



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 412. MORFOFIZIOLOGIJA

Laboratorinis darbas

ERITROCITŲ NUSĖDIMO GREIČIO (ENG) NUSTATYMAS.

ERITROCITŲ IR LEUKOCITŲ SKAIČIAVIMAS

Kraujas (*sanguis s. haema*) – jungiamasis audinys, sudarytas iš:

- **kraujo ląstelių** – eritrocitų (raudonųjų kraujo kūnelių), leukocitų (baltųjų kraujo kūnelių) ir trombocitų (kraujo plokštelių). Ląstelės sudaro apie 45 % kraujo tūrio, tai atitinka **hematokrito rodiklį**. Moterims hematokrino rodiklis yra 37 – 47 %, vyrams 42 – 52 %. Jis nustatomas centrifuguojant heparizuoto kraujo mėginį – 99, 86 % nusėdusių ląstelių sudaro eritrocitai, 1,14 % - leukocitai bei trombocitai.
- **tarpląstelinės medžiagos (kraujo plazmos)** – kraujo tarpląstelinė medžiaga yra skysta. Kraujo plazma sudaro apie 55 % kraujo tūrio.

Eritrocitai (raudonieji kraujo kūneliai). Pavieniai eritrocitai yra gelsvai žalios spalvos, bet jų visuma suformuoja raudoną atspalvį. Jis priklauso nuo jame esančio deguonies bei anglies dvideginio kiekio. Žinduolių subrendusių eritrocitų forma panaši į iš abiejų pusių įgaubtą diską. Lamos bei kupranugario eritrocitai yra apvalūs. Žmogaus eritrocitų vidutinis skersmuo yra 7,5 μm, aukštis – 2 μm. Plokščia eritrocitų forma labai palengvina dujų apykaitą. Dar vienas iš žinduolių subrendusių eritrocitų ypatumų yra tai, kad jie neturi branduolio. Tai leidžia jiems laikinai

deformuotis, tekant pro siauresnį nei jų skersmuo kapiliarą. Žuvų, varliagyvių, roplių ir paukščių eritrocitai turi branduolius, yra stambūs, ovalios formos.

Žmogaus kraujyje yra atitinkamas eritrocitų kiekis: moterų kraujyje yra $3,9 - 4,7 \cdot 10^{12}/l$, vyrų kraujyje yra $4,0 - 5,0 \cdot 10^{12}/l$. Eritrocite yra 66 % vandens, 33 % hemoglobino (Hb), 1 % įvairių lipidų bei fermentų. Svarbiausia iš sudedamųjų eritrocito dalių yra hemoglobinas (Hb), kurį sudaro pigmentas hemas ir baltymas globinas. Jo yra visų stuburinių, kai kurių bestuburių eritrocituose bei daugelio bestuburių hemolimfoje. Hb yra būtinas deguonies ir anglies dvideginio pernešimui, gali juos prisijungti, sudarydamas lengvai skylančius junginius:

- Hb, prisijungęs O_2 , sudaro junginį oksihemoglobina (HbO_2),
- Hb, prisijungęs CO_2 , sudaro junginį karbohemoglobina ($HbCO_2$).

Hb junginiai su kitomis dujomis yra patvaresni, be to jei Hb prisijungia tam tikras kitas dujas, tai jau negali prisijungti deguonies, todėl galimas organizmo apsinuodijimas, kuris gali pasibaigti mirtimi. Itin pavojingas Hb junginys su smalkėmis (CO) – karboksihemoglobinas ($HbCO$), nes $HbCO$ lėtai skyla ir galima apsinuodyti smalkėmis net esant jų negausiam kiekiui. Stipriai oksiduojančios medžiagos, pvz., kalio permanganatas, nitratų jonai sudaro su hemoglobinu junginį methemoglobina ($MetHb$). Normoje žmogaus organizme yra atitinkamas Hb kiekis: moterų kraujyje yra 120 – 140 g/l, vyrų kraujyje yra 130 – 160 g/l. Hb koncentracija sumažėja sergant pvz., mažakraujyste, leukoze, dėl lėtinės intoksikacijos. Hb koncentracija padidėja dėl, pvz., širdies ydų, nudegimų, eritemijos.

Eritrocitų membranos išorėje turi teigiamą krūvį, todėl eritrocitai stumia vienas kitą, tolygiai pasiskirstydami kraujyje. Pasenę eritrocitai (eritrocitai gyvena maždaug 100 parų) netenka krūvio, sulimpa vienas su kitu ir nusėda. Juos suardo kepenų, kaulų čiulpų bei blužnies makrofagai. Suaugusio žmogaus eritrocitai gaminasi kaulų čiulpuose iš kamieninių ląstelių eritropoezės būdu, veikiant eritropoetinui ir interleukinui 3. Jauni, dar nesubrendę eritrocitai vadinami **retikulocitais**, jie sudaro apie 1 % visų eritrocitų populiacijos.

Eritrocitų nusėdimo greitis (ENG). Nejudančiame kraujyje eritrocitai iš lėto nusėda tam tikru greičiu, nes jų santykinis tankis didesnis už plazmos. Eritrocitų nusėdimo greitis (ENG) vyrams yra 3 - 6mm/val., moterims 8 – 10 mm/val., kūdikių - iki 18 mm/val. Organizme vykstant uždeginiams procesams arba esant navikams ENG gali labai padidėti. ENG sulėtėjimas taip pat gali būti dėl tam tikrų ligų, pvz., eritemijos, širdies ydų, nudegimų.

ENG priklauso nuo daugelio faktorių, pvz., tulžies pigmentų kiekio kraujo plazmoje, kraujo klampumo, eritrocitų skersmens, tūrio, kiekio. Normaliomis sąlygomis kraujo plazmos albuminai, turintys neigiamą krūvį, stabdo eritrocitų nusėdimą. Patologijos atveju didėja tam tikrų antikūnų sintezė, o albuminų sintezė mažėta – tai sąlygoja ENG padidėjimą. ENG gali padidėti valgant kai kuriuos maisto

produktus (gausus baltyminio maisto vartojimas), vartojant sieros preparatus, vakcinoterapijos bei kraujo transfuzijos atvejais, menstruacijų ir nėštumo metu. Taip pat ENG gali pagreitinti masažas, dušai, vonios, alkoholis, šiluma. ENG lėtina šaltis, tam tikrų vaistų vartojimas, pvz., kalcio, salicilo preparatai.

Leukocitai (baltieji kraujo kūneliai). Leukocitai vystosi kaulų čiulpuose iš kamieninių ląstelių. Apie 30 % visų leukocitų esti kaulų čiulpuose, virš 50 % - audiniuose, mažiau nei 20 % - kraujyje. Leukocitai vykdo savo funkcijas įvairiuose audiniuose. Leukocitai yra bespalvės, turinčios branduolį ląstelės. Jų koncentracija kraujyje yra $4 - 8 * 10^9/l$. Leukocitų kiekis padidėja infekcijos arba leukemijos metu, sumažėja leukopenijos atveju, pvz., dėl kaulų čiulpų pažeidimo. Leukocitai gali prisitvirtinti prie kraujagyslių endotelio, judėti intersticiniame tarpe bei išeiti pro kapiliarų tarpus. Leukocitas juda dėka laikinai susidarančių mikrofilamentų, susidedančių iš aktino ir miozino. Laikinas susitraukiančių struktūrų formavimasis leidžia ląstelei keisti jos formą bei judėjimo kryptį. Leukocitai esti grūdėtieji (neutrofiliniai, acidofiliniai, bazofiliniai) ir negrūdėtieji (limfocitai, monocitai).

Trombocitai (kaulų plokštelės). Trombocitai kilę iš kaulų čiulpų stambiųjų ląstelių megakariocitų. Gyvena apie 10 parų, miršta ir suyra, liekanas sunaikina makrofagai. Tai neturinčios branduolio apvalios arba ovalios plokštelės, skersmuo $2 - 3 \mu m$, kiekis kraujyje $150 - 400 * 10^9/l$. Trombocitai dalyvauja kraujavimo stabdyme patys sulipdami į krūvą ir taip užkimšdami žaizdą. Be to, jie išskiria serotoniną, kuris lėtina kraujo tekėjimo greitį ir siaurina kraujagyslę. Normaliomis sąlygomis, trombocitai neprilimpa prie kraujagyslės, nes tai slopina iš kraujagyslių endotelio išskiriamas kraujagysles atpalaiduojantis faktorius – azoto oksidas (NO) bei prostaglandinas (PGI_2). Šios medžiagos nustoja veikti, kuomet kraujagyslių endotelis yra pažeidžiamas.

Morfologinis kraujo tyrimas. Įvairių patologinių procesų atveju būtina atlikti morfologinį kraujo tyrimą, vadinamą bendru kraujo vaizdu. Kiti tyrimai atliekami pagal indikacijas. Morfologinį kraujo tyrimą sudaro:

- **Eritrocitų nusėdimo greičio (ENG) tyrimas** – tradiciškai ENG yra tiriamas Pančenkos metodu, naudojant Pančenkos aparatą.
- **Hemoglobino (Hb) koncentracijos nustatymas kraujyje** - Hb kiekis gali būti tiriamas įvairiais metodais, pvz., hemoglobincianidiniu metodu ar naudojant hemometrą.
- **Eritrocitų ir leukocitų kiekio nustatymas 1 l kraujo** – kraujo ląstelės gali būti skaičiuojamos pro mikroskopą, naudojant specialias kameras skaičiavimui ir automatiškai, dėka automatinių skaitiklių. Esti įvairūs automatinių skaitiklių modeliai, veikiantys pagal tą patį principą - prietaisas skaičiuoja elektros impulsus, kuriuos sukelia elektrolito tirpale esančios ląstelės, praeidamos pro kapiliaro angelę.

- **Leukogramos (leukocitų formulės) skaičiavimas.** Leukograma - periferiniame kraujyje esančių leukocitų formų tarpusavio santykis, išreikštas procentais. Kraujo tepinėlis yra tiriamas mikroskopu imersine sistema. Tepinėlyje leukocitai pasiskirsto skirtingai: didesni esti pakraštyje bei gale, mažesni – viduryje. Todėl leukocitai skaičiuojami tam tikruose regėjimo laukuose.

I darbo dalis. Eritrocitų nusėdimo greičio (ENG) nustatymas

Darbo tikslas: išmokti nustatyti ir įvertinti eritrocitų nusėdimo greitį (ENG).

Darbo uždaviniai:

1. ištirkite pageidaujancio asmens, iš dalyvaujančių laboratoriniame darbe, ENG;
2. aptarkite ir paaiškinkite gautus rezultatus.

Darbo priemonės:

1. kraujo nusėdimo greičio matavimo prietaisas (stovas ir mėgintuvėliai),
2. stiklinis indelis,
3. piršto pradūriklis,
4. sterilus Pančenkos kapiliaras,
5. sterilus vatos tamponas,
6. vienkartinės pirštinės,
7. chalatai.

Reagentai:

1. sterilus 5 % natrio citrato tirpalas,
2. spiritas.

Darbo objektas: žmogaus kapiliarinis kraujas

Darbo eiga:

Darbo metu būtina dėvėti chalatus bei mėvėti vienkartinės pirštines!

1. Rekomenduojama kraują imti ryte, tiriamasis turi būti nevalgęs. Nerekomenduojama tirti kraujo po fizioterapijos procedūrų, spindulinio gydymo, sunkaus fizinio darbo bei jei vartojami tam tikri medikamentai.
2. Pasiruoškite priemones ir reagentus. Kapiliaro spindį praplaukite steriliu 5 % natrio citrato tirpalu – pritraukite jo į kapiliarą iki P padalos, po to natrio citratą išpilkite į mėgintuvėlį. Kraujas, sumaišytas su natrio citrato tirpalu, nesukreša, todėl ir juo praplautoje pipetėje kraujas nekrešės.
3. Kraują galite imti iš bet kurio piršto paskutinės falangos minkštimo (dažniausiai imama iš kairės rankos IV piršto). Pirštą, iš kurio imsite kraują, nuvalykite spiritu suvilgytu steriliu vatos tamponu. Kairiąja ranka paimkite nuvalytą pirštą, jį lengvai suspauskite ir durkite piršto pradūrikliu.
4. Kraują imkite labai greitai, kol jis nesukrešėjo. Pirmą pasirodžiusį kraujo lašą nuvalykite steriliu vatos tamponu. Vėliau ištekėjusį lašą paimkite steriliu Pančenkos kapiliaru – kapiliarą priglauskite prie lašo ir lėtai nukreipkite žemyn – kraujas galės tekėti į kapiliarą. Kairiąja ranka lengvai paspaudinėkite pradurtą pirštą, kad ištekėtų pakankamai kraujo. Stenkitės kad į kapiliarą nepatektų oro.
5. Kraujo paimkite iki kapiliaro K padalos ir išpūskite jį į stilinį indelį, kur jau yra natrio citrato tirpalas.
6. Paėmę kraują, pirštą nuvalykite spiritu suvilgytu steriliu vatos tamponu, ant pradurtos vietos uždėkite spirituotą vatos tamponą. Kruvinus vatos tamponėlius dėkite į specialų indą.
7. Vėliau tuo pačiu kapiliaru paimkite kraujo dar kartą ir vėl išpūskite į jį į tą patį stiklinį indelį, taip natrio citratas praskies kraują santykiu 1:4. Mišinį sumaišykite, įtraukdami jį į kapiliarą ir išpūsdami iš jo.
8. Vėl nuvalykite pirštą pagal 6 darbo eigos punkte pateiktą aprašymą.
9. Gautu natrio citrato ir kraujo mišinio įtraukite iki kapiliaro viršutinės ‘K’ padalos, vertikalčiai pastatykite į stovą ir palikite vienai valandai. Temperatūra patalpoje turi būti 18-20°C, nes žemesnėje temperatūroje ENG yra mažesnis, o aukštesnėje – didesnis.
10. Tyrimo rezultatus vertinkite po valandos, apskaičiuodami kiek milimetrų užima plazmos sluoksnis virš nusėdusių eritrocitų.
11. Aptarkite gautus rezultatus

II darbo dalis. Eritrocitų skaičiavimas.

Darbo tikslas: išmokti nustatyti ir įvertinti eritrocitų kiekį viename litre kraujo.

Darbo uždaviniai:

1. ištirkite pageidaujamo asmens, iš dalyvaujančių laboratoriniame darbe, eritrocitų skaičių viename litre kraujo;
2. stebėdami pro mikroskopą, išidėmėkite ir nuspėskite matomą eritrocitų vaizdą. Apibūdinkite eritrocitų išvaizdą;
3. aptarkite ir paaiškinkite gautus rezultatus.

Darbo priemonės:

1. šviesinis mikroskopas (Motic, SFC-100),
2. Gorjajevo kamera,
3. mėgintuvėlis,
4. piršto pradūriklis,
5. sterilus vatos tamponas,
6. sausa marlė,
7. filtrinis popierius,
8. sterilus Pančenkos kapiliaras.

Reagentai:

1. 0,9 % natrio chlorido tirpalas,
2. spiritas

Darbo objektas: žmogaus kapiliarinis kraujas.

Darbo eiga:

Darbo metu būtina dėvėti chalatus bei mėvėti vienkartinės pirštines!

1. Pasiruoškite darbo priemones ir reagentus. Įpilkite į mėgintuvėlį 4 ml 0,9 % natrio chlorido tirpalo.
2. Paimkite 0,02 ml kraujo pagal pirmoje darbo dalies darbo eigos 1, 3, 4, 6 punktų aprašymus.
3. Praskieskite kraują - 0,02 ml kraujo išpūskite iš kapiliaro į mėgintuvėlį su 4 ml 0,9 % natrio chlorido tirpalo ir 0,02 ml kraujo (kraujas prasiskies 200 kartų). Kraują praskiesti yra būtina, nes eritrocitų skaičius kameroje bus per didelis, jie uždengs vieni kitus.
4. Išmaišykite mišinį, jį įtraukdami ir išpūsdami iš kapiliaro.

5. Nuvalykite Gorajjevo kameros stiklėlį sausa marle. Ant šlifuoatų plokštelių uždėkite dengiamąjį stiklėlį, atsargiai laikydami jį už kraštų. Švelniai pastumkite jį į priekį, kol susidarys Niutono žiedai - stiklelis yra prisispaudęs prie plokštelių.
6. Dar kartą išmaišykite mišinį. Pipete paimkite kraujo lašą ir užlašinkite jį ant kameros po pritvirtintu stikleliu.
7. Mišinio turinys turi pasiskleisti po visą tinklėlį. Jeigu grioveluose esti mišinio perteklius, jį nusiurbkite, naudodami filtrinį popierių.
8. Eritrocitų skaičiavimą pradėkite, jiems nusėdus (po 1-2 min). Eritrocitus skaičiuokite, naudodami šviesinį mikroskopą (mikroskopo okuliaras – 10 X, objektyvas – 10 X). Eritrocitus reikia skaičiuoti 5 kvadratuose, įstrižai kameros padalytuose į 16 mažų kvadratėlių. Jei eritrocitai yra ant kvadrato linijos, tokiu atveju skaičiuokite tik esančius ant viršutinės linijos ir dešinėje pusėje.
9. Apskaičiuokite eritrocitų kiekį 1 l kraujo pagal formulę:

$$x = (a * 4000 * b) / e * 10^6,$$

kur, a- suskaičiuotų eritrocitų skaičius, b – praskiedimo laispnis, e – kvadratėlių skaičius, 4000 – mažojo kvadratėlio tūris, 10^6 - μ l kiekis 1 l

III darbo dalis. Leukocitų skaičiavimas.

Darbo tikslas: išmokti nustatyti ir įvertinti leukocitų kiekį viename litre kraujo.

Darbo uždaviniai:

1. Išstirkite pageidaujančio asmens, iš dalyvaujančių laboratoriniame darbe, leukocitų skaičių viename litre kraujo.
2. Stebėdami pro mikroskopą, įsidėmėkite ir nusipieškite matomą leukocitų vaizdą. Apibūdinkite leukocitų išvaizdą.
3. Aptarkite ir paaiškinkite gautus rezultatus.

Darbo priemonės:

1. šviesinis mikroskopas (Motic, SFC-100),
2. Gorajjevo kamera,
3. mėgintuvėlis,
4. sterilus Pančenkos kapiliaras,
5. sterilus vatos tamponas,
6. sausa marlė,

7. filtrinis popierius,
8. vienkartinės pirštinės,
9. chalatas.

Reagentai:

1. 3-5 % acto rūgšties tirpalas,
2. spiritas.

Darbo objektas: žmogaus kapiliarinis kraujas

Darbo eiga:

Darbo metu būtina dėvėti chalatus bei mūvėti vienkartinės pirštines!

1. Pasiruoškite prietaisus ir priemones. Į mėgintuvėlį įpilkite 3-5 % 0,4 ml acto rūgšties tirpalo.
2. Pagal pirmos darbo dalies darbo eigos 1, 3, 4, 6 punktų aprašymus paimkite 0,02 ml kraujo.
3. Į mėgintuvėlį su 3-5 % 0,4 ml acto rūgšties tirpalo išpūskite iš kapiliaro 0,02 ml kraujo – taip kraują praskiesite 20 kartų. Be to, acto rūgštis ištirpdo eritrocitus. Mišinį mėgintuvėlyje sumaišykite įtraukdami jį į pipetę ir išpūsdami iš jos.
4. Leukocitų skaičiavimo principai yra tokie patys kaip eritrocitų skaičiavimo, tik leukocitus. Todėl toliau tęskite darbą pagal II darbo dalies darbo eigos 5, 6, 7, 8, 9, punktus, tik leukocitus skaičiuokite 100 kvadratų.

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. 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, 2003, 317 psl.