

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра микробиологии и иммунологии

КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ, АЛЛЕРГОЛОГИЯ

БАЗОВЫЕ МЕТОДЫ

ПРАКТИКУМ



Пермь 2020

Составитель: канд. биол. наук **Е. В. Сайдакова**

Клиническая иммунология, аллергология. Базовые методы : практикум / сост. Е. В. Сайдакова ; Пермский государственный национальный исследовательский университет. – Пермь, 2020. – 40 с.

В настоящем учебном издании описаны некоторые базовые методы, использующиеся в биологических лабораториях различного профиля. Приведены протоколы для самостоятельного определения количества лейкоцитов крови и расчета лейкоформул, выделения мононуклеарных клеток из периферической крови. Для обеспечения безопасности при работе с биологически опасными агентами и гемоконтактными патогенами представлены основные требования техники безопасности и процедуры по ликвидации экстренных ситуаций.

Пособие предназначено для студентов, обучающихся по направлению подготовки бакалавров «Биология» (направленность «микробиология и иммунология» и «генетика»).

*Печатается по решению кафедры микробиологии и иммунологии
Пермского государственного национального исследовательского университета*

Учебное издание

Составитель: **Сайдакова** Евгения Владимировна

Издается в авторской редакции
Компьютерная вёрстка:
Е. В. Сайдакова

Подписано в печать 17.12.2020.
Формат 60×84/16. Усл. печ. л. 2,33.
Тираж 50 экз. Заказ 160

Издательский центр
Пермского государственного
национального исследовательского университета.
614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15

Типография ПГНИУ,
614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15

© ПГНИУ, 2020

© Сайдакова Е. В., составление, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ЗАНЯТИЕ 1. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С БИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫМИ АГЕНТАМИ В ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ	4
Последовательность действий для асептического (безопасного) снятия одноразовых перчаток	8
Процедуры по ликвидации экстренных ситуаций в лаборатории	9
Базовые правила для безопасной работы в биологической лаборатории	11
ЗАНЯТИЕ 2. ДОЗИРОВАНИЕ ЖИДКОСТЕЙ	12
Строение дозатора	13
Принцип работы дозатора	14
Прямое дозирование	15
Обратное дозирование	17
Задания для самостоятельного выполнения	18
ЗАНЯТИЕ 3. ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ	19
Рекомендации по использованию центрифуги	23
Задания для самостоятельного выполнения	24
ЗАНЯТИЕ 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА И СОСТАВА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ	25
Подсчет лейкоцитов в камере Горяева	25
Приготовление, фиксация и окраска мазков крови для подсчета лейкоцитарной формулы	28
Подсчет лейкоформулы	31
Самостоятельный подсчет лейкоцитов в камере Горяева	34
Самостоятельное приготовление красящей смеси и окраска мазков по методу Романовского-Гимзе	35
Самостоятельный подсчет лейкоформулы	36
ЗАНЯТИЕ 5. ВЫДЕЛЕНИЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ	37
Протокол для самостоятельного выделения мононуклеарных клеток на градиенте плотности диаколла	39

ЗАНЯТИЕ 1. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С БИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫМИ АГЕНТАМИ В ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Биологическую опасность (Biohazard) представляют биологические агенты, организмы и их токсины, способные при передаче по воздуху, при проглатывании и через кровь инфицировать человека или любую другую форму жизни. К биологическим угрозам относятся прионы, вирусы, бактерии, грибы, простейшие, метаболиты этих живых существ, а также нуклеиновые кислоты, полученные из патогенных организмов, из онкогенов и трансформированных клеточных линий.

Начиная с 1966 года, по всему миру для обозначения биологической опасности используется специальный знак (рис. 1), основой которого являются круг и трилистник особой формы. Чаще всего это обозначение встречается на ярко-оранжевом или красном фоне.



Рис. 1. Знак биологической опасности

Гемоконтактные патогены (bloodborne pathogens) – любые патологические микроорганизмы или вирусы, присутствующие в человеческой крови и способные вызывать заболевания у человека. Все гемоконтактные патогены биологически опасны, но не все биологически опасные вещества являются гемоконтактными патогенами.

В лабораторной практике гемоконтактные патогены могут передаваться посредством ряда путей, а именно:

- через проколы кожных покровов контаминированными инструментами;
- через контакт с поврежденной кожей (порезами, царапинами и т.д.);
- через контакт со слизистыми (глаза, нос, рот, т.д.).

Гемоконтактные патогены могут присутствовать в таких жидкостях человеческого тела, как:

- кровь;
- сперма;
- секреты влагалища;
- спинномозговая жидкость;
- синовиальная жидкость;
- плевральная жидкость;
- перитонеальная жидкость;
- амниотическая жидкость;
- слюна (если в ней есть следы крови).

Опасными «по умолчанию» считаются любые жидкости человеческого тела, визуально содержащие кровь, или те жидкости, происхождение которых невозможно установить.

Потенциально опасными являются:

- химически незафиксированные ткани и органы человека (кроме неповрежденной кожи);
- клетки и тканевые культуры человеческого происхождения;
- культуральные среды или растворы, в которых могут присутствовать клетки человеческого происхождения;
- животные и ткани животных, которые могут содержать гемоконтактные патогены.

Если нет видимых следов крови, то НЕ считаются опасными:

- моча;
- кал;
- рвотные массы;
- слезы;
- пот;
- слюна;
- мокрота;
- носовые секреты.

Следует помнить, что при работе с **ЛЮБЫМИ** образцами человеческого происхождения **ВСЕГДА** следует соблюдать меры предосторожности!

Согласно современным представлениям тератогены, мутагены и канцерогены не представляют биологической опасности. Это химически опасные вещества и их утилизация производится согласно соответствующим правилам. В случае загрязнения, биологически опасные вещества должны быть обезврежены перед началом утилизации химически опасных веществ.

Ткани животных и человека, зафиксированные в растворе формальдегида, считаются обезвреженными. Исключение составляют прионы, сохраняющие свои

негативные свойства при использовании этого метода фиксации.

Все биологически опасные вещества можно разделить на четыре группы, согласно степени их патогенности (т.н. группы риска). Представленная ниже классификация предложена всемирной организацией здравоохранения для лабораторной работы.

1 группа. Вещество не вызывает болезни у взрослых и представляет минимальную угрозу для окружающей среды.

2 группа. Вещество способно вызывать болезнь у здоровых взрослых. Редко, но вызываемое заболевание может быть серьезным. Доступны методы профилактики или лечения болезни. Несет умеренный риск для окружающей среды.

3 группа. Вещество может вызывать серьезное или смертельное заболевание. Меры профилактики и лечения заболевания могут быть доступны. Высокий риск для окружающей среды.

4 группа. Вещество может вызывать серьезные или смертельные заболевания. Методы предотвращения или лечения болезни недоступны. Представляет серьезную угрозу для окружающей среды.

В России существует своя классификация патогенности организмов. Основное ее отличие – это обратный порядок увеличения опасности: организмы наиболее высокой степени патогенности отнесены к 1 группе. Также в России приняты Санитарные Правила, устанавливающие требования к организационным и профилактическим мероприятиям, направленным на обеспечение личной и общественной безопасности, защиту окружающей среды при работе с патогенными биологическими агентами:

- СП 1.3.2322–08 регламентирует работу с организмами III–IV групп патогенности (согласно классификатору РФ);

- СП 1.3.3118–13 регламентирует работу с организмами I–II группы патогенности (согласно классификатору РФ).

Для снижения риска при работе с биологически опасными веществами используются инженерно-технические средства контроля и средства индивидуальной защиты. Они включают в себя:

- ламинарные боксы;
- вакуумные ловушки;
- средства для безопасной утилизации острых инструментов;
- заглушки и колпачки для игл и скальпелей;
- твердые контейнеры для утилизации материалов;
- лабораторные халаты;
- одноразовые перчатки;
- защитные очки, щитки и т.д.

Ламинарные боксы разной степени безопасности обеспечивают защиту персонала от повреждающих агентов, защиту окружающей среды от опасных веществ, а также защищают вещества внутри бокса от контаминаций. Большинство лабораторий оснащены боксами биологической безопасности 1 и 2 класса. Безопасную работу оператора с наиболее опасными веществами обеспечивает бокс 3 класса безопасности.

Последовательность действий для асептического (безопасного) снятия одноразовых перчаток



Стянуть перчатку с одной руки, держась за ее основание.



Держа снятую перчатку в защищенной руке, двумя пальцами свободной руки стянуть вторую перчатку.



Продолжая стягивать вторую перчатку, вывернуть ее наизнанку, оставив первую перчатку внутри. Выбросить перчатки в соответствующий контейнер. Тщательно вымыть руки.

Рис. 2. Метод асептического снятия одноразовых перчаток

Процедуры по ликвидации экстренных ситуаций в лаборатории

Колотые раны, порезы и царапины. Пострадавшему следует снять защитную одежду, вымыть руки и пораженную зону. Позволить крови некоторое время беспрепятственно вытекать из пореза, затем обработать кожу соответствующим дезинфицирующим средством. Обязательно сообщить о происшествии старшему сотруднику лаборатории. При необходимости, обратиться за медицинской помощью.

Поглощение потенциально инфекционного материала. Следует снять защитную одежду и обратиться за медицинской помощью к старшему сотруднику лаборатории.

Повреждение контейнеров и разлитие инфекционных веществ. Незамедлительно сообщить об инциденте старшему сотруднику лаборатории. Работу по устранению последствий разлива следует проводить в перчатках. Поврежденные контейнеры, а также пролитые биологически опасные вещества следует накрыть тканевыми или бумажными полотенцами. Через полотенца место разлива следует полить дезинфицирующим раствором и оставить на некоторое время. Затем полотенца и поврежденные материалы следует удалить. Острые предметы, например осколки стекла, следует брать пинцетом. По завершению этих процедур загрязненную зону следует протереть дезинфицирующим средством. Многоразовые инструменты, использованные для устранения разлива (пинцеты, совки и т.д.) следует автоклавировать или поместить в дезинфицирующий раствор.

Повреждение пробирок с потенциально инфекционным материалом в центрифугах, не имеющих герметичных стаканов. Если во время работы центрифуги произошло или Вы думаете, что произошло повреждение пробирок, мотор центрифуги следует

выключить и оставить машину закрытой в течение 30 минут. Если повреждение обнаружено после остановки вращения центрифуги и открытия крышки, крышку следует немедленно закрыть и оставить закрытой. В обоих случаях следует незамедлительно сообщить об инциденте старшему сотруднику лаборатории. При очистке центрифуги следует работать в прочных перчатках из толстой резины. Все острые осколки следует брать пинцетом и помещать в дезинфицирующее средство. Туда же следует поместить съемный ротор центрифуги и центрифужные стаканы. Неразбитые закрытые пробирки можно поместить в дезинфицирующее средство в отдельном контейнере и затем повторно использовать. Со всеми материалами, которые использовались для чистки, следует обращаться как с инфекционными отходами.

Будьте осторожны и соблюдайте технику безопасности при работе в лаборатории!

Базовые правила для безопасной работы в биологической лаборатории

1. Во время работы в лаборатории ВСЕГДА следует носить специальную одежду или халат.

2. При всех процедурах, которые могут сопровождаться прямыми или случайными контактами с гемоконтактными патогенами следует надевать специальные перчатки. Предварительно следует убедиться, что тип перчаток (латексные, виниловые или нитриловые) является подходящим для защиты от потенциальной угрозы. После использования снимать перчатки следует асептически.

3. Необходимо мыть руки КАЖДЫЙ РАЗ после манипуляций с потенциально опасными веществами, а также в конце рабочего дня.

4. При необходимости можно использовать специальные очки или щиток для предохранения глаз и лица от брызг и попадания инфицированного материала.

5. Носить защитную одежду вне лабораторных помещений ЗАПРЕЩАЕТСЯ.

6. Сменная обувь для работы в лабораториях должна быть с закрытым носком.

7. В рабочей зоне лаборатории ЗАПРЕЩЕНО принимать пищу, пить, курить, применять косметические средства и использовать контактные линзы.

8. Хранить пищу и напитки в рабочей зоне лаборатории ЗАПРЕЩЕНО.

ЗАНЯТИЕ 2. ДОЗИРОВАНИЕ ЖИДКОСТЕЙ

Дозирование жидкостей – это технологическая операция, заключающаяся в отмеривании точного, заданного объема жидкости. Эта процедура является неотъемлемой частью химических и биологических исследований. Результат любого анализа зависит от точности дозирования.

Градуированная посуда (стаканы, пробирки и т.п.) не является измерительным оборудованием. Градуировка служит только для облегчения работы с различными объемами. В современных лабораториях для дозирования жидкостей используются автоматические дозаторы нескольких модификаций:

- переменного объема;
- фиксированного объема.

Различные модели дозаторов рассчитаны на разный объем (0,1–2,5 мкл; 0,5–10 мкл; 5–50 мкл; 20–200 мкл; 100–1000 мкл; 1–5 мл) и могут иметь один или несколько (8–16) каналов (рис. 3).



Рис. 3 Одноканальный и восьмиканальный дозаторы переменного объема

Строение дозатора

Механические дозаторы имеют типичное строение (рис. 4). Основная рабочая кнопка расположена сверху поршня и часто совмещена с регулировочным колесом – вращающимся барабаном, позволяющим устанавливать дозируемый объем. Ниже располагаются упор для пальца и кнопка сброса наконечников. На основном корпусе расположен дисплей, отображающий настройки дозируемого объема. На носике дозатора выделяется посадочный конус для установки наконечника.



Рис. 4. Строение одноканального дозатора переменного объема

Принцип работы дозатора

При нажатии на основную кнопку поршень выталкивает воздух из дозатора. При возвращении поршня в исходную позицию в наконечнике создается вакуум, затягивающий жидкость. При повторном нажатии на основную кнопку, перемещающийся поршень создает избыточное давление, ввиду чего жидкость выбрасывается из наконечника.

Объем дозируемой жидкости определяется ходом поршня. Дозаторы переменного объема позволяют выбирать значение, однако диапазон объемов может быть разным и зависит от модели прибора. Дозаторы фиксированного объема не позволяют выбирать количество дозируемой жидкости, а используют только значения, предусмотренные моделью.

Перед началом работы необходимо проверить наличие подходящих наконечников. Рекомендуется использовать одноразовые, полипропиленовые, утилизируемые наконечники. Наконечники могут быть стерильные (с фильтрами и без) и нестерильные; фасованные по штативам или упакованные россыпью. Разным дозаторам подходят разные наконечники (рис. 5), что определяется объемом дозируемой жидкости и диаметром посадочного конуса. При дозировании различных жидкостей необходимо менять наконечники. Это помогает снизить вероятность контаминации образцов. Иногда наконечники могут быть использованы повторно, но для этого им требуются предварительная чистка и стерилизация (автоклавирование).

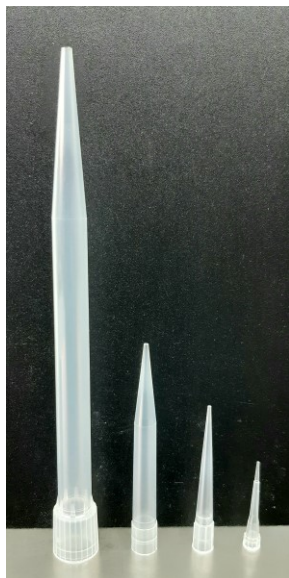


Рис. 5. Наконечники для дозаторов (слева направо): 1–5 мл; 100–1000 мкл; 20–300 мкл; 1–10 мкл.

Прямое дозирование

Прямое дозирование – это наиболее часто используемый метод при работе с водными растворами. Для выполнения дозирования необходимо:

1. Подобрать дозатор и наконечник таким образом, чтобы обеспечить минимальный объем воздушной подушки (например, при дозировании 150 мкл жидкости использовать дозатор переменного объема на 20–200 мкл, а не на 100–1000 мкл).

2. Присоединить наконечник к посадочному конусу на носике пипетки и обязательно проверить плотность посадки.

3. Установить желаемый объем дозирования, вращая барабан.

4. Погрузить наконечник в дозируемую жидкость на 1–5 мм. Глубина погружения наконечника при отборе жидкости должна быть минимальной, но исключать случайный захват воздуха.

5. Держать дозатор в вертикальном положении, так как при уменьшении угла наклона изменяется гидростатическое давление и снижается точность дозирования.

6. Не менее трех раз смочить наконечник и насытить воздушную подушку парами жидкости.

7. Держа дозатор строго вертикально, набрать нужный объем жидкости: оператор нажимает на поршень дозатора до первого упора, опускает наконечник в дозируемую жидкость, после чего плавно отпускает поршень, возвращая его в исходное положение (рис. 6).

8. Забранную жидкость переносят в другую посуду, плавно нажимая на поршень до второго упора. Жидкость сливают, касаясь стенки пробирки, так как адгезия способствует лучшему переносу. Для более точных и воспроизводимых результатов необходимо обеспечить медленный и плавный ход поршня.



Рис. 6. Процедура выполнения прямого дозирования

Обратное дозирование

Обратное дозирование используется для работы с вязкими и пенящимися жидкостями, а также при работе с малыми объемами (до 20 мкл). Общие правила подбора дозатора и наконечников соответствуют таковым при прямом дозировании. Однако есть и отличия в выполнении процедуры:

1. Оператор нажимает на поршень до второго упора и забирает объем, превышающий установленный на дисплее (рис. 7).

2. Сбрасывание жидкости происходит при нажатии на основную рабочую кнопку до первого упора. При этом часть жидкости остается в наконечнике и утилизируется вместе с ним.

Малые объемы рекомендуется, по возможности, дозировать непосредственно в жидкость. При работе с вязкими жидкостями следует ждать 2–3 секунды для того, чтобы жидкость пришла в равновесное состояние после перемещения внутрь наконечника и из него.



Рис. 7. Процедура выполнения обратного дозирования

Задания для самостоятельного выполнения

1. Определите наиболее подходящий прибор для дозирования следующих объемов жидкостей:

- 180 мкл
- 948 мкл
- 3,02 мл
- 1,2 мл
- 15 мкл
- 0,3 мкл

2. Используя метод прямого дозирования, отмерьте следующие объемы водных растворов:

- 920 мкл
- 123 мкл
- 21 мкл
- 48 мл
- 2,6 мл
- 4,9 мл

3. Используя метод обратного дозирования, отмерьте следующие объемы водных растворов:

- 10 мкл
- 1,4 мл
- 0,1 мкл
- 190 мкл
- 620 мкл
- 20 мкл

ЗАНЯТИЕ 3. ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Центрифугирование – это метод сепарации (разделения) неоднородных смесей на составляющие части при помощи центробежной силы. В гетерогенном растворе частицы с течением времени сами разделяются на фракции в зависимости от размера и плотности: более мелкие и менее плотные частицы остаются в растворе, в то время как более крупные и тяжелые частицы оседают на дно. Дополнительное влияние на скорость седиментации оказывает вязкость среды, в которой расположены осаждаемые частицы. Центробежное поле, создаваемое вращением в центрифуге, лишь ускоряет этот процесс. Результатом центрифугирования является разделение гетерогенной жидкости на осадок и супернатант (надосадочную жидкость).

Центрифуги могут быть настольными или настенными, что определяет их вместимость. Вне зависимости от модификации любая центрифуга состоит из трех основных компонентов:

- ротора;
- ведущего вала;
- мотора.

Ротор – это вращающийся элемент центрифуги, в гнездах которого размещаются пробирки, содержащие разделяемые вещества. Существует два основных типа центробежных роторов (рис. 8):

- угловой;
- с подвесными стаканами (бакет-ротор).



Рис. 8. Общий тип строения угловых роторов и бакет-роторов

В угловых роторах пробирки фиксируются под углом ($25\text{--}45^\circ$) относительно оси вращения. Центрифугирование гетерогенных растворов в этом положении приводит к осаждению более крупных частиц на наиболее удаленной от оси вращения стенке пробирки. В свою очередь, бакет-роторы подвижны и поднимают пробирки на 90° в момент вращения. Это способствует осаждению частиц, находящихся в гетерогенном растворе, на дно пробирки. Адаптеры, вставляемые в стаканы бакет-роторов, могут удерживать различные емкости: пробирки разного объема, бутылки, мешки, планшеты и т.д., что дополнительно расширяет возможности центрифуги. Роторы различных типов взаимозаменяемы, а возможность их применения зависит от модели центрифуги.

Роторы устанавливают на ведущем валу и закрепляют с помощью специального ключа. В свою очередь ведущий вал соединен с мотором, который и обеспечивает вращение. Для того чтобы ротор вращался плавно его необходимо сбалансировать. Дисбаланс может повредить ведущий вал или подшипники. Для поддержания баланса следует **УРАВНОВЕСИТЬ** пробирки, находящиеся в противоположащих стаканах, между собой и расставить их **СИММЕТРИЧНО** как по отношению к оси вращения каждого стакана, так и по отношению к центру вращения ротора (рис. 9).

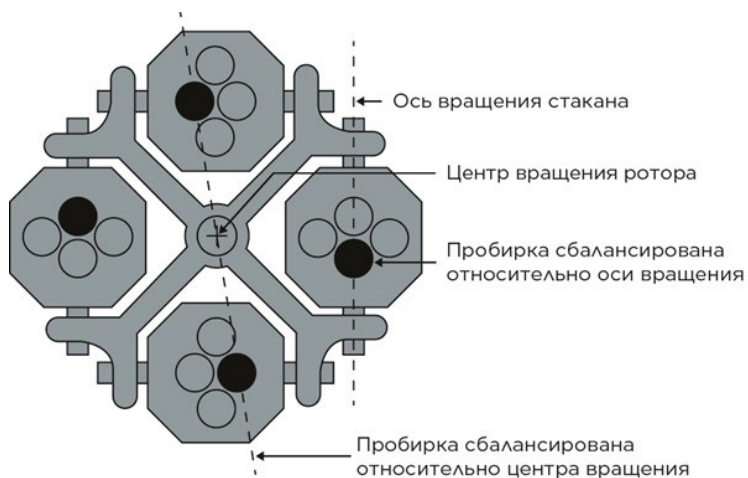


Рис. 9. Пример сбалансированной загрузки бакет-ротора

Некоторые центрифуги оснащены встроенными холодильными установками, предотвращающими нагревание биологических образцов в процессе центрифугирования. Необходимость использования холодильной установки определяется требованиями протокола исследования.

Основными параметрами, устанавливаемыми пользователем лабораторной центрифуги, являются скорость вращения и время центрифугирования. Скорость вращения может измеряться двумя способами:

- обороты в минуту (RPM);
- относительное центробежное ускорение (RCF).

Относительное центробежное ускорение измеряется в единицах, кратных ускорению свободного падения на Земле (g) и рассчитывается по формуле:

$$RCF = 1.12r \left(\frac{RPM}{1000} \right)^2$$

где r – радиус в мм от центра вращения до некоторой точки внутри ротора; RPM – скорость вращения в оборотах/мин.

Так как ускорение сильно зависит от размера ротора при оптимизации протоколов исследования лучше ориентироваться на значения RCF, а не на значения RPM.

В некоторых случаях изменение величины центробежной силы можно компенсировать, изменив продолжительность центрифугирования. Необходимое время можно рассчитать с использованием следующего уравнения:

$$t_1 = \frac{t_2 * RCF_2}{RCF_1}$$

где t_1 – время центрифугирования для нового ротора; t_2 – время, указанное в протоколе для старого ротора; RCF_1 – RCF нового ротора при максимальной скорости вращения; RCF_2 – RCF для старого ротора, указанное в протоколе.

Перед изменением условий следует убедиться, что образец не пострадает от более жестких условий или более продолжительного центрифугирования.

Рекомендации по использованию центрифуги

1. Перед запуском проверьте надежность закрепления ротора на валу привода с помощью специального ключа. Ротор должен свободно вращаться.

2. Перед запуском убедитесь, что бакеты на крестовине ротора подвешены надлежащим образом: свободно двигаются при покачивании.

3. Не перегружайте центрифугу. На роторе указаны ограничения по весу, учитывающие также вес бакета и адаптера.

4. Не превышайте максимальное значение ускорения для используемого ротора и типа пробирок.

5. Выбирайте адаптеры, обеспечивающие плотную установку и надежную поддержку пробирок.

6. Уравновешивайте пробирки.

7. Загружайте ротор и бакеты симметрично.

8. Всегда загружайте все бакет-роторы, даже если используете только часть из них.

9. Открывайте крышку ротора только после полной остановки вращения.

Задания для самостоятельного выполнения

1. Какой из вариантов расстановки пробирок в стаканах бакет-ротора является правильным (рис. 10)?

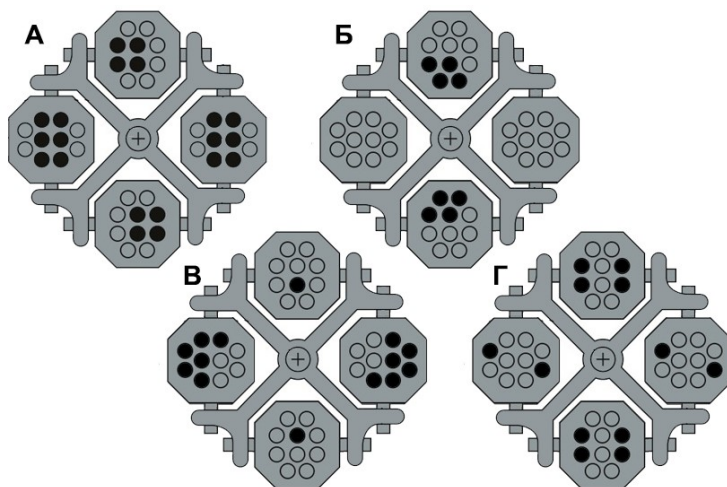


Рис. 10. Варианты расстановки пробирок в стаканах бакет-ротора

2. Рассчитайте необходимую скорость вращения (в оборотах/мин) для центрифуги с радиусом ротора 22,6 см, если в имеющемся протоколе указана скорость вращения 1500 оборотов/мин для ротора радиусом 25 см.

3. Рассчитайте, как изменится время центрифугирования при смене ротора на модель с меньшей максимально допустимой скоростью вращения, если RCF старого ротора 3000 g, RCF нового ротора – 2300 g, а время центрифугирования, указанное в старом протоколе – 10 мин.

ЗАНЯТИЕ 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА И СОСТАВА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ

Подсчет лейкоцитов в камере Горяева

Для подсчета лейкоцитов и приготовления мазков используют кровь, стабилизированную антикоагулянтom. Для стабилизации наиболее часто применяют гепарин в конечной концентрации 25 ед./мл или этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) в конечной концентрации 0,135 % (50 мкл ЭДТА 2,7 % на 1 мл крови).

Для подсчета лейкоцитов широко используется камера Горяева (рис. 11). Она представляет собой толстое предметное стекло с прямоугольным углублением и нанесенной на него микроскопической сеткой. Сетка камеры Горяева состоит из 225 больших квадратов, из которых 25 разделены на 16 малых квадратов. Размеры малого квадрата камеры Горяева – 0,05×0,05 мм. Размеры большого квадрата камеры Горяева – 0,2×0,2 мм. Глубина камеры – 0,1 мм. Объем жидкости под 1 малым квадратом – 0,00025 мкл. Объем жидкости под 1 большим квадратом – 0,004 мкл. Объем камеры Горяева 0,9 мкл. Под микроскопом сетка незаправленной камеры Горяева выглядит, как показано на рисунке 12.

Перед началом работы камеру Горяева следует тщательно

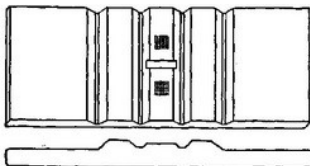


Рис. 11. Внешний вид камеры Горяева

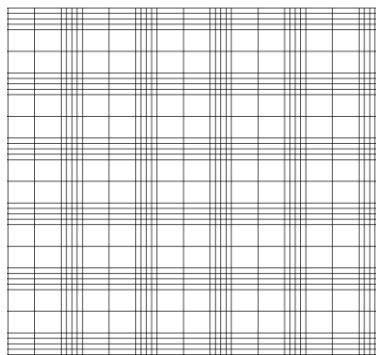


Рис. 12. Внешний вид сетки, нанесенной на камеру Горяева

протереть чистой безворсовой тканью. Затем сверху наложить тонкое покровное стекло и плотно притереть его до формирования видимых радужных разводов (колец Ньютона) в местах соприкосновения.

До внесения в камеру цельную кровь перемешивают для того, чтобы равномерно распределить клеточные элементы по всему объему образца. Каплю цельной крови объемом 10 мкл переносят в планшет и разводят 3–5 % уксусной кислотой в 20 раз. Уксусная кислота лизирует (разрушает) эритроциты. Полученный образец (10 мкл) вносят в камеру Горяева, выжидают 1 минуту до прекращения хаотичного движения клеток и считают количество клеток под световым микроскопом. Если в поле зрения наблюдается не очень большое число клеток, то лейкоциты считают в 100 больших квадратах (рис. 13). Если клеток оказывается слишком много, то готовят образец заново, используя больший коэффициент разведения, либо считают клетки в 20 больших квадратах, расположенных по диагонали. Для увеличения

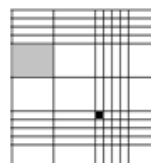


Рис. 13. Виды квадратов:
серый – большой;
черный – малый

точности, подсчет проводят два раза в двух диагоналях и выводят среднее число клеток.

Расчет числа лейкоцитов в 1 мкл крови производят по формуле:

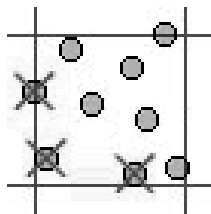
$$X = \frac{\text{количество клеток} * \text{разведение}}{\text{объем жидкости в одном квадрате} * \text{число квадратов}}$$

Например, образец был разведен в 20 раз, подсчет был осуществлен в 100 больших квадратах, а в камере было насчитано 88 клеток.

$$\frac{88 * 20}{0,004 * 100} = 4400 \text{ клеток/мкл цельной крови}$$

Практически, при использовании 20-кратного разведения и 100 больших квадратов, для ускорения расчетов количество посчитанных в камере лейкоцитов умножают на 50. Например, 88 клеток * 50 = 4400 клеток/мкл цельной крови.

Важно отметить, что считать следует не все клетки внутри большого квадрата, а лишь те, что лежат внутри или касаются его правой и верхней границ. Клетки, касающиеся левой и



нижней границ квадрата, при подсчете не учитываются. Пример правильного подсчета показан на рисунке 14.

Рис. 14. Метод подсчета клеток в камере Горяева

Показатель количества лейкоцитов в цельной крови служит не только важным клиническим показателем, но и является необходимым параметром при подсчете абсолютного количества различных клеток крови.

Приготовление, фиксация и окраска мазков крови для подсчета лейкоцитарной формулы

Лейкоцитарная формула (лейкоформула) – это процентное соотношение лейкоцитарных клеток, представленных гранулоцитами (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) и мононуклеарными клетками (моноциты, лимфоциты). Мазки для подсчета лейкоформулы крови делают на предметных стеклах с использованием стекла с отшлифованным краем. Перед нанесением образца оба стекла обезжиривают и тщательно протирают куском сухой чистой материи. Процедуру приготовления мазка лучше проводить на бумажной подложке, которую можно будет утилизировать после завершения работы.

Перед началом приготовления мазка кровь перемешивают для равномерного распределения клеточных элементов по всему объему образца. Затем 10–15 мкл крови наносят каплей на предметное стекло примерно в 1 см от узкого края (рис. 15). Шлифованное стекло приставляют к предметному стеклу слева от капли под углом примерно 45° и продвигают вправо до соприкосновения с кровью. Для того чтобы капля крови равномерно разошлась по всей протяженности ребра шлифованного стекла, последнее можно двигать, изменяя угол наклона. Затем легким быстрым движением капля размазывается по всей поверхности предметного стекла слева направо. Не следует слишком сильно нажимать на стекло во время приготовления мазка, так как излишнее давление может повредить хрупкие клетки.



Рис. 15. Схематическое изображение предметного стекла с нанесенной каплей крови

Хорошо приготовленный мазок имеет желтоватый цвет и заканчивается «метелочкой». Слишком толстый мазок следует переделать, так как дальнейшая работа с ним будет затруднительной из-за слишком большой плотности форменных элементов крови. Хорошему мазку следует дать просохнуть на воздухе.

Шлифованное стекло следует тщательно вытереть ватой, пропитанной 70 % этанолом. По окончании работы такое стекло следует замочить в 6 % растворе перекиси водорода не менее чем на 60 минут.

Фиксация мазка производится фиксирующими жидкостями (метанол, 96 % этанол, и т.д.). Они придают клеткам крови стойкость, препятствуя гемолизу эритроцитов и изменению формы лейкоцитов, а также прикрепляют образец крови к стеклу. Приготовленный и просушенный мазок кладется на ровную горизонтальную поверхность. Метанол или этанол наносится на мазок сверху в объеме достаточном, для покрытия всей поверхности стекла. Мазку следует дать высохнуть самостоятельно. Не надо пытаться ускорить процесс, дуя или обмахивая поверхность стекла.

На высушенном зафиксированном мазке специальным карандашом или перманентным маркером пишут фамилию, инициалы донора и дату, или номер образца и дату. Помните, неправильная маркировка образцов внесет неразрешимую путаницу в эксперимент!

Окрашивание мазков для дальнейшего изучения методом световой микроскопии часто проводят по Романовскому, или, как еще называют этот метод, по Романовскому–Гимзе. Используемый в данном методе краситель окрашивает ацидофильные образования в различные оттенки красного цвета, а базофильные – в цвета от пурпурного до синего. Готовый жидкий краситель перед началом окрашивания разводят в дистиллированной воде (рН 7,0) в соотношении 1–2 капли красителя на 1 мл воды. Количество раствора должно быть достаточным для погружения всех мазков (зависит

от размера используемой ванны). Разведенной краской можно пользоваться в течение одного дня. Мазки окрашивают в течение 20–25 минут. После завершения окраски мазки промываются проточной водой и сушатся на воздухе.

Метод окраски мазков по Романовскому–Гимзе основан на химическом сродстве частей клеток к определенным анилиновым краскам. Цитоплазма некоторых клеток, будучи щелочной, имеет сродство к кислым краскам, выявляя оксифильные элементы крови. Цитоплазма других клеток содержит базофильные и нейтрофильные вещества, вследствие чего поглощает и кислые, и основные краски. Ядра, содержащие большие количества нуклеиновых кислот, связывают основные краски. Для окрашивания используются смеси основных и кислых красок: метиленовый синий и его производные – азур I (метиленазур) и азур II (смесь равных частей азура I и метиленового синего); водорастворимый желтый эозин. Следует помнить, что азур-эозиновые смеси красок обладают высокой чувствительностью к реакции воды. Поэтому используемая при окраске и смыве дистиллированная вода должна иметь нейтральную реакцию. Вода с неправильной рН изменяет оттенок клеток мазка и затрудняет работу.

Представленный метод приготовления, фиксации и окрашивания мазков не является единственно верным. В разных лабораториях практикуются различные методы. Однако всегда следует помнить, что слабоокрашенный мазок можно докрасить, но перекрашенный мазок можно смыть лишь частично.

Подсчет лейкоформулы

Мазок крови, окрашенный по методу Романовского–Гимзе, помещают под микроскоп с иммерсионным объективом и подсчитывают разные формы лейкоцитов. В общей сложности необходимо определить не менее 100 клеток. Более точные результаты получают при анализе 200 клеток. Первую половину форменных элементов следует считать в верхней части мазка, а вторую половину – в нижней части мазка, не заходя на самый край и середину. Двигаться необходимо по зигзагу, например, как показано на рисунке 16. Следует помнить, что гранулоциты и моноциты в большинстве случаев располагаются в начале и в конце мазка, а посередине, как правило, располагаются лимфоциты. Наиболее равномерно лейкоциты разных форм располагаются в углах мазка.

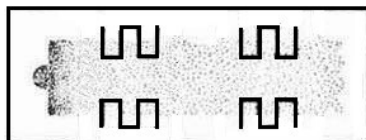
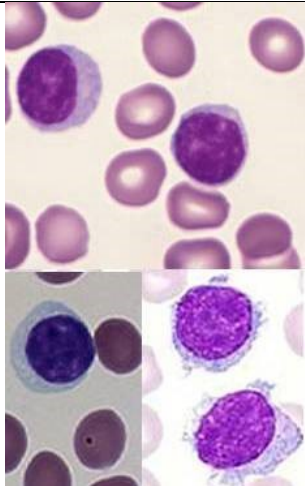
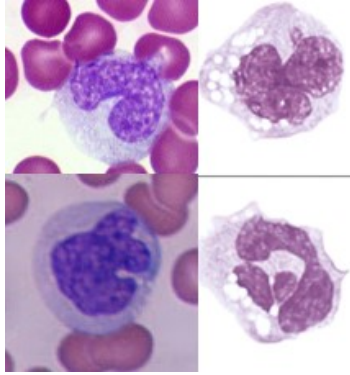


Рис. 16. Схема движения при подсчете лейкоформулы

Суммарное количество посчитанных клеток принимают за 100 % и вычисляют долю, приходящуюся на каждый из типов выявленных лейкоцитов. При подсчете лейкоформулы анализируют только количество лейкоцитов, не обращая внимания на эритроциты. Далее вы найдете схематическое изображение и основные внешние характеристики основных типов клеток белой крови (лейкоцитов).

Основные морфологические характеристики клеток крови

	<p>Малые лимфоциты могут составлять 20–50 % от общего числа лейкоцитов. Обычно имеют размер 6–10 мкм. Они имеют круглое или немного овальное ядро, занимающее большую часть объема клетки и по размеру сопоставимое с эритроцитами. Цитоплазма чаще всего видна лишь в виде небольшого ободка вокруг ядра.</p>
	<p>Моноциты – крупные фагоцитирующие клетки, составляющие 2–10 % от числа лейкоцитов. Их размер колеблется от 10 до 30 мкм в диаметре. Ядро часто занимает более половины объема клетки. По форме ядро может напоминать боб или подкову. Хорошо видна цитоплазма, в которой нередко можно различить азурофильные гранулы. Могут быть видны вакуоли.</p>

	<p>Нейтрофилы – сегментоядерные лейкоциты, составляющие 40–75 % клеток белой крови. Диаметр клетки обычно 9–16 мкм. Ядро состоит из 2–5 сегментов, которые могут загибаться, накладываясь друг на друга. Видно большое количество цитоплазмы с розово-фиолетовыми гранулами.</p>
	<p>Эозинофилы составляют 1–4 % от периферических лейкоцитов. Эти клетки имеют 9–15 мкм в диаметре. Ядро может быть разделено на 2 или 3 доли, или быть несегментированным. При окрашивании по методу Романовского–Гимзе цитоплазма этих клеток становится красновато-оранжевого цвета ввиду большого количества гранул, окрашивающихся эозином.</p>
	<p>Базофилы составляют около 0,5–1 % от числа лейкоцитов. Клетки имеют 10–15 мкм в диаметре. Их ядро часто бывает несегментированным, но может иметь два, или, реже, 3–4 доли. Цитоплазма бледно голубого цвета, но содержит большое количество фиолетово-синих гранул с гепарином и вазоактивными веществами.</p>

Протокол самостоятельного подсчета лейкоцитов в камере Горяева

1. Развести образец крови в 20 раз 3–5 % уксусной кислотой (10 мкл крови + 190 мкл $C_2H_4O_2$). Тщательно перемешать пипетированием.

2. Протереть камеру Горяева и покрывное стекло спиртом и чистой сухой тканью.

3. Заправить камеру, плотно притерев покрывное стекло до образования радужных колец Ньютона.

4. Еще раз перемешать образец и внести его в камеру (максимальный объем 10 мкл). Подождать 1 минуту.

5. В зависимости от количества клеток, определить область подсчета (в 100 больших квадратах или 20 больших квадратах).

6. Посчитать количество лейкоцитов (клетки, прилегающие к 2-м из 4-х граней квадрата, не учитываются!).

7. Рассчитать концентрацию лейкоцитов в образце по формуле

$$X = \frac{\text{количество клеток} * \text{разведение}}{\text{объем жидкости в одном квадрате} * \text{число квадратов}}$$

Протокол самостоятельного приготовления красящей смеси и окраска мазков по методу Романовского-Гимзе

1. Распределить каплю крови по стеклу. Высушить мазок.
2. Зафиксировать мазок метанолом или 96 % этанолом. Высушить.
3. Приготовить необходимое количество красящей смеси из расчета 1–2 капли жидкого красителя на 1 мл дистиллированной воды (рН 7,0).
4. Равномерно нанести красящую смесь на мазок, держать 20 минут.
5. Смыть красящую смесь проточной водой.
6. Высушить мазок.

Протокол самостоятельного подсчета лейкоформулы

1. Поместить мазок крови, окрашенный по методу Романовскому–Гимзе, под микроскоп с иммерсионным объективом.
2. Считать 100 клеток, различая разные формы лейкоцитов с одного края мазка, двигаясь зигзагом.
3. Считать еще 100 клеток с другого края мазка.
4. Определить среднее арифметическое количества каждого типа лейкоцитов. Если результаты подсчета клеток с двух сторон сильно отличаются, пересчитать еще раз.
5. Рассчитать абсолютные количества каждого типа лейкоцитов в мл крови.

ЗАНЯТИЕ 5. ВЫДЕЛЕНИЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Основной метод, используемый для выделения мононуклеаров (лимфоцитов и моноцитов) из периферической крови человека – это разделение клеток в градиенте плотности среды. Метод основан на различиях в величине плавучей плотности клеток. Нанесенный на градиентный раствор ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) образец крови центрифугируют, в результате чего клетки оседают, пока не достигнут области градиента, где их плавучая плотность равна плотности среды (рис. 17). Так как плавучая плотность мононуклеаров меньше, чем величина градиента, они располагаются в интерфазе (слое между плазмой и градиентом), а гранулоциты и эритроциты, имеющие большую плавучую плотность, проходят через градиентный раствор и опускаются на дно пробирки. После разделения мононуклеарные клетки аккуратно собирают из интерфазы, отмывают, считают в камере Горяева и используют для дальнейшей работы или замораживают для длительного хранения.

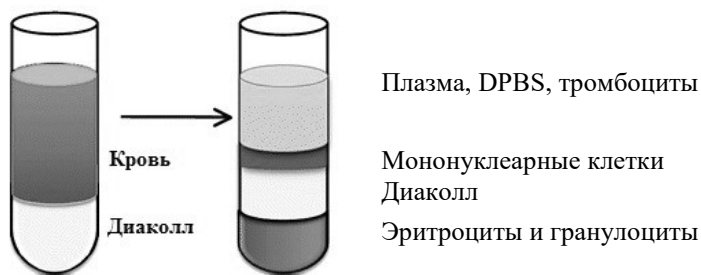


Рис. 17. Принцип разделения клеток на градиенте плотности диаколла ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$)

Следует помнить, что цельную периферическую кровь, смешанную с антикоагулянтом, от момента забора до начала обработки необходимо хранить при комнатной

температуре (15–30°C). Выделение клеток лучше начать так быстро, как это возможно. Выделить и заморозить клетки следует в течение менее чем 8 часов после момента забора (рис. 18). Сам процесс выделения должен быть произведен менее чем за 4 часа. Ни в коем случае не следует охлаждать или замораживать цельную кровь.

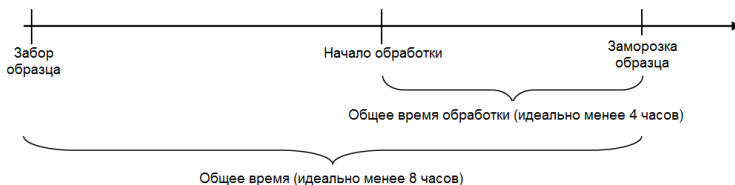


Рисунок 18. Схема распределения времени при работе с кровью

Для выделения моноклеарных клеток периферической крови вам понадобятся:

- одноразовые перчатки;
- цельная периферическая кровь человека;
- DPBS (или раствор Хэнкса);
- градиентная среда плотностью 1,077 г/см³ (фиколл-урографин, диаколл или аналоги);
- центрифуга с бакет-роторами;
- механические дозаторы разного объема;
- одноразовые наконечники для дозаторов разного объема;
- полипропиленовые пробирки объемом 50 мл и 10 мл;
- раствор трипанового синего;
- камера Горяева.

**Протокол для самостоятельного выделения
мононуклеарных клеток на градиенте плотности
диаколла**

1. До начала работы нагреть DPBS и диаколл до комнатной температуры. Беречь диаколл от попадания света.
2. Перенести кровь в стерильную пробирку объемом 50 мл, посчитав объем крови с точностью до 0,5 мл.
3. Разбавить цельную кровь в 2 раза DPBS (например, 10 мл крови + 10 мл DPBS).
4. В пробирки на 10 мл внести по 3 мл диаколла.
5. Нанести на диаколл по 6 мл разведенной крови. Наносить плавно, пуская тонкую струйку крови по стенке пробирки. Кровь не должна пробить границу раздела фаз.
6. Центрифугировать при 400 g 40 минут при комнатной температуре на центрифуге с бакет-роторами.
7. Убрать и выбросить 2/3 объема плазмы.
8. Собрать кольцо мононуклеаров из интерфазы в чистые пробирки на 10 мл.
9. Добавить до 10 мл DPBS, тщательно перемешивая клеточный осадок.
10. Центрифугировать клетки при 400 g в течение 15 мин.
11. Слить супернатант, разбить клеточный осадок.
12. Добавить 10 мл DPBS, тщательно перемешивая клеточный осадок.
13. Центрифугировать клетки при 400 g в течение 10 мин.
14. Слить супернатант, разбить клеточный осадок.
15. Добавить 1 мл DPBS. Тщательно перемешать.
16. Посчитать количество клеток в камере Горяева и оценить их жизнеспособность с трипановым синим.

17. Рассчитать:

а. Абсолютное количество клеток = концентрация ($10^6/\text{мл}$) * объем DPBS.

б. Выход клеток ($10^6/\text{мл}$) = абсолютное кол-во клеток / объем крови

Выделенные таким образом клетки можно использовать для дальнейших исследований или заморозить в парах жидкого азота для длительного хранения.