



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“

Projekto sutarties numeris: ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

BIO 421. LYGINAMOJI GYVŪNŲ MORFOLOGIJA

Laboratorinis darbas

ŽMOGAUS IR VARLĖS LEUKOGRAMOS ĮVERTINIMAS

Leukograma (leukocitų formulė) – leukocitų formų periferiniame kraujyje tarpusavio santykis, išreikštas procentais.

Žmogaus leukocitų (baltųjų kraujo kūnelių) koncentracija kraujyje yra $4 - 8 \cdot 10^9/l$. Žinomos įvairios leukocitų formos:

- **grūdėtieji leukocitai (granulocitai)** – dydis $10 - 14 \mu m$, jų branduolius sudaro atskiri segmentai, citoplazmoje daug savitųjų granulių, kurios suteikia citoplazmai grūdėtą vaizdą. Mitoziškai nesidaugina. Granulocitai pagal jų nusidažymą tam tikrais dažais skirstomi į:
 1. **neutrofilinius (makrofagai)** – dažosi neutraliais dažais. Sudaro $50 - 70 \%$ visų leukocitų. Normoje kraujyje cirkuliuoja subrendę segmentuoti neutrofilai. Jų funkcija – fagocitozė. Jaunesnių formų atsiradimą sąlygoja uždegiminis procesas. Uždegimo vietoje neutrofilai fagocituoja svetimkūnius bei pažeistas savo organizmo ląsteles. Atlikę funkciją, neutrofilai žūsta, sudarydami pūlius. Įvairūs žinduoliai gyvūnai turi nevienodą neutrofilų kiekį (daugiausiai turi šunys – apie 70% , mažiausiai atrajotojai - $30 - 35 \%$. Subrendusių neutrofilų forma yra apskrita, skersmuo $10 - 12 \mu m$; branduoliai sudaryti iš $2 - 5$ segmentų, kurie yra sujungti

chromatino siūlais; branduolėlių branduoliuose nesimato. Senesnių ląstelių branduolys primena užlenktos lazdos galą – **lazdeliniai leukocitai**. Jaunų neutrofilų branduolys yra pupelės formos. Nudažyto branduolio spalva yra mėlyna arba melsvai violetinė, citoplazmos – rožinė spalva.

2. **acidofilinius (eozinofilai)** – dažosi rūgščiais dažais. Sudaro apie 2 % visų leukocitų. Lyginant su neutrofilais, jų fagocitazinė funkcija silpnesnė. Svarbūs esant alerginės kilmės uždegimams, nes inaktyvuoja histaminą. Eozinofilų ląstelių forma yra apskrita, skersmuo 12 – 17 μm , branduolys sudarytas iš 2 segmentų, kurie sujungti plona sąsmauka. Kai kurių gyvūnų branduoliai sudaryti iš daugiau segmentų.
 3. **bazofilinius** – dažosi baziniais dažais. Sudaro apie 1 % visų leukocitų. Paukščių kraujyje jų yra daugiau; pelių, žiurkių, kačių kraujyje jų nėra. Pažeistose vietose kaip imuninę atsaką iš savo granuliu išskiria histaminą ir hepariną. Bazofilų skersmuo 10 – 12 μm ; branduolys stambus netaisyklingos formos, gali būti skiltėtas. Branduolys nudažytame kraujo tepinėlyje matosi neryškiai.
- **negrūdėtieji (agranulocitai) leukocitai** – branduoliai nesegmentuoti, citoplazma negrūdėta. Gali mitotiškai daugintis bei tapti kitos rūšies ląstelėmis. Skirstomi į:
 1. **monocitus** – tai didžiausios kraujo ląstelės (15 – 20 μm). Sudaro apie 1 % visų leukocitų. Audiniuose virsta makrofagais, fagocituoja visus svetimkūnius ir žuvusių ląstelių liekanas. Branduolys gali būti įvairios formos (pasagos, pupelės, inksto). Melsvai pilkšvoje citoplazmoje yra aiškiai matomos lizosomos, Goldžio kompleksas.
 2. **limfocitus** - skirstomi į T, B limfocitus (8 – 10 μm) ir NK ląsteles (12 – 14 μm). Vykdo organizmo apsauginę funkciją. Sudaro 30 % visų leukocitų. Naujagimio kraujyje limfocitai sudaro apie 60 %, senų žmonių 20 %. Triušių, galvijų, kiaulių kraujyje yra daugiau limfocitų. Limfocitų forma apskrita, pagal dydį esti:
 - mažieji - skersmuo 4,5 – 6,5 μm , ląstelės diferencijuotos; branduolys stambus apskritas, aplink jį plonu sluoksniu išsidėsčiusi citoplazma;
 - vidutiniai,
 - didieji - skersmuo 10 – 18 μm , ląstelės silpnai diferencijuotos arba jaunos. Vidutinių ir didžiųjų limfocitų branduolys apgaubtas platesniu citoplazmos sluoksniu.

Citoplazma gali būti išsidėsčiusi tik vienoje branduolio pusėje. Būdingas limfocitų bruožas – šviesesnis nenusidažęs siauras citoplazmos ruoželis prie pat branduolio (perinukleaninė zona). Limfocitų branduoliai apskriti arba ovalios formos, stambūs, dažnai vienas branduolio šonas šiek tiek įlinkęs. Branduolėlių nesimato. Normoje kraujyje esti mažieji ir dalinai vidutiniai limfocitai.

Varliagyvių kraujyje, kaip ir žinduolių kraujyje, yra eritrocitai, trombocitai bei minėtų rūšių leukocitai. Trombocitai gana stambūs. Įvairaus subrendimo eritrocituose ir trombocituose yra branduoliai, kas nėra būdinga žinduolių toms pačioms ląstelėms. Stambiausi eritrocitai iš visų stuburinių gyvūnų yra būdingi uodeguotosioms amfibijoms – 70 – 80 μm skersmens.

Darbo tikslas – išmokti paruošti, įvertinti bei palyginti žmogaus ir varlės leukogramas.

Darbo uždaviniai:

1. Padarykite žmogaus ir varlės fiksuotus kraujo tepinėlius.
2. Išanalizuokite kokias leukocitų formas matote paruoštuose kraujo tepinėlius. Nusipieškite matomą vaizdą bei nurodykite leukocitų formas.
3. apskaičiuokite rastų leukocitų formų procentinį santykį.
4. Palyginkite ir aptarkite gautus rezultatus

Darbo priemonės:

1. šviesinis mikroskopas (Motic, F1115) su imersiu objektyvu 100x bei imersinė alyva mikroskopavimui
2. piršto pradūriklis,
3. sterilus vatos tamponas,
4. sausa marlė,
5. objektiniai matiniai stikleliai,
6. objektiniai šlifuoti stikleliai,
7. Indai kraujo tepinėlių fiksavimui,
8. Pančenkovo kapiliaras,
9. vienkartinės pirštinės,
10. chalatai

Reagentai:

1. 96 % etilo alkoholis,
2. kalio dihidrofosfatas (KH_2PO_4),
3. natrio hidrofosfatas (NaHPO_4),
4. distiliuotas vanduo,
5. Azuro ir eozino dažų tirpalas.

Tyrimo objektas:

1. žmogaus kraujas,
2. varlės kraujas

Darbo eiga:

Darbo metu būtina dėvėti chalatus bei mėvėti vienkartinės pirštines!

1. Paimkite žmogaus periferinio kraujo. Tai geriausia atlikti ryte, tiriamasis asmuo turi būti nevalgęs. Kraują galite imti iš bet kurio piršto paskutinės falangos minkštimo (dažniausiai imama iš kairės rankos IV piršto). Pirštą nuvalykite spiritu suvilgytu steriliu vatos tamponu. Tuomet savo kairiąja ranka paimkite pirštą, lengvai suspauskite ir durkite piršto pradūrikliu. Steriliu vatos tamponu nuvalykite pirmą pasirodžiusį kraujo lašą. Priglauskite sterilų kapiliarą prie sekančio ištekėjusio kraujo lašo ir lėtai nukreipkite kapiliarą žemyn – tuomet kraujas galės tekėti į kapiliarą. Paėmę kraujo, nuvalykite pirštą spiritu suvilgytu steriliu vatos tamponu, ant pradurtos vietos uždėkite spirituotą vatos tamponą. Kruvinus vatos tamponėlius dėkite į specialų indą.
2. Padarykite žmogaus periferinio kraujo tepinėlį. Kraujo tepinėlį darykite ant objektinio matinio stiklelio, kuris turi būti švarus bei sausas. Užlašinkite kraujo lašą ant objektinio stiklelio 1-1,5 cm atstumu nuo jo krašto. Priglauskite bei palenkite šlifuoatą stiklelį 45° kampu nedaug į priekį nuo kraujo lašo. Palaukite kol prisilietęs prie stiklelio lašas išsiplės per visą stiklelio plotį ir tuomet greitai braukite šlifuoatą stikleliu į priekį taip, kad kraujo tepinėlis pasibaigtų 'šluotele' 1-1,5 cm iki stiklelio galo. Gerai padarytas kraujo tepinėlis yra nestoras, ilgas, gelsvos spalvos. Tepinėlį išdžiovinkite kambario temperatūros patalpoje.

3. Paimkite varlės periferinio kraujo.
4. Padarykite varlės periferinio kraujo tepinėlį. Kraujo tepinėlis ruošiamas analogiškai kaip žmogaus periferinio kraujo tepinėlis.
5. Fiksuokite kraujo tepinėlius, pamerkdami juos į 96 % etilo alkoholi atskiruose induose 20 – 25 min.
6. Pasiruoškite buferinių tirpalų mišinį: 0,49 g kalio dihidrofosfato (KH_2PO_4) ir 1,14 g natrio hidrofosfato (NaHPO_4) ištirpinkite 1 l distiliuoto vandens. Buferinio tirpalo pH turi būti 7,4 – 7,5.
7. Atskieskite Azuro ir eozino dažų tirpalą buferių tirpalų mišiniu, santykiu 1 – 2 lašus dažų su 1 ml buferinių tirpalų mišinio. Gautu tirpalu dažykite tepinėlius 20 – 25 min., pamerkdami juos į dažus, arba užlašindami juos ant tepinėlių. Nudažę, gerai nuplaukite tepinėlius vandentiekio vandeniui.
8. Skaičiuokite leukocitus tirdami žmogaus ir varlės kraujo tepinėlius mikroskopu imersine sistema. Tiriant imersine sistema būtina ant tiriamos vietos užlašinti imersinės alyvos lašą. Tirdami užsirašykite matomų leukocitų formų skaičių. Leukogramą skaičiuokite pradėdami paeiliui iš visų tepinėlio kampų pakraščių; po to keiskite tepinėlio padėtį zigzagu, kad 2 regėjimo laukai būtų į tepinėlio vidurį, 2 į tepinėlio šoną ir vėl atgal. Taip suskaičiuokite po 50 leukocitų, pradėdami iš skirtingų kraštų (viso suskaičiuokite 200 leukocitų).
9. Nusipieškite matytas leukocitų formas žmogaus ir varlės kraujo tepinėliuose. Palyginkite jas.
10. Rezultatus išreiškite procentais. Gauti leukogramos skaičiai yra santykiniai, kadangi jie priklauso nuo bendro leukocitų kiekio 1 l kraujo. Norint sužinoti kiek iš tikro yra leukocitų formų, reikia perskaičiuoti absoliučiais dydžiais: $x = (a \times b) / 100 \%$ (x – ieškomas tiriamos leukocitų formos kiekis % formulėje, a – leukocitų kiekis 1 l kraujo, b – tiriamos leukocitų formos kiekis % formulėje).
11. Palyginkite ir įvertinkite gautus rezultatus.
12. Naudotus stiklelius nuvalykite vatos tamponu. Po to stikliukai bus sterilizuojami.

Literatūra:

1. Anusevičienė O. V. ir kt. Žmogaus anatomija ir fiziologija. Kaunas: Linos pasaulis, 2002, 263 psl.
2. Civinskienė G. ir kt. Fiziologijos praktikos darbai. Kaunas: KMU leidykla, 2003, 121 psl.
3. Kėvelaitis E. ir kt. Žmogaus fiziologija. Kaunas: KMU leidykla, 2003, 478 psl.
4. Kublickienė O. Lyginamosios histologijos pagrindai. Vilnius: Mokslas, 1994, 199 psl.

5. Jurgelionienė S. ir Šergalienė O. Klinikinių laboratorinių tyrimų metodai. Vilnius: Mokslo ir enciklopedijų leidykla, 1995, 186 psl.
6. Lašas Vl. ir kt. Fiziologijos pratybos. Vilnius : Mintis, 1967, 261 psl.
7. Tamašauskas K. A. ir Stropus R. Žmogaus anatomija. Kaunas KMU leidykla, 2003, 317 psl.