



**Cuiavian University in Wloclawek**

International scientific and practical conference

**PROSPECTS FOR THE DEVELOPMENT OF MEDICINE  
IN EU COUNTRIES AND UKRAINE**

December 21–22

**Wloclawek,  
Republic of Poland  
2018**

International scientific and practical conference «Prospects for the development of medicine in EU countries and Ukraine» Włocławek, Republic of Poland, December 21–22, 2018. Włocławek: Izdevniecība «Baltija Publishing», 2018. 152 pages.

#### ORGANISING COMMITTEE

dr **Marek Zieliński**, Dean of the Faculty of Health Sciences of Cuiavian University in Włocławek;

prof. dr hab. **Waldemar Jędrzejczyk**, Faculty of Health Sciences of Cuiavian University in Włocławek;

prof. dr hab. **Ludwik Malendowicz**, Faculty of Health Sciences of Cuiavian University in Włocławek.

Each author is responsible for content and formation of his/her materials.  
The reference is mandatory in case of republishing or citation.

## THEORETICAL MEDICINE

### АНАЛІЗ ІНФОРМАТИВНОСТІ КІЛЬКІСНИХ ПОКАЗНИКІВ ЛЮМІНЕСЦЕНТНОЇ МІКРОСКОПІЇ ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРІФЕРИЧНОЇ КРОВІ З ЗАСТОСУВАННЯМ АКРИДИНОВОГО ОРАНЖЕВОГО

**Александрова К. В.**

*доктор хімічних наук, професор,  
завідувач кафедри біологічної хімії  
Запорізького державного медичного університету*

**Федотов Є. Р.**

*кандидат біологічних наук,  
доцент кафедри біологічної хімії  
Запорізького державного медичного університету*

**Михальченко Є. К.**

*аспірант кафедри біологічної хімії  
Запорізького державного медичного університету  
м. Запоріжжя, Україна*

В даний час в якості флуорохрому великий інтерес для кількісної люмінесценції нуклеїнових кислот імунокомпетентних клітин представляє діамінопохідне акридину – акридиновий оранжевий (АО) [1]. Відмічено, що застосування спектральної техніки дозволяє одержувати досить надійні та відтворені результати виміру інтенсивності червоної і зеленої люмінесценції препаратів, пофарбованих АО. Акридиновий оранжевий активно взаємодіє з хімічними компонентами як живої, так і фіксованої клітини, надаючи їм надзвичайно яскраву поліхромну люмінесценцію. Встановлено, що ця речовина, у фіксованих клітинах, з'єднуючись із ДНК, додає їй зелену, а з РНК – червону люмінесценцію, тобто, була показана можливість люмінесцентно-мікроскопічного виявлення нуклеїнових кислот на фіксованих препаратах [2, 3]. Однак, навіть, якщо дотримані необхідні обережності, питання інтепретації отриманих даних у термінах фізіології клітини та тканини залишається досить важким і повинно вирішуватися дослідником стосовно до конкретного об'єкта вивчення і поставленого завдання.

За спектрами люмінесценції НК у клітинах, пофарбованих АО, можна з великою точністю судити про ступінь спіралізації (вторинну структуру) НК, що у свою чергу характеризує білоксинтетичну активність клітини в цілому. Ріглер [1, 4] у якості показника ступеня упорядкованості вторинної структури ДНК запропонував спеціальний коефіцієнт  $\alpha$ , що являє собою відношення інтенсивностей червоної (дімерної,  $\lambda = 640$  нм) і зеленої (мономерної,  $\lambda = 530$  нм) люмінесценції АО. Однак відомі способи визначення білоксинтетич-

ної активності клітин по  $\alpha$ -параметру мало придатні для характеристики клітин крові, що циркулюють. Клітини крові, що циркулюють: лімфоцити, моноцити, гранулоцити, на відміну від клітин осілих тканин, наприклад, мієлоїдних, лімфоїдних тканин, вийшли з мітотичного циклу і знаходяться в  $G_0$  стадії життєвого циклу. У цей період синтез НК знаходиться на мінімальному рівні, а ДНК у ядрі максимально конденсується (наростає дволанцюговість). Тому активність білоксинтетичної системи лейкоцитів визначається, в основному, кількістю напрацьованих ще в мієлоїдних та лімфоїдних органах РНК. Зроблений висновок підтверджується нашими даними про слабку та недостовірну популяційну варіацію I 530 нм (дволанцюгові НК, в основному ДНК), тоді як I 640 нм (одноланцюгові НК, в основному РНК) коливається в широких межах. У цьому зв'язку  $\alpha$ -параметр не дає однозначної характеристики функціональної активності конкретної клітини крові. Він є відношенням інтенсивності люмінесценції при максимумі 640 нм до інтенсивності люмінесценції при максимумі 530 нм і може бути низьким при високих значеннях I 640 і I 530, високим при низьких їхніх значеннях і однаковим у клітин із різної I 640 і I 530. Крім того, більшість дослідників проводять вимір люмінесценції клітин без огляду на власну люмінесценцію фону препарату.

Слабка інформативність  $\alpha$ -параметра стосовно білоксинтетичної функції клітин крові пояснюється ще і тим, що лейкоцити розрізняються за ступенем диференціювання. Так, сегментоядерцеві лейкоцити (нейтрофіли, еозінофіли, базофіли) потрапляють у кров на кінцевих стадіях диференціювання, тоді лімфоцити, які циркулюють, у цьому відношенні гетерогені. Велика їх частина може після зустрічі з антигеном та мітогеном вступати в мітотичний цикл, у якому збільшується частка одноланцюгових НК (флуоресцюють при I 640) [4].

Лімфоцити периферичної крові, на відміну від сегментоядерцевих лейкоцитів, розрізняються за ступенем диференціювання і функціональної активності їх білоксинтетичної системи. Але варіації I 530 їхніх ядер також відбуваються у вузьких межах за рахунок конденсації ДНК, яка спостерігається в  $G_0$  – періоді життєвого циклу лімфоцитів. Метаболічна активність ДНК (редуплікація, транскрипція), що призводить до появи одноланцюгових НК, відбувалася в короткий період часу при імуногенезі ще в лімфоїдних органах. У той же час продукти цієї транскрипційної активності – різні види РНК (інформаційна, транспортна, рибосомальна), зберігаються в ядрі й особливо в цитоплазмі клітини значно довше, включаючи і лімфоцити крові, що циркулюють [5]. Даний факт пояснює причини значно меншої варіації I 530 у порівнянні з I 640. Тому усі варіації  $\alpha$ -параметра в клітинах крові, що відбиває їх білоксинтетичну активність, відбуваються за рахунок рівня I 640. Отже, при вивченні функціональної активності білоксинтетичної системи в клітинах периферичної крові досить і об'єктивніше аналізувати I 640 замість  $\alpha$ -параметра.

Для доказу вищезазначених розумінь було обстежено 15 хірургічних хворих, оперованих із приводу пухлин головного мозку різної локалізації. Обстеження проводили до операції і після її закінчення. Групою порівняння служили 10 донорів крові, подібні з хворими віком. Рівень люмінесценції визначали на мікроспектрофлуориметрі – 2 (МСФ-2).

Навіть після сильного антигенного і стресорного впливу на організм, яким супроводжується операція,  $\alpha$ -параметру лейкоцитах крові не досягає достовірних різниць після операції в обстежених хворих, а також при порівнянні даного показника у донорів, унаслідок відсутності зрушень I530 до і після операції. Значні зрушення показників люмінесценції відбувалися тільки в спектрі I640. У нейтрофілах різниці даного показника досягали критичних значень тільки між донорами і хворими після операції. Невелике збільшення I640 у нейтрофілах хворих після операції в порівнянні з вихідним рівнем не досягло рівня значимості ( $0,45 \pm 0,04$  і  $0,54 \pm 0,04$  у.е.  $p > 0,05$ ). Це і зрозуміло, тому що нейтрофіли перебувають у кінцевій стадії диференціювання, в якій для виконання їх функцій вже напрацьовані специфічні структури і речовини під час попередньої активності білоксинтетичної системи клітин у мієлоїдних органах.

Високі і достовірні зміни інтенсивності люмінесценції відбуваються в лімфоцитах тільки в спектрі I640 (одноланцюгові НК). Лімфоцити є імунокомпетентними клітинами, що активуються антигенами та аутоантигенами, перетворюючись у ефекторні і регуляторні клітини. В лімфоцитах, що циркулюють у крові накопичуються одноланцюгові НК (в основному РНК) під час попереднього імуногенезу в лімфоїдних органах.

Отже, найбільш об'єктивним показником динаміки інтенсивності люмінесценції периферичних клітин крові, оброблених АО, є рівень I 640, що відбиває активність білоксинтетичної системи лейкоцитів крові.

### Література:

1. Карнаухов В. Н. Люминесцентный анализ клеток : учебное пособие. Пушино : ИБК РАН, 2002. 131 с.
2. Маряхина В. С. Оптические методы в химии, биологии и медицине : монография. Москва : Наука, 2015. 141 с.
3. Побилат А. Е. Флюоресцентная диагностика. Москва : LAP Lambert /Academic Publishing. 2011. 176 с.
4. Федотов Е. Р. Оценка функциональной активности лимфоцитов крови с помощью двуволнового люминофора акридинового оранжевого / Е. Р. Федотов, В. В. Копейка, А. К. Фролов, Л. А. Фролова, С. В. Иващенко. *Лабораторная диагностика*. 2008. № 1 (43) С. 48-53.
5. Фролов А. К. Методология оценки состояния иммунной системы по соотношению пулов активированных и неактивированных лимфоцитов крови / А. К. Фролов, Л. А. Фролова, Е. Р. Федотов, В. В. Копейка. *Имунологія та алергологія*. 2005. № 3. С. 75-77.