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

Методичні рекомендації щодо практичних занять з дисципліни «Противірусний імунітет»

Київ 2023

Рекомендовано Вченою радою Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАН України (протокол № 9 від 24.10.2023 р.)

Укладачі:
Лазаренко Л.М., доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, провідний науковий співробітник відділу проблем інтерферону та імуномодуляторів
Співак М.Я., академік НАН України, професор, доктор біологічних наук, головний науковий співробітник відділу проблем інтерферону та імуномодуляторів

У методичних рекомендаціях до навчальної дисципліни «Противірусний імунітет» подано зміст практичних занять з вивчення імунореактивності організму. У методичних рекомендаціях наведено методики досліджень і прописи необхідних матеріалів, буферів та розчинів.

© Колектив авторів, 2023
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Ці методичнів рекомендація стосуються досліджень показників імунореактивності організму при визначенні ефективності противірусного імунітету. Дослідження ґрунтуються на аналізі фізикального стану тварин, а також оцінюванні показники імунного статусу, принаймні, на трьох рівнях: 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. Оцінка ризику та зниження ризику
ДСТУ EN 340:2001	Засоби індивідуального захисту. Загальні вимоги
ДСТУ EN ISO 13688:2016	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” (№ 771/97-ВР від 23.12.1997).

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.
- HEPES 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-Ілосваля 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 приміщені при сталій температурі повітря (22-25 ^{o}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: ATCC CCL 1; ECACC 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 $ІД_{50}$/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. ЗАГАЛЬНІ ПІДХОДИ ДО МЕТОДИКИ ОЦІНЮВАННЯ ІМУНОРЕАКТИВНОСТІ ОРГАНІЗМУ

6.1 Скринінгові методи оцінювання

На першому етапі імунологічних досліджень проводять фізикальне обстеження тварин, визначають стан їх шкіри, слизових оболонок, загальну виснаженість, поведінкові реакції на подразники, інтенсивність поїдання харчового раціону тощо.

За допомогою загальноприйнятих методів дослідження проводять визначення цитоморфологічної структури уражених тканин та лімфоїдних органів [3-7].

6.2 Методи оцінювання показників імунітету та запалення

Тести першого орієнтуючого рівня (кількісної оцінки імунологічних показників) ґрунтуються на оцінюванні функціональної активності клітин фагоцитарної системи: їх функціональної здатності до поглинання та перетравлювання патогенів, а також рівня кисневозалежного механізму фагоцитозу за допомогою загальноприйнятих методів дослідження.

При оцінюванні фагоцитарної ланки імунної системи визначають показник фагоцитозу (ПФ), який відображає здатність фагоцитів до поглинання та виражається у відсотку таких клітин, а також фагоцитарний індекс (ФІ) – інтенсивність поглинальної функції фагоцитів – середню кількість поглинених однією клітиною часток об’єкту фагоцитозу (латексу, стафілококу тощо). Визначення ПФ є найінформативнішим критерієм оцінювання та діагностики імунологічної недостатності та імунодефіцитних станів, насамперед при рецидивуючих інфекційно-запальних процесах, алергічних та аутоімунних хворобах.

Оцінювання кисневозалежного механізму фагоцитозу здійснюється шляхом проведення тесту відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест), який

ґрунтується на здатності НСТ відновлюватись до темно-синього диформазану під впливом кисневих радикалів, підвищення рівня яких чітко корелює з активацією фагоцитів. Показники спонтанного НСТ-тесту використовують для визначення метаболічного потенціалу фагоцитів та їх здатності до кілінгу патогенів. Показники стимульованого НСТ-тесту характеризують потенційну здатність фагоцитів відповідати активацією кисневозалежного метаболізму на дію стимулювальних факторів і розглядаються як критерій їх готовності до кілінгу патогенів. Функціональний резерв (ФР), який вираховується як різниця між показниками спонтанного та стимульованого НСТ-тесту, відображає резерв системи фагоцитозу та імунітету взагалі. Визначають також здатність фагоцитів до продукції оксиду азоту (NO), який залучається в розвиток вродженої імунної відповіді та запалення.

За допомогою методу протокової цитометрії проводять імунофенотипування лімфоцитів селезінки.

За допомогою моноклональних антитіл визначають кількість CD3+ Т-лімфоцитів, CD4+ Т-хелперів/індукторів, CD8+ Т-супресорів/цитотоксичних, CD19+ В-лімфоцитів, CD16+/56+ природних кілерних клітин (ПКК). Зміна їх кількості в лімфоїдних органах може свідчити про гіпереактивацію імунної системи, формування імунологічної недостатності або виникнення імунодефіцит них станів.

Тести другого функціонального рівня включають визначення за допомогою методу протокової цитометрії активаційних маркерів лімфоцитів таких як CD25 та CD138. Також проводять оцінювання цитокінового профілю організму. За допомогою імуноферментного методу дослідження у сироватці крові та біологічних рідинах визначають вміст імунорегуляторних цитокінів різних опозиційних груп: інтерлейкіну (ІЛ)-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10, ІЛ-12, ІЛ-17, ІЛ-23, фактора некрозу пухлин (ФНП)α та інтерферону-γ, які впливають на розвиток запальної реакції та балансування Th1/Th2/Th17/Treg імунної відповіді. Дослідження продукції цих цитокінів є важливим інформаційним критерієм функціональної активності різних типів імунокомпетентних клітин, прогнозування захворювання, а також тяжкості запального процесу та імовірності його переходу

на системний рівень. Одночасно за допомогою імуноферментного методу дослідження проводять оцінювання цитокінпродукувальної активності лімфоцитів селезінки та клітин фагоцитарної системи шляхом дослідження їх здатності до продукції цитокінів у спонтанному та мітоген-стимульованому тестах (під впливом фітогемаглютиніну (ФГА), ліпополісахариду (ЛПС)). Вміст ФНПα та інтерферонів у сироватці крові та культуральній рідині спленоцитів визначають також за допомогою біологічного методу дослідження, перевагами якого є оцінювання біологічної активності цих цитокінів відповідно за їх цитотоксичною дією на перевивну культуру фібробластів мишей та антивірусною активністю стосовно тест-вірусу (ВВС).

Тести третього рівня включають імуногістохімічне дослідження тканин та лімфоїдних органів. За допомогою імуногістохімічного методу дослідження у тканині стінки піхви та селезінці визначають експресію CD282 та CD284 молекул (Толл-подібних рецепторів 2 та 4 типу), які залучаються в розпізнавання антигенів та активацію факторів вродженого і набутого імунітету шляхом балансування продукції цитокінів різних груп. За допомогою методу протокової цитометрії проводять оцінювання експресії CD284 молекул на поверхні клітин фагоцитарної системи з метою визначення характеру перебігу запалення [3-8].

6.3 Статистичні методи

Усі отримані цифрові дані обробляють за допомогою загальноприйнятих методів варіаційної статистики з вирахуванням середніх арифметичних величин (X), їх середньоквадратичного відхилення (S_X) і середньоквадратичної похибки (m) [9-11].

7 ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ВІД ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

7.1 Тварини

Дослідження проводять з використанням самиць мишей лінії BALB/c вагою 16-18 г (віком 7-8 тижнів).

7.2 Прилади та реактиви

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

7.3 Проведення дослідження

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 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 Горєва.

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 охолодженому середовищі 199, фільтруючи через 4-шаровий капроновий фільтр. Кількість спленоцитів підраховують у камері Горяєва. Усі маніпуляції проводять на холоду [12-15].

8 ОЦІНЮВАННЯ ЦИТОМОРФОЛОГІЧНОЇ БУДОВИ ТКАНИН ТА ОРГАНІВ

8.1 Тварини

Дослідження проводять з використанням самиць мишей лінії BALB/c вагою 16-18 г (віком 7-8 тижнів).

8.2 Прилади та реактиви

Використовують: ножиці Кохера, мікротом, мікроскоп, цифрову камеру, ефір, формалін, етиловий спирт, парафін, препарувальні столики.

8.3 Проведення дослідження

Визначають візуальні клінічні прояви захворювання шляхом дослідження стану слизових оболонок статевих органів та шкіри інфікованих тварин експериментальних груп, їх поведінкових реакцій на подразники, здатність поїдати харчовий раціон.

Проводять цитоморфологічні дослідження стінки піхви та селезінки мишей всіх груп порівняння, які отримують на 1, 3, 6 та 9 добу після введення пробіотичних бактерій. 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 розчини спирту різної концентрації – 50, 60, 70, 80, 96 та абсолютного спирту. 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 абсолютного спирту протягом 12-24 год. Далі зразки проводять через суміш абсолютного спирту та хлороформу (2-3 год), занурюють в чистий хлороформ (двіч-тричі протягом 1,5 год), просочують спочатку в хлороформ-парафіні (при 37 ˚С протягом 3-6 год), а потім – в парафіні (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 підготовлену 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 її охолоджують, поміщаючи у посуд з водою (10-18 °С).

З парафінових блоків на мікротомі готують гістологічні зрізи товщиною 5-6 мкм. Отримані препарати фарбують гематоксиліном та еозином. Проводять мікроскопічне дослідження зразків з використанням мікроскопа “Olympus BX 51”, цифрової камери “Olympus C 5050 Z” та програмного забезпечення “Olympus DP-Soft” [16].

8.4 Оцінювання результатів дослідження

Наявність рясних виділень, гіперемії та набряку вульви, зміна поведінкових реакцій на подразники (млявість) та здатності поїдати харчовий раціон свідчить про розвиток інфекційно-запального процесу в піхві. Суттєве набрякання епітеліального пласта, його вогнищева інфільтрація поліморфноядерними лейкоцитами та лімфоїдними клітинами, скупчення яких можна виявити також і в субепітеліальних ділянках; а також помірно виражена інфільтрація запальними клітинами підслизового шару, м’язової і адвентиційної оболонки у стінці піхви свідчить про розвиток інфекційно-запального процесу. Зникнення візуальних клінічних ознак захворювання та його морфологічних проявів у стінці піхви під впливом пробіотичних штамів бактерій свідчить про їх протизапальні властивості.

9 ОЦІНЮВАННЯ ПОГЛИНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МАКРОФАГІВ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЕКСУДАТУ *in vitro*

9.1 Тварини

Дослідження проводять з використанням самиць мишей лінії BALB/c вагою 16-18 г (віком 7-8 тижнів).

9.2 Прилади та реактиви

У роботі використовують: центрифугу, термостат, світловий мікроскоп, камеру Горяєва, живильне середовище RPMI-1640, живильне середовище 199, фетальну телячу сироватку, HEPES, гентаміцин, гепарин, фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), 0,15 М NaCl, етиловий спирт, азур-еозин, латекс.

9.3 Проведення дослідження

Від мишей отримують суспензію клітини перитонеального ексудату в охолодженому живильному середовищі 199 з 1 % фетальної телячої сироватки та 20 од/мл гепарину, центрифугують її при 1500 об/хв протягом 10 хв, після чого надосад відбирають, а до осаду клітин вносять свіже охолоджене живильне середовище 199 і ресуспендують. Клітини знову центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв, надосад відбирають, а до осаду клітин вносять живильне середовище RPMI-1640 з 5 % фетальної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл) і ресуспендують. Кількість клітин підраховують у камері Горяєва і доводять їх концентрацію до 2,5 х 10^7 кл/мл.

Суспензію клітин перитонеального ексудату наносять по 200 мкл на покривні скельця, розміщені на дні чашки Петрі малого діаметру або пеніцилінових флаконів. Клітини інкубують при 37 °С протягом 30 хв у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). Потім покривні скельця двічі відмивають у живильному середовищі 199, а до клітин, що прикріпилися, вносять 100 мкл свіжого культурального середовища RPMI-1640 з 5 % фетальної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл) та 50 мкл суспензії пробіотичних штамів бактерій у 0,15 М NaCl або ФСБ (у співвідношенні 1:100). У контролі до клітин вносять 200 мкл цього ж живильного середовища.

Клітини інкубують при 37 °С протягом 60 хв у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). Далі покривні скельця двічі відмивають у живильному середовищі 199, до клітин додають 150 мкл живильного середовища RPMI-1640 з 5

% фетальної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл) та 50 мкл суспензії латексу у 0,15 М NaCl або ФСБ (у співвідношенні 1:100). У контролі до клітин вносять 150 мкл цього живильного середовища та 50 мкл 0,15 М NaCl або ФСБ. Клітини інкубують при 37 °С протягом 60 хв у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %).

Покривні скельця двічі відмивають у розчині Хенкса від латексу, який не поглинувся, клітини висушують, фіксують у метанолі протягом 10 хв і фарбують за Романовським-Гімзою.

Визначають показник фагоцитозу (ПФ), вираховуючи у полі зору мікроскопу на 100 підрахованих клітин відсоток клітин, що містять частинки латексу, а також фагоцитарне число (ФЧ), визначаючи середню кількість частинок латексу, які поглинулись фагоцитами [17].

9.4 Оцінювання результатів дослідження

Аналіз результатів проводять, порівнюючи показники функціональної активності макрофагів перитонеального ексудату, оброблених та необроблених пробіотичними штамами бактерій. Підвищення ПФ та ФЧ свідчить про збільшення кількості макрофагів перитонеального ексудату, здатних до поглинання об’єкту фагоцитозу, а також активацію інтенсивності їх поглинальної функції. Зменшення ПФ та ФЧ свідчить про пригнічення їх поглинальної активності. Зміна показників поглинальної активності макрофагів перитонеального ексудату під впливом пробіотичних штамів бактерій свідчить про їх імуномодулювальні властивості *in vitro*.

10 ОЦІНЮВАННЯ ПОГЛИНАЛЬНОЇ АКТИВНІСТЬ МАКРОФАГІВ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЕКСУДАТУ *in vivo*

10.1 Тварини

Дослідження проводять з використанням самиць мишей лінії BALB/c вагою 16-18 г (віком 7-8 тижнів).

10.2 Прилади та реактиви

У роботі використовують: центрифугу, термостат, світловий мікроскоп, камеру Горяєва, живильне середовище RPMI-1640, живильне середовище 199, фетальну телячу сироватку, HEPES, гентаміцин, гепарин, фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), 0,15 М NaCl, етиловий спирт, азур-еозин, латекс.

10.3 Проведення дослідження

На 1, 3, 6 та 9 добу після введення пробіотичних бактерій від мишей всіх груп отримують суспензію клітини перитонеального ексудату в охолодженому живильному середовищі 199 з 1 % фетальної телячої сироватки та 20 од/мл гепарину, центрифугують її при 1500 об/хв протягом 10 хв, після чого надосад відбирають, а до осаду клітин вносять свіже охолоджене живильне середовище 199 і ресуспендують. Отриману суспензію клітин знову центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв, надосад відбирають, а до осаду клітин вносять живильне середовище RPMI-1640 з 5 % ембріональної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл) і ресуспендують. Кількість клітин підраховують у камері Горяєва і доводять їх концентрацію до 2,5 х 10^7 кл/мл.

Суспензію клітин наносять по 200 мкл на покривні скельця, розміщені на дні чашки Петрі малого діаметру або пеніцилінових флаконів. Клітини інкубують при 37 °С протягом 30 хв у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). Покривні скельця двічі відмивають у середовищі 199, до клітин вносять 150 мкл живильного середовища RPMI-1640 з 5 % фетальної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл) та 50 мкл суспензії латексу у 0,15 М NaCl або ФСБ (у співвідношенні 1:100). У контролі до клітин вносять 150 мкл цього живильного середовища та 50 мкл 0,15 М NaCl або ФСБ. Клітини інкубують при 37 °С протягом 60 хв у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %).

Покривні скельця двічі відмивають у розчині Хенкса від латексу, який не поглинувся, клітини висушують, фіксують у метанолі і фарбують за Романовським-Гімзою.

Визначають показник фагоцитозу (ПФ), вираховуючи у полі зору мікроскопу відсоток клітин, що містять частинки латексу, на 100 підрахованих клітин, а також фагоцитарне число (ФЧ), визначаючи середню кількість частинок латексу, які поглинулись фагоцитами [17].

10.4 Оцінювання результатів дослідження

Аналіз результатів проводять, порівнюючи показники функціональної активності макрофагів перитонеального ексудату мишей експериментальних та контрольних груп. Підвищення ПФ та ФЧ свідчить про збільшення кількості макрофагів перитонеального ексудату, здатних до поглинання об'єкту фагоцитозу, а також активацію інтенсивності їх поглинальної функції. Зменшення ПФ та ФЧ свідчить про пригнічення фагоцитарної функції імунної системи. Зміна показників поглинальної активності макрофагів перитонеального ексудату під впливом пробіотичних штамів бактерій свідчить про їх імуномодулювальні властивості *in vivo*.

11 ОЦІНЮВАННЯ БАКТЕРИЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ МАКРОФАГІВ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЕКСУДАТУ *IN VITRO*

11.1 Тварини

Дослідження проводять з використанням самиць мишей лінії BALB/c вагою 16-18 г (віком 7-8 тижнів).

11.2 Прилади та реактиви

У роботі використовують: центрифугу, термостат, мікроскоп, камеру Горяєва, живильне середовище RPMI-1640, живильне середовище 199, фетальну телячу сироватку, гентаміцин, фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), 0,15 М NaCl, етиловий спирт, ліпополісахарид (ЛПС), нітросиній тетразолій (НСТ), сафранін, диметилсульфоксид.

11.3 Проведення дослідження

Від мишей отримують суспензію клітини перитонеального ексудату в охолодженому живильному середовищі 199 з 1 % фетальної телячої сироватки та 20 од/мл гепарину, центрифугують її при 1500 об/хв протягом 10 хв, після чого надосад відбирають, а до осаду клітин вносять свіже охолоджене живильне середовище 199 і ресуспендують. Отриману суспензію клітини знову центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв, надосад відбирають, а до їх осаду вносять живильне середовище RPMI-1640 з 5 % фетальної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл) і ресуспендують. Кількість клітин підраховують у камері Горяєва і доводять їх концентрацію до 2,5 х 10^7 кл/мл.

Суспензію клітин наносять по 200 мкл на покривні скельця, розміщені на дні чашки Петрі малого діаметру або пеніцилінових флаконів. Клітини інкубують при 37 °С протягом 30 хв у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). Потім покривні скельця двічі відмивають у живильному середовищі 199, а до клітин, що прикріпилися, вносять 150 мкл свіжого живильного середовища RPMI-1640 з 5 % фетальної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл) та 50 мкл суспензії пробіотичних штамів бактерій 0,15 М NaCl або ФСБ (у співвідношенні 1:100). У контролі до клітин вносять 150 мкл цього живильного середовища та 50 мкл фізіологічного розчину (0,15 М) або ФСБ.

Клітини інкубують при 37 °С протягом 60 хв у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). Покривні скельця двічі відмивають у розчині Хенкса, до клітин додають 130 мкл свіжого живильного середовища RPMI-1640 з 5 % фетальної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл) та 50 мкл 0,1 % розчину НСТ у ФСБ. У контролі до клітин вносять 130 мкл цього живильного середовища та 50 мкл ФСБ. У стимульованому НСТ-тесті до клітин додають 20 мкл розчину ЛПС у живильному середовищі 199, у спонтанному – 20 мкл живильного середовища 199. Для отримання робочого розчину ЛПС 1 мг ліофілізованого препарату ЛПС розчиняють у 25 мл живильного середовища, доводячи його концентрацію до 40 мкг/мл. Клітини інкубують при 37 °С протягом 60 хв у

водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). Далі покривні скельця двічі відмивають у середовищі 199, клітини висушують, фіксують в етанолі і фарбують у 0,1 % розчині сафраніну протягом 45 сек. У полі зору мікроскопа вираховують відсоток клітин, що містять темно-сині гранули диформазану на 100 підрахованих фагоцитів. Функціональний резерв (ФР) визначають за різницею між показниками стимульованого та спонтанного тесту (у %).

При спектрофотометричному методі постановки НСТ-тесту на дно 96-коміркового планшета вносять 100 мкл суспензії МФПЕ (5×10^6 кл/мл) у середовищі 199 з 5 % фетальної телячої сироватки та інкубують протягом 15 хв в водонасиченій атмосфері з 5% CO_2 при 37 °С. До моношару МФПЕ вносять 0,1 мл розчину НСТ і повторно інкубують протягом 1 год при 37 °С. Залишки розчину видаляють, лунки промивають розчином Хенксу шляхом центрифугування протягом 15 хв при 1500 об/хв. Надосадову рідину видаляють, а до клітин вносять 200 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО), ставлять на киплячу водяну баню на 10 хв. Оптичну густину зразків визначають при довжині хвилі $\lambda = 490$ нм [17].

11.4. Оцінювання результатів дослідження

Аналіз результатів проводять, порівнюючи показники спонтанного та стимульованого НСТ-тесту, а також ФР макрофагів перитонеальної порожнини, оброблених та необроблених пробіотичними штамами бактерій. Підвищення показників спонтанного та стимульованого НСТ-тесту свідчить про активацію кисневозалежної бактерицидності фагоцитів. Збільшення ФР свідчить про підвищення резервних можливостей системи фагоцитозу. Зниження показників НСТ-тесту, в першу чергу, стимульованого вказує на порушення фагоцитарної функції імунної системи. Зниження ФР свідчить про пригнічення резервних можливостей системи фагоцитозу. Зміна показників спонтанного та стимульованого НСТ-тесту макрофагів та ФР під впливом пробіотичних штамів бактерій свідчить про їх імуномодулювальні властивості *in vitro*.

12 ОЦІНЮВАННЯ БАКТЕРИЦИДНОЇ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГІВ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЕКСУДАТУ У ТЕСТІ ВІДНОВЛЕННЯ НІТРОСИНЬОГО ТЕТРАЗОЛІЮ *IN VIVO*

12.1 Тварини

Дослідження проводять з використанням самиць мишей лінії BALB/c вагою 16-18 г (віком 7-8 тижнів).

12.2 Прилади та реактиви

У роботі використовують: центрифугу, термостат, мікроскоп, камеру Горяєва, живильне середовище RPMI-1640, живильне середовище 199, фетальну телячу сироватку, HEPES, гентаміцин, гепарин, фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), 0,15 М NaCl, етиловий спирт, ліпополісахарид (ЛПС), нітросиній тетразолій (НСТ), сафранін.

12.3 Проведення дослідження

На 1, 3, 6 та 9 добу після введення суспензії пробіотичних бактерій від мишей всіх груп отримують суспензію клітин перитонеального ексудату в охолодженому живильному середовищі 199 з 1 % фетальної телячої сироватки та 20 од/мл гепарину, центрифугують її при 1500 об/хв протягом 10 хв, після чого надосад відбирають, а до осаду клітин вносять свіже охолоджене живильне середовище 199 і ресуспендують. Отриману суспензію клітин знову центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв, надосад відбирають, а до їх осаду вносять живильне середовище RPMI-1640 з 5 % фетальної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл) і ресуспендують. Кількість клітин підраховують у камері Горяєва і доводять їх концентрацію до 2,5 х 10^7 кл/мл.

Суспензію клітин наносять по 200 мкл на покривні скельця, розміщені на дні чашки Петрі малого діаметру або пеніцилінових флаконів. Клітини інкубують при 37 °С протягом 30 хв у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). Потім покривні скельця двічі відмивають у живильному середовищі 199. До клітин,

що прикріпилися, вносять 150 мкл живильного середовища RPMI-1640 з 5 % фетальної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл) та 50 мкл 0,1 % розчину НСТ у ФСБ. У контролі до клітин вносять 150 мкл цього живильного середовища та 50 мкл ФСБ. У стимульованому НСТ-тесті до клітин вносять 20 мкл робочого розчину ЛПС у живильному середовищі 199, у спонтанному – 20 мкл живильного середовища 199. Для отримання робочого розчину ЛПС 1 мг ліофілізованого препарату ЛПС розчиняють у 25 мл живильного середовища, доводячи його концентрацію до 40 мкг/мл.

Клітини інкубують при 37 °С протягом 60 хв у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). Покривні скельця двічі відмивають у розчині Хенкса, клітини висушують, фіксують в етанолі і фарбують у 0,1 % розчині сафраніну протягом 45 сек. У полі зору мікроскопа вираховують відсоток клітин, що містять темно-сині гранули диформазану на 100 підрахованих фагоцитів. Функціональний резерв (ФР) визначають за різницею між показниками стимульованого та спонтанного тесту (у %) [17].

12.4 Оцінювання результатів дослідження

Аналіз результатів проводять, порівнюючи показники спонтанного та стимульованого НСТ-тесту, а також ФР макрофагів перитонеального ексудату мишей експериментальних та контрольних груп. Підвищення показників спонтанного та стимульованого НСТ-тесту свідчить про активацію кисневозалежної бактерицидності фагоцитів. Збільшення ФР свідчить про підвищення резервних можливостей системи фагоцитозу. Підвищення показників спонтанного НСТ-тесту може вказувати на розвиток запального процесу. Зниження показників НСТ-тесту, в першу чергу, стимульованого свідчить про порушення фагоцитарної функції імунної системи. Зниження ФР вказує на пригнічення резервних можливостей системи фагоцитозу. Зміна показників спонтанного та стимульованого НСТ-тесту макрофагів та ФР під впливом пробіотичних штамів бактерій свідчить про їх імуномодулювальні та протизапальні властивості *in vivo*.

13 ОЦІНЮВАННЯ ПРОДУКЦІЇ ОКСИДУ АЗОТУ МАКРОФАГАМИ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЕКСУДАТУ *in vitro*

13.1 Тварини

Дослідження проводять з використанням самиць мишей лінії BALB/c вагою 16-18 г (віком7-8 тижнів).

13.2 Прилади та реактиви

У роботі використовують: центрифугу, термостат, мікроскоп, спектрофотометр, камеру Горяєва, живильне середовище RPMI-1640, живильне середовище 199, фетальну телячу сироватку, гентаміцин, 0,15 М NaCl, Реактив Грісса-Ілосваля.

13.3 Проведення дослідження

Від мишей отримують суспензію клітини перитонеального ексудату в охолодженому живильному середовищі 199 з 1 % фетальної телячої сироватки та 20 од/мл гепарину, центрифугують її при 1500 об/хв протягом 10 хв, після чого надосад відбирають, а до осаду клітин вносять свіже охолоджене живильне середовище 199 і ресуспендують. Потім суспензію клітини знову центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв, надосад відбирають, а до їх осаду вносять живильне середовище RPMI-1640 з 5 % фетальної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл) і ресуспендують. Кількість клітин підраховують у камері Горяєва і доводять їх концентрацію до 2,5 х 10^7 кл/мл.

Суспензію клітин вносять по 200 мкл у комірки 24-коміркового стерильного планшета та інкубують при 37 °С протягом 30 хв у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). Потім відбирають культуральне середовище, а до клітин, що прикріпилися, вносять свіже живильне середовище 199 і відмивають (тричі).

Далі у комірки вносять 150 мкл свіжого живильного середовища RPMI-1640 з 5 % фетальної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл) та 50 мкл суспензії пробіотичних штамів бактерій у 0,15 М NaCl або ФСБ (у співвідношенні 1:100). У контролі в лунки вносять 150 мкл цього живильного середовища та 50 мкл 0,15 М NaCl або ФСБ. Клітини інкубують при 37 ˚С протягом 24 год, після чого планшети центрифугують. Культуральне середовище клітин відбирають в окремі пробірки. Визначають концентрацію оксиду азоту (NO) наступним чином. До 100 мкл середовища додають 5 мкл реактиву Грісса-Ілосваля, приготовленого безпосередньо перед застосуванням шляхом змішування рівних кількостей сульфанілової кислоти та α-нафтиламіну.

Оптичну густину зразків вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі λ = 750 нм (контроль – поживне середовище з реактивом Грісса-Ілосваля). Для побудови калібрувальної кривої використовують двократні розведення $NaNO_2$ з вихідною концентрацією 7 мМ. Концентрацію NO визначають за результатами калібрувальної кривої [18].

13.4 Оцінювання результатів дослідження

Аналіз результатів проводять, порівнюючи показники рівня продукції NO макрофагами перитонеальної порожнини, оброблених та необроблених пробіотичними штамами бактерій. Підвищення або зниження рівня продукції NO свідчить відповідно про активацію та пригнічення їх метаболічної активності. Зміна рівня продукції NO макрофагами перитонеальної порожнини під впливом пробіотичних штамів бактерій свідчить про їх імуномодулювальні властивості *in vitro*.

14 ОЦІНЮВАННЯ СУБПОПУЛЯЦІЙНОГО СКЛАДУ ЛІМФОЦИТІВ СЕЛЕЗІНКИ

14.1 Тварини

Дослідження проводять з використанням самиць мишей лінії BALB/c вагою 16-18 г (віком 7-8 тижнів).

14.2 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, HEPES, моноклональні антитіла до CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45, CD138, CD 16/56 молекул.

14.3 Проведення дослідження

На 1, 3, 6 та 9 добу після введення пробіотичних бактерій 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 HEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл) і ресуспендують. Кількість клітин підраховують у камері Горяєва і доводять їх концентрацію до 2,5 х 10^7 кл/мл.

Фракціонування спленоцитів проводять шляхом їх центрифугування в градієнті щільності фікол-урографіну (1,077 г/$см^3$). Для приготування розчину фікол-урографіну з щільністю 1,077 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 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 холоду.

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.

14.4 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 пробіотичних штамів бактерій свідчить про їх імуномодулювальні та протизапальні властивості.

15 ОЦІНЮВАННЯ ПРОДУКЦІЇ ФАКТОРА НЕКРОЗУ ПУХЛИН МАКРОФАГАМИ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЕКСУДАТУ *in vitro* БІОЛОГІЧНИМ МЕТОДОМ

15.1 Тварини

Дослідження проводять з використанням самиць мишей лінії BALB/c вагою 16-18 г (віком 7-8 тижнів).

15.2 Прилади та реактиви

У роботі використовують: центрифугу, термостат, світловий мікроскоп, планшети, живильне середовище RPMI-1640, живильне середовище 199, фетальну телячу сироватку, 0,15 М NaCl, глютамін, HEPES, гентаміцин, пеніцилін, стрептоміцин, гепарин, ліпополісахарид (ЛПС), актиноміцин D (AcD), кристалічний фіолетовий.

15.3 Проведення дослідження

Від мишей отримують суспензію клітини перитонеального ексудату в охолодженому живильному середовищі 199 з 1 % фетальної телячої сироватки та 20 од/мл, центрифугують її при 1500 об/хв протягом 10 хв, після чого надосад відбирають, а до осаду клітин вносять свіже охолоджене живильне середовище 199 і ресуспендують. Отриману суспензію клітин знову центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв, надосад відбирають, а до їх осаду вносять живильне середовище RPMI-1640 з 10 % ембріональної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, 1 % глютаміном, гентаміцином (0,08 мг/мл) або пеніциліном та стрептоміцином (по 100 од/мл) і ресуспендують. Кількість клітин підраховують у камері Горяєва і доводять їх концентрацію до 2,5 х 10^7 кл./мл. Суспензію клітин вносять по 200 мкл у комірки

96-коміркового планшета та інкубують при 37 °С протягом 60 хв у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). Після цього культуральне середовище видаляють, а до клітин, що прикріпилися вносять свіже живильне середовище 199 і відмивають (тричі). У комірки з клітинами, що прикріпилися, вносять 130 мкл живильного середовища RPMI-1640 з 10 % ембріональної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, 1 % глютаміном, 50 мкМ 2-меркаптоетанолом і гентаміцином (0,08 мг/мл) або пеніциліном та стрептоміцином (по 100 од/мл), 50 мкл суспензії пробіотичних штамів бактерій у 0,15 М NaCl або ФСБ (у співвідношенні 1:100). У контроль комірки замість суспензії пробіотичних бактерій вносять 50 мкл 0,15 М NaCl або ФСБ. Для індукції ФНПα у комірки вносять 20 мкл робочого розчину ЛПС у живильному середовищі. Для його отримання 1 мг ліофілізованого препарату ЛПС розчиняють у 25 мл живильного середовища, доводячи його концентрацію до 40 мкг/мл. При дослідженні спонтанної продукції ФНПα у комірки з клітинами, що прикріпилися, замість розчину ЛПС вносять 20 мкл живильного середовища. Планшети закривають та струшують.

Клітини інкубують при 37 °С протягом 24 год у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). По закінченні процесу культивування планшети центрифугують, після чого культуральне середовище клітин, що прикріпилися, відбирають у стерильний посуд і при необхідності зберігають при -20 °С до постановки експериментальних досліджень. Вміст ФНПα у культуральному середовищі клітин перитонеального ексудату визначають за допомогою загальноприйнятого методу дослідження за цитотоксичною дією на перевивну культуру фібробластів мишей L-929. Отримують моношар клітин лінії L-929. Для цього 100 мкл суспензії клітин L-929 у посівній концентрації 10^6 кл/мл у живильному середовищі RPMI-1640 з 10 % ембріональної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, 1 % глютаміном, гентаміцином (0,08 мг/мл) або пеніциліном та стрептоміцином (по 100 од/мл) вносять у комірки стерильного 96-коміркового планшета (крім А1-А2, це бланк-комірки).

Клітини інкубують при 37 °С протягом 24-48 год у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %) до повного формування моношару клітин, який контролюють під інвертованим мікроскопом. Із планшета зі сформованим моношаром клітин L-929 видаляють живильне середовище. Для кожного зразка використовують не менше ніж по три комірки. Не менше ніж у 6 комірок на кожному планшеті замість зразків вносять по 100 мкл підтримуючого середовища (контроль AcD). Для отримання матричного розчину AcD 2 мг препарату розчиняють у 25 мл живильного середовища (кінцева концентрація становить 80 мкг/мл) і зберігають при необхідності при -20 °С. Клітини інкубують при 37 °С протягом 24 год у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). По закінченні процесу культивування живильне середовище видаляють, а в кожну комірку (крім бланк-комірок) вносять по 40 мкл робочого розчину кристалічного фіолетового. Клітини фарбують протягом 10-15 хв при кімнатній температурі. Фарбник видаляють, а моношар клітин обережно відмивають у воді та висушують. Визначають оптичну густину зразків (ОГ) у лунках на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм. Кількість ФНПα у досліджуваних зразках визначають за індексом цитотоксичності (ІЦ, %), який обчислюють за формулою:

$$ІЦ = \frac{ОГ(контролюAcD) - ОГ(зразка)}{ОГ(контролюAcD)} \times 100$$, де ОГ (контролю AcD) – середнє арифметичне оптичної густини в комірках з контролем AcD; ОГ (зразка) – середнє арифметичне оптичної густини в комірках з одним досліджуваним зразком [17].

15.4 Оцінювання результатів дослідження

Аналіз результатів проводять, порівнюючи показники рівня ФНПα у культуральному середовищі макрофагів перитонеального ексудату, оброблених та необроблених пробіотичними штамами бактерій. Підвищення або зменшення концентрації ФНПα у культуральному середовищі макрофагів перитонеального ексудату свідчить відповідно про активацію та супресію продукції цього цитокіну

та розвиток запальної реакції організму. Нормалізація продукції ФНПα макрофагами перитонеального ексудату під впливом пробіотичних штамів бактерій *in vitro* свідчить про їх протизапальні та імуномодулювальні властивості.

16 ОЦІНЮВАННЯ ВМІСТУ ЦИТОКІНІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ІМУНОФЕРМЕНТНИМ МЕТОДОМ

16.1 Тварини

Дослідження проводять з використанням самиць мишей лінії BALB/c вагою 16-18 г (віком 7-8 тижнів).

16.2 Прилади та реактиви

У роботі використовують: центрифугу; світловий мікроскоп; термостат; спектрофотометр; фосфатно-сольовий буфер (ФСБ); тест-системи імуноферментні для визначення інтерферону-γ та -α, фактора некрозу пухлин-α, а також інтерлейкінів-4, -6, -10, -12, -17, -23.

16.3 Проведення дослідження

На 1, 3, 6 та 9 добу після введення пробіотичних бактерій від мишей всіх груп відбирають периферичну кров та отримують сироватку. Концентрацію цитокінів у сироватці крові визначають за допомогою імуноферментного методу з використанням відповідних тест-систем згідно рекомендацій їх виробника. Концентрацію цитокінів у сироватці крові виражають у пкг/мл.

16.4 Оцінювання результатів дослідження

Аналіз результатів проводять, порівнюючи показники рівня цитокінів у сироватці крові мишей дослідних та контрольних груп. Збільшення або зменшення

рівня продукції цитокінів Th1 типу свідчить відповідно про активацію та пригнічення розвитку Т-лімфоцитів Th1 типу, які відповідають за формування клітинної ланки імунітету (активацію специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів, макрофагів, природних кілерних клітин тощо). Збільшення або зменшення рівня продукції цитокінів Th2 типу свідчить відповідно про активацію та пригнічення розвитку Т-лімфоцитів Th2 типу, які відповідають за формування гуморальної ланки імунітету і синтез антитіл. Збільшення або зменшенні рівня продукції ІЛ-17 та ІЛ-23 вказує відповідно на активацію та пригнічення розвитку Т-лімфоцитів Th17 типу, які сприяють розвитку аутоімунних і запальних захворювань. Збільшення або зменшення рівня протизапального цитокіну ІЛ-10, який пригнічує продукцію всіх прозапальних цитокінів, проліферативну відповідь Т-клітин на антигени і міогени тощо, може свідчити відповідно про пригнічення та активний розвиток запальної реакції. Інтерпретацію зміни рівні ІЛ-6 потрібно проводити, враховуючи фазу розвитку імунної відповіді, оскільки цей цитокін має як про-, так і протизапальні властивості. Зміна концентрації цитокінів різних опозиційних груп під впливом пробіотичних штамів бактерій у сироватці крові свідчить про їх імуномодулювальні та протизапальні властивості, а також здатність балансувати імунну відповідь Th1/Th2/Th17/Treg типу.

17 ОЦІНЮВАННЯ ВПЛИВУ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ НА КОНЦЕНТРАЦІЮ ЦИТОКІНІВ У КУЛЬТУРАЛЬНОМУ СЕРЕДОВИЩІ МАКРОФАГІВ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЕКСУДАТУ ІМУНОФЕРМЕНТНИМ МЕТОДОМ

17.1 Тварини

Дослідження проводять з використання самиць мишей лінії BALB/c вагою 16-18 г (віком 7-8 тижнів).

17.2 Прилади та реактиви

У роботі використовують: центрифугу; термостат; світловий мікроскоп; спектрофотометр; живильне середовище RPMI-1640; живильне середовище 199; фетальну телячу сироватку; глютамін; HEPES; тест-системи імуноферментні для визначення фактора некрозу пухлин-α, інтерлейкіну-6, -10, -12.

17.3 Проведення дослідження

На 1, 3, 6 та 9 добу після введення пробіотичних бактерій від мишей всіх груп отримують суспензію клітин перитонеального ексудату в охолодженому живильному середовищі 199 з 1 % фетальної телячої сироватки та 20 од/мл гепарину, центрифугують її при 1500 об/хв протягом 10 хв, після чого надосад відбирають, а до осаду клітин вносять свіже охолоджене живильне середовище 199 і ресуспендують. Отриману суспензію клітин знову центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв, надосад відбирають, а до їх осаду вносять живильне середовище RPMI-1640 з 10 % ембріональної телячої сироватки, гентаміцином (0,08 мг/мл) і ресуспендують. Кількість клітин підраховують у камері Горяєва і доводять їх концентрацію до 2,5 х 10^7 кл/мл.

Суспензію клітин вносять по 200 мкл у комірки 96-коміркового планшета та інкубують при 37 °С протягом 60 хв у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). Після цього культуральне середовище видаляють, а до клітин, що прикріпилися, вносять свіже живильне середовище 199 і відмивають (тричі). Для індукції цитокінів у комірки з клітинами, що прикріпилися, вносять 180 мкл свіжого живильного середовища RPMI-1640 з 10 % ембріональної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, 1 % глютаміном, гентаміцином (0,08 мг/мл) та 20 мкл робочого розчину ЛПС у живильному середовищі або 100 мкл живильного середовища без ЛПС (у контролі). Для отримання робочого розчину ЛПС 1 мг ліофілізованого препарату розчиняють у 25 мл живильного середовища, доводячи його концентрацію до 40 мкг/мл. По закінченні процесу інкубації культуральне середовище клітин, що прикріпилися, відбирають у стерильний посуд і при необхідності зберігають при -20 °С до постановки експериментальних досліджень. Концентрацію цитокінів у культуральному середовищі клітин перитонеального

ексудату визначають за допомогою імуноферментного методу з використанням відповідних тест-систем згідно рекомендацій їх виробника. Концентрацію цитокінів виражають у пкг/мл.

17.4 Оцінювання результатів дослідження

Аналіз результатів проводять, порівнюючи показники рівня цитокінів у культуральному середовищі макрофагів перитонеального ексудату мишей дослідних та контрольних груп. Підвищення спонтанної продукції ІЛ-6 та ФНПα макрофагами перитонеального ексудату може свідчити про розвиток активної запальної реакції. Зміна продукції ІЛ-10 може відбуватись при розвитку запалення (зменшуватись) та його затуханні (підвищуватись). Підвищення продукції ІЛ-12 є прогностично сприятливою ознакою переважного розвитку Th1 клітин. Супресія продукції ІЛ-12 може вказувати на порушення факторів вродженого імунітету та клітинної ланки імунітету. Зміна концентрації цитокінів різних опозиційних груп під впливом пробіотичних штамів бактерій у культурі макрофагів перитонеального ексудату свідчить про їх імуномодулювальні та протизапальні властивості.

18 ОЦІНЮВАННЯ ЕКСПРЕСІЇ ТОЛЛ-ПОБІДНИХ РЕЦЕПТОРІВ У ТКАНИНІ СТІНКИ ПІХВИ ТА СЕЛЕЗІНКИ

18.1 Тварини

Дослідження проводять з використанням самиць мишей лінії BALB/c вагою 16-18 г (7-8 тижнів).

18.2 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.

18.3 Проведення дослідження

На 1, 3, 6 та 9 добу після введення пробіотичних бактерій від мишей всіх груп отримують стінку піхви та 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 розчини 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-парафіні (при 37 ^{o}C протягом 3-6 год), а потім – в парафіні (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 ^{o}C 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 ^{o}C).

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”.

18.4 Оцінювання результатів дослідження

Аналіз обробку результатів проводять, порівнюючи показники експресії Толл-подібних рецепторів у тканині стінки піхви мишей дослідних та контрольних груп. Підвищення кількості CD282+ та CD284+ клітин в ураженій тканині піхви та селезінці може свідчити про розвиток активного інфекційно-запального процесу. Зміна експресії Толл-подібних рецепторів у тканині стінки піхви під впливом пробіотичних штамів бактерій свідчить про їх імуномодулювальні та протизапальні властивості.

19 ОЦІНЮВАННЯ ЕКСПРЕСІЇ ТОЛЛ-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ НА МАКРОФАГАХ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЕКСУДАТУ

19.1 Тварини

Дослідження проводять з використанням самиць мишей лінії BALB/c вагою 16-18 г (віком 7-8 тижнів).

19.2 Прилади та реактиви

У роботі використовують: центрифугу; термостат; світловий мікроскоп; протоковий цитофлюориметр; живильне середовище RPMI-1640; живильне середовище 199; фетальну телячу сироватку; HEPES; гентаміцин; гепарин; фосфатно-сольовий буфер (ФСБ); моноклональні антитіла до CD282 (Толл-подібних рецепторів 2 типу), CD284 (Толл-подібних рецепторів 4 типу), CD11 молекул; ізотиповий контроль IgG2a та IgG2b.

19.3 Проведення дослідження

На 1, 3 та 6 добу після введення пробіотичних бактерій від мишей всіх груп отримують суспензію клітин перитонеального ексудату в охолодженому живильному середовищі RPMI-1640 з 10 % ембріональної телячої сироватки, 10 мМ HEPES, гентаміцином (0,08 мг/мл), центрифугують її при 1500 об/хв протягом 10 хв, після чого надосад відбирають, а до осаду клітин вносять свіже охолоджене

живильне середовище і ресуспендують. Отриману суспензію клітин знову центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв, надосад відбирають, а до осаду клітин вносять ФСБ. Кількість клітин підраховують у камері Горяєва і доводять їх концентрацію до 2,5 х 10^7 кл/мл.

У пробірки вносять 50 мкл суспензії клітин перитонеального ексудату та 10 мкл моноклональних антитіл до антигенів: CD284 PE (фікоеритрин), CD11b PE, IgGb PE, CD282 Alexa Fluor або IgGa Alexa Fluor, струшують та інкубують при 4 ^oC протягом 30 хв у темряві. Потім клітини відмивають тричі у ФСБ шляхом центрифугування при 1500 об/хв протягом 10 хв. До осаду додають 100 мкл ФСБ і ресуспендують.

Зразки аналізують за допомогою методу протокової цитометрії. Аналіз проводять на протоковому цитофлюориметр [19-23].

19.4 Оцінювання результатів дослідження

Аналіз результатів проводять, порівнюючи рівень експресії CD284, CD282 та CD11b антигенів на макрофагах перитонеального ексудату мишей експериментальних та контрольних груп. Підвищення експресії CD284, CD282 антигенів на макрофагах перитонеального ексудату за інфекційного процесу може свідчити про активацію запалення на системному рівні. Зниження рівня експресії цих антигенів на макрофагах перитонеального ексудату за інфекційного процесу під впливом пробіотичних штамів бактерій свідчить про їх протизапальні та імуномодулювальні властивості.

20 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

дезинфекції використовують розчини 70 %-ого спирту, 3 %-ного хлораміну та інші дезінфікуючі засоби, а також термічне обеззаражування і ультрафіолетове опромінення. Рештки тварин утилізують.

21 АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА ЇХ СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА

Експериментальні дані обробляють загальноприйнятими методами варіаційної статистики з вирахуванням медіанних значень та їх інтерквартильного інтервалу. Для визначення достовірності відмінностей між середніми величинами використовують критерій t Стьюдента (результати дослідження складу мікробіоти піхви та кишківника). Для статистичної обробки дискретних даних (результати титрування інтерферону, ФНП) використовують метод Кербера у модифікації Ашмаріна, інтервал надійності даних оцінюють за середнім геометричним логарифму досліджуваної величини. Для статистичної обробки інших дискретних даних (результати дослідження продукції цитокінів за допомогою імуноферментного методу, показників активності макрофагів перитонеального ексудату, кількості окремих субпопуляції лімфоцитів у селезінці) використовують непараметричний метод Колмогорова-Смирнова. Результати вважають достовірними при $P < 0,05$. Розрахунки проводять за допомогою IBM PC з використанням пакету програмних засобів Microsoft Excel-2000 [9-11]. Результати, що подані графічно, отримують за допомогою програми Excel-2000, Microsoft.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Широбоков ВП. Микробная экология человека с цветным атласом. Учебное пособие / В.П. Широбоков, Д.С. Янковский, Г.С. Дымент. – Київ : ООО «Червона Рута-Турс», 2010. – 340 с.

2. Доклинические исследования лекарственных средств. Методические рекомендации / под. ред. А.В. Стефанова. – Киев : Издательский дом “Авицена”, 2002. – 566 с.

3. Навчальний посібник з клінічної імунології та алергології (для аудиторної роботи студентів) / [Казимирчук В.Є. Драннік Г.М., Мальцев Д.В. та ін.]. – Київ : ООО “Поліграф плюс”, 2008. – 263 с.

4. Казимирчук В.Є. Клінічна імунологія і алергологія / В.Є. Казимирчук, Л.В. Ковальчук. – Вінниця : “Нова книга”, 2006. – 528 с.

5. Дранник Г.Н., Клиническая иммунология и алергология: учебное пособие / Дранник Г.Н. – Киев: ООО “Полиграф плюс”, 2010. – 552 с.

6. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с применением “Excel” / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: Морион, 2000. – 320 с.

7. Пастер Е.У. Иммунология / Е.У. Пастер, В.В. Овод, В.К. Позур, Н.Е. Вихоть. – К.: Выща школа, 1989. – 304 с.

8. Методики морфологічних досліджень: монографія / [Багрій М.М., Діброва В.А., Попадинець О.Г., Грищук М.І.]; за ред. М.М. Багрія, В.А. Діброви. – Вінниця : “Нова книга”, 2016. – 328 с.

9. Современные методы диагностики вирусных респираторных инфекций и их терапии с использованием препаратов интерферона (Методические рекомендации) / Под. ред. А.Ф. Модзолевского, Н.С. Дяченко, Н.Я. Спивака – Киев, 1994. – 18 с.

10. Macrophage-Specific TLR2 Signaling Mediates Pathogen-Induced TNF-Dependent Inflammatory Oral Bone Loss / George Papadopoulos, Ellen O. Weinberg, Paola Massari [et al.] // J Immunol, 2013. – V. 190, N 3. – P. 1148–1157.

11. Lagasse E. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes / E. Lagasse, I.L.J. Weissman // The Journal of Immunological Methods. – 1996. – V. 197, N 1-2. – P. 139–150.

12. Activin A inhibits activities of lipopolysaccharide-activated macrophagesvia TLR4, not of TLR2 / N. Li, X. Cui, J. Ge J. [et al.] //

Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2013. – V. 435, N 2. – P. 222–228.

13. PPE57 induces activation of macrophages and drives Th1-type immune responses through TLR2 /Y. Xu, E.Yang E., Q. Huang [et al.] // Journal of **Molecular Medicine.** – 2015. – V. 93, N 6. – P. 645–662.

14. Low-dose cisplatin administration to septic mice improves bacterial clearance and programs peritoneal macrophage polarization to M1 phenotype/ Li Yanyan, W. Zhenling, Ma Xuelei [et al.] // Pathogens and Disease. – 2014. – N 72. – P. 111–123.