



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 bakalaurų rengimui**

BIO 412. MORFOFIZIOLOGIJA

Laboratorinis darbas

KRAUJO GRUPIŲ IR Rh FAKTORIAUS NUSTATYMAS

Kraujo grupės – tam tikras kraujo tipas, kurį nulemia kraujyje esančios specifinės struktūros, priklausančios ABO sistemai:

- eritrocitų membranose yra **agliutinogenai** (antigenai), sudaryti iš aminorūgščių ir polisacharidų. Agliutinogenai yra dviejų rūšių – žymimi **A** ir **B**.
- kraujo plazmoje yra **agliutininai** (antikūnai) – kraujo plazmos gamaglobulinų frakcijos baltymai. Agliutininai taip pat yra dviejų rūšių – žymimi α ir β .

ABO sistema sudaro keturios (O, A, B, AB) kraujo grupės, kurioms būdingos tam tikros eritrocitų paviršiaus antigeninės savybės. Šios sistemos antikūnai yra IgM. Taigi, žmonių kraujas yra skirstomas į keturias grupes, atsižvelgiant į jų kraujyje esančių arba nesančių agliutinogenų tipą:

O kraujo grupė – jai priskiriami žmonės neturintys eritrocitų membranose agliutinogenų A ir B, bet turintys kraujo plazmoje agliutininus α ir β ,

A kraujo grupė – žmonės turi agliutinogeną A bei agliutininą β ,

B kraujo grupė - žmonės turi agliutinogeną B bei agliutininą α ,

AB kraujo grupė - žmonės turi agliutinogenus A ir B bet neturi agliutininų α ir β .

Neteisingai perpilant kraują įvyksta eritrocitų agliutinacija t. y. eritrocitų sulipimas į krūveles, kurios užkemša smulkiąsias kraujagysles, taip sutrikdydamos normalią kraujotaką. Procesas

gali pasibaigti mirtimi. Agliutinacija įvyksta tuomet, kai donoro eritrocitai atsiranda vienoje aplinkoje su sutampančiais agliutiniais recipiento kraujyje: agliutinogenas A susitinka su agliutininu α , arba agliutinogenas B susitinka su agliutininu β . Agliutininų molekulė turi du aktyvius centrus, kurie agliutinacijos metu sujungia du eritrocitus, prie susijungusių eritrocitų jungiasi kiti eritrocitai. Eritrocitus jungia svetimos kraujo grupės antikūnai – Ig M, agliutinacijos metu aktyvinama ir komplemento sistema.

Be paminėtų agliutinogenų, priklausančių ABO sistemai, žmogaus eritrocitų membranose yra ir daugiau specifinių agliutinogenų (daugiau nei 500), priklausančių kitoms sistemoms. Šiuo metu yra išskirta 23 genetiškai nepriklausomos kraujo grupių sistemos, pvz., Kell, Duffy, Diego, Kidd. Daugumos jų antigeninės savybės gana silpnos, pasireiškia retai, todėl perpilant kraują į jas paprastai neatsižvelgiama. Tačiau tai svarbu nustatant kraujo tapatumą, organų transplantacijos bei teismo medicinos tyrimų atvejais. Be to, tam tikri agliutinogenai esti ir leukocitų bei trombocitų membranose.

Rh sistema. Rezus (Rh) faktorius (rezus agliutinogenas), nepriklausantis ABO sistemai nustatytas imunizuojant triušius bengališkos beždžionės (*Macacus rhesus*) eritrocitais – tai **agliutinogenas D**. Agliutinogeno D yra 85 % žmonių kraujyje ir toks kraujas vadinamas **rezus teigiamu - Rh (+)**. Apie 15 % žmonių neturi agliutinogeno D, kraujas vadinamas **rezus neigiamu - Rh (-)**. Žinoma ir daugiau agliutinogenų, priklausančių Rh sistemoms, tačiau agliutinogenas D pasižymi stipriausiomis antigeninėmis savybėmis. Jeigu Rh (-) turinčiam asmeniui yra perpilamas Rh (+) kraujas, tuomet susidaro imuniniai antirezus agliutininiai. Todėl pakartotinai perpilant tam pačiam asmeniui Rh (+) kraują, ištinka anafilaksinis šokas. Rezus agliutinogenas labai svarbus ir nėštumo metu, jei moteris turi Rh (-) kraują, vyras Rh (+), o vaisiaus kraujas taip pat yra Rh (+). Esant tokiam atvejui pirmojo gimdymo metu vaisiaus eritrocitai gali patekti į motinos kraują ir todėl jame pradės gamintis Rh antikūniai, daugiausiai anti D, IgG. Antrojo nėštumo metu jie gali prasiskverbti pro placentos membraną ir sukelti vaisiaus eritrocitų hemolizę. Dėl to vaisius gali žūti. Esant tokiai situacijai, norint apsaugoti vaisių, reikia tuoj pat prieš arba po pirmojo gimdymo suleisti mamai anti-D antikūnių, kurie apsaugos patekusius vaisiaus Rh (+) antigenus nuo imunokompetentinių mamos ląstelių.

Perpilant kraują yra geriau naudoti kraujo pakaitalus, nes juose nėra agliutinogenų ir agliutininų, todėl tai pilnai apsaugo nuo agliutinacijos tikimybės. Jei perpilamas kraujas, rekomenduojama perpilti tik tos pačios grupės ir rezaus faktoriaus kraują. Anksčiau buvo leidžiama 0 grupės kraują perpilti kitas kraujo grupes turintiems asmenims. Bet 0 kraujo grupės kraujyje esti agliutininiai α ir β , tai perpilant didesnę kraujo kiekį donoro agliutininiai nepakankamai prasiskiedžia recipiento plazma ir įvyksta agliutinacija. Todėl 0 grupės kraują perpilti kitos kraujo grupės žmonėms galima tik atitinkamą kiekį. AB kraujo grupės žmonėms galima perpilti visų grupių kraują.

Darbo tikslas: išmokti nustatyti žmogaus kraujo grupę ir Rh faktorių bei parinkti tinkamą perpylimui kraują.

I dalis. Kraujo grupių ir Rh faktoriaus nustatymas

Darbo užduotis: nustatykite visų laboratoriniuose darbuose dalyvaujančių asmenų kraujo grupes bei Rh faktorius. Užduoties atlikimui tirkite kartu po vieną asmenį, kiekvienas pasižymėdamas savo tyrimo išvadas. Po to sulygininkite tarpusavyje savo atsakymus, juos aptarkite, pagrįsdami kodėl taip manote ir kodėl (jei taip buvo) iš pradžių neteisingai manėte.

Darbo priemonės:

1. sterilus vatos tamponas,
2. balta plokštelė,
3. objektinis stiklelis,
4. piršto pradūriklis.
5. vienkartinės pirštinės
6. chalatai

Reagentai:

1. reagentai kraujo grupių ir Rh faktoriaus tyrimui:
 - monokloninis antiserumas Anti-A
 - monokloninis antiserumas Anti-B
 - monokloninis antiserumas Anti-AB
 - monokloninis antiserumas Anti-D
 - kontrolė ABO + Rh
2. spiritas

Darbo objektas: žmogaus kapiliarinis kraujas.

Darbo eiga:

Darbo metu būtina dėvėti chalatus bei mėvėti vienkartinės pirštines!

1. Įvertinkite patalpos, kur bus atliekamas kraujo grupių nustatymas, temperatūrą. Tyrimas turi būti atliekamas šiltoje temperatūroje (15 – 25° C), nes žemesnėje nei 10°C temperatūroje gali įvykti pseudoagliutinacija (netikroji agliutinacija). Aukštoje temperatūroje (apie 50° C) agliutinacija nevyksta.

2. Pasiruoškite darbo priemones bei reagentus. Ant plokštelės eilės tvarka pažymėkite kur koks serumas bus lašinamas, pradedant nuo plokštelės krašto: kontrolė ABO+Rh, anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D.
3. Patogiai pasodinkite tiriamąjį asmenį. Naudodami spiritu sudrėkintą sterilų vatos tamponą, nuvalykite tiriamojo pirštą, iš kurio imssite kraują (dažniausiai kraujas imamas iš IV piršto paskutinės falangos minkštimo).
4. Kairiąja ranka paimekite nuvalytą spiritu tiriamojo pirštą, jį lengvai suspauskite ir pradurkite pirštą piršto pradūrikliu.
5. Pasirodžiusius kraujo lašus vieną po kito paimekite skirtingais objekcinio stiklelio kampais ir uždėkite juos ant baltos plokštelės šalia paruoštų serumo lašų. Jei kraujas nelaša, paspaudinėkite pradurtą pirštą.
6. Paėmę kraują, įdurtą piršto vietą patepkite spiritu.
7. Pasižymėkite laiką ir objekcinio stiklelio atitinkamu kampu sumaišykite atitinkamus kraujo lašus su atitinkamais kraujo serumais. Po to, norint, kad kraujas visiškai susimaišytų su serumu, švelniai pasukinėkite plokštelę, kol kraujo ir serumo mišinys taps vienodos spalvos.
8. Įvertinkite gautus tyrimo duomenis:
 - Tyrimo reakcija laikoma teigiama, jei po 1-5 min. įvyksta agliutinacija – mišinyje stebimi raudoni gumulėliai, o pats mišinys esti beveik bespalvis; pavarčius plokštelę, eritrocitų krūvelės dar labiau išryškėja. Yra labai svarbu agliutinaciją atskirti nuo pseudoagliutinacijos, kuri prasideda po ilgesnio laiko, eritrocitų krūvelės labai smulkios ir, pavarčius plokštelę, išnyksta.
 - Tyrimo reakcija laikoma neigiama, jei po 1-5 min. agliutinacija neįvyksta – mišinys atrodo negrūdėtas, rausvos spalvos.
 - Įvertinkite kontrolinę reakciją – joje neturi būt įvykusi agliutinacija.
 - Nustatykite su kuriais kraujo serumais įvyko agliutinacija.
 - Nustatykite Rh faktorių - Rh faktorius nustatomas taip pat pagal agliutinacijos reakciją: kraujas turės Rh (+), jei reakcija su serumu anti-D yra teigiama t.y. įvyko agliutinacija, kraujas turės Rh (-), jei reakcija su serumu anti-D neigiama t.y. agliutinacija neįvyko.
 - Nustatę, su kuriais kraujo serumais įvyko agliutinacija, nustatykite kraujo grupę (1 lentelė):

1 lentelė. Kraujo grupių tyrimo įvertinimas

Kraujo grupės	Standartiniai serumai			Išvados
	anti-A	anti-B	anti-AB	
0	-	-	-	Tiriamąjį kraują yra 0 grupės, nes agliutinacija neįvyko su visais serumais
A	Agliutinacija	-	Agliutinacija	Tiriamąjį kraują yra A grupės, nes agliutinacija įvyko su anti-A ir anti-AB serumais, su anti-B – neįvyko.
B	-	Agliutinacija	Agliutinacija	Tiriamąjį kraują yra B grupės, nes agliutinacija įvyko su anti-B ir anti-AB serumais, su anti-A – neįvyko.
AB	Agliutinacija	Agliutinacija	Agliutinacija	Tiriamąjį kraują yra AB grupės, nes agliutinacija įvyko su visais serumais

II dalis. Kraujo, tinkamo tam tikros kraujo grupės kraujo perpylimui, nustatymas

Darbo užduotis:

Žinodami visų laboratoriniuose darbuose dalyvaujančių studentų kraujo grupes bei Rh faktorius, nustatykite kuris kuriam galėtumėte būti kraujo donoru. Po to teoriškai pakeiskite priešingomis nei nustatėte Rh faktoriaus tyrimo išvadas ir vėl nustatykite kuris kuriam galėtumėte duoti kraujo perpylimui. Savo tyrimo išvadas sulyginkite tarpusavyje, aptardami kodėl taip manote ir kodėl (jei taip buvo) iš pradžių neteisingai manėte.

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, 2003, 121 psl.
3. Kėvelaitis E. ir kt. Žmogaus fiziologija. Kaunas: KMU, 2003, 478 psl.
4. Jurgelionienė S. ir Šergalienė O. Klinikinių laboratorinių tyrimų metodai. Vilnius: Mokslo ir enciklopedijų leidykla, 1995, 186 psl.

5. Lašas Vl. ir kt. Fiziologijos pratybos. Vilnius: Mintis, 1967, 261 psl.
6. Tamašauskas K. A. ir Stropus R. Žmogaus anatomija. Kaunas: KMU, 2003, 317 psl.
7. Voroneckienė V. Kraujo grupės (pagal eritrocitų antigenų sistemas). Vilnius: UAB 'Grafinės mašinos', 2001, 100 psl.