Akceptuję
W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej Polityce Prywatności

Izolacja oraz analiza wybranych parametrów płytek krwi cz. 2

Płytki krwi (trombocyty) są najmniejszymi elementami morfotycznymi krwi, nieposiadającymi jądra komórkowego, które odgrywają bardzo istotną rolę w procesie hemostazy. W związku z tym stanowią ważny obiekt licznych badań *in vitro* (ich głównym celem jest m.in. wyselekcjonowanie preparatów wykazujących działanie przeciwpłytkowe) [1]. Oprócz zaangażowania w fizjologiczne procesy hemostazy, płytki krwi biorą również udział w procesach patologicznych (związane są m.in. z chorobami układu naczyniowego czy w procesy tworzenia przerzutów nowotworowych) [5], [9].

Izolacja płytek krwi metodą przemywania

Osocze bogatopłytkowe (PRP) otrzymane tak jak opisano powyżej, przeniesiono do probówki polipropylenowej, do której dodano ACD i PGE1. Próbkę wirowano przy 650 x g przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a otrzymane po wirowaniu osocze usunięto. Płytki zawieszono w 10 ml buforu Jamieson'a (tj. 5,5 mM [D]-glukoza-1,28 mM NaCl-4,26 mM Na_2HPO_4-7,46 mM NaH_2PO_4-4,77 mM cytrynian sodu-2,35 kwas cytrynowy-0,35% BSA, pH 6,5), a następnie wirowano przy 500 x g przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Otrzymany supernatant odrzucono, a osad ponownie zawieszono w wolnym od Ca^2+ buforze Hepes-Tyroda [18],[19].

Otrzymywanie krwinek płytkowych (wg Rendu F., i wsp., 1983)

Zasada metody:

W metodzie tej należy tak dobrać warunki wirowania, by w trakcie wirowania próbki erytrocyty i leukocyty krwi osadzały się, a płytki krwi pozostały w osoczu, tworząc tzw. osocze bogatopłytkowe (ang. platelet rich plasma- PRP).

Zawieszone w osoczu płytki oczyszczane są od pozostałych komórek, a następnie oddziela od osocza za pomocą różnych metod laboratoryjnych (najczęściej wykorzystywana jest metoda wirowania). Białko płytkowe oznacza się z kolei zmodyfikowaną metodą Lowry’ego bądź też metodą mikrobiuretową. W celu określenia ilości płytek krwi wykorzystuje się stolik Thoma-Zeissa (inaczej komora zliczeniowa Thoma). Liczba płytek krwi w osoczu (lub zawiesinie) oznaczana jest z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej (przy λ= 800 nm) [2].

Materiał do oznaczenia: krew świni (50-200 ml), pobrana na 0,2 M roztwór cytrynianu sodowego (krew nie może zostać pobrana na heparynę).

Wykonanie oznaczenia:

Otrzymywanie osocza bogatopłytkowego: krew należy odwirować przy 1000 obr./min. (15 minut). Osadzone w trakcie wirowania erytrocyty i leukocyty należy odrzucić, i bardzo ostrożnie ściągnąć supernatant (osocze bogatopłytkowe), który należy zachować do badania agregacji [2].

Wybrane metody otrzymywanie płytek krwi z osocza bogatopłytkowego:

a) Metoda frakcjonowanego wirowania i przemywania płytek: osocze należy odwirować przez 20 minut przy 6000 obr./min. Otrzymany supernatant odrzucić, pozostawiając otrzymany na dnie probówki osad płytek zanieczyszczonych domieszką erytrocytów i leukocytów. Osad zawiesić w niewielkiej ilości (10-20 ml) buforu Tyroda (tj.: 10 mM HEPES-140 mM NaCl-3 mM KCl- 0,5 mM $MgCl_2$- 5 mM $NaHCO_3$- 10 mM glukoza, pH=7,4). Próbkę odwirować (1000 obr./min., 10 minut).

Osadzone po wirowaniu erytrocyty i leukocyty należy odrzucić, a zawiesinę płytek w roztworze przemywającym ponownie odwirować (6000 obr./min., 20 minut), w celu osadzenia płytek. Otrzymany osad płytek ponownie zawiesić w buforze Tyroda 910 ml). Próbka może być wykorzystana do pomiaru aktywacji krwinek płytkowych [2].

b) Metoda wirowania w gradiencie stężenia albuminy (wg Walsh, 1972): osocze bogatopłytkowe (w objętości ok. 5-8 ml) należy nawarstwić na 2-centymetrować warstwę 25% roztworu BSA, znajdującego się w probówce wirówkowej. Następnie należy lekko zamieszać górną (0,5-centymetrową) warstwę roztworu BSA, po czym odwirować próbkę przez 30 minut przy 6000 obr./minutę). Po wirowaniu erytrocyty osadzają się na dnie probówki, z kolei płytki krwi znajdują się w górnej warstwie roztworu BSA. Warstwę płytek należy ostrożnie ściągnąć, używając w tym celu pipety.

c) Metoda wirowania z olejem silikonowym (wg Feinberg i wsp., 1974): metoda wykorzystywana jest do oddzielania płytek krwi od osocza, a podczas jej przebiegu osocze bogatopłytkowe (ok. 5-8 ml) nawarstwiane jest na 1 ml oleju silikonowego. Następnie próbka poddawana jest odwirowaniu przez 15 minut przy 6000 obr./min. Po wirowaniu otrzymuje się osad płytek, który oddzielony jest od osocza warstwą oleju silikonowego [2].

d) Wirowanie w gradiencie stężenia metrizamidu (wg Rendu, 1983): próbkę osocza bogatopłytkowego należy nanieść w ilości ok. 8 ml na gradient metrizamidu (10%/25%) znajdującego się w probówce wirówkowej. Tak przygotowaną próbkę odwirować przy 2600 obr./min. przez 12 minut, po wirowaniu usunąć warstwę PRP wraz z górną i dolną warstwą metrizamidu. Do pozostałej objętości próbki (0,5-1 ml) należy dodać bufor przemywający A (tj.: 140 mM NaCl-5 mM KCl-12 mM cytrynian sodu- 10 mM glukoza- 12,5 mM sacharoza, pH=6.0). Bufor należy dodać w takiej ilości by otrzymać wyjściowa objętość PRP. Otrzymaną zawiesinę płytek należy nanieść na następny gradient metrizamidu (10%/25%), ponownie odwirować i usunąć górną i dolną warstwę (jak wyżej), a otrzymane płytki krwi zawiesić w buforze Tyroda (również jak wyżej).

e) Filtracja żelowa (wg Walkowiak i wsp., 1989): na kolumnę wypełnioną żelem Sepharose 4B (o wymiarach 1,5 x 30cm, przemytą buforem Tyroda) należy nanieść od 5 do 10 ml osocza bogatopłytkowego, po czym przeprowadzić elucję buforem Tyroda (z szybkością 15 ml/min). W trakcie elucji należy rejestrować absorbancję próbki, mierzoną przy długości fali λ= 230 lub 280 nm. W trakcie elucji jako pierwsze z próbki wymywane zostają płytki krwi, a następnie białka osocza [2].

Wykrywanie przeciwciał płytkowych

W przypadku wykrywania przeciwciał płytkowych najczęściej wykorzystywane są metody oparte na zasadzie testu antyglobulinowego, gdzie surowicę, w której poszukuje się przeciwciał poddaje się inkubacji z allogenicznymi płytkami krwi, a następnie z surowicą antyglobulinową, która jest sprzężona z fluorochromem lub enzymem. W przypadku, gdy surowica antyglobulinowa jest znakowana fluoresceiną (tzw. test immunofluorescencyjny) wtedy wyniki badań ocenia się z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego lub cytometru przepływowego. Z kolei, gdy surowica sprzężona jest z enzymami np. fosfatazą zasadową lub peroksydazą (tzw. test immunoenzymatyczny) to wyniki badań ocenia się w spektrofotometrze.

https://laboratoria.net/artykul/24706.html
Informacje dnia: Resort nauki chce wprowadzić parytety i feminatywy Czeski historyk wyróżniony Nagrodą im. Wacława Felczaka i Henryka Wereszyckiego Użyteczne związki organiczne z gazów cieplarnianych Nie zmiana stanu skupienia śniegu Wodór z wody i światła Smartfony ograniczają zainteresowanie uczniów nauką Resort nauki chce wprowadzić parytety i feminatywy Czeski historyk wyróżniony Nagrodą im. Wacława Felczaka i Henryka Wereszyckiego Użyteczne związki organiczne z gazów cieplarnianych Nie zmiana stanu skupienia śniegu Wodór z wody i światła Smartfony ograniczają zainteresowanie uczniów nauką Resort nauki chce wprowadzić parytety i feminatywy Czeski historyk wyróżniony Nagrodą im. Wacława Felczaka i Henryka Wereszyckiego Użyteczne związki organiczne z gazów cieplarnianych Nie zmiana stanu skupienia śniegu Wodór z wody i światła Smartfony ograniczają zainteresowanie uczniów nauką

Partnerzy