

[Akceptuje](#)

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](#)

[Portal](#) [Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

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 przeciwplateletowe) [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 Na₂HPO₄-7,46 mM NaH₂PO₄-4,77 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 Ca²⁺ 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 zawieszynie) oznaczana jest z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej (przy $\lambda = 800$ 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 MgCl₂- 5 mM NaHCO₃- 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). Próbkę 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-centymetrową 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 wyjściową objętość PRP. Otrzymałą 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 $\lambda = 230$ 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.

« | **1** | [2](#) | [3](#) | [4](#) | [5](#) | »

<http://laboratoria.net/arttykul/24706.html>

Informacje dnia: [Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14 Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14 Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14](#)

Partnerzy