УДК 619:576.807.7.7:616.982.2

МЕТОД ВИЯВЛЕННЯ ЛІЗОСОМ В КЛІТИНАХ КУЛЬТУРИ ЛЕЙКОЦИТІВ КРОВІ

Є.І. Буряк, *доктор вет. наук, професор*

В.Ю. Столяр, *асистент*

Одеський державний аграрний університет

Проводилось дослідження лізосомальної активності в культурі лейкоцитів одержаних через 24,48,72,96 і 120 годин інкубування. Лізосомна активність вивчалась за допомогою вітального фарбування акридиновим оранжевим 1:10000, pH 5,4. Для активації лізосомних ферментів фарбовані препарати витримували у вологій камері при кімнатній температурі впродовж 24,48,72,96 і 120 годин.

Ключові слова: культура лейкоцитів, макрофаги, лизосомі, лізосомальна активність.

В організмі важливими ефекторними клітинами, які виконують свої функції завдяки здатності до фагоцитозу є макрофаги. Шляхом секреції різноманітних біологічно активних речовин, ферментів і цитокінів макрофаги виконують роль регулюючих клітин, підтримують гомеостаз, беруть участь в неспецифічному захисті організму, індукують запальні реакції, направленні на знешкодження чужорідних агентів, які проникли в організм, та аутоантигенів [2,3,5].

Одним з основних тестів, які характеризують функціональну повноцінність макрофагів є визначення вмісту лізосом в їх цитоплазмі. Впродовж останніх 50 років лізосоми знаходяться у фокусі все більш уважного вивчення у галузі клітинної біології і патології. Основною функцією лізосом є клітинне травлення і цим визначається їх важливе значення в захисті від чужерідних агентів. Крім того вони приймають участь в лізисі і резорбції тканин, які втратили свою специфічність.

Вміст лізосом в цитоплазмі макрофагів можливо визначити за допомогою фарбування акридиновим оранжовим, який вибірково накопичується в лізосомах і, так чином, забарвлює

їх в яскравочервоний колір[4]. Інші варіанти визначення вмісту лізосом позв'язані з цитохімічним визначенням активності лізосомальних ферментів: кислої фосфатази або неспецифічної естерази[1].

В задачу наших досліджень входило проведення досліджень з визначенню вмісту лізосом в культурі лейкоцитів крові.

Матеріали і методи досліджень:

Для дослідження відбиралась кров від здорової великої рогатої худоби. Інкубування крові проводилось в середовищі 199 з гепарином (25 ОД/мл) у флаконах з покривними скельцями, розташованими під кутом 30-35^{0}С, при температурі 38,5^{0}С. Культуру лейкоцитів, яка прикріпилась до скла, досліджували з інтервалом 24,48,72, 96 і 120 годин інкубування. Кожен день флакони струшували, щоб розмилися і перейшли у завись клітини лейкоцитарного шару і осідаючи, прикріплялись до поверхні покривного скельця. Покривні скельця з культурою лейкоцитів переносили у флакони з робочим розчином акридинового оранжевого 1:10000, pH 5,4. Після фарбування покривні скельця сполоскували водою і культурою униз клали на предметне скельце, поміщали у вологу камеру і досліджували під люмінесцентним мікроскопом, з інтервалом 24, 48, 72, 96 і 120 годин.

Результати досліджень:

Принцип методу полягає в тому, що в процесі зберігання культури лейкоцитів в препараті придавлена крапля при кімнатній температурі у вологій камері припиняється життєздатність і активується процес аутолізу макрофагів, викликаний дією лізосомальних ферментів на загиблу клітину. Активовані лізосоми в макрофагах культури лейкоцитів фарбованих акридиновими оранжевим, в люмінесцентному мікроскопі виявляються у вигляді овальної форми гранул яскраво-червоного кольору.

Вивчаючи процес трансформації моноцитів крові в макрофаги ми встановили, що через 24 години інкубування в препаратах виявляються незрілі макрофаги, з погано структурованим ядром і цитоплазмою, через 48 годин – на фоні молодих макрофагів виявляються і зрілі з добре структурованим ядром і цитоплазмою, через 72 години – виявляються зрілі чітко структуровані одно- і багатоядерні округлі і полігонально витягнутої форми макрофаги та поодинокі гігантські клітини, через 96 і 120 годин інкубування

виявляються добре структурованні макрофаги часто округлої форми, а одноядерні макрофаги через 120 годин набувають форми епітеліоїдних клітин.

Для активації лізосомальних ферментів фарбовані препарати витримували у вологій камері при кімнатній температурі впродовж 24, 48, 72, 96 і 120 годин.

В препаратах, одержаних після 24-годинної інкубації крові на всіх етапах зберігання лізосоми не виявлялись.

В препаратах, одержаних після 48-72 годинної інкубації крові лізосоми в макрофагах виявлялись у формі червоних гранул лише в препаратах після їх зберігання у вології камері впродовж 48-120 годин. Зі збільшенням терміну зберігання більш чітко проявлялись гранули червоного кольору, розташовані частіше по периметру цитоплазми макрофагів.

В препаратах, одержаних через 96-120 годинної інкубації крові, лізосоми виявлялись через 48-120 годин їх зберігання у вологій камері, але кількість лізосом була меншою, ніж в препаратах одержаних після 72 годинної інкубації крові. Найбільш чітко зменшення кількості лізосом спостерігалось в округлих епітеліоїдної форми клітинах. Тобто при «старінні» культури в макрофагах зменшується кількість лізосом, а в багатьох клітинах гранул не виявляється.

Оцінку лізосомальної активності макрофагів в культурі лейкоцитів крові ми проводили за 4-х бальною системою: 1 бал – за наявності до 10 гранул, 2 бали – до 20 гранул, 3 бали – до 30 гранул і 4 бали – до 40 і більше гранул.

Висновки

1. При зберіганні у вологій камері вітально фарбованних акридиновим оранжевим 1:10000, pH 5,4 препаратів, впродовж 48-96 год. в результаті активації лізосом вони набувають здатності флуоресціювати червоним кольором.

2. В культурі молодих макрофагів, одержаних після 24-годиноої інкубації крові в цитоплазмі не виявляється лізосомальних ферментів.

3. В культурі зрілих макрофагів одержаних через 48 и 72 години інкубації крові, в цитоплазмі виявляються червоні гранули лізосом за умови зберігання препаратів, забарвлених акридиновим оранжевим 1:10000, pH 5,4 впродовж 48-96 годин.

4. За кількістю лізосом в цитоплазмі макрофагів можна визначити їх потенціальну здатність до фагоцитарної активності.

Література

1. *Исупова А.А. Этиопатогенетические особенности изменений иммунитета и микробиологического профиля кожных покровов у лиц, проживающих вблизи урановых хвостохранилищ в горных условиях: Автореф. дис. … к.м.м. - Бишкек, - 2007. – 26 С.*
2. *Луговская С.А. Структура и функции моноцитов и макрофагов//Клиническая и лабораторная диагностика.- №9 - 1997 – с.10.*
3. *Олиферчук Н.С., Ильинская А.Н., Пинегин В.В. Оценка фагоцитарной и бактерицидной активности нейтрофилов и макрофагов // Иммунология.- №1- 2005 – с.10-12*
4. *Фрейдлин И.С. Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека: учебн. пособие.- Л.- 1986.- 37 С.*
5. *Balleux R.E. The mind and the immune system // Theor.Med. - Vol.15.- №40.- 1995.- P.387*

Буряк Е.И., Столяр В.Ю. Метод выявления лизосом в клеточной культуре лейкоцитов крови.

Проводилось исследование лизосомной активности в культуре лейкоцитов, полученных через 24,48,72,96 и 120 часов инкубации. Лизосомная активность изучалась при помощи витального окрашивания акридиновым оранжевым 1:10000, pH 5,4. Для активации лизосомных ферментов окрашенные препараты выдерживались во влажной камере при комнатной температуре в течении 24,48,72,96 и 120 часов.

Ключевые слова: *культура лейкоцитов, макрофаги, лизосомы, лизосомная активность.*

Buryack E.I., Stolar V.U. The method of determining lysosoms in the cellular culture of leucocytes of blood.

A research of lysosomal enzymes activity was conducted in the culture of leucocytes, got in 24,48,72,96 and 120 hours of incubation. An activity of lysosomal enzymes was studied through the vital painting the acridine orange. For lysosomal enzymes activating, painted preparation were maintained in a moist chamber with the room temperature during 24,48,72,96 and 120 hours.

Key words: *leucocytes, macrophages, lysosoms, lysosomal enzyme.*