**CVIČENIE č. 2**

**Meno, odbor: Samuel Nalevanko, 3FBb**

**Dátum: 17. 02. 2020**

**Téma: Fyziológia krvi**

**Úlohy: 1.** Pripraviť krvný náter.

**2.** Vyhodnotiť diferenciálny rozpočet leukocytov v krvi človeka.

**Princíp: Krvný náter:** je výhodný na priame pozorovanie krvi v mikroskope. Týmto spôsobom je možné objektívne zhodnotiť tvar, počet a veľkosť jednotlivých buniek. Kvôli dobrej viditeľnosti buniek musí byť náter tenký, rovnomerný a dobre zafarbený. Leukocyty (biele krvinky) sú dôležitou súčasťou krvi, kvôli ich podieľaniu sa na imunitnej odpovedi organizmu. Podľa obsahu granúl v plazme sa delia na **granulocyty** (neutrofily, bazofily, eozinofily) a **agranulocyty** (monocyty, lymfocyty). Na základe fyziologickej normy (Tab. 1) sa z počtu leukocytov v krvnom nátere vie určiť zdravotný stav človeka.

Fyziologická norma:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **TYP LEUKOCYTU** | Neutrofily | Lymfocyty | Monocyty | Eozinofily | Bazofily |
| **POČET [%]** | 50 – 60 | 20 – 40 | 2 – 6 | 1 – 4 | 0,5 – 1 |

**Tab. 1: Fyziologická norma leukocytov v ľudskej krvi**

**Diferenciálny rozpočet:** Pri určovaní typu leukocytov z diferenciálneho rozpočtu je nutné, aby sa krvný náter prechádzal mendrovite po celej dĺžke, keďže leukocyty nie sú rovnomerne rozložené. Monocyty a eozinofily (väčšie) sa zhromažďujú na okajoch, keďže pri tvorbe krvného náteru vďaka ich veľkosti ľahšie prešli pomedzi menšie krvné telieska. Zvyšné menšie leukocyty sa nachádzajú skôr v strednej časti náteru.

**Materiál:** podložné sklíčka (dobre odmastené), náterové sklíčka, May-Grünwaldovo farbivo (Merk) (eozín, metylénová modrá, metylalkohol, glycerín), farbivo Giemsa-Romanovského (Merk) (azúr II-eozín, azúr II, glycerín, metylalkohol), neutrálna slabo alkalická voda, farbiace mostíky, gáza, filtračný papier, šikmý stojan na sušenie preparátov, mikroskop s imerzným objektívom, imerzný olej, xylol, benzín-alkohol, pinzeta na uchopenie sklíčok, vata

**Postup: Krvný náter:**

* odmastené sklíčko sme uchopili palcom a ukazovákom ľavej ruky
* kvapku krvi (priemer=0,5mm) sme umiestnili asi 1 cm od protiľahlého okraja
* náterovým sklíčkom sme sa priblížime ku kvapke pod 45° uhlom
* nechali sme krv rovnomerne roztiecť po hrane náterového sklíčka
* kvapku sme ťahali so sklom smerom k palcu a ukazováku rýchlym rovnomerným pohybom
* náter sme nechali zaschnúť na vzduchu (~ 1hod.)

*Farbenie:*

* suchý preparát sme uložili na farbiaci mostík
* po celej ploche sme ho pokryli May-Grünwaldovým farbivom
* po ~3 min. sme roztoky zliali a preparát opláchli šikmým ostrým prúdom alkalickej vody
* preparát sme zaliali čerstvo zriedeným roztokom Giemsu-Romanovského (10 kvapky v 10ml vody), nechali sme pôsobiť ~20 min a zliali
* preparát sme opláchli alkalickou vodou, spodnú stranu sklíčka sme očistili benzín-alkoholom
* preparát sme šikmo opreli a nechali usušiť

**Rozpočet leukocytov:**

* po usušení sme pozorovali krvný náter pod mikroskopom (1000-násobné zväčšenie)
* biele krvinky sme diferencovali a zapisovali do tabuľky podľa pokynov (v každom z 10 stĺpcov 10 buniek)
* pozorovali sme veľkosť a tvar bunky, jadra, cytoplazmu a granuláciu

**Výsledky:**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **TYP** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **Σ [%]** |
| **neutrofil (tyčka)** | - | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | 3 |
| **neutrofil (segment)** | 4 | 4 | 6 | 6 | 9 | 6 | 8 | 6 | 6 | 6 | 61 |
| **eozinofil** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| **bazofil** | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| **lymfocyt** | 3 | 4 | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 2 | 2 | 2 | 22 |
| **monocyt** | 2 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 13 |

**Tab. 2: Počet jednotlivých nájdených leukocytov**

monocyt

lymfocyt

bazofil

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| neutorfil (tyčka) | neutorfil (segment) | eozinofil |

**Tab. 3: Nákresy nájdených typov leukocytov**

**Diskusia:** Preparát som začal pozorovať až od polovice, z dôvodu zlej priehľadnosti na začiatku, kde krv nebola dôkladne roztretá, a teda všetky krvné telieska sa navzájom prekrývali a bolo problematické dané bunky identifikovať. Celkové zafarbenie preparátu bolo veľmi tmavé, a bolo potrebné zvýšiť jas aby sa leukocyty dali rozpoznávať. Taktiež si z porovnania fyziologickej normy leukocytov (Tab. 1) a nami napočítanými leukocytmi (Tab. 2) môžeme všimnúť konkrétne odchýlky počtu monocytov a eozinofilov. V krvnom nátere sme našli dvojnásobný počet monocytov. Tento počet mohol spôsobiť imunologický problém študenta (infekcia), ktorému táto krv patrí, ale aj ľudský faktor, teda chyba pri pozorovaní a nesprávne určenie bunky. Z dôvodu, že som v preparáte nenašiel žiaden eozinofil som pozoroval ešte jeden preparát, pre správne určenie a zakreslenie bunky do tabuľky (Tab. 3).

**Záver:** Na tomto cvičení sme sa oboznámili s rozoznávaním leukocytov v ľudskej krvi. Preparát sme pozorovali meandrovite podľa návodu, aby bolo možné nájsť všetky druhy leukocytov. Najpočetnejšie boli neutrofily, z celkového počtu tvorili **64%**, z čoho 61% boli segmenty (zrelé neutrofily) a 3% tyčky (nezrelé formy). Pozorované neutrofily mali málo denznú cytoplazmu a žiadnu granuláciu, teda boli ľahko rozpoznateľné. Eozinfily sa v preparáte nenašli, teda ich zastúpenie je **0%**, avšak pozorovaný eozinofil na druhom preparáte mal svetloružovú granulovanú cytoplazmu a dvojsegmentové jadro a veľkosťou bol podobný neutrofilom. Bazofily tvorili **1%** z celkového počtu. Mali denznú tmavofialovú granulovanú cytoplazmu, a teda bolo problematické pozorovať ich jadro. Veľkosťou sú podobné zvyšným granulocytom. Ďalej sme pozorovali lymfocyty, ktoré tvorili **22%**. Pozorovali sme veľké jadro, ktoré vypĺňalo takmer celý objem bunky, a teda okolitá cytoplazma bola len veľmi tenká. Lymfocyty boli o niečo menšie ako granulocyty. Ďalej sme pozorovali monocyty, ktorých zastúpenie bolo **13%**. Sú to najväčšie leukocyty s obličkovitým jadrom a svetlou cytoplazmou, teda boli ľahko rozpoznateľné.

a.) Všetky biele krvinky sa tvoria v kostnej dreni, pričom jediné T lymfocyty dozrievajú v týmuse. Biele krvinky zanikajú v slezine.

b.) neutrofil – nešpecifická

bazofil – nešpecifická

eozinofil – nešpecifická

monocyt – nešpecifická

lymfocyt – špecifická