

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного

Методичні рекомендації
щодо практичних занять з навчальної дисципліни
«Імунодіагностика, імунотерапія та імунопрофілактика вірусних
інфекцій»

Рекомендовано Вченою радою Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (протокол № 10 від 23.10.2025 р.)

Укладачі:

Співак М.Я., академік НАН України, професор, доктор біологічних наук, головний науковий співробітник відділу проблем інтерферону та імуномодуляторів

Лазаренко Л.М., доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, провідний науковий співробітник відділу проблем інтерферону та імуномодуляторів

У методичних рекомендаціях до навчальної дисципліни «Імунодіагностика, імунотерапія та імунопрофілактика вірусних інфекцій» подано зміст практичних занять з вивчення показників імунореактивності організму та впливу на них імунотропних препаратів. У методичних рекомендаціях наведено методики досліджень і прописи необхідних матеріалів, буферів та розчинів.

1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Ці методичні рекомендації присвячені формуванню практичних навичок щодо сучасних імунологічних методів, які застосовуються для імунодіагностики, імунопрофілактики та імунотерапії. Особлива увага приділяється вмінню адаптувати ці методи для вирішення конкретних науково-практичних завдань у рамках власних експериментальних досліджень, зокрема визначенню впливу імунотропних та інших препаратів на показники імунореактивності організму. Дослідження ґрунтуються на аналізі фізикального стану тварин, а також оцінюванні показники імунного статусу на трьох рівнях оцінювання: орієнтуючому (кількісної оцінки імунологічних параметрів); ефекторному або функціональному; а також рівні визначення молекулярно-біологічних механізмів дії (продукції імунорегуляторних речовин та гормонів, експресії костимуляційних молекул тощо).

2. НОРМАТИВНІ ПОСИЛАННЯ

У цих методичних рекомендаціях є посилання на наступну нормативну документацію:

ДСТУ EN 54-1:2017	Системи пожежної сигналізації. Частина 1. Вступ та положення
ДСТУ EN 689:2019	Методи оцінки відповідності впливу інгаляційних хімічних речовин.
ДСТУ EN 482:2015 –	Загальні вимоги до методів вимірювання хімічних агентів у повітрі робочої зони.
ДСТУ ISO 16000 (серія)	Якість повітря у приміщеннях (мікробіологічні та хімічні показники).
ДСТУ ISO 1014:2014	Паспорт безпеки хімічних речовин. Класифікація та маркування.
ДСТУ EN 689:2019	Визначення відповідності впливу інгаляційних хімічних речовин на робочому місці.
ДСТУ EN 14042:2015	Стратегії вимірювання та оцінки впливу на робочому місці
ДСТУ EN 12128:2014	Лабораторії мікробіологічні. Вимоги до біобезпеки
ДСТУ EN 12469:2016	Біологічні шафи безпеки. Вимоги та методи випробувань
ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019	Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій
ДСТУ EN ISO 12100:2014	Безпечність машин. Загальні принципи конструювання.
ДСТУ EN 340:2001	Оцінка ризику та зниження ризику
ДСТУ EN ISO 13688:2016	Засоби індивідуального захисту. Загальні вимоги
ДСТУ EN 149:2017	Захисний одяг. Загальні вимоги
ДСТУ EN 149:2017	Фільтрувальні респіратори для захисту від частинок. Вимоги та методи випробувань
ДСТУ EN 166:2017	Засоби захисту очей. Загальні вимоги
ДСТУ EN 374 (серія):2017	Захисні рукавички від хімічних речовин та мікроорганізмів
ДСТУ ISO 14001:2015	Системи екологічного менеджменту. Вимоги та настанови щодо застосування
ДСТУ ISO 14004:2016	Системи екологічного менеджменту. Загальні настанови щодо принципів, систем та методів
ДСТУ ISO 14040:2014	Екологічне управління. Оцінка життєвого циклу. Принципи та структура
ДСТУ EN 13779:2011	Вентиляція нежитлових будівель. Вимоги до параметрів повітря

ДСТУ ISO 4788:2005	Лабораторний посуд. Мірні циліндри. Технічні вимоги
ДСТУ ISO 1042:2005	Лабораторний посуд. Мірні колби. Технічні вимоги
ДСТУ ISO 3819:2005	Лабораторний посуд. Мензурки. Технічні вимоги
ДСТУ ISO 4142:2005	Лабораторний посуд. Пробірки. Загальні технічні вимоги
ДСТУ EN ISO 15189:2015	Медичні лабораторії. Вимоги до якості та компетентності (для підтвердження відповідності обладнання та посуду стандартам якості)
ДСТУ 2708-99	Метрологія. Повірка засобів вимірювальної техніки. Організація та порядок проведення.
ДСТУ 7270:2012	Метрологія. Прилади зважувальні еталонні. Загальні технічні вимоги, порядок та методи атестації

Державна фармакопея України.

Закон України “Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів”.

3. ТЕХНІЧНІ ВИМОГИ ДО ЯКОСТІ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Імунологічні дослідження повинні відповідати вимогам цієї методички зазначеним вище нормативним посиланням.

3.2 Вимоги до реагентів

3.2.1 У доклінічних дослідженнях використовують наступні реагенти:

- Живильне середовище 199 згідно з паспортними характеристиками.
- Живильне середовище RPMI-1640 згідно з паспортними характеристиками.
- Ембріональну телячу сироватку згідно з паспортними характеристиками.
- Розчин Хенкса згідно з паспортними характеристиками.
- 0,15 М NaCl згідно з паспортними характеристиками.
- Латекс згідно з паспортними характеристиками.
- Азур-еозин згідно з паспортними характеристиками.
- Фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) згідно з паспортними характеристиками.
- Нітросиній тетразолій згідно з паспортними характеристиками.
- Сафранін згідно з паспортними характеристиками.
- Глютамін згідно з паспортними характеристиками.
- Гентаміцин згідно з паспортними характеристиками.
- Стрептоміцин згідно з паспортними характеристиками.
- Пеніцилін згідно з паспортними характеристиками.
- NEPES згідно з паспортними характеристиками.
- Гепарин згідно з паспортними характеристиками.
- Фітогемаглютинін (ФГА) згідно з паспортними характеристиками.
- Ліпополісахарид (ЛПС) згідно з паспортними характеристиками.
- Ридостин згідно з паспортними характеристиками.
- Спирт етиловий згідно з паспортними характеристиками.
- Реактив Грісса-Глосваля згідно з паспортними характеристиками.
- Актиноміцин D (AcD) згідно з паспортними характеристиками.
- Кристалічний фіолетовий згідно з паспортними характеристиками.
- Формалін згідно з паспортними характеристиками.
- Гематоксилін згідно з паспортними характеристиками.
- Еозин згідно з паспортними характеристиками.
- Гепарин згідно з паспортними характеристиками.
- Диметилсульфоксид (ДМСО) згідно з паспортними характеристиками.

- Тест-систему імуноферментну для визначення інтерферону- γ , інтерферону- α , фактора некрозу пухлин- α , інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-6, інтерлейкіну-10, інтерлейкіну-12, інтерлейкіну-17, інтерлейкіну-23 згідно з паспортними характеристиками.
 - Моноклональні антитіла до CD282, CD284, CD11, CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45, CD138 молекул згідно з паспортними характеристиками.
 - Моноклональні антитіла до молекул до CD282, CD284i для імуногістохімічних досліджень згідно з паспортними характеристиками.
 - Ізотиповий контроль IgG2a та IgG2b згідно з паспортними характеристиками.
- 3.2.2 Кожна партія реагентів повинна супроводжуватись документом про якість встановленої форми.

3.2 Вимоги до експериментальних тварин

3.2.1 Використовують статевозрілих тварин. Розходження по масі тварин не повинно перевищувати 15 %. Тварини повинні утримуватись у стандартних умовах віварію в пластикових клітках в окремому приміщенні при сталій температурі повітря (22-25 °C); отримувати повноцінне харчування та мати вільний доступ до автопоїлок. Перед початком експерименту тварини повинні витримуватись на карантині протягом двох тижнів і не мати клінічних ознак будь-яких захворювань.

3.2.2 Усі дослідження повинні проводитись із урахуванням норм Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, від 18.03.1986 р. (Страсбург) та закону України № 3447-IV „Про захист тварин від жорстокого поводження”.

3.3 Вимоги до культур клітин

Культури клітин, які використовуються у дослідженнях, повинні мати паспорт культур клітин.

У дослідженнях використовують перещеплювану культуру фібробластів мишей L-929 (колекції: АТСС ССЛ 1; ЕСАСС 88102702; НДІ вірусології РАМН; ІНЦ РАН, НДІ грипу РАМН) з паспортом культур клітин.

3.4 Вимоги до бактеріальних

Культури бактерій, які використовують у дослідженнях, повинні мати паспорт штаму. Життєздатність ліофілізованих культур мікроорганізмів перед кожним дослідженням перевіряють шляхом контролю їх росту на селективних середовищах.

3.5 Вимоги до вірусів

Віруси, які використовують у дослідженнях, повинні мати паспорт вірусу.

У дослідженнях використовують вірус везикулярного стоматиту (ВВС) штам Індіана (отриманий з музею НДІ епідеміології і мікробіології ім. Н.Ф. Гамалеї (Москва), інфекційний титр вірусу = 10^6 ІД₅₀/мл), який має паспорт вірусу.

3.6. Вимоги до приладів

У дослідженнях використовують: ламінарний бокс, центрифуги, термостат, спектрофотометр, світловий мікроскоп, інвертований світловий мікроскоп, ліофільну сушку, автоклав, холодильник, протоковий цитофлюориметр, мікротом.

Прилади повинні бути метрологічно перевірені.

4. ВИМОГИ БЕЗПЕКИ

4.1. Вимоги безпеки.

4.1.1. При доклінічних дослідженнях імуномодулювальних та протизапальних властивостей пробіотичних штамів бактерій необхідно керуватися вимогами з техніки безпеки згідно з ГОСТ 12.1.007, ГОСТ 12.1.008.

4.1.2 Вимоги до пожежної безпеки повинні відповідати ГОСТ 12.1.004.

4.1.3 Загальні вимоги до виробничого обладнання повинні відповідати ГОСТ 12.2.003.

4.1.4 Вимоги безпеки працівників повинні відповідати ГОСТ 12.4.011.

5. ВИМОГИ ОХОРОНИ ДОВКІЛЛЯ, УТИЛІЗАЦІЯ

5.1 Вимоги охорони довкілля.

5.1.1 Контроль над станом довкілля, який включає охорону атмосферного повітря, контроль за викидами стічної води, охорону ґрунту, повинен виконуватись згідно з вимогами ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 17.0.0.01, ГОСТ 17.2.3.02, ДСП 201, СанПиН 4630, СанПиН 42-128-4690.

6 МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ВІД ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

6.1 Тварини

Дослідження проводять з використанням мишей різних генетичних ліній вагою 16-18 г (віком 7-8 тижнів).

6.2 Прилади та реактиви

Використовують: камеру Горяєва, ефір, ножиці Кохера, препарувальні столики, живильне середовище 199, формалін, спирт етиловий.

6.3 Проведення дослідження

Для отримання клітин перитонеального ексудату тушку миші, яку присипляють ефірним наркозом, укладають на препарувальному столику на спину, обробляють спиртом черево, розрізають шкіру по середній лінії вздовж усього тіла. Шкіру фіксують препарувальними голками, оголюючи м'язову поверхню черевної сторони тулуба. Шприцом з тонкою голкою вводять 4-5 мл охолодженого середовища 199 з 1 % фетальної телячої сироватки та 20 од/мл гепарину дочеревно праворуч або ліворуч від білої лінії живота. Для перемішування введеного розчину з нутрощами миші обережно масажують черевце, що здулося, протягом 3-5 хв. Шприцем з товстою голкою відбирають введене в порожнину середовище. Голку вводять зрізом догори на відстані 2 см праворуч від середньої лінії очеревини (у цьому місці видно вільний від нутрощів простір). Отриману суспензію клітин перитонеального ексудату (без еритроцитів) центрифугують при 1500 об/хв протягом 5 хв, до осаду клітин додають 5-7 мл охолодженого середовища 199, ресуспендують та використовують у подальших дослідженнях. Кількість клітин підраховують у камері Горяєва.

Для отримання периферійної крові мишей присипають ефіром, потім фіксують за холку вказівним та великим пальцями лівої руки, мізинцем притискають до долоні корінь хвоста. Хвіст протирають спиртовим ватним тампоном, одразу після цього надрізають вену скальпелем, тримаючи мишу так, щоб краплі венозної крові капали на дно пробірки. Кров у пробірках витримують у термостаті при 37 °С протягом однієї години, потім витягнутим носиком пастерівської піпетки відділяють від стінок пробірки згусток, що утворився. Далі мікропіпеткою обережно відбирають сироватку з пробірки та центрифугують її при 3000 об/хв протягом 5 хв. Надосад відбирають у нові стерильні мікропробірки типу "Eppendorf" мікропіпеткою, нумерують та використовують у подальших дослідженнях. При необхідності сироватку заморожують при -20 °С та зберігають її до постановки експериментальних досліджень.

Для отримання стінки піхви тушку миші, яку присипляють ефірним наркозом, укладають на препарувальному столику на спину, обробляють спиртом черево, розрізають шкіру по середній лінії вздовж усього тіла. Шкіру фіксують препарувальними голками, оголюючи м'язову поверхню черевної сторони тулуба. Розріз м'язів роблять ножицями, попередньо відтягнувши черевну стінку; видаляють стінку піхви та поміщають її у 10 % формалін.

Для отримання селезінки тушку миші, яку присипляють ефірним наркозом, кладуть на препарувальний столик на правий бік, лівий – обробляють спиртом. На черевці роблять сагітальний розріз шкіри довжиною 2-2,5 см, ліворуч білої лінії, потім розріз розсовують пінцетом (щоб через тонкий м'язовий шар було видно темно-буру селезінку). Розріз м'язів роблять ножицями, попередньо відтягнувши черевну стінку; пінцетом достають селезінку, обережно відрізають ножицями сполучні тяжі та поміщають її в стерильну чашку Петрі на льоду. Від селезінки відпрепаровують залишки сполучної тканини і гомогенізують її в охолоджену середовищі 199, фільтруючи через 4-шаровий капроновий фільтр. Кількість спленоцитів підраховують у камері Горяєва. Усі маніпуляції проводять на холоді [12-15].

7. ШЛЯХИ ВВЕДЕННЯ ІМУНОГЕНІВ ТА ІМУНОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ ЛАБОРАТОРНИМ ТВАРИНАМ

7.1 Тварини

Для проведення лабораторних дослідів використовують мишей різних генетичних ліній, які є найбільш поширеною моделлю в імунологічних дослідженнях. Зазвичай беруть тварин віком 6–10 тижнів із масою 18–25 г, оскільки в цей період їх імунна система є зрілою та стабільною. Стать: допускається використання як самців, так і самок. Миші повинні перебувати у стандартних умовах віварію (температура 20–24 °С, відносна вологість 40–60 %, світловий режим 12/12 год). Годування здійснюється повноцінним гранульованим кормом та водою. Перед початком експериментів необхідно отримати дозвіл комітету з біоетики ІМВ НАН України. Для введення імуногенів або імунотропних препаратів застосовують ручну фіксацію або спеціальні пристрої без травмування та надмірного стискання.

7.2 Прилади і реактиви

У роботі використовують:

- стерильні одноразові шприци різного об'єму (0,5–2,0 мл);
- голки відповідного діаметра (27–30G для внутрішньовенних та підшкірних ін'єкцій, 25–27G для внутрішньочеревних);
- піпетки та мікропіпетки для точного дозування;
- фіксатори для мишей (станки, дошки, стереотаксичні прилади);
- стерильні пробірки для приготування та зберігання розчинів;
- антисептичні засоби для обробки місця ін'єкції та рук експериментатора.
- розчини імуногенів (антигени у вигляді білкових екстрактів, клітинних суспензій або синтетичних пептидів);
- ад'юванти (повний та неповний ад'ювант Фрейнда, Alum, CpG олігонуклеотиди тощо);
- фізіологічний розчин (0,9 % NaCl) або фосфатно-сольовий буфер (PBS) для розведення антигенів;
- стерильна вода для ін'єкцій;
- дезінфікуючі розчини для інструментів та робочої поверхні.
- одноразові рукавички та халати для експериментатора;
- маркери та етикетки для позначення пробірок;
- контейнери для утилізації використаних голок та шприців.

7.3 Проведення досліджень

Імуноген – антиген, що викликає специфічну імунну відповідь у реципієнта. Введення імуногенів є ключовим етапом отримання імунних сироваток та моноклональних антитіл. Імунотропний препарат — це засіб, який цілеспрямовано впливає на роботу імунної системи, посилюючи або пригнічуючи її функції залежно від терапевтичної мети.

Основні способи введення імуногенів:

- Внутрішньовенне (в/в): 0,2–1,0 мл. Забезпечує швидке надходження антигену у кровотік, стимулюючи гуморальну відповідь. Пік утворення антитілоутворюючих клітин у селезінці – на 4-ту добу.
- Внутрішньочеревне (в/ч): 0,2–1,0 мл. Використовується для корпускулярних антигенів та отримання асцитів. Пік імунної відповіді – на 5-ту добу.
- Внутрішньом'язове (в/м): до 0,5 мл. Застосовується для лікування (антибіотики) та індукції клітинного імунітету у поєднанні з іншими методами.
- Підшкірне (п/ш): до 1,0 мл. Антиген надходить у регіонарні лімфовузли, що забезпечує активацію клітинного імунітету. Часто використовується для первинної імунізації, рекомендовано з ад'ювантом Фрейнда.
- Пероральне (п/о): стимулює імунну систему слизових оболонок, рідше застосовується для отримання сироваток.

Використання ад'ювантів (Freund's Complete Adjuvant, Alum, CpG олігонуклеотиди) значно підвищує титр антитіл та якість імунної відповіді.

Рекомендації до застосування ад'ювантів:

- Рекомендовано використовувати мінімально необхідний об'єм, враховуючи масу тіла миші (звичайно 18–25 г). Надмірний об'єм може викликати стрес та ускладнення.
- Внутрішньовенне введення забезпечує швидкий ефект, підшкірне та внутрішньом'язове – більш тривале вивільнення антигену.
- Оптимальні протоколи часто включають первинну імунізацію підшкірно з ад'ювантом, а бустерні – внутрішньочеревно чи внутрішньовенно. Це дозволяє отримати високоспецифічні антитіла.
- Маніпуляції повинні проводитися відповідно до міжнародних протоколів (IACUC, FELASA), з мінімальним стресом і болем для тварини.

Перед введенням імуногену необхідна надійна ручна фіксація тварини: утримання за хвіст із подальшим захопленням складки шкіри в ділянці потилиці. Можна використати спеціалізовані пристрої: станки, дошки-фіксатори, стереотаксичні прилади. Потрібно дотримуватися принципів гуманності: фіксація повинна бути короткочасною та безпечною сили, щоб уникнути травмування.

Рекомендована схема оптимальної імунізації мишей:

- Первинна імунізація: підшкірне введення антигену з повним ад'ювантом Фрейнда (об'єм 0,1–0,2 мл) для активації клітинного імунітету та формування первинної відповіді.
- Перша бустерна ін'єкція (через 14 днів): внутрішньочеревне введення антигену без ад'юванту (0,2–0,5 мл) для стимуляції гуморальної відповіді.
- Друга бустерна ін'єкція (через 21–28 днів): внутрішньовенне введення антигену (0,2–0,3 мл) для максимальної активації антитілоутворюючих клітин у селезінці.
- Збір матеріалу: на 3–5 добу після останньої ін'єкції проводять забір селезінки або сироватки для подальших досліджень.

Ті самі принципи та вимоги до шляхів введення, що застосовуються для імуногенів, є універсальними також і для імунотропних препаратів. Вони забезпечують контрольованість експерименту, відтворюваність результатів та можливість цілеспрямованого аналізу різних ланок імунної системи. Використання кількох шляхів введення (наприклад, первинна імунізація підшкірно з ад'ювантом, а бустерні внутрішньочеревно чи внутрішньовенно) дозволяє оцінити як первинну активацію, так і формування імунної пам'яті.

7.4 Оцінювання результатів дослідження

Найважливішими критеріями є баланс між силою, специфічністю та тривалістю імунної відповіді, а також її безпечність для організму. Оцінювання ефективності введення імуногенів або імунопропних препаратів проводиться за кількома ключовими критеріями. Проводяться клінічні спостереження: стан тварин після ін'єкцій (поведінка, активність, апетит, наявність місцевих реакцій у місці введення). Визначаються показники гуморальної ланки імунітету: визначення титру антитіл у сироватці крові за допомогою серологічних методів (ELISA, реакція преципітації, імуофлуоресценція). Оцінюється стан клітинної імунної відповіді: активності фагоцитів, кількості антитілоутворюючих клітин у селезінці або лімфовузлах (наприклад, методом ELISPOT), кількості клітин різних популяцій у селезінці тощо. Визначається часова динаміка: аналіз піку імунної відповіді (для внутрішньовенного введення – 4-та доба, для внутрішньочеревного – 5-та доба, для підшкірного – більш тривала активація). Досліджується якість імунної відповіді: специфічність антитіл, їх авідність та здатність нейтралізувати антиген. Встановлюється безпечність: відсутність надмірних побічних реакцій (запалення, аутоімунні прояви), що може свідчити про небажану імунну активацію.

8. МЕТОДОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ДО ОЦІНЮВАННЯ ІНТЕРФЕРОНОВОГО СТАТУСУ ОРГАНІЗМУ

8.1 Тварини

Для дослідження інтерферонового статусу використовують лабораторних тварин (найчастіше мишей, щурів, кролів тощо залежно від мети). Оптимально брати зрілих тварин із стабільною імунною системою і бажано використовувати особин однієї статі для зменшення варіабельності. Тварини повинні перебувати у стандартних умовах віварію (температура 20–24 °С, відносна вологість 40–60 %, світловий режим 12/12 год). Годування здійснюється повноцінним гранульованим кормом та водою. Перед початком експериментів необхідно отримати дозвіл комітету з біоетики ІМВ НАН України.

8.2 Прилади і реактиви

- стерильні шприци та голки для забору крові;
- центрифуга для відділення плазми/сироватки;
- ламінарний бокс для роботи з біологічними матеріалами;
- ELISA-ридер або спектрофотометр для аналізу;
- інкубатор для клітинних культур;
- мікропіпетки для точного дозування.
- стандартизовані набори для визначення інтерферону (ELISA, ELISPOT, біологічні тести на індукцію протівірусного стану);
- контрольні зразки інтерферону (рекомбінантні ІФН- α , - β , - γ);
- фосфатно-сольовий буфер (PBS), фізіологічний розчин;
- антисептики та стерильні витратні матеріали.
- живильні середовища RPMI-1640 або 199;
- глютамін (0,3 мг/мл);
- фетальна теляча сироватка;
- антибіотики (гентаміцин у концентрації 0,08 мг/мл або пеніцилін+стрептоміцин по 100 од/мл);
- HEPES;
- фітогемаглютинін Р (ФГА; Difco, США);
- гепарин;
- 1М HCl;
- 1М NaOH;
- віруси хвороби Н'юкасла (ВХН, штам Індіана), везикулярного стоматиту (ВВС, вакцинний штам Н);
- первинна культуру фібробластів курячих ембріонів, клітини лінії M14.

8.3 Хід дослідження

Проводять комплексне оцінювання ІФН статусу, яке забезпечує багатовимірне розуміння функціональної активності імунної системи та створює підґрунтя для розроблення нових діагностичних і персоналізованих терапевтичних стратегій у сучасній біомедицині. Перед дослідженням отримують периферійну крові, тканину (селезінка, лімфовузли), клітини перитонеального ексудату тощо для аналізу та проводять підготовку зразків: центрифугують крові для отримання плазми/сироватки; готують клітинні суспензії.

Показників ІФН статусу визначають за допомогою таких методів дослідження:

1. Серологічні методи: ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Використовується для кількісного визначення рівня ІФН. Метод ґрунтується на специфічній взаємодії антиген–антитіло. У лунки планшета іммобілізують антитіла до ІФН, далі додають зразок сироватки чи культуральної рідини, де ІФН зв'язується з антитілами. Потім додають вторинні антитіла, кон'юговані з ферментом (наприклад, пероксидазою хрому), які утворюють комплекс. Після додавання субстрату фермент каталізує реакцію, що призводить до утворення кольорового продукту. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації ІФН у зразку. Кількісне визначення ІФН здійснюється шляхом побудови калібрувальної кривої за стандартами відомої концентрації. ELISA характеризується високою чутливістю, специфічністю та можливістю одночасного аналізу багатьох зразків.

2. Функціональні тести: оцінювання індукції противірусного стану в клітинних культурах. Проводять дослідження продукції ІФН- α та - γ у культурі клітин (клітин периферійної крові, клітин селезінки, лімфовузлів, макрофагів перитонеального ексудату (МФПЕ) тощо). При дослідженні продукції ІФН у культурі клітин периферійної крові кров попередньо розводять живильним середовищем у співвідношенні 1:4. Готують живильне середовище RPMI-1640, яке містить 10 % ембріональної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, 1 % глутаміну, 50 мкМ 2-меркаптоетанолу та гентаміцину у концентрації 0,08 мг/мл або пеніциліну+стрептоміцину по 100 од/мл. У дослідженнях можна використовувати також сироватку крові людини і тварин.

ІФН- α індують за допомогою ВХН. Концентрацію вірусу визначають попередньо шляхом титрування у первинній культурі фібробластів курячих ембріонів. Використовують ВХН у робочій дозі 10-100 ТЦД₅₀/0,1 мл. Для індукції ІФН- α у лунки стерильного плоскодонного 24-лункового планшета вносять по 490 мкл живильного середовища, 500 мкл периферійної крові та 10 мкл суспензії ВХН. У контрольні лунки замість суспензії ВХН додають по 10 мкл живильного середовища. Клітини культивують при 37°C протягом 24 год у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO₂ (5 %). Після інкубації планшети центрифугують протягом 10 хв при 1500 об/хв. Із кожної лунки відбирають надосад в іншу стерильну пробірку. У зразках інактивують ВХН. Для цього надосад підкислюють розчином 1 М HCl до рН_{2,0} та витримують при 4°C 48-72 год. Далі рН зразків доводять до 7,2-7,4 за допомогою 1М NaOH. Для індукції ІФН- α можна використовувати препарати індукторів ІФН, наприклад Ридостин

ІФН- γ індують за допомогою ФГА. У лунки стерильного плоскодонного 24-лункового планшета вносять по 500 мкл живильного середовища із ФГА у концентрації 40 мкг/мл та 500 мкл розведеної периферійної крові. У контрольні лунки додають по 500 мкл живильного середовища, яке не містить ФГА. Клітини інкубують при 37°C у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO₂ (5 %) протягом 48 год. Після інкубації клітини центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв, надосад відбирають та використовують у подальших дослідженнях. Зразки з ІФН при необхідності зберігають при 4°C – тиждень, а при -20°C – до шести місяців [137, 138, 139].

Для визначення вмісту ІФН у сироватці крові цільну негепаринізовану кров витримують при 4°C протягом 18 год, після чого її центрифугують при 1000 об/хв протягом 5 хв та відбирають сироватку у стерильний посуд для подальших досліджень. Сироватку зберігають при +4°C не більше 2 тижнів.

При постановці методу титрування ІФН використовують живильне середовище RPMI-1640, ембріональну телячу сироватку, NEPEP, глютамін, 2-меркаптоетанол, антибіотики (гентаміцин або пеніцилін+стрептоміцин); диплоїдні фібробласти людини М-19. Перед титруванням ІФН у стерильному мікропланшеті готують послідовні дворазові розведення зразків, що досліджуються, у живильному середовищі RPMI-1640 без сироватки від 1:2 до 1:256 (титрують їх послідовно відповідно від 2-1 до 2-8). ІФН титрують на диплоїдних фібробластах людини М-19. Попередньо отримують суцільний моношар клітин М-19 у плоскодонних 96-лункових планшетах. У лунки планшета вносять по 100 мкл клітини М-19 (105 кл/мл) у живильному середовищі RPMI-1640 з 10 % ембріональної телячої сироватки, 10 мМ NEPEP, 1 % глютаміну, 50 мкМ 2-меркаптоетанолу та гентаміцину у концентрації 0,08 мг/мл або пеніциліну+стрептоміцину по 100 од/мл. Клітини культивують протягом 18 год при 37°C у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO₂ (5 %) до отримання суцільного моношару. Якість моношару клітин контролюють під інвертованим мікроскопом. Лунки, в яких моношари мають дефекти (острівковий ріст, не повністю сформований моношар, зони руйнування тощо), для постановки реакції не використовують. Із планшета з 48-годинною культурою диплоїдних фібробластів людини М-19 видаляють ростове середовище і послідовно вносять дворазові розведення зразків з інтерфероном або сироватку крові, або цервікальний слиз, які розводять живильним середовищем, в об'ємі 100 мкл. На кожне розведення виділяють по дві лунки. У контрольні лунки додають 1000 мкл живильного середовища. Клітини інкубують при 37°C у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO₂ (5 %) протягом 18 год. Після цього в усі лунки (за винятком лунок „контроль клітин”) вносять по 100 мкл ВВС у дозі 100 ТЦД50/0,1 мл, яку попередньо відтитрують. У лунки „контроль клітин” вносять по 100 мкл живильного середовища RPMI-1640. Загальний об'єм рідини у лунках становить 200 мкл. Далі клітини інкубують протягом 24 год при 37°C в атмосфері з постійним рівнем CO₂ (5 %) до повного прояву цитопатичної дії ВВС у лунках “контроль вірусу”. Облік результатів проводять при мікроскопії під інвертованим мікроскопом. Активність ІФН оцінюють за пригніченням цитопатичної дії тест-вірусу. За титр ІФН приймають те розведення зразка, при якому спостерігається захист 50 % моношар.

3. Молекулярні методи: RT-PCR для визначення експресії генів інтерферонів та інтерферон-стимульованих генів. Молекулярні методи, зокрема RT-PCR, є ключовим інструментом для визначення експресії генів інтерферонів та інтерферон-стимульованих генів. Суть методу полягає в тому, що мРНК клітин перетворюється на комплементарну ДНК (сDNA), яка потім ампліфікується і кількісно аналізується. Це дозволяє точно оцінити рівень активності генів, що відповідають за синтез інтерферонів (ІФН- α , - β , - γ) та генів-мішеней інтерферонового шляху (ISGs, таких як ISG15, MX1, OAS1). RT-PCR широко застосовується у фундаментальних і клінічних дослідженнях. Він дає змогу: виявляти так звані ІФН сигнатури (IFN signature), який відображає активацію імунної відповіді; стратифікувати пацієнтів із автоімунними захворюваннями, наприклад системним червоним вовчаком, де ІФН-сигнатура є діагностичним та прогностичним маркером; контролювати ефективність терапії, спрямованої на блокування інтерферонового шляху. Метод має високу чутливість і дозволяє одночасно аналізувати кілька генів, що робить його універсальним і швидким. Водночас він потребує якісного вихідного РНК-матеріалу та стандартизації між лабораторіями, адже результати можуть варіювати залежно від типу клітин і умов індукції. RT-PCR є золотим стандартом для кількісного визначення експресії інтерферонів та ISGs, а його застосування допомагає глибше зрозуміти патогенез імунних процесів та оптимізувати лікування пацієнтів.

4. Клітинні методи: ELISPOT для підрахунку клітин, що продукують ІФН- γ . Суть методу полягає в тому, що мононуклеарні клітини крові (РВМС) або інші імунні клітини стимулюють антигенами чи пептидами, після чого вони продукують ІФН- γ . Цей цитокін захоплюється антитілами, закріпленими на дні планшета, і візуалізується у вигляді окремих плям (spots). Кожна пляма відповідає одній клітині, яка продукує ІФН- γ . Таким чином, метод дозволяє кількісно оцінити число антиген-специфічних Т-лімфоцитів. Основні характеристики ELISPOT: висока чутливість — здатність виявляти навіть низькочастотні

популяції клітин; можливість одночасно отримати якісну інформацію (який саме цитокін секретується) та кількісну (скільки клітин відповідає); рекомендовано використовувати у дослідженнях ефективності вакцин, а також механізмів патогенезу інфекційних, онкологічних хвороб, аутоімунних процесів тощо. Метод є відносно швидким і відтворюваним, але потребує ретельної стандартизації та контролю умов стимуляції клітин. ELISPOT вважається золотим стандартом для оцінювання клітинної імунної відповіді на рівні окремих клітин. Він широко застосовується у доклінічних і клінічних дослідженнях, зокрема для перевірки ефективності вакцин та імунотерапії. Метод дозволяє безпосередньо підрахувати кількість клітин, що продукують IFN- γ , і тим самим оцінити силу та специфічність імунної відповіді.

При оцінюванні ІФН статусу обов'язковим є використання негативних та позитивних контролів (тварини без стимуляції та з відомим індуктором ІФН).

8. 4 Оцінювання результатів дослідження

Оцінювання результатів дослідження ІФН статусу проводиться комплексно, із врахуванням кількісних, якісних та функціональних параметрів. Кількісні показники відображають концентрацію ІФН в плазмі або сироватці крові, або в культуральному середовищі клітин, виражену у пг/мл чи міжнародних одиницях на мілілітр (МО/мл). Цей параметр є базовим для характеристики інтенсивності продукції ІФН в організмі. Водночас рекомендовано проводити аналіз якісних характеристик, що включає ідентифікацію типів ІФН (α , β , γ) та визначення їхньої біологічної активності. Такий підхід дозволяє можливість оцінити специфіку імунної відповіді та функціональну спрямованість інтерференового захисту. Оцінювання клітинної відповіді, яке передбачає підрахунок кількості клітин-продуцентів ІФН, дає змогу встановити, які саме популяції імунокомпетентних клітин беруть участь у формуванні відповідної реакції та наскільки ефективно вони активуються під впливом стимулятора чи препарату.

За показниками ІФЕН статусу можна визначити аналіз динаміки продукції ІФН шляхом побудови часових профілів його синтезу після введення стимулюючих агентів. Такий підхід дозволяє простежити фазність і тривалість продукції ІФН, а також визначити оптимальні часові інтервали для терапевтичного втручання. Інтерпретація отриманих даних проводиться у порівнянні з показниками у групах контролю, що дає можливість встановити рівень активації або пригнічення інтерференового статусу, визначити ефективність застосованих препаратів чи стимуляторів та зробити висновки щодо потенційної клінічної значущості досліджуваних змін.

9. ВІДБІР ІМУНОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ, ЯКІ МАЮТЬ СПРЯМОВАНУ ДІЮ НА ФАГОЦИТАРНУ ЛАНКУ ІМУНІТЕТУ *IN VITRO*

9.1 Тварини та периферійна кров донорів

Для проведення досліджень використовують мишей різних генетичних ліній, які є найбільш поширеною моделлю в імунологічних дослідженнях. Зазвичай беруть тварин віком 6–10 тижнів із масою 18–25 г, оскільки в цей період їх імунна система є зрілою та стабільною. Стать: допускається використання як самців, так і самок. Миші повинні перебувати у стандартних умовах віварію (температура 20–24 °С, відносна вологість 40–60 %, світловий режим 12/12 год). Годування здійснюється повноцінним гранульованим кормом та водою. Перед початком експериментів необхідно отримати дозвіл комітету з біоетики ІМВ НАН України. Також використовують моноцити та нейтрофіли периферійної крові, виділені з гепаринізованої венозної крові донорів методом фракціонування у градієнті щільності фікол-верографіну.

9.2 Прилади і реактиви

- Середовища RPMI-1640 та 199.
- Культуральні планшети (96-лункові), чашки Петрі, покривні скельця.

- Тест-бактерії *Staphylococcus aureus* (штами 8325, Wood-46, Cowan-1), латексні частинки.
- Центрифуга (1500–8000 об/хв).
- Ареометр для перевірки щільності розчинів.
- Автоклав для стерилізації.
- Мікроскоп для підрахунку клітин та оцінки фагоцитозу.
- Мультискан EX Labsystems для спектрофотометрії ($\lambda = 490\text{--}540$ нм).
- Водяна баня для інкубації зразків.
- Фікол, верографін (для градієнтів щільності).
- Гепарин, НЕРЕС, гентаміцин.
- Фетальна теляча та ембріональна теляча сироватка.
- Розчин Хенкса, фізіологічний розчин (0,15 М NaCl), ФСБ.
- НСТ (нітросиній тетразолій), ЛПС (ліпополісахарид).
- Метанол, етанол, диметилсульфоксид (ДМСО).
- Барвники: сафранін, азур-еозин, Романовський-Гімза.

9.3 Хід дослідження

Чутливість клітин до дії інтерферону та інших імуномодуляторів визначають за зміною функціонально-метаболічної активності клітин фагоцитарної системи. У реакції використовують лише зрілі фагоцити – моно- і полінуклеари периферійної крові людини, які виділяють із гепаринізованої венозної крові методом фракціонування клітин у градієнті щільності фікол-верографіну ($\rho = 1,120$ і $\rho = 1,077$ г/см³). Для приготування розчину фікол-верографіну з щільністю 1,077 г/см розчиняють 6,48 г фіколу у 85 мл гарячої дистильованої води і поступово додають 17 мл верографіну. Для отримання фікол-верографіну із щільністю 1,120 г/см до такої ж кількості фіколу, розчиненого в 85 мл гарячої дистильованої води, вносять 25 мл верографіну. Щільність розчинів перевіряють за допомогою ареометра. Розчини стерилізують автоклавуванням і зберігають при 4 °С. Градієнт фікол-верографіну готують обережно, нашаровуючи один на один по 1,5 мл розчину. Гепаринізовану венозну кров ретельно перемішують з 0,15 М NaCl у співвідношенні 1:4. На двоступінчастий градієнт фікол-верографіну зверху обережно нашаровують 4 мл розведеної крові. Розподіл моно- і полінуклеарів відбувається у ході центрифугування протягом 45 хв при 1500 об/хв. Клітини розподіляються між різними шарами таким чином: між плазмою і верхнім шаром фікол-верографіну – моноцити і лімфоцити, між верхнім і нижнім шарами – нейтрофіли.

Клітини у розчині Хенкса двічі відмивають центрифугуванням при 1,5 тис об/хв протягом 10 хв, після чого їх концентрацію доводять до 1×10^6 кл/мл у живильному середовищі RPMI-1640, яке містить 5 % ембріональної телячої сироватки. По 10 мкл суспензії клітин вносять у лунки 96-лункового планшета та культивують при 37 °С у водонасиченій атмосфері з 5 % CO₂ протягом 30 хв. Після цього вносять по 100 мкл імуномодуляторів, які досліджують, у різних концентраціях та продовжують культивування за тих же умов протягом 20 хв. У контрольні лунки вносять 100 мкл живильного середовища. По закінченні інкубації живильне середовище із лунок видаляють, а клітини відмивають розчином Хенкса. Планшети центрифугують при 1000 об/хв протягом 3 хв, середовище видаляють, а до моношару клітин додають по 100 мкл 0,2 % розчину НСТ. Клітини інкубують при 37 °С у водонасиченій атмосфері з 5 % CO₂ протягом 45 хв. Далі планшети центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв, живильне середовище видаляють, а до моношару клітин вносять по 100 мкл диметилсульфоксиду. Оптичну щільність диформагану вимірюють при довжині хвилі 540 нм на мультискані EX Labsystems. Активацію клітин (у %) розраховують за формулою $(1 - A/B) \times 100$, де А – оптична густина диформагану у контрольних лунках, В – оптична густина диформагану в оброблених імуномодулятором клітинах [146].

Фагоцитарну активність моноцитів та нейтрофілів периферійної крові оцінюють за показником фагоцитозу (ПФ) – відносній кількості клітин (у %), які поглинають тест-бактерії, а також за фагоцитарним числом (ФЧ) – середнім числом мікроорганізмів, захоплених одним фагоцитом (в ум. од.). У дослідженні використовують живильне середовище RPMI-1640 або

199; фетальну телячу сироватку; розчин Хенкса; азур-еозин. Як тест-бактерії використовують живу культуру *S. aureus* (штами 8325, Wood-46, Cowan-1). Стафілокок вирощують 24 год на твердому поживному селективному середовищі, яке містить 10 % NaCl. Після цього збирають біомасу (на одній і тій же стадії культивування), тричі відмивають 0,15 М NaCl шляхом центрифугування при 6–8 тис. об/хв протягом 15 хв. Концентрацію мікроорганізмів доводять до 10^9 кл/мл, використовуючи стандарт мутності. Як об'єкт фагоцитозу також можна використовувати латекс. Суспензію фагоцитів (5×10^6 кл/мл) у живильному середовищі і мікроорганізмів у 0,15 М NaCl або латексу наносять по 0,2 мл на покривні скельця, які розміщують на дні чашки Петрі малого діаметру або пеніцилінового флакону. Співвідношення між фагоцитами та стафілококами або латексом становить 1:100. Клітини культивують при 37 °С протягом 30–45 хв у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO₂ (5 %). Після цього вносять по 100 мкл імуномодуляторів, які досліджують, у різних концентраціях та продовжують культивування за тих же умов протягом 20 хв. Потім моношар клітин двічі відмивають розчином Хенкса від бактерій або латексу, що не зв'язуються, і ретельно висушують. Після цього клітини фіксують метанолом протягом 4 хв, висушують і фарбують розчином азур-еозину протягом 15–20 хв. Під мікроскопом переглядають 100 клітин і вираховують ПФ та ФЧ [139].

Відбір імунотропних препаратів, які мають спрямовану дію на фагоцитарну ланку імунітету, також можна проводити у культурі МФПЕ мишей різних генетичних ліній, які отримують, як описано вище. Клітинну суспензію перитонеального ексудату мишей отримують у середовищі 199 з 1 % фетальної телячої сироватки та гепарином (20 од/мл). Далі її центрифугують при 1500 об/хв 10 хв. Осад ресуспендують у свіжому середовищі 199, повторно центрифугують, після чого клітини переносять у RPMI-1640 з 5 % сироватки, 10 мМ NEPES та гентаміцином (0,08 мг/мл). Концентрацію доводять до $2,5 \times 10^7$ кл/мл.

При постановці НСТ-тесту по 200 мкл суспензії наносять на покривні скельця у чашках Петрі чи флаконах, інкубують 30 хв при 37 °С у атмосфері з 5 % CO₂. Скельця двічі відмивають середовищем 199, після чого додають 150 мкл RPMI-1640 (з добавками) та та 50 мкл імуномодуляторів, які досліджують, у різних концентраціях. У контролі — середовище з фізіологічним розчином. Інкубація триває 60 хв. Далі клітини двічі відмивають розчином Хенкса, додають 130 мкл RPMI-1640 та 50 мкл 0,1 % НСТ у ФСБ. У контролі — середовище з ФСБ. Для стимульованого тесту додають 20 мкл ЛПС (40 мкг/мл), для спонтанного — 20 мкл середовища 199. Інкубують 60 хв при 37 °С. Потім клітини відмивають, висушують, фіксують в етанолі та фарбують сафраніном (0,1 %, 45 сек). Під мікроскопом визначають відсоток клітин з гранулами диформазау; функціональний резерв (ФР) розраховують як різницю між стимульованим і спонтанним тестом. При спектрофотометричному методі у лунки планшета вносять 100 мкл суспензії МФПЕ (5×10^6 кл/мл), інкубують 15 хв при 37 °С, додають 0,1 мл НСТ і повторно інкубують 1 год. Після промивання розчином Хенкса клітини обробляють 200 мкл ДМСО, витримують на киплячій бані 10 хв. Оптичну густину вимірюють при $\lambda = 490$ нм.

При дослідженні впливу імунотропних препаратів на фагоцитарну активність МФПЕ по 200 мкл суспензії клітин перитонеального ексудату наносять на покривні скельця у чашках Петрі чи флаконах, інкубують 30 хв при 37 °С у атмосфері з 5 % CO₂. Скельця двічі відмивають середовищем 199, після чого додають 100 мкл RPMI-1640 (з добавками) та 50 мкл імуномодуляторів, які досліджують, у різних концентраціях. У контролі вносять лише середовище. Інкубація триває 60 хв. Далі клітини знову відмивають, додають 150 мкл RPMI-1640 та 50 мкл суспензії латексу (1:100). У контролі — середовище з 0,15 М NaCl або ФСБ. Інкубують 60 хв при 37 °С. Скельця двічі відмивають розчином Хенкса, клітини висушують, фіксують у метанолі (10 хв) та фарбують за Романовським-Гімзою. Фагоцитоз оцінюють за показником ПФ (відсоток клітин з латексом серед 100 підрахованих) та фагоцитарним числом ФЧ (середня кількість частинок у клітині).

9.4 Оцінювання результатів

НСТ-тест дозволяє визначати утворення диформазау мікроскопічно або спектрофотометрично. Збільшення кількості диформазау свідчить про активацію

оксидативного метаболізму фагоцитів і підвищення їх здатності продукувати активні форми кисню, тоді як зниження цього показника може вказувати на пригнічення метаболічної активності та зменшення бактерицидного потенціалу клітин. ФР, який визначають як різницю між стимульованим та спонтанним НСТ-тестом, свідчить про резерв активації. Його зростання вказує на високу, а зменшення – на виснаження або низьку реактивність клітин.

Оцінювання фагоцитарної активності включає два показники: ПФ та ФЧ. Підвищення ПФ свідчить про посилення здатності фагоцитів розпізнавати та захоплювати мікроорганізми, тоді як його зниження вказує на зменшення кількості активних клітин і може бути ознакою імунодепресивного ефекту препаратів (речовин). Зростання ФЧ означає посилення інтенсивності поглинання та підвищення функціональної активності клітин, а зменшення – слабшу здатність до внутрішньоклітинного захоплення, що може свідчити про пригнічення їх фагоцитарної функції.

Таким чином, зростання показників НСТ-тесту, функціонального резерву, показника фагоцитозу, фагоцитарного числа та активації клітин відображає стимулювальний ефект препаратів (речовин) на фагоцитарну систему, тоді як їх зниження свідчить про пригнічувальну дію.

10. ВІДБІР ІМУНОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ, ЯКІ МАЮТЬ СПРЯМОВАНУ ДІЮ НА ФАГОЦИТАРНУ ЛАНКУ ІМУНІТЕТУ *IN VIVO*

10.1 Тварини

Для проведення досліджень використовують мишей різних генетичних ліній, які є найбільш поширеною моделлю в імунологічних дослідженнях. Зазвичай беруть тварин віком 6–10 тижнів із масою 18–25 г, оскільки в цей період їх імунна система є зрілою та стабільною. Стать: допускається використання як самців, так і самок. Миші повинні перебувати у стандартних умовах віварію (температура 20–24 °С, відносна вологість 40–60 %, світловий режим 12/12 год). Годування здійснюється повноцінним гранульованим кормом та водою. Перед початком експериментів необхідно отримати дозвіл комітету з біоетики ІМВ НАН України. Для введення імунотропних препаратів застосовують ручну фіксацію або спеціальні пристрої без травмування та надмірного стискання.

10.2 Прилади і реактиви

- Середовища RPMI-1640 та 199.
- Культуральні планшети (96-лункові), чашки Петрі, покривні скельця.
- Тест-бактерії *Staphylococcus aureus* (штами 8325, Wood-46, Cowan-1), латексні частинки.
 - Центрифуга (1500–8000 об/хв).
 - Ареометр для перевірки щільності розчинів.
 - Автоклав для стерилізації.
 - Мікроскоп для підрахунку клітин та оцінки фагоцитозу.
 - Мультискан EX Labsystems для спектрофотометрії ($\lambda = 490\text{--}540$ нм).
 - Водяна баня для інкубації зразків.
 - Гепарин, НЕРЕС, гентаміцин.
 - Фетальна теляча та ембріональна теляча сироватка.
 - Розчин Хенкса, фізіологічний розчин (0,15 М NaCl), ФСБ.
 - НСТ (нітросиній тетразолій), ЛПС (ліпополісахарид).
 - Метанол, етанол, диметилсульфоксид (ДМСО).
 - Барвники: сафранін, азур-еозин, Романовський-Гімза.

10.3 Хід досліджень

Введення імунотропних препаратів здійснюється відповідно до методики, описаної у розділі 7. Кратність введення та дози препаратів визначаються індивідуально з урахуванням

особливостей експериментальної моделі та мети дослідження. Після введення препаратів проводять макрофагів перитонеального ексудату (МФПЕ), постановку НСТ-тесту та визначення показників фагоцитарної активності – показника фагоцитозу (ПФ) і фагоцитарного числа (ФЧ) – згідно з методиками, наведеними у розділах 6 та 9.

10.4 Оцінювання результатів

Проведення досліджень за даною схемою забезпечує комплексну оцінку ефективності імуноотропних препаратів та дозволяє відібрати ті з них, що мають найбільш виражений позитивний вплив на фагоцитарну систему імунітету *in vivo*. Зростання показників НСТ-тесту, функціонального резерву, ПФ та ФЧ свідчить про стимулюючий ефект препарату, що проявляється у посиленні метаболічної та фагоцитарної активності клітин. Натомість їх зниження може вказувати на пригнічувальну дію або імунодепресивний ефект.

11. ВІДБІР ІМУНОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ, ЯКІ МАЮТЬ СПРЯМОВАНУ ДІЮ НА ЕКСПРЕСІЮ РЕЦЕПТОРІВ НА ПОВЕРХНІ КЛІТИН ФАГОЦИТАРНОЇ СИСТЕМИ *IN VIVO*

11.1 Тварини

Для проведення досліджень використовують мишей різних генетичних ліній, які є найбільш поширеною моделлю в імунологічних дослідженнях. Зазвичай беруть тварин віком 6–10 тижнів із масою 18–25 г, оскільки в цей період їх імунна система є зрілою та стабільною. Стать: допускається використання як самців, так і самок. Миші повинні перебувати у стандартних умовах віварію (температура 20–24 °С, відносна вологість 40–60 %, світловий режим 12/12 год). Годування здійснюється повноцінним гранульованим кормом та водою. Перед початком експериментів необхідно отримати дозвіл комітету з біоетики ІМВ НАН України. Для введення імуноотропних препаратів і маніпуляції з тваринами застосовують ручну фіксацію або спеціальні пристрої без травмування та надмірного стискання.

11.2 Прилади та реактиви

У роботі використовують:

- мікротом,
- світловий мікроскоп,
- формалін,
- спирт етиловий,
- хлороформ,
- парафін,
- моноклональні антитіла до CD282 та CD284 (Толл-подібних рецепторів) із ізотиповим контролем для імуногістохімічного дослідження.

11.3 Проведення дослідження

Введення імуноотропних препаратів здійснюється відповідно до методики, описаної у розділі 7. Кратність введення та дози препаратів визначаються індивідуально з урахуванням особливостей експериментальної моделі та мети дослідження. Після введення препаратів у різні терміни спостереження від мишей отримують селезінку. Експериментальний матеріал фіксують в 10 % формаліні протягом 24-48 год.

Після фіксації зразки промивають у воді протягом 20-24 год та зневоднюють для подальшого ущільнення. Для зневоднення готують водний розчин спирту різної концентрації – 50, 60, 70, 80, 96 та 100 %. Зразки зневоднюють у спиртах зростаючої концентрації – 50 та 60 % протягом 4-6 год, 70, 80 та 90 % – 8-12 год, а також у двох порціях 100 % спирту протягом 12-24 год. Далі зразки проводять через суміш абсолютного спирту та хлороформу (2-3 год), занурюють в чистий хлороформ (дві-три зміни протягом 1,5 год), просочують спочатку в хлороформ-парафін (при 37 °С протягом 3-6 год), а потім – в парафін (в трьох порціях 1-1,5 год).

Після повного зневоднення зразки заливають в парафінові блоки наступним чином. Призначений для заливки парафін розігрівають при 58-60 °С і обережно наливають в приготовлену формочку, заповнюючи її по самі вінця і уникаючи утворення бульбашок повітря. Потім підігрітим пінцетом швидко переносять зразок в формочку з парафіном і орієнтують його в необхідному положенні. Після цього формочку охолоджують водою (10-18 °С).

З парафінових блоків на мікротомі готують гістологічні зрізи товщиною 5-6 мкм і поміщають їх на скельця для проведення імуногістохімічних досліджень (обробка антитілами і фарбування). Постановку експериментальних досліджень проводять згідно рекомендації виробника тест-систем для імуногістохімічного дослідження Толл-подібних рецепторів.

Проводять мікроскопічне дослідження зразків з використанням мікроскопа "Olympus BX 51", цифрової камери "Olympus C 5050 Z" та програмного забезпечення "Olympus DP-Soft".

11.4 Оцінювання результатів дослідження

Оцінювання результатів спрямоване на визначення впливу імунотропних препаратів на експресію рецепторів фагоцитарної системи, зокрема Толл-подібних рецепторів (TLR) -2 та -4.

Основними критеріями оцінювання є:

- Інтенсивність забарвлення клітинних мембран та цитоплазми, що відображає рівень експресії відповідних рецепторів. Посилення інтенсивності свідчить про активацію фагоцитарної системи під дією препарату, тоді як зниження – про пригнічення або відсутність стимулюючого ефекту.
- Кількість позитивних клітин у полі зору. Зростання частки клітин із вираженим забарвленням вказує на підвищення експресії рецепторів у популяції фагоцитів, а зменшення – на зниження їх функціональної активності.
- Локалізація експресії (мембранна чи цитоплазматична). Мембранна експресія є показником готовності клітин до розпізнавання патогенів, тоді як цитоплазматична може свідчити про внутрішньоклітинні механізми регуляції.
- Порівняння з контролем. Це дозволяє визначити специфічний ефект досліджуваних засобів.

Для кількісної оцінки застосовують напівкількісний метод (оцінка інтенсивності забарвлення за шкалою від слабкого до сильного) або цифровий аналіз зображень із використанням програмного забезпечення, що дозволяє визначити середню оптичну густину та відсоток позитивних клітин.

TLR2 розпізнає бактеріальні ліпопротеїни та компоненти клітинної стінки грампозитивних мікроорганізмів. Підвищення експресії TLR2 після введення імунотропного препарату свідчить про активацію механізмів розпізнавання бактеріальних патогенів та посилення здатності фагоцитів до ініціації запальної відповіді. Це може проявлятися у збільшенні кількості позитивно забарвлених клітин та інтенсивності мембранного сигналу. Зниження експресії TLR2 вказує на пригнічення здатності клітин розпізнавати бактеріальні структури, що може бути ознакою імунодепресивної дії препарату або його спрямованого регуляторного ефекту (наприклад, зменшення надмірної запальної реакції).

TLR4 розпізнає ліпополісахариди (ЛПС) грамнегативних бактерій і відіграє важливу роль в ініціації продукції прозапальних цитокінів. Підвищення експресії TLR4 свідчить про посилення чутливості фагоцитів до грамнегативних патогенів та активацію сигнальних шляхів, що індукують продукції інтерлейкінів та факторів некрозу пухлин. Це проявляється у більш інтенсивному забарвленні клітинних мембран та збільшенні кількості позитивних клітин. Зниження експресії TLR4 означає зменшення здатності клітин реагувати на ЛПС, що може бути наслідком імуномодулювальної або імунодепресивної дії препарату. Це може трактуватися, як зниження надмірної запальної відповіді, але водночас може свідчити про зниження (або нормалізацію) бактерицидного потенціалу клітин.

12 ВІДБІР ІМУНОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ, ЯКІ МАЮТЬ СПРЯМОВАНУ ДІЮ НА КЛІТИННУ ЛАНКУ ІМУНІТЕТУ *IN VIVO*

12.1 Тварини

Для проведення досліджень використовують мишей різних генетичних ліній, які є найбільш поширеною моделлю в імунологічних дослідженнях. Зазвичай беруть тварин віком 6–10 тижнів із масою 18–25 г, оскільки в цей період їх імунна система є зрілою та стабільною. Стать: допускається використання як самців, так і самок. Миші повинні перебувати у стандартних умовах віварію (температура 20–24 °С, відносна вологість 40–60 %, світловий режим 12/12 год). Годування здійснюється повноцінним гранульованим кормом та водою. Перед початком експериментів необхідно отримати дозвіл комітету з біоетики ІМВ НАН України. Для введення імунотропних препаратів і маніпуляції з тваринами застосовують ручну фіксацію або спеціальні пристрої без травмування та надмірного стискання.

12.2 Прилади та реактиви

У роботі використовують:

центрифугу,

- термостат,
- мікроскоп,
- камеру Горяєва,
- протоковий цитофлюориметр,
- живильне середовище RPMI-1640,
- живильне середовище 199,
- фетальну телячу сироватку,
- фосфатно-сольовий буфер (ФСБ),
- філол,
- урографін,
- гентаміцин,
- NEPES,
- моноклональні антитіла до CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45, CD138, CD 16/56

молекул.

12.3 Проведення дослідження

Введення імунотропних препаратів здійснюється відповідно до методики, описаної у розділі 7. Кратність введення та дози препаратів визначаються індивідуально з урахуванням особливостей експериментальної моделі та мети дослідження. Від мишей всіх груп відбирають селезінку та отримують суспензію спленоцитів у живильному середовищі 199. Клітини центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв, після чого надосад відбирають, а до осаду клітин вносять свіже живильне середовище 199 і ресуспендують. Отриману суспензію спленоцитів знову центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв, надосад відбирають, до осаду клітин вносять живильне середовище RPMI-1640 з 10 % ембріональної телячої сироватки, 10 мМ NEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл) і ресуспендують. Кількість клітин підраховують у камері Горяєва і доводять їх концентрацію до $2,5 \times 10^7$ кл/мл.

Фракціонування спленоцитів проводять шляхом їх центрифугування в градієнті щільності фікол-урографіну ($1,077 \text{ г/см}^3$). Для приготування розчину фікол-урографіну з щільністю $1,077 \text{ г/см}^3$ розчиняють 6,48 г фіколу в 85 мл гарячої дистильованої води і потім поступово додають 17 мл урографіну. Щільність розчину перевіряють за допомогою ареометра, стерилізують в автоклаві і зберігають при 4 °С. Суспензію спленоцитів у живильному середовищі (2 мл) обережно нашаровують на розчин фікол-урографіну ($1,077 \text{ г/см}^3$) і центрифугують у центрифужних пробірках при 1500 об/хв протягом 30 хв. Після центрифугування обережно відбирають клітини над шаром фікол-урографіну, переносять їх в окремі центрифужні пробірки, додають живильне середовище 199 та центрифугують при 1500

об/хв протягом 10 хв. Далі надосад відбирають, а до осаду клітин вносять свіже живильне середовище 199, ресуспендують та центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв. До осаду клітин додають ФСБ, ресуспендують та доводять їх концентрацію до 1×10^8 кл/мл. Всі маніпуляції для визначення субпопуляцій лімфоцитів виконують на холоді.

Проводять імунофенотипування лімфоцитів. Експресію CD3-, CD4-, CD8-, CD19-, CD25-, CD45- та CD16/56-антигенів на клітинах визначають згідно рекомендацій виробника реактивів. Зразки аналізують за допомогою методу протокової цитометрії. Аналіз зразків проводять на цитофлюориметрі.

12.4 Оцінювання результатів дослідження

Аналіз результатів проводять, порівнюючи кількість клітин різних субпопуляцій селезінки мишей експериментальних та контрольних груп. Зниження або підвищення кількості CD3+ Т-лімфоцитів свідчить відповідно про недостатність клітинного імунітету та гіперактивність імунної системи. Зниження або підвищення кількості CD4+ Т-лімфоцитів указує, відповідно, на формування імунологічної недостатності, яка часто супроводжує розвиток інфекційних та інших хвороб, та гіперактивність імунітету. Зменшення або підвищення кількості CD8+ Т-лімфоцитів свідчить, відповідно, про наявність мішеней для їх цитотоксичної дії та активацію гуморальної ланки імунної системи. Молекула CD25 – рецептор до інтерлейкіну-2 (ІЛ-2), є найважливішим раннім активаційним маркером Т-лімфоцитів, який свідчить про залучення Th1 клітин у розвиток набутої клітинної імунної відповіді. Зміна експресії молекули CD45, яка є загальним лейкоцитарним поверхневим білком, може мати наслідком зміну передачі сигналу від Т- і В-клітинних рецепторів антигену. Зменшення або збільшення кількості CD19+ В-лімфоцитів указує, відповідно, на первинний імунодефіцит антитілоутворення та розвиток тяжких запальних процесів. Зміна експресії молекули CD138, яка з'являється під час активації і диференціювання В-клітин і є специфічною для термінально диференційованих В-клітини, свідчить про зміну активності плазматичних клітин.

Зміна кількості різних субпопуляцій клітин у селезінці та експресії активаційних маркерів лімфоцитів під впливом імуноотропних препаратів може свідчити про їх імуномодуляторні та протизапальні властивості.

13 ВІДБІР ІМУНОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ, ЯКІ МАЮТЬ СПРЯМОВАНУ ДІЮ НА ГУМОРАЛЬНУ ЛАНКУ ІМУНІТЕТУ *IN VIVO*

13.1 Тварини

Для проведення досліджень використовують мишей різних генетичних ліній, які є найбільш поширеною моделлю в імунологічних дослідженнях. Зазвичай беруть тварин віком 6–10 тижнів із масою 18–25 г, оскільки в цей період їх імунна система є зрілою та стабільною. Також використовують кролів. Стать: допускається використання як самців, так і самок. Тварини повинні перебувати у стандартних умовах віварію (температура 20–24 °С, відносна вологість 40–60 %, світловий режим 12/12 год). Годування здійснюється повноцінним гранульованим кормом та водою. Перед початком експериментів необхідно отримати дозвіл комітету з біоетики ІМВ НАН України. Для введення імуноотропних препаратів і маніпуляції з тваринами застосовують ручну фіксацію або спеціальні пристрої без травмування та надмірного стискання.

13.2 Прилади та реактиви

У роботі використовують:

- Стерильні пробірки (конічні, з гумовими пробками, ампули).
- Термостат (+37 °С).
- Холодильник (+4 °С) та морозильну камеру (–20 °С до –70 °С).
- Центрифуга(1000 об/хв).
- Пастерівські піпетки.

- Предметні скельця (знежирені).
- Лупу або біокулярний мікроскоп.
- Добові культури мікроорганізмів (стафілококи, кишкова паличка тощо).
- Фізіологічний розчин NaCl.
- Імунотропні препарати та антигени (бактеріальні, вірусні).
- Консерванти для рідкої форми сироватки: 0,1 % азид натрію, мертиолат, 0,5 % фенол.
- Засоби для наркозу тварин.

13.3 Проведення дослідження

Введення імунотропних препаратів здійснюється відповідно до методики, описаної у розділі 7. Тварин імунізують добовою культурою бактерій (стафілококками, кишковою паличкою тощо) чи вводять інші антигени, в тому числі вірусні. Вивчення впливу імунних препаратів на утворення антитіл проводять на етапі імунізації експериментальних тварин. Кратність введення, дози препаратів та терміни забору біологічного матеріалу (див. розділ 6) від імунізованих тварин визначаються індивідуально із урахуванням особливостей експериментальної моделі та мети дослідження.

Готують імунні сироватки. Антисироватки отримують у кілька послідовних етапів: спочатку готують антиген, далі проводять імунізацію тварин та визначають специфічність отриманих антитіл. Для імунізації антигени вводять різними способами — внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньошкірно чи внутрішньом'язово, часто комбінуючи методи для досягнення високих титрів антитіл. Використовують кілька послідовних імунізацій із поступовим підвищенням доз або повторними циклами через певні інтервали. Важливим є досягнення високої специфічності, особливо для антисироваток, що застосовуються в чутливих імунохімічних аналізах. Концентрацію антитіл визначають титруванням, а титр сироватки — це найбільше розведення, при якому реакція залишається позитивною. Для збереження активності антисироватки фасують невеликими порціями та зберігають у рідкому (+4 °C), замороженому (-15 °C) або ліофілізованому стані, причому ліофілізовані препарати найбільш придатні для тривалого зберігання. Повторне заморожування небажане, оскільки знижує якість, а для запобігання контамінації до рідких форм додають консерванти, такі як азид натрію, мертиолат чи фенол.

Хід роботи. Для отримання антисироватки у кролів через 6–10 діб після завершення курсу імунізації беруть 5–10 мл крові з вушної вени. Кров збирають у стерильні пробірки без консервантів та антикоагулянтів і витримують у термостаті при +37 °C протягом 30 хв. Після утворення згустка його відшаровують пастерівською піпеткою від стінок пробірки та залишають на 30 хв у холодильнику при +4 °C для ретракції. Далі проводять центрифугування протягом 10–15 хв при 1000 об/хв. Отриману сироватку переносять у стерильні пробірки з гумовими пробками або ампули.

Сироватку також можна отримати від імунізованих мишей: після декапітації під ефірним наркозом кров збирають у конічну пробірку без антикоагулянта. Препарат зберігають у стерильних умовах у холодильнику до 1 місяця, для тривалішого зберігання — заморожують при температурі від -20 °C до -70 °C.

Для постановки реакції на знежирене предметне скло наносять краплю нерозведеної або розведеної фізіологічним розчином (1:10 чи 1:20) сироватки — дослід, а окремо краплю фізіологічного розчину NaCl — негативний контроль. У кожен краплю додають петлею добову культуру досліджуваного мікроорганізму та ретельно перемішують. Через кілька хвилин реакцію оцінюють неозброєним оком або за допомогою лупи чи біокулярного мікроскопа: при позитивній реакції утворюються пластівці або зернистість, при негативній — рідина залишається рівномірно мутною.

Сироватку бажано використовувати одразу після розморожування, оскільки повторне заморожування знижує її якість. У рідкій формі титр антитіл швидко зменшується, тому строки зберігання обмежені. Для запобігання контамінації до рідкої форми додають консерванти — 0,1 % азид натрію, мертиолат або 0,5 % фенол.

13.4 Оцінювання результатів

Оцінювання результатів дослідження здійснюється шляхом аналізу утворення антитіл у імунізованих тварин після введення імунотропних препаратів. Основним критерієм є визначення титру сироватки, тобто найбільшого її розведення, при якому серологічна реакція з гомологічним антигеном залишається позитивною. Високі титри свідчать про ефективну стимуляцію імунної відповіді, тоді як низькі — про недостатню активність препарату або потребу в корекції схеми імунізації. Додатково оцінюють специфічність антитіл, щоб уникнути перехресних реакцій, особливо при використанні антисироваток у високочутливих імунохімічних аналізах. Реакцію аглютинації або утворення пластівців у краплі сироватки порівнюють із негативним контролем, що дозволяє об'єктивно встановити наявність і силу імунної відповіді. Отримані дані узагальнюють з урахуванням кратності введення, доз та інтервалів між імунізаціями, що забезпечує комплексну оцінку впливу досліджуваних препаратів на формування антитіл. Реакцію аглютинації можна використати як серологічний метод діагностики вірусних інфекцій

14 ВІДБІР НАНОМАТЕРІАЛІВ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ВАКЦИНАЦІЇ ТА ПОДОЛАННЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНИХ ПОБІЧНИХ РЕАКЦІЙ

14.1 Тварини

Для проведення досліджень використовують мишей різних генетичних ліній, які є найбільш поширеною моделлю в імунологічних дослідженнях. Зазвичай беруть тварин віком 6–10 тижнів із масою 18–25 г, оскільки в цей період їх імунна система є зрілою та стабільною. Стать: допускається використання як самців, так і самок. Тварини повинні перебувати у стандартних умовах віварію (температура 20–24 °С, відносна вологість 40–60 %, світловий режим 12/12 год). Годування здійснюється повноцінним гранульованим кормом та водою. Перед початком експериментів необхідно отримати дозвіл комітету з біоетики ІМВ НАН України. Для введення наноматеріалів або імунотропних препаратів застосовують ручну фіксацію або спеціальні пристрої без травмування та надмірного стискання.

14.2 Прилади та реактиви

Для проведення досліджень необхідні:

- Термостат (+37 °С).
- Холодильник (+4 °С) та морозильна камера (–20 °С до –70 °С).
- Центрифуга (1000 об/хв).
- Спектрофотометр (двохвильовий режим 450/620 нм).
- Лупа або біноклярний мікроскоп.
- Пастерівські піпетки.
- Предметні скельця (знежирені).
- 96-луночні полістиролові планшети для ІФА.
- Вакцина *Енджерікс-В* (ENGERIX-B).
- Наноматеріал (у вигляді суспензії, розведеної у PBS).
- Фосфатно-сольовий буфер (PBS, рН 7,4).
- Карбонат-бікарбонатний буфер (рН 9,2).
- Екстракт коров'ячого молока (для блокування неспецифічних ділянок).
- Твін-20 (0,05 %).
- Консерванти: 0,1 % азид натрію, мертиолат, 0,5 % фенол.
- ТМБ/субстрат для проявлення реакції.
- 0,5 М H₂SO₄ (для зупинки реакції).
- Козячі поліклональні антитіла анти-миша, мічені пероксидазою хрена.

14.3 Проведення дослідження

У роботі використовується рекомбінантна вакцина *Енджерікс-В* (ENGERIX-B, GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Бельгія) з концентрацією HBsAg 20 мкг/мл, яка розводиться фосфатно-сольовим буфером (PBS, рН 7,4) до 1,25 мкг/мл.

Вакцина вводиться мишам підшкірно вздовж хребта по 500 мкл один раз на добу тричі з інтервалом 10 днів. Одночасно тварини отримують перорально суспензію наноматеріалу, розведеного у PBS, у дозі 1×10^6 /мишу один раз на добу протягом 7 днів. Забір периферичної крові здійснюється з хвостової вени через 10 днів після кожної імунізації. Сироватка отримується загальноприйнятим методом та зберігається при -20°C до проведення аналізу. Сироватка п'яти мишей у кожній групі об'єднується та досліджується на наявність антитіл до HBsAg після першої, другої та третьої імунізації. Забір периферичної крові здійснюється з хвостової вени через 10 днів після кожної імунізації. Сироватка отримується загальноприйнятим методом та зберігається при -20°C до проведення аналізу. Сироватка п'яти мишей у кожній групі об'єднується та досліджується на наявність антитіл до HBsAg після першої, другої та третьої імунізації.

Імуноферментний аналіз (ІФА). Для проведення ІФА використовуються 96-луночні полістиролові планшети, сенсibilізовані очищеним HBsAg у концентрації 0,5 мкг/мл (100 мкл/луночку) в карбонат-бікарбонатному буфері (рН 9,2). Сорбція проводиться при 4°C протягом 20 год. Для блокування неспецифічних ділянок планшет обробляється буферним розчином екстракту коров'ячого молока (рН 7,2), після чого висушується під вакуумом.

У лунки додається 70 мкл PBS з 0,05 % твіном-20 та блокаторами неспецифічних реакцій, а також 30 мкл досліджуваних зразків сироватки. Планшет інкубується при 37°C протягом 60 хв, після чого промивається 4 рази PBS з твіном-20. Імунні комплекси виявляються козячими поліклональними антитілами анти-миша, міченими пероксидазою хрена, які додаються по 100 мкл/луночку. Після інкубації при 37°C протягом 30 хв проводиться промивка, додається 100 мкл розчину ТМБ/субстрату, інкубація здійснюється при $18-20^\circ\text{C}$ у темряві протягом 30 хв. Реакція зупиняється додаванням 100 мкл 0,5 М H_2SO_4 .

Результати аналізу враховуються спектрофотометром у двохвильовому режимі при 450/620 нм. Для кожного зразка результат розраховується за формулою: $\text{ОП} / \text{ОПк}$, де ОП — оптична щільність досліджуваного зразка, ОПк — оптична щільність контролю (інтактні миші).

14.4 Оцінювання результатів

Оцінювання результатів ґрунтується на аналізі утворення антитіл у імунізованих тварин після введення вакцини та наноматеріалу. Основним показником є титр сироватки, тобто найбільше її розведення, при якому серологічна реакція з гомологічним антигеном залишається позитивною. Високі титри свідчать про ефективну стимуляцію імунної відповіді, низькі — про недостатню активність препарату або потребу в корекції схеми імунізації. Додатково оцінюється специфічність антитіл, що дозволяє уникнути перехресних реакцій, особливо при застосуванні антисироваток у високочутливих імунохімічних аналізах. Реакцію аглютинації або утворення пластівців у краплі сироватки порівнюють із негативним контролем, що забезпечує об'єктивність результатів. Імуноферментний аналіз дозволяє кількісно визначити рівень антитіл за показником оптичної щільності, який порівнюється з контролем. Узагальнення даних проводиться з урахуванням кратності введення, доз та інтервалів між імунізаціями, що дає змогу комплексно оцінити вплив вакцини та наноматеріалу на формування специфічної імунної відповіді.

15. СТАТИЧНА ОБРОБКА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДАНИХ

Отримані експериментальні дані аналізуються за допомогою програмного пакета GraphPad Prism версії 5.01 для Windows (GraphPad Software, Сан-Дієго, Каліфорнія, США). Перевірка нормальності розподілу здійснюється за критерієм Шапіро-Вілка. Параметричні дані оцінюються методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з подальшим застосуванням пост-хок тесту Тьюкі, а непараметричні дані аналізуються за допомогою

критерію Манна–Вітні або тесту Вілкоксона. Результати подаються у вигляді середнє значення \pm стандартна похибка середнього (SEM). Статистично значущими вважаються відмінності при $p < 0,05$.

Для підвищення надійності оцінювання рекомендується вказувати кількість тварин у кожній групі, а також проводити повторні вимірювання для підтвердження відтворюваності результатів. У випадку багатофакторних експериментів доцільно застосовувати багатофакторний ANOVA, що дозволяє врахувати взаємодію між різними змінними

16 УТИЛІЗАЦІЯ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ПІСЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Весь непотрібний біологічний матеріал, використаний посуд, спецодяг, рушники знезаражуються за допомогою дезінфікуючих розчинів, а також шляхом автоклавування (1,5 атм, 30 хвилин) чи кип'ятіння (2 %-ний розчин соди 1 год). Для дезінфекції використовують розчини 70 %-ого спирту, 3 %-ного хлораміну та інші дезінфікуючі засоби, а також термічне обеззаражування і ультрафіолетове опромінення. Рештки тварин утилізують.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Клінічна імунологія і алергологія / В.Є. Казимирчук, Л.В. Ковальчук. – Вінниця, «Нова книга», 2006. – 528 с.
2. Клінічна імунологія та алергологія. Посібник для практичних занять / В.В. Чоп'як, Г.О. Потеміна, А.М. Гаврилук, Х.О. Ліщук-Якимович, Р.Р. Гловин, О.С.Толох. – Київ, ВСВ «Медицина», 2017. – 224 с.
3. Клінічна імунологія та алергологія. Навчальний посібник медичних ВНЗ IV рівня акредитації та медичних факультетів університетів / О.М. Біловол, П.Г. Кравчун, В.Д. Бабаджан та ін. – Харків, «Гриф», 2011. - 550 с.
4. Нейроімунологія: Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів / О.М. Макаренко, О.С. Моложава, В.В. Позур, П.Е. Ермак. – Київ, ВПЦ «Київський університет», 2012. – 200 с.
5. Імунологія: Підручник для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів / А.Ю. Вершигора, Є.У. Пастер, Д.В. Колибо, В.К. Позур, М.Є. Віхоть, Л.О. Михальський, Ю.В. Швець, Л.С. Холодна, О.С. Моложава. – Київ, «Вища школа», 2005. – 599 с.
6. Папилломавирусная инфекция и система интерферона / Л.Н. Лазаренко, Н.Я. Спивак, О.Н. Михайленко, Г.Т. Сухих, В.П. Лакатош. – Киев, «Фитосоциоцентр», 2008. – 228 с.
7. Иммуотропные препараты / С.М. Белоцкий, Н.Я. Спивак. – Киев, «Фитосоциоцентр», 2008. – 288 с.
8. Интерфероны: биологические и клинические эффекты / С.М. Белоцкий, Н.Я. Спивак. – Киев, «Фитосоциоцентр», 2006. – 288 с.
9. Клиническая иммунология и аллергология. Пособие для студентов, врачей-интернов, иммунологов, аллергологов, врачей лечебного профиля всех специальностей / Г.Н. Дранник – Киев, ООО «Полиграф плюс», 2010. – 552 с.
10. Загальна вірусологія / С.П. Гудзь, Т.Б. Перетятко, Ю.О. Павлова. – Львів, Видавничий центр ЛНУ ім. Івана Франка, 2010. – 264 с.
11. Загальна вірусологія: посібник / Т.Г. Ташута. – Київ, БІБ, 2004. – 328 с.

12. Специфічна лабораторна діагностика TORCH-інфекцій. Практичний посібник / ред. А.Л. Гураля. – Київ, 2004. – 101 с.
13. Посібник з медичної вірусології / В.М. Гирін, В.Г. Порохницький, С.Г. Вороненко та ін.; за ред. В.М. Гиріна. – Київ, «Здоров'я», 1995. – 49 с.
14. Чайченко Г.М., Цибенко В.О., Сокур В.Д. Фізіологія людини і тварини. Підручник. К.: Вища школа. 2003. - 463 с.
15. Скок М. В. Основи імунології. Курс лекцій. Київ 2002.- 151 с.
16. Пастер Е. У., Овод В. В. Позур В. К., Вихоть Н. Е. Иммунология. Практикум. – К.: Вища шк. Изд-во при Киев. ун-те, 1989 – 304 с.
17. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте // Учебное пособие. — 3-е изд., перераб. и доп. — Киев: Вища школа, 1983. — 383 с.
18. Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Войціцький В.М. Сучасні методи біохімічних досліджень: учбовий посібник.- К: Фітосоціоцентр, 2001. - 424 с.
19. Mansouri A., Akthar I., Miyamoto A. TLR2 and TLR4 bridge physiological and pathological inflammation in the reproductive system // Nature Communications Biology. – 2025.
20. Zúquete S., Ferreira M., Delgado I.L.S., Gazalle P., Andaluz S., Rosa M.T., Mendes A.C., Santos D., Nolasco S., Graça L., Leitão A., Basto A.P. Combined TLR2/TLR4 activation equip non-mucosal dendritic cells to prime Th1 cells with gut tropism // iScience, Cell Press. – 2024.
21. Kim H.J., Kim H., Lee J.H., Hwangbo C. Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight into immune and aging // Immunity & Ageing, Springer Nature. – 2024.
22. Khositnithikul R., Laisuan W., Setthaudom C., Sriwanichrak K., Kunakorn M., Srihirin T., Lumjiaktase P., Vongsakulyanon A. Application of QuantiFERON ELISA for Detection of Interferon-Gamma Autoantibodies in Adult-Onset Immunodeficiency Syndrome // Laboratory Medicine, Oxford Academic. – 2022.
23. Laguna Heras M.F., Ramirez Y., Fernández Martín C., Espinosa R.L., Lavín A., Holgado M. A Point-of-Care Based on Label-Free Interferometric Optical Detection Method to Evaluate Interferon Gamma (IFN- γ): A Correlation with the ELISA Technique // Sensors, MDPI. – 2021.
24. Crisafulli S., Pandya Y., Moolchan K., Lavoie T.B. Interferon Gamma Activity and ELISA Detection // PBL Assay Science.
25. Tesser A., Bocca P., Ulivi M., Pin A., Pastorino C., Cangelosi D., Santori E., Drago E., Caorsi R., Candotti F., Gattorno M., Tommasini A., Volpi S. Type I interferon signature: a quantitative standardized method for clinical application // Clinical and Experimental Immunology, Oxford Academic. – 2025.
26. Qian J., Lu L., Cao Z., Fu Q. A multiplex RT-qPCR kit for expression analysis of interferon-stimulated genes as a useful tool for molecular stratification in lupus and other autoimmune diseases // Annals of the Rheumatic Diseases. – 2024.
27. Renn L.A., Theisen T.C., Navarro M.B., Mane V.P., Schramm L.M., Kirschman K.D., Fabozzi G., Hillyer P., Puig M., Verthelyi D., Rabin R.L. Expression profiles of types I and III interferon subtypes // Journal of Visualized Experiments, ResearchGate. – 2015.
28. Yang F., Patton K., Kasprzyk T., Long B., Gupta S., Zoog S.J., Tracy K., Vettermann C. Validation of an IFN- γ ELISpot assay to measure cellular immune responses against viral antigens // Nature. – 2021.
29. Sedegah M. The Ex Vivo IFN- γ Enzyme-Linked Immunospot (ELISpot) Assay // Methods in Molecular Biology, Springer. – 2015.
30. Interferon Gamma ELISpot: Protocol and Data Insights // Biology Insights. – 2025.
31. Van de Walle G.R., Harman R.M. Contributions of large and agricultural animal models to immunology // The Journal of Immunology, Oxford Academic. – 2025.
32. Özşengezer S.K., Altun Z.S. Animal Models for Cancer Immunology // Current Jamil K.J., Sherchand S.P., Adhikari R.P., Coosemans A.C. Editorial: Challenges associated with identifying preclinical animal models for immunotherapy // Frontiers in Immunology. – 2024.

33. GraphPad Software. GraphPad Prism 11 Statistics Guide – Choosing a normality test. – 2023.
34. Bradburn S. How To Perform Normality Tests In GraphPad Prism // Top Tip Bio. – 2018.
35. Rasul K.H. ANOVA using GraphPad Prism // Lecture Notes, Tishk International University. – 2024. Molecular Biology Reports, Springer Nature. – 2023.