

Ćwiczenie 4

Metody izolowania różnych form morfotycznych leukocytów – wykonywanie preparatów cd.

Plan ćwiczeń

1. Izolowanie makrofagów z otrzewnej - rozmazy
2. Barwienie preparatów z ćw.3 i 4
3. Oglądanie preparatów – odróżnianie różnych form morfotycznych leukocytów
4. Porównanie otrzymanych preparatów z Atlasem krwi i z gotowymi preparatami z krwi.

1 . Izolowanie makrofagów z otrzewnej

A. Pobieranie płynu otrzewnowego

Odwirować i zawiesić w 1ml podłoża:

- 1 kropla zawiesiny + 1 kropla surowicy – rozmaz

B. Izolowanie makrofagów poprzez przyleganie

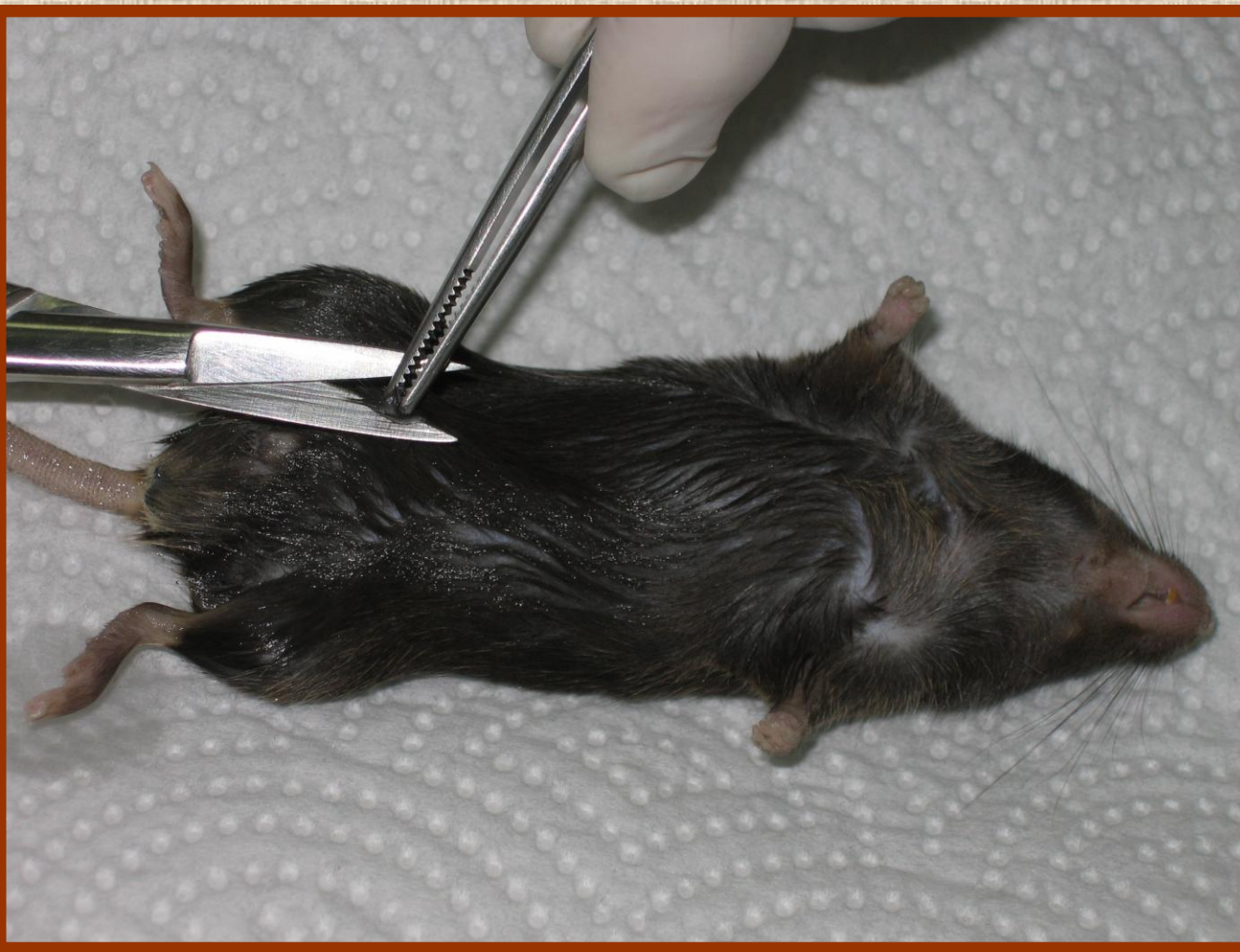
- 0,2ml – na szkiełko podstawowe - 60 minut w 37°C

odpłukać , wysuszyć preparat

C. Usuwanie makrofagów z wykorzystaniem ich właściwości żernych

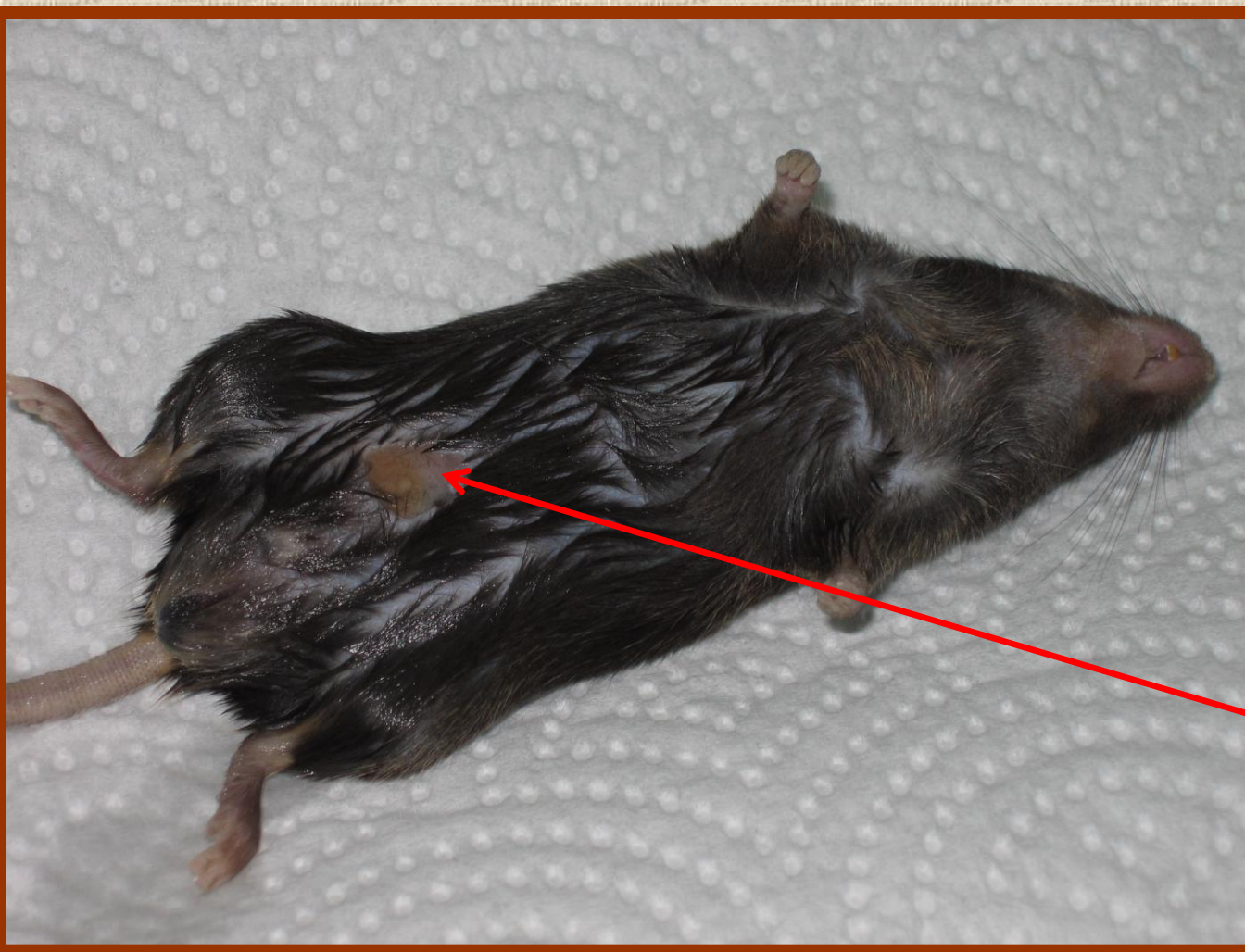
- 0,5ml – dodać 4 mg pudru żelaza, inkubować 45 minut w temp. 37°C, mieszać, użyć magnezu

Izolowanie makrofagów z otrzewnej



za pomocą nożyczek
odciąć mały
fragment skóry,
tworząc małe,
okrągłe pole

Izolowanie makrofagów z otrzewnej



małe, okrągłe pole
pozbawione skóry

Izolowanie makrofagów z otrzewnej



wstrzyknąć za
pomocą
strzykawki 10ml
podłoża do jamy
otrzewnowej

Izolowanie makrofagów z otrzewnej



masować powłoki
brzucha przez
ok.1 min

Izolowanie makrofagów z otrzewnej



pobrać płyn z
otrzewnej do
probówki
polipropylenowej

Izolowanie makrofagów z otrzewnej



- pobrany płyn
zwirować 1200
obr/min, 10 min, 4°C

- osad zawiesić w 1ml
podłoża hodowlanego

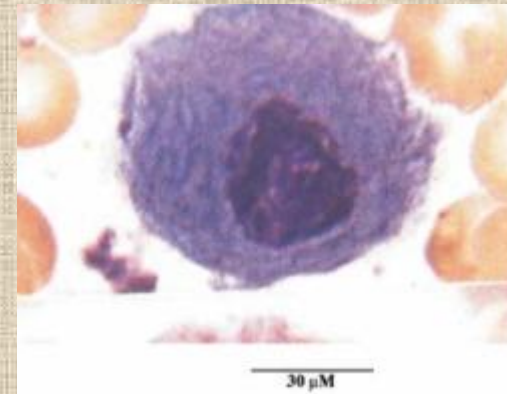
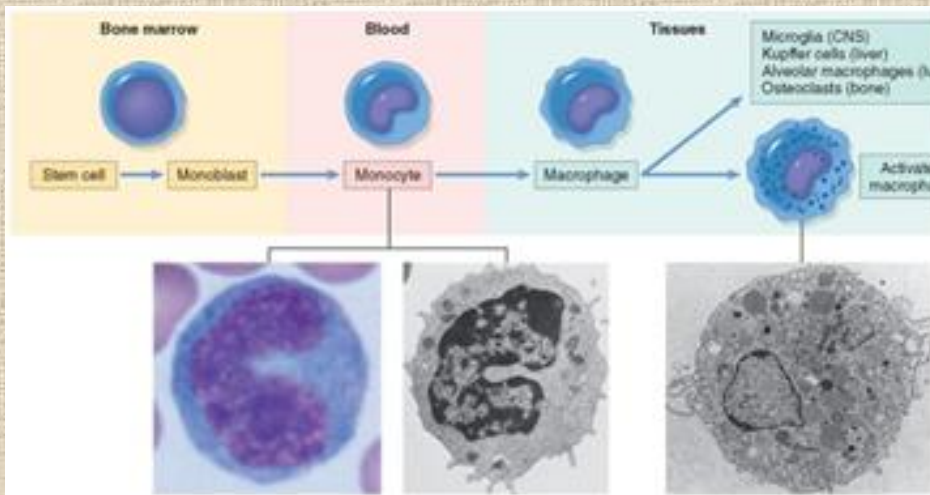
- zmieszać 1 krople
zawiesiny makrofagów
z 1 kropla surowicy i
zrobić rozmaz,
(preparat O)

- po wyschnięciu
utrwalić metanolem

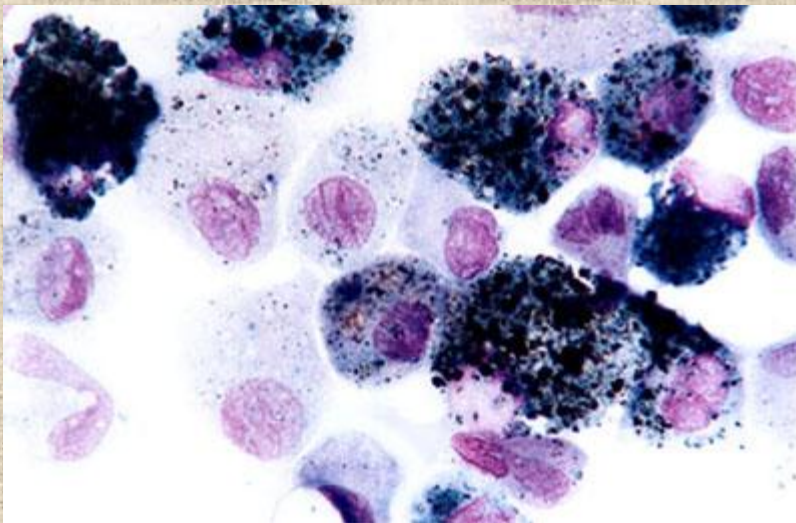
Izolowanie makrofagów z wykorzystaniem ich zdolności przylegania do powierzchni szklanych i plastikowych

- nałożyć 0,2 ml zawiesiny komórek otrzewnowych, tak żeby zawiesina wypełniła wnętrze parafinowego kółka na szkiełku podstawowym.
- inkubować 60 minut w 37°C, w atmosferze 5% dwutlenku węgla
- po inkubacji odpłukać nieprzylegające komórki kilkakrotnie nakraplając i zlewając PBS
- wysuszyć preparat, po wyschnięciu rozmaz utrwalić metanolem.
(preparat MO)

Makrofagi - właściwości żerne



monocyty po przejściu do tkanek
stają się makrofagami



nasze doświadczenie -
makrofagi wyizolowane
z otrzewnej fagocytują
opiółki żelaza (obserwacje
mikroskopowe)

Usuwanie makrofagów z wykorzystaniem ich właściwości żernych.

-0,5 ml zawiesiny komórek z płynu otrzewnowego w podłożu hodowlanym przenieść do pr eppendorfa dodać 4 mg pudru żelaza, zawartość próbówki wymieszać

-inkubować 45 minut w temp. 37°C, mieszając w czasie inkubacji zawartość próbówki

-komórki żerne wyizolować z zawiesiny przy pomocy magnesu- wg instrukcji osoby prowadzącej.

Barwienie preparatów z ćw.3 i 4

Barwienie metodą Pappenheima

- na suchy preparat nakropić bufor Giemzy, zlać bufor po upływie 5 min.
- nakropić na 15 min świeżo rozcieńczony w buforze Giemzy
(w stosunku 1:1) barwnik May-Grunwalda
- opłukać preparat kilkakrotnie nakraplając bufor Giemsy i zlewając go, osuszyć preparat opierając dłuższą krawędź szkiełka na bibule
- nakropić barwnik Giemsy na 15 min
- opłukać preparat nakraplając bufor Giemsy i zlewając go
- wysuszyć preparat przed oglądaniem pod mikroskopem

Oglądanie preparatów – odróżnianie różnych form morfotycznych leukocytów

Porównanie z gotowymi preparatami krwi (dostarczonymi przez prowadzącego)

oraz

Atlasem krwi:

<https://www.cellavision.com/en/cellavision-cellatlas/leukocytes>

<http://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookID=1630>

Granulocyty

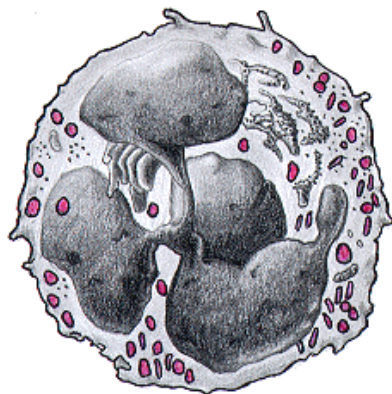


Fig. 8 - Neutrophil

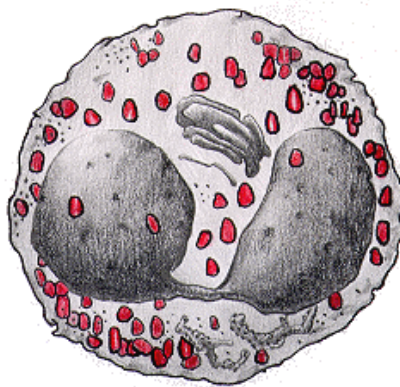


Fig. 9 - Eosinophil

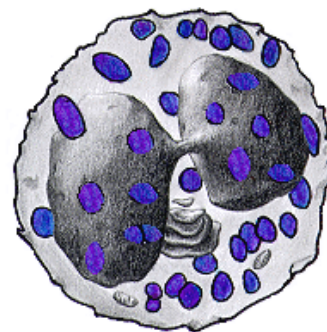
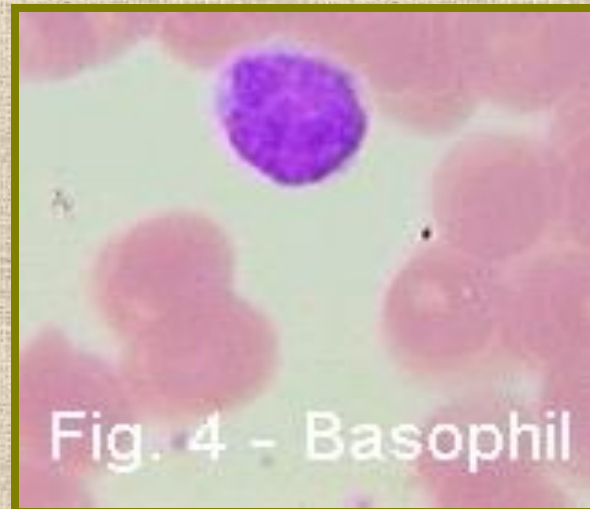
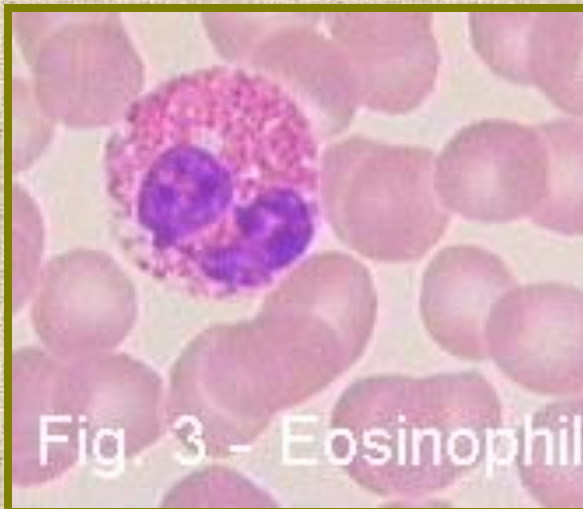
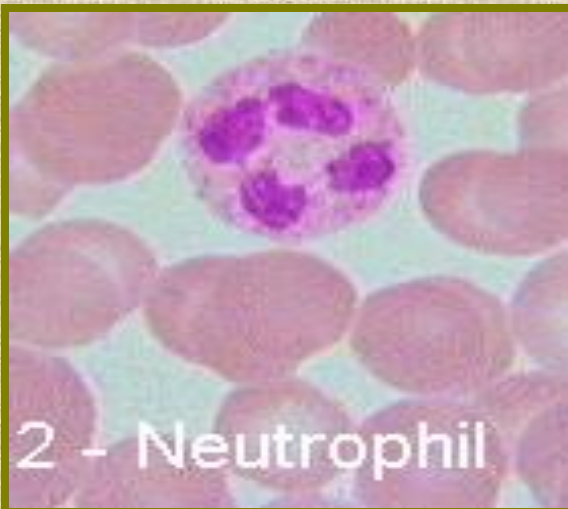


fig. 10 - Basophil



Immunologia-ćwiczenia



Fig. 11 - Lymphocyte



Fig. 12 - Monocyte

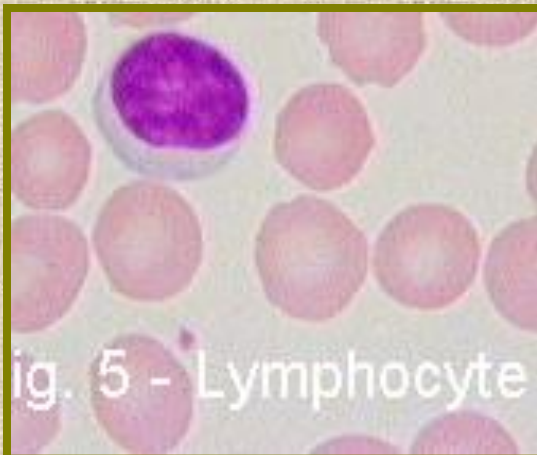


Fig. 5 - Lymphocyte



Fig. 6 - Monocyte

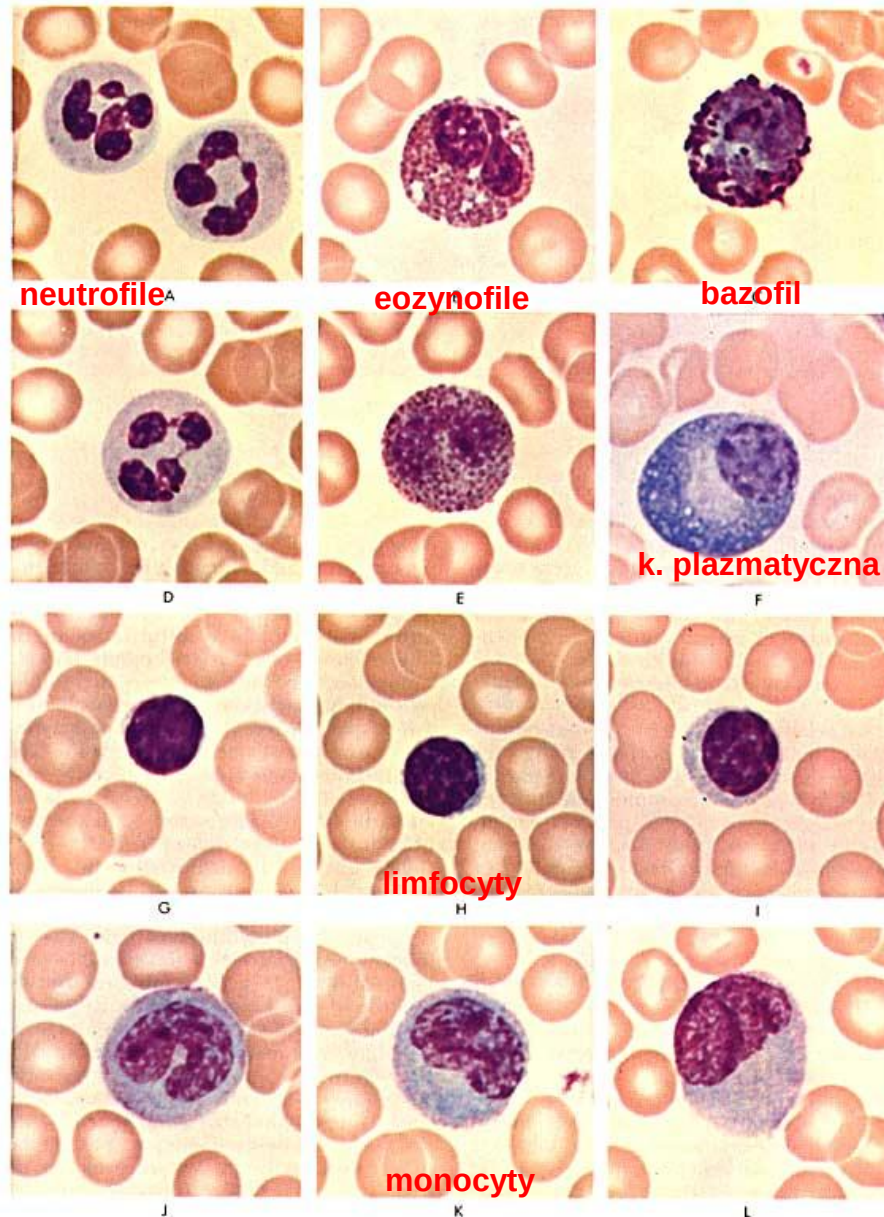
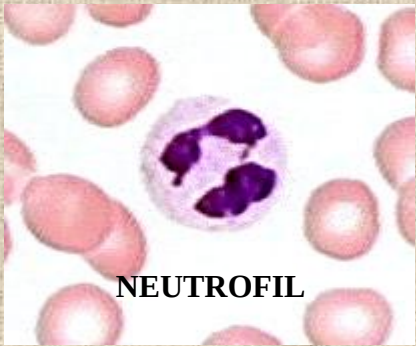
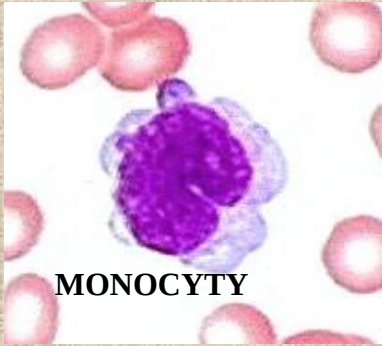


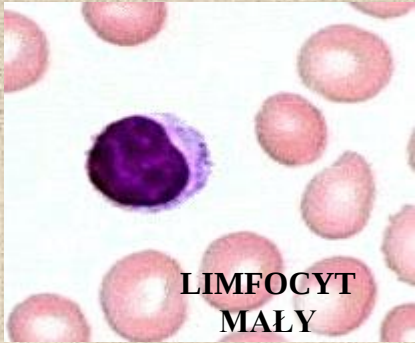
Figure 4-7. Human blood cells form a smear after Wright's stain. *A* and *D*, Neutrophilic leukocytes. *B* and *E*, Eosinophilic leukocytes. *C*, Basophilic leukocyte. *F*, Plasma cell; this is not a normal constituent of the peripheral blood but is included here for comparison with the nongranular leukocytes. *G* and *H*, Small lymphocytes. *I*, Medium lymphocytes. *J*, *K*, and *L*, Monocytes.



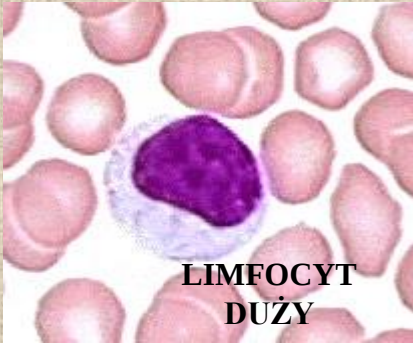
NEUTROFIL



MONOCYTY



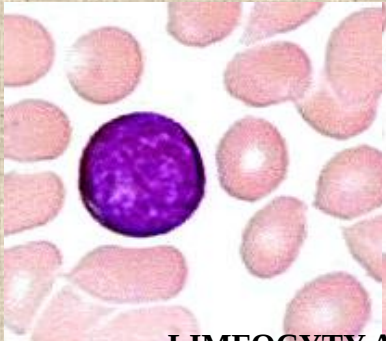
**LIMFOCYT
MAŁY**



**LIMFOCYT
DUŻY**



EOZYNOFIL



LIMFOCYTY AKTYWOWANE



BAZOFIL

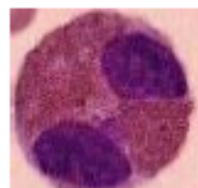


GRANULOCYTY



Bazofil, granulocyt zasadochłonny

Stanowią <1% wszystkich krwinek białych.
Cytoplazma jest lekko kwaśna, cała komórka wypełniona grubymi, okrągłymi zasadochłonnymi ziarenkami barwiącymi się na ciemnofioletowo.



Eozynofil, granulocyt kwasochłonny

Zawiera w cytoplazmie ziarnistości, które przy barwieniu eozyną barwią się na kolor ceglasto-czerwony. Stanowią od 1-5% wszystkich krwinek białych. Wykazuje słabe właściwości żerne (fagocytoza).



Neutrofil, granulocyt obojętnochłonny z jądrem pałeczkowatym.



Neutrofil, granulocyt obojętnochłonny z jądrem wielopłatowym.

Stanowią 60% wszystkich leukocytów. Należą do komórek fagocytujących.

AGRANULOCYTY



Duży ziarnisty limfocyt

Cechuje się niską wartością stosunku objętości jądra do objętości cytoplazmy oraz obecnością dużej zawartości ziaren azurofilnych.



Mały limfocyt

Zawiera duże jądro i mało cytoplazmy je otaczającej.

Stanowią około 25% wszystkich białych krwinek



Monocyt

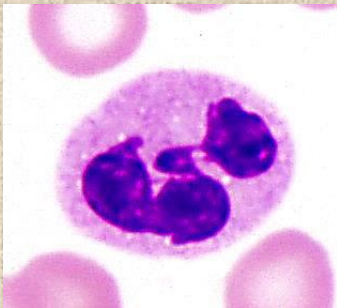
Stanowią 5-8% wszystkich krwinek białych. Należą do komórek fagocytujących (żernych) – makrofagów.

Granulocyty

- biorą udział w odpowiedzi niespecyficznej
- posiadają charakterystyczne granule - uwalniane podczas kontaktu z patogenem, zawierają białka zabijające lub regulujące inne komórki
- zawierają podzielone jądra

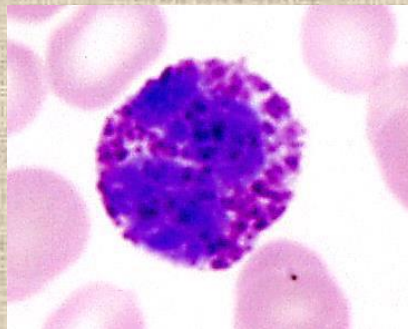
• **neutrofile**

- główne komórki efektorowe wczesnej odpowiedzi
- stanowią 50-70% WBC
- uwalniane ze szpiku, krążą 7-10 h, wchodzą do tkanek, żyją kilka dni
- ich liczba wzrasta w czasie infekcji
- zabijają mikroorganizmy na drodze fagocytozy
- główny składnik komórkowy ropy



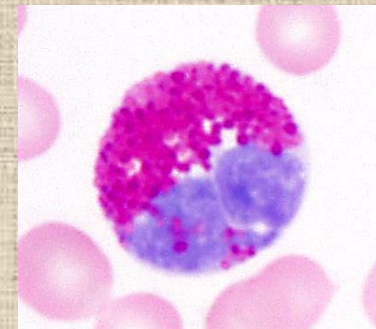
• **Bazofile**

- stanowią <1% WBC
- nie fagocytują
- jądro podzielone, zasłonięte przez niebieskie granule
- biorą udział w reakcjach alergicznych
- biorą udział w odpowiedzi na pasożyty
- wiążąc się z antygenami wydzielają histaminę

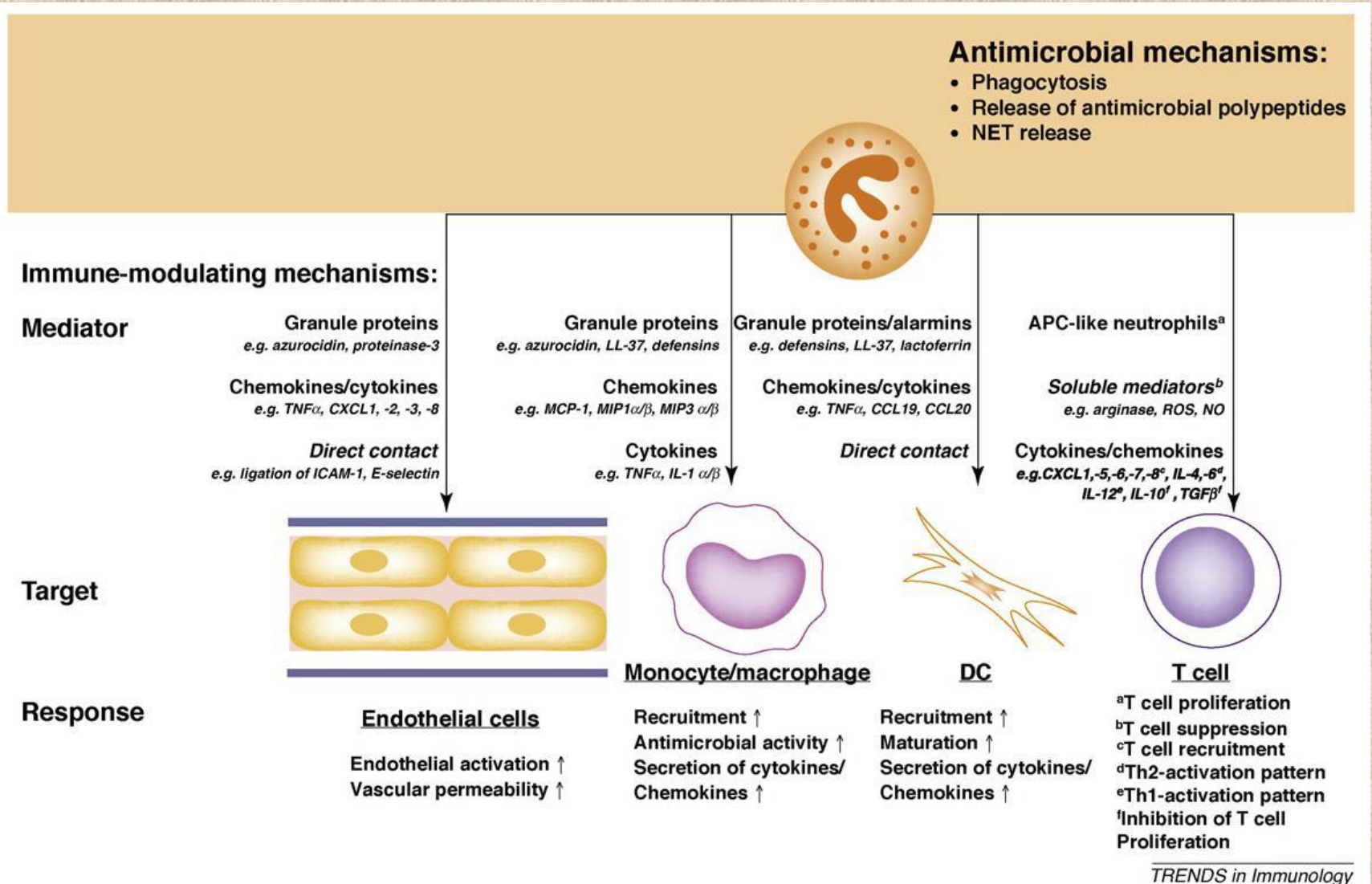


• **Eozynofile**

- dwuczłonowe jądro
- ruchliwe, fagocytujące
- rozpoznają antygeny na pasożytach
- biorą udział w zabijaniu pasożytów, robaków



Jak neutrofile wpływają na układ immunologiczny



Czynniki wydzielane przez leukocyty

TABLE 2-2 Examples of proteins contained in neutrophil, eosinophil, and basophil granules

Cell type	Molecule in granule	Examples	Function
Neutrophil	Proteases	<i>Elastase, Collagenase</i>	Tissue remodeling
	Antimicrobial proteins	<i>Defensins, lysozyme</i>	Direct harm to pathogens
	Protease inhibitors	<i>α1-anti-trypsin</i>	Regulation of proteases
	Histamine		Vasodilation, inflammation
Eosinophil	Cationic proteins	<i>EPO</i>	Induces formation of ROS
	Ribonucleases	<i>MBP</i>	Vasodilation, basophil degranulation
	Cytokines	<i>ECP, EDN</i>	Antiviral activity
	Chemokines	<i>IL-4, IL-10, IL-13, TNFα</i> <i>RANTES, MIP-1α</i>	Modulation of adaptive immune responses Attract leukocytes
Basophil/Mast Cell	Cytokines	<i>IL-4, IL-13</i>	Modulation of adaptive immune response
	Lipid mediators	<i>Leukotrienes</i>	Regulation of inflammation
	Histamine		Vasodilation, smooth muscle activation

Table 2-2

Kuby Immunology, Seventh Edition
© 2013 W. H. Freeman and Company