мужские особи белых беспородных представителей рода *mus* с весом при контрольном измерении равном 18-20 г. Данных представителей обездвиживали и располагали на специальном приспособлении на дорзальной плоскости тела в течение 6 часов. Следом экспериментальные объекты подвергали процедуре умерщвления при помощи мгновенной декапитации, предварительно обезболив их при помощи легкого эфирного наркоза. Полученное в результате вещество в начале исследования внедряли в организм животного интраперитонеально за 60 минут до их обездвиживания. На следующий день процедура введения была совмещена с внедрением в организм антигена. Через четверо суток у испытуемых из серии номер 2 аналогично определяли степень воздействия стресса на физиологические показатели по описанным ранее методам сбора и учёта данных, а также выявляли то, насколько активен был ответ иммунной защиты организма и какие отклонения или специфические особенности возникали в результате воздействия в различных системах организма мышей.

ВЫВОДЫ:

Статистическая обработка и фиксирование данных исследования были проведены благодаря учёту в базу данных ЭВМ и обработки их путём применения для статистического анализа t-критерия Стьюдента. Для вычислительных операций были использованы функции программы ПК «Microsoft Excel». Для расчета всех необходимых параметров применялись следующие условные обозначения:

- средняя арифметическая (M);
- среднее квадратичное отклонение (σ);

МЕДИЦИНА, ПЕДАГОГИКА И ТЕХНОЛОГИЯ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

Researchbib Impact factor: 11.79/2023

SJIF 2024 = 5.444

Том 2, Выпуск 6, 30 Июнь

- стандартная ошибка (m);
- критерий Стьюдента (t);
- вероятность ошибки (p);

При значении, равном $P < 0,05$ изменения фиксировались как статистически значимые. При этом стоит отметить, что для корректных расчётов нами были учтены и приняты к сведению постулаты, указанные в современных руководствах по статистической обработке данных клинических и лабораторных исследований [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Болотников И. А., Конопатов Ю. В. Физиолого-биохимические основы иммунитета сельскохозяйственных птиц: -Л.: Наука, 1987. – 164 с.
2. Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). 13 с. <https://base.garant.ru/>
3. Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. Прикладная медицинская статистика : Учеб. пособие для студентов мед. вузов - СПб. : Фолиант, 2003 (Акад. тип. Наука РАН). – 428 с.
4. Закирходжаев Ш.Я., Касымов И.Ю., Дулянов Р.П. и др.. Эффективность иммуностимулирующей пищевой добавки “Табиб 1” у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки в период ремиссии //Журнал теоретической и клинической медицины, 2000. - № 4. - С. 102-103.
5. Петров Р. В., Зарецкая Ю. М. Трансплантационный иммунитет и радиационные химеры [Текст]. Москва : Атомиздат, 1965. - 231 с.
6. Петров Р.В. с соавт. //Методические материалы по экспериментальному (фармакологическому) испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств. –М., 1984. - 35 с.
7. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И. Иммуногенетика и искусственные антигены. - М. - Медицина.- 1983. - 256 с.
8. Примкулов А. Ж. Влияние экстракта из почек кур и селезенки овец на Т-супрессоры и розеткообразующие клетки у мышей-опухоленосителей //Журнал «Аллергология и иммунология».- Матер. II съезда иммунологов и аллергологов СНГ .- Сочи. – Россия. - 2000.- Т.1.- №2.- С.168. 3

МЕДИЦИНА, ПЕДАГОГИКА И ТЕХНОЛОГИЯ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

Researchbib Impact factor: 11.79/2023

SJIF 2024 = 5.444

Том 2, Выпуск 6, 30 Июнь

9. Примкулов А. Ж. Влияние экстракта из почек кур и селезенки овец на Т-супрессоры и розеткообразующие клетки у мышей-опухоленосителей //Журнал «Аллергология и иммунология».- Матер. II съезда иммунологов и аллергологов СНГ .- Сочи. – Россия. - 2000.- Т.1.- №2.- С.168. 4

10. Прус Е. К. Биологическая характеристика очищенных компонентов экстракта селезенки черепахи *Testudo horsfieldi*: Дис.... канд. биол. наук. - Ташкент. - 1990.- 106 с. 5

11. Jerne N. K., Nordin A. A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells //Science. -1963- Vol.- 140. - P. 405-407.