

## CVIČENIE č.2

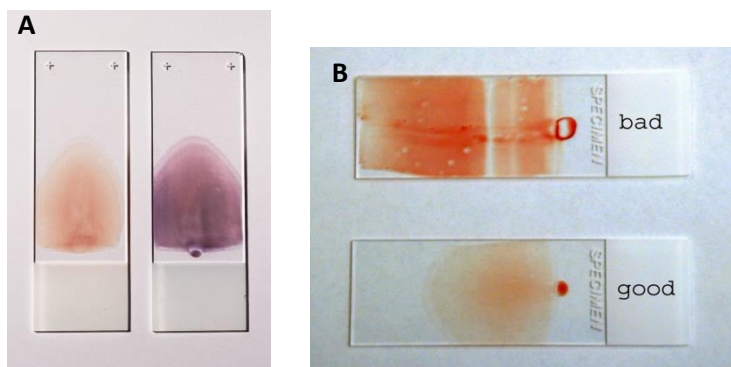
Meno :

Dátum:

Téma: Fyziológia krvi

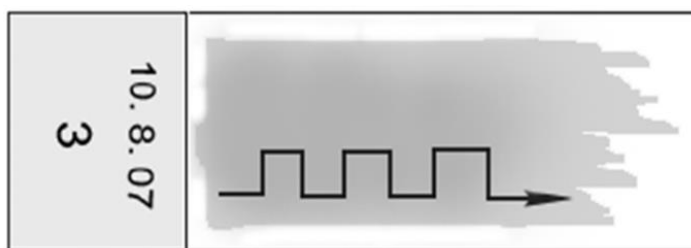
Úloha: 1. Vyhodnotiť diferenciálny rozpočet leukocytov v krvi človeka  
2. Stanovenie krvných skupín

Princíp: **ÚLOHA 1: Krvný náter:** znamená priame pozorovanie krvi v mikroskope. V porovnaní s automatickým krvným obrazom umožňuje dôveryhodnejšie posúdiť počet, tvar a veľkosť jednotlivých buniek, ako aj prípadné abnormality. Nevyhnutnou podmienkou pre rozpočet jednotlivých typov leukocytov v krvi je správne prevedený krvný náter. Náter musí byť tenký, rovnomerný a dobre zafarbený (Obr.1)



Obr.1: A) Krvný náter pred a po zafarbení. B) Nesprávne (horný) a správne (dolný) prevedený krvný náter

**Diferenciálny rozpočet:** Rozloženie leukocytov v nátere nie je rovnaké pre jednotlivé typy bielych krviniek. Väčšie (monocyty a eozinofily) sa zhromažďujú na okrajoch, menšie (lymfocyty) sú skôr v strednej časti náteru. Diferenciálny rozpočet sa preto nerobí len na jednom konci, uprostred alebo na okraji náteru, **ale meandrovite** (cikcakovite), čím sa dosiahne prezretie celého náteru (Obr.2).



Obr.2: schéma prezerania krvného náteru

**Tab.1:** Prehľad normálneho zastúpenia jednotlivých druhov bielych krviniek (%) u človeka (podľa D. Wiedermanna)

%	Neutrofily	Eozinofily	Basofily	Lymfocyty	Monocyty
Človek	50-70	1-4	0-1	20-40	2-8

**ÚLOHA 2: Krvné skupiny:** Krvné skupiny určujeme na základe zhlukovania neznámych červených krviniek, ktoré sú nositeľmi aglutinogénov, známymi aglutinínmi krvnej plazmy alebo séra (Tab 2). V ľudských erytrocytoch bolo doposiaľ objavených viac než 30 antigénov, ktoré môžu vyvolať reakciu antigén-protilátka. Najdôležitejšie sú systém ABO a Rh.

**Tab. 2:** Princíp fungovania diagnostických antisér (+ vznik zrazeniny, – bez zrazeniny)

Známe diagnostické antisérum	Neznáme erytrocyty			
Anti- A	+	-	-	+
Anti - B	-	+	-	+
Anti - AB	+	+	-	+

Podrobný princíp a teória krvných skupín je v osobitnom súbore v Moodle pod názvom **KRVNÉ SKUPINY**. Naštudovať!!!

**Pomôcky:**

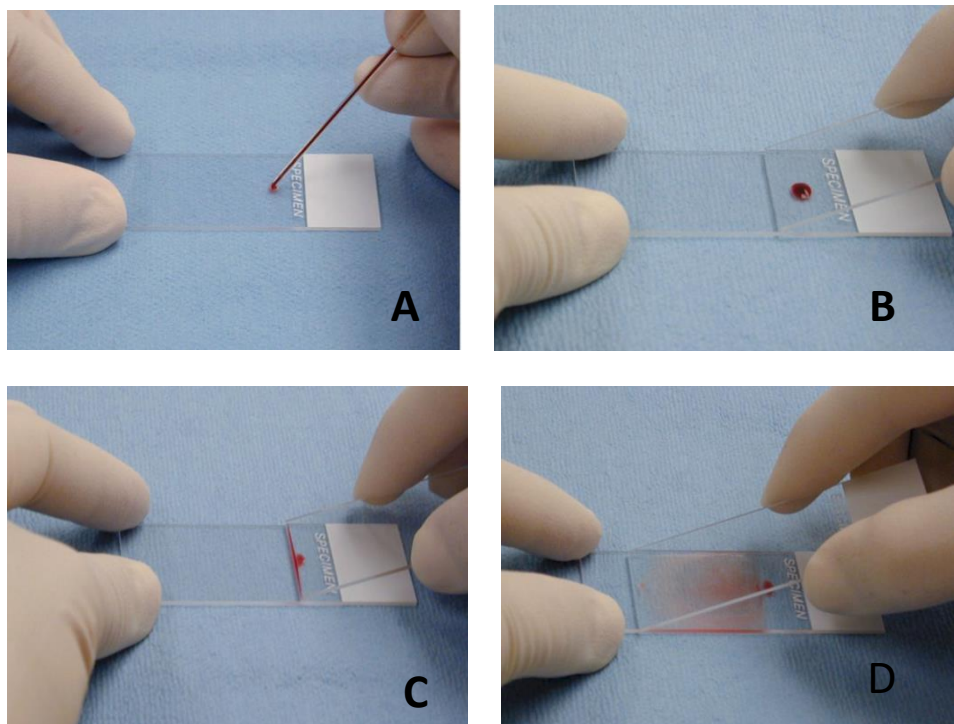
**Úloha 1:** trvalé krvné nátery človeka

**Úloha 2:** krv, sterilné ihly, mikropipeta, krvné séra- anti A, anti B, anti AB, anti D, podložné sklíčka, farebná pastelka na popis sklíčka, vata, septonex, mikroskop a pomôcky na mikroskopovanie

**Postup:**

**Úloha 1: Krvný náter:**

Odmastené sklíčko uchopíme palcom a ukazovákom ľavej ruky na protiľahlých úzkych stranách a kvapku krvi umiestnime asi 1 cm od druhého okraja (obr. 3A). Priemer kvapky má byť asi 0,5 cm. Potom sa náterovým sklíčkom priblížime pod 45°stupňovým uhlom ku kvapke krvi (obr. 3B), počkáme kým sa krv rovnomerne roztečie po hrane náterového sklíčka (obr. 3C). Následne ťaháme kvapku za sklom smerom k palcu rýchlym rovnomerným pohybom (obr. 3D).



**Obr.3:** Príprava krvného náteru

**Fixácia:**

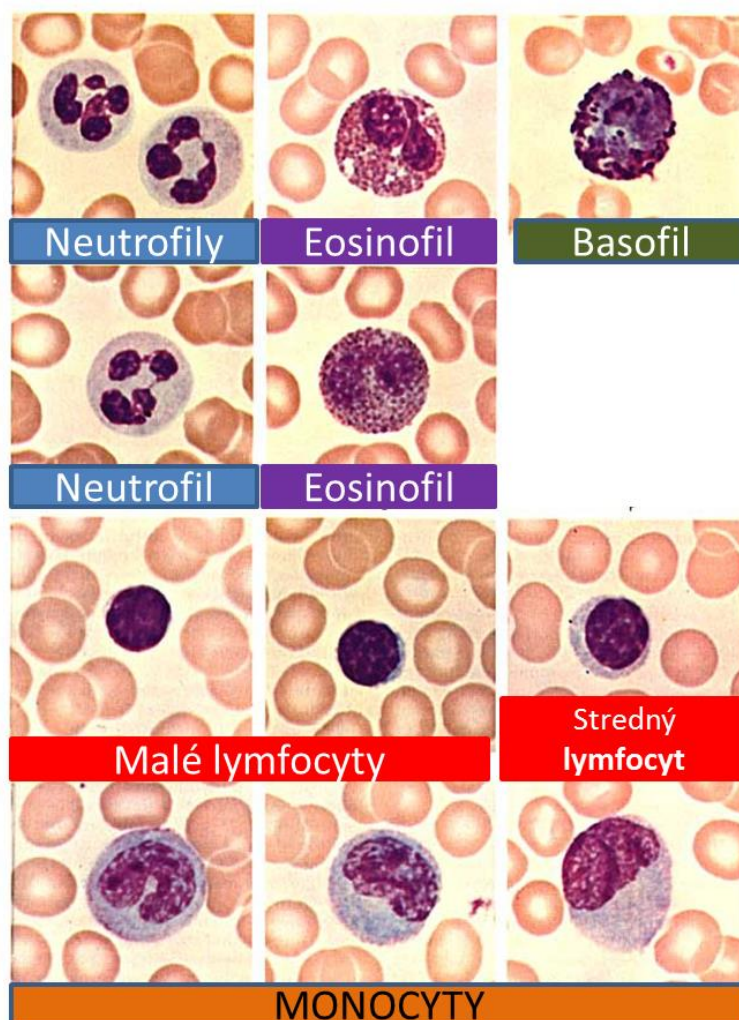
Zhotovený náter necháme zaschnúť na vzduchu (1 hod.).

#### Farbenie:

Suchý preparát položíme na farbiaci mostík a pokryjeme ho zvolna po celej ploche May-Grünwaldovým farbivom. Po 3 minútach roztoky zlejeme, preparáty opláchneme ostrým šikmým prúdom alkalickej vody. Potom preparáty zalejeme čerstvo zriedeným roztokom Giemsu-Romanovského (10 kvapiek farbiva do 10 ml alkalickej vody), necháme pôsobiť 20 minút, zlejeme, opláchneme ostrým prúdom alkalickej vody a spodnú stranu sklíčka očistíme benzín-alkoholom. Preparát šikmo oprieme, aby voda stiekla a necháme usušiť.

#### Rozpočet leukocytov:

Po usušení pozorujeme krvný náter pod mikroskopom s použitím objektívu 100. V mieste najtenšieho náteru nakvapkáme imerzný olej, ponoríme doň objektív a postupne prezeráme celý preparát (viď. princíp). Biele krvinky v zornom poli diferencujeme a zapisujeme ich do tabuľky do celkového počtu 100 tak, aby v každom stĺpci bolo 10 krviniek. Novú desiatku zapisujeme vždy do nového stĺpca. Všímame si **veľkosť a tvar bunky, jadra, cytoplazmu, granuláciu** (Obr. 4). Súčet jednotlivých druhov bielych krviniek v riadku udáva % jednotlivých druhov bielych krviniek.



Obr. 4: Jednotlivé druhy bielych krviniek pod mikroskopom.

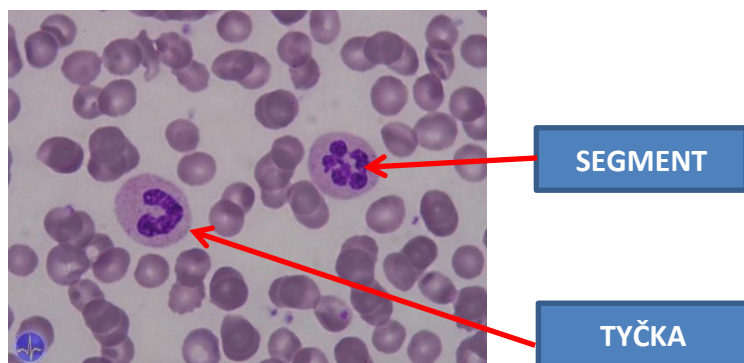
#### Postup:

#### Úloha 2: Krvné skupiny:

- Čisté podložné sklíčko označíme na ploche obrátenej ku podložke písmenami A, B a AB a na spodnú stranu ďalšieho sklíčka označíme písmeno D.

[illegible]

**Vysvetlivka:** Nezrelé neutrofilý majú jadro rôzne zakrivené najčastejšie v tvare podkovy (Obr.6). Tieto bunky označujeme ako *tyčky*. S dozrievaním dochádza postupne k segmentácii jadra a preto zrelé neutrofilý nazývame *segmenty* (Obr.6).



**Obr.6:** Vývinové typy neutrofilov: nezrelá forma (tyčka), zrelá forma (segment).

## Pozorovanie Úloha 2:

Zaznamenajte zistenú krvnú skupinu do Tab 4.

**Tab.4: Vyhodnotenie krvného testu**

Známe diagnostické antisérum	Neznáme vyšetř. Erytrocyty
Anti- A	
Anti - B	
Anti - AB	
Anti-D	

## Záver:

Zhodnoťte výsledky cvičenia a záver doplňte o informáciu:

- kde sa tvoria biele krvinky a kde zanikajú
- zadeľte pozorované leukocyty k nešpecifickej (vrodenej) resp. špecifickej imunite.
- Ktorá krvná skupina predstavuje univerzálneho darcu a príjemcu krvi pri krvnej transfúzii:
- Aké ďalšie systémy krvných skupín ešte poznáte?
- Vysvetlite čo rozumiete pod krvnou skupinou Bombay?