# ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

На основании параграфов 1.1-1.6. мной была поставлена определенная траектория эксперимента для выяснения эффективности подобранных методов относительно поставленных задач. Для их осуществления было необходимо совершить следующие действия с помощью конкретных материалов.

## Подготовка крови для эксперимента.

Донорами крови для экспериментов стали 5 женщин и 5 мужчин. Показатели полученной от доноров цельной крови представлены в таблице 1.

*Таблица 1. Показатели цельной крови доноров.*

|  |  |
| --- | --- |
| Женщины | Мужчины |
| Номер донора | RBC в цельной крови [(4,3-4,6)\*10^6 клеток/мл] | Ht в цельной крови [34-43%] | Возраст | Номер донора | RBC в цельной крови [(4,3-4,6)\*10^6 клеток/мл] | Ht в цельной крови [44-48%] | Возраст |
| 1 | 4,3 | 40 | 35 | 5 | 4,6 | 44 | 38 |
| 2 | 4,3 | 38 | 34 | 6 | 4,6 | 44 | 36 |
| 3 | 4,3 | 42 | 31 | 7 | 4,6 | 43 | 36 |
| 4 | 4,4 | 36 | 28 | 8 | 4,4 | 37 | 26 |
| 9 | 4,3 | 37 | 30 | 10 | 4,4 | 36 | 27 |
| max | 4,4 | 42 | 35 | max | 4,6 | 44 | 38 |
| min | 4,3 | 36 | 28 | min | 4,4 | 36 | 26 |
| средний показатель | 4,32 | 38,6 | 31,6 | средний показатель | 4,52 | 40,8 | 32,6 |

Полученная цельная кровь должна быть обработана для получения эритроцитарной массы; центрифугирование входит в методики проведения ряда диагностических исследований и базируется на создании значительных по величине центробежных сил, от действия которых происходит разделение нескольких компонентов с разной удельной плотностью: в случае данного режима центрифугирования на дно пробирки осаждаются форменные элементы крови, в надосадке - плазма крови. Скорость центрифугирования донорской крови составляет 1000 об./мин; длительность равна 5 минутам. Полученную плазму и форменные элементы крови в соответствии с исследованием необходимо разделить для дальнейшего центрифугирования и отмывания эритроцитарной массы. Отмывание полученной в отсутствии плазмы эритроцитарной массы происходит путем добавления в нее 1 М фосфатного (PBS) буфера, pH которого равен 7,4, что соответствует pH крови и не повреждает клетки. Причиной этого действия является свойство буферных систем сохранять постоянство реакции среды организма при разбавлении. Скорость и длительность центрифугирования на данном этапе не изменяется; для получения наиболее чистого результата вероятно несколько повторений.

В результате проведенного последовательного центрифугирования цельной крови доноров мы получали необходимое количество эритроцитарной массы для последующей заморозки.

## Измерение гематокрита эритроцитарной массы.

**Гематокрит (Ht) представляет собой соотношение красных клеток крови к ее общему объему. Нормой показателей гематокрита являются такие значения:**

* **Норма гематокрита для мужчин: 44-48%;**
* **Норма гематокрита для женщин: 34-43%.**

Эти значения могут слегка варьироваться в зависимости от фирмы и чувствительности счетчика клеток, на котором выполняется анализ.

**Для выяснения значений гематокрита необходимо использовать** гематокритные капилляры; подобный метод считается одним из самых точных в лабораторной практике. Предварительно обработанный капилляр заполняют кровью на ¾ его длины. Закупоривают капилляр с одного конца на спиртовой горелке и помещают в ротор центрифуги так, чтобы укупоренный конец упирался в резиновую прокладку. Скорость центрифугирования капилляров составляет 1200 об./мин; длительность равна 3 минутам. Линейка гематокритная предназначена непосредственно для определения гематокритного числа крови с использованием капилляров после центрифугирования. Для этого необходимо установить линейку на горизонтальную поверхность шкалой вверх и установить движок на линейке, совместив короткий паз движка с ребром, выступающим над поверхностью линейки. Совместить закупоренный край уложенного в длинный паз движка капилляра с нижней линией шкалы. С помощью риски, проходящей через границу плазмы и крови, можно вычитать гематокритное число по краю шкалы линейки.

**Вновь обращаясь к таблице 1, можно заметить, что показатели гематокрита крови доноров в норме.** Изменение гематокритного объема эритроцитов может свидетельствовать о степени концентрации крови или о том, насколько кровь разведена. Нами была приготовлена эритроцитарная масса с показателями гематокрита среднее 38,6/40,8, min 36, max 42/44.

## Процесс заморозки и разморозки крови.

После фиксации показателей гематокрита эритроцитарная масса замораживается в размере 1000 мкл четырьмя различными способами, описанными далее,:

* Проба 1: содержание 40% глицерина в качестве криопротектора и медленное снижение температуры;
* Проба 2: в отсутствии криопротекторов замораживание в жидком азоте;
* Проба 3: в отсутствии криопротекторов и медленное снижение температуры, при этом магнитное поле составило 1320-1380мТл;
* Проба 4: в отсутствии криопротекторов и медленное снижение температуры; контрольная проба.

Разморозка крови происходит в течение 30 минут в комнатной температуре.

## Расчёт степени гемолиза.

Размороженная кровь разливается в 4 эппендорфа; необходимое количество крови отбирается для последовательного разведения с водой[[1]](#footnote-1) ×10 ×50 ×2, что дает общее разведение ×1000. Вследствие такого разведения можно вычислить значения абсолютного гемолиза (Abs), то есть происходит полное разрушение эритроцитов, что соответствует 100% гемолизу.

Оставшаяся часть крови вновь помещается в центрифугу: скорость центрифугирования эппендорфов составляет 1200 об./мин; длительность равна 10 минутам. По итогу этого центрифугирования от осадка разрушенных клеток отделяется слой целых клеток. Собранный надосадок разводится с водой в последовательности ×30 ×10, что дает общее разведение ×300. Вследствие разведения неразрушенных клеток можно вычислить значения истинного гемолиза образца (S), то есть разрушения непосредственно после заморозки и заморозки крови.

Полученные материалы разведения исследовала методом спектрофотометрии, который основан на определении интенсивности поглощения света веществом в зависимости от длины волны. Мы измеряли интенсивность поглощения света в образцах на длине волны 415 нм, которая соответствует пику в спектре поглощения эритроцитарной массы.

1. Опытным путем было подобрано оптимальное для достижения целей разведение. [↑](#footnote-ref-1)