

Инструкция по выполнению методик по научному направлению «Физиология крови»

**Разработала с.н.с., к.б.н.О.А.Пахрова,
ответственная за выполнение данного блока методик**

№1

Вискозиметрия крови с помощью ротационного вискозиметра АКР-2.

1. Включить прибор в сеть и дать прогреться в течение 30 мин.
2. В измерительный стакан поместить 0.85 мл стабилизированной крови (плазмы, суспензии эритроцитов) (гепарин, цитрат натрия, ЭДТА) и поместить в термостат блока пробоподготовки на 15 мин.
3. В измерительный стакан с пробой поместить ротор (убедитесь в отсутствии пузырей).
4. Поместить стакан с ротором в статор, закрыть статор крышкой.
5. Установите необходимую скорость сдвига с помощью переключателя.
6. Снять показания прибора после установки режима вращения (показания индикатора не изменяются).
7. Повторить измерения на других скоростях сдвига.

№2а

Прямой оптический метод определения агрегации эритроцитов.

1. Стабилизированную кровь (гепарин, цитрат натрия, ЭДТА) центрифугировать 15 минут при 3000 об/мин.
2. Полученную плазму раскапать микропипеткой по 0,2 мл в 2 лунки 96-луночного пластикового планшета.
3. Остатки плазмы удалить.
4. Оставшиеся эритроциты дважды отмыть в фосфатном буфере.
5. В первую лунку с плазмой добавить 0,02 мл отмытой эритроцитарной массы и перемешать.
6. 0.02 мл из первой лунки поместить во вторую и перемешать.
7. Полученную суспензию эритроцитов в аутоплазме поместить в камеру Горяева
8. С помощью светового микроскопа через 4 минуты после начала спонтанной агрегации, подсчитать число агрегатов, количество эритроцитов в каждом агрегате и количество свободных эритроцитов.

№2б

Оптический метод определения агрегации эритроцитов с помощью эритроагрегометра МА-1.

1. Очистить детали прибора, соприкасающиеся с кровью дистиллированной водой и дать высохнуть.
2. Закрыть крышку, включить питание.
3. Провести калибровку, нажав кнопку «а».

4. Открыть крышку и поместить 0.02 мл крови на конус (нижняя часть).
5. Закрыть крышку, выбрать время 5 или 10 сек и нажать кнопку М или М1 – дисплей покажет степень агрегации (усл.ед).
6. Провести измерение 3 раза в каждой позиции.

№3

Метод определения поверхностной цитоархитектоники эритроцитов.

1. Каплю крови (без антикоагулянта) поместить во флакон с 2-3 мл 1% раствора глютарового альдегида.
2. Оставить флакон на 24-часа в холодильнике ($t = 4^{\circ}\text{C}$) для фиксации клеток.
3. Приготовить препарат раздавленная капля.
4. Микроскопировать препарат под масляной иммерсией с использованием фазово-контрастного устройства.
5. Подсчитать процентное содержание разных форм эритроцитов (по классификации Г.И. Козинца).

№4

Метод определения деформируемости эритроцитов на автоматическом приборе ИДА-4.

1. Приготовить суспензию эритроцитов из цельной стабилизированной крови (гепарин, цитрат натрия) и ресуспендирующего раствора (изотонический фосфатный буфером) с гематокритом 0,1%.
2. Собрать установку, поместить ядерный мембранный фильтр с диаметром пор 3 мкм.
3. Внести 0,5 мл буфера и с помощью датчика и электронного регистрирующего устройства определить время протекания 250 мкл ресуспендирующего раствора через фильтр.
4. Повторить это измерение не менее 3 раз для большей точности.
5. Удалить остатки жидкости из верхнего резервуара.
6. Измерить время протекания через этот же микропоровый фильтр 250 мкл суспензии эритроцитов.

№5

Метод определения количества циркулирующих в крови десквамированных эндотелицитов

1. Венозная кровь в количестве 4-5 мл отбирается в пробирки, в качестве стабилизатора используется 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 1: 9.
2. Кровь центрифугируется 5 мин при 1000 оборотов.
3. Отбирается 1 мл плазмы богатой тромбоцитами плазмы и добавляется 0,4 мл раствора АДФ в концентрации 0,5 мг/мл.
4. Смесь перемешивается в течение 10 мин аккуратным встряхиванием пробирок и центрифугируется 10 мин при 1000 оборотов.

5. Супернатант переносится в другую пробирку и центрифугируется 15 мин при 1000 оборотов для осаждения эндотелиальных клеток.
6. Полученная надосадочная жидкость аккуратно удаляется, а полученный осадок суспендируется в 0,1 мл 0,9% растворе NaCl и перемешивается стеклянной палочкой.
7. Готовой суспензией заполняется камера Горяева.
8. Подсчитывают количество эндотелиальных клеток в двух сетках камеры.

№6

Исследование агрегации тромбоцитов на анализаторе «Solar»

1. Венозная кровь в количестве 2-3 мл отбирается в пробирки, в качестве стабилизатора используется 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 1: 9.
2. Кровь центрифугируется 5 мин при 1000 об/мин.
3. Поместить 0.45 мл богатой тромбоцитами плазмы в пластиковую кювету.
4. Оставшуюся кровь повторно центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин.
5. Поместить 0.5 мл бестромбоцитарной плазмы во вторую пластиковую кювету.
6. Включить агрегометр.
7. После нагрева термостатированного кюветного отделения (37°C), выбрать режим нажатием кнопки «MODE»-режим AP.
8. Поставить в кюветное отделение кювету с бестромбоцитарной плазмой, закрыть крышку и нажать кнопку «ZERO» - на индикаторе появиться значение 100.0.
9. Вынуть из кюветного отделения кювету с бестромбоцитарной плазмой и на ее место установить кювету с плазмой, богатой тромбоцитами, опустить в нее магнитный якорь, закрыть крышку.
10. Нажать кнопку «START», в течение 20 сек. идет подсчет концентрации тромбоцитов, если тромбоцитов больше $250 \cdot 10^9/\text{л}$, то нужно развести бестромбоцитарной плазмой.
11. Открыть крышку кюветного отделения и добавить 0.05 мл индуктора агрегации тромбоцитов (АДФ - 5 мкМ) и снова нажать кнопку «START», начинается запись процесса агрегации, который продолжается 10 мин.

№7a

Определение концентрации гемоглобина унифицированным гемиглобинцианидным методом

1. Поместить в пробирку 5 мл трансформирующего раствора и добавить 0.02 мл крови, тщательно перемешать.

2. Подождать 20-30 мин, чтобы произошла реакция.
3. Откалибровать прибор, поместив сначала в фотометрическую ячейку контрольную камеру, на индикаторе должно появиться число, равное $KM2 \pm 5$, а затем оптическую кювету с дистиллированной водой, для определения оптического нуля, на индикаторе должно появиться значение -1, 0,+1.
4. Вылить из оптической кюветы воду и перелить туда раствор из пробирки, убедиться, что прозрачные стороны кюветы сухие.
5. Установить кювету в фотометрическую ячейку, на индикаторе появиться число, соответствующее концентрации гемоглобина.

№76

Определение гематокрита

1. Набрать кровь в капилляр на 60-65 мм.
2. Конец капилляра с кровью воткнуть в замазку и покачать, высота замазки должна быть не менее 4 мм.
3. Установите капилляр в гематокритную центрифугу замазкой вниз.
4. Закройте крышку и центрифугируйте 5 мин при 7000 об/мин.
5. Извлеките капилляр и измерьте высоту столбика форменных элементов и высоту всей крови.
6. Определите объемный процент форменных элементов по отношению к объему всей крови.

№8

Морфометрия эритроцитов

(определение среднего диаметра эритроцитов)

1. Приготовить мазок крови.
2. Зафиксировать мазок в 96% этиловом спирте 30 минут.
3. Окрасить по Романовскому 10-15 минут.
4. Микроскопировать препарат под масляной иммерсией.
5. С использованием окулярмикрометра определить диаметр 100-200 эритроцитов.