

VILNIAUS GABIJOS GIMNAZIJA

PELĖS MAKROFAGŲ IŠSKYRIMAS IR KULTIVAVIMAS *IN VITRO*

GABIJA BILIŪTĖ

Darbo vadovas: Virginija Kriaučiūnaitė

biologijos mokytoja

2016

IVADAS

Makrofagai yra imuninės sistemos ląstelės, vykdančios fagocitozę. Gyvame organizme makrofagai šalina mikrobus, svetimas arba pažeistas ląsteles. Jie taip pat gamina įvairius citokinus, kurie reguliuoja kitų ląstelių funkcijas. Šios makrofagų savybės gali būti panaudotos *in vitro* eksperimentams, dirbant su ląstelių kultūromis.

Gabijos gimnazijos moksleivių grupė turėjo galimybę apsilankyti VU Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos laboratorijoje (vedėja VU prof. Aurelija Žvirblienė) ir susipažinti su laboratorijoje vykdomais eksperimentais. Vienas iš jų – pelės makrofagų paėmimas ir kultivavimas. Darbus su eksperimentinėmis pelėmis gali atlikti tik darbuotojai, išklause specialius kursus ir turintys specialų leidimą.

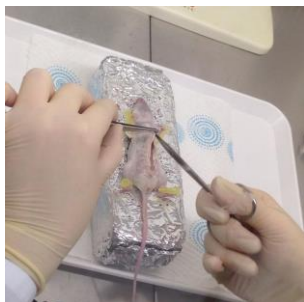
Šiame laboratoriniame darbe buvo stebimas makrofagų paėmimas iš pelės pilvo ertmės ir jų kultivavimas *in vitro*. Makrofagų gyvybingumas ir kiekis buvo vertinamas mikroskopu.

Tyrimo tikslas: Susipažinti su pelės pilvo ertmės makrofagų išskyrimo ir kultivavimo sąlygomis.

Tyrimo hipotezė: Pelės pilvo ertmėje yra reziduojančių makrofagų, kurie gali būti išskirti ir kultivuojami *in vitro*.

TYRIMO EIGA

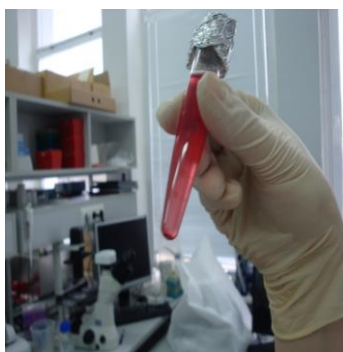
1. Laboratorijos darbuotoja, turinti leidimą darbui su eksperimentiniais gyvūnais, atliko pelės eutanaziją ir trumpam panardino ją į etanolio tirpalą, kad pašalintų mikroorganizmus nuo pelės paviršiaus.
2. Ištraukus pelę iš tirpalo, ji buvo padėta ant specialaus padėklo pilvu į viršų, o jos galūnės prismeigtos smeigtukais. Darbas vyko laminarinėje spintoje. Laminarinėje spintoje iš apačios į viršų pučiamas sterilus oras ir taip sudaromas barjeras, kuris apsaugo, jog atliekant bandymus į mėginius nepakliūtų mikroorganizmų..
3. Žirkklėmis labai atsargiai prakirpta pilvo oda, kad nepažeistume, nepradurtume pilvaplėvės. Šiam etapui naudotos žirkklės bei pincetas, kurie prieš tai dezinfekuoti spiritu ir liepsna. Dezinfekavimas liepsna taip pat atliekamas norint išvengti pašalinių mikroorganizmų patekimo į mėginį.



4. Nuo pilvaplėvės buvo surinkti makrofagai. Tam naudotas sterilus fiziologinis tirpalas. Apie 7 ml tirpalo buvo supilta ant pilvaplėvės ir maždaug tiek pat jo surinkta jau su makrofagais.



5. Fiziologinis tirpalas su makrofagais buvo centrifuguotas ir makrofagai nusodinti. Po to jie buvo suspenduoti 1 ml augimo terpės. Augimo terpė yra pritaikyta žinduolių ląstelių kultivavimui *in vitro*.



6. Makrofagai buvo užsėti į specialius ląstelių auginimui skirtus plastiko indus. Mėginys laikytas inkubatoriuje, kuriame panašios sąlygos kaip gyvame organizme - sudaroma 37°C temperatūra, drėgna, 5% CO₂ prisotinta aplinka.

7. Iš inkubatoriaus buvo paimtas ir tolimesniam darbui naudojamas kitas makrofagų mėginys, paimtas prieš savaitę. Jeigu mes būtume stebėję mūsų ką tik paimtą makrofagų mėginį mikroskopu, negalėtume atskirti makrofagų nuo kitų leukocitų ir negalėtume pamatyti, kaip kultivuojant keičiasi makrofagų morfologija



8. Savaitę kultivuoti makrofagai buvo stebėti mikroskopu. Mėginys buvo padidintas 400 kartų. Pastebėta, jog makrofagai buvo verpstės formos („išsiplastavę“), t.y., įgavę panašią morfologiją kaip ir gyvame organizme. Audiniuose makrofagai būna išsiplastavę. Kai į organizmą patenka ligos sukėlėjų ar atsiranda žuvusių ląstelių, jie pradeda vykdyti fagocitozę.

Mikroskopu stebėti makrofagai laboratorijoje buvo panaudoti kitų pelės ląstelių klonavimui. Jie padeda išgyventi pavienėms ląstelėms, nes išvalo augimo terpę bei fagocituoja žuvusias ląsteles ir išskiria citokinus.



Išsiplastavęs
makrofagas

IŠVADOS

1. Iš pelės pilvo ertmės pavyko išskirti apie 1 mln gyvybingų makrofagų.
2. Makrofagų gyvybingumas buvo patvirtintas mikroskopu.
3. Makrofagai gali būti kultivuojami specialiuose audinių kultūroms skirtuose plastiko induose ir specialiose auginimo terpėse.
4. Kultivuojami makrofagai prisitvirtina prie plastiko paviršiaus ir pakeičia savo morfologiją – iš apvalių ląstelių virsta verpstės formos ląstelėmis. Tokia forma būdinga audinių makrofagams.