**UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI**

**Katedra Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej**

**ZESZYT DO ĆWICZEŃ Z FIZJOLOGII**

Praca zespołowa pod redakcją

dr hab. n. med. Anny Walczewskiej



**Łódź 2009**

Wydano na zlecenie Senackiej Komisji ds. Wydawnictw

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Autorzy:

Katarzyna Asłanowicz-Antkowiak

Barbara Dziedzic

Anna Gorąca

Maria Łuczyńska

Janina Mazanowska-Gajdowicz

Dariusz Nowak

Monika Orłowska-Majdak

Maria Pawelska-Zubrzycka

Elżbieta Potargowicz

Urszula Szkudlarek

Anna Walczewska

© Copyright by Uniwersytet Medyczny w Łodzi

 Łódź 2009

**ISBN 978-83-61058-66-3**

 **Wydanie II**

**Krew i nerki**

Zasady postępowania w czasie pracy z krwią 95

Temat 1. Podstawowe parametry morfologii krwi 96

Temat 2. Oznaczenie liczby erytrocytów, leukocytów i płytek krwi metodą komorową 97

Temat 3. Oznaczenie stężenie hemoglobiny w krwi 100

Temat 4. Oznaczenie hematokrytu 101

Temat 5. Obliczenie średniej objętości erytrocytu (MCV), średniej masy hemoglobiny (MCH)

 i średniego stężenia hemoglobiny w erytrocycie (MCHC) 102

Temat 6. Zestawienie wyników morfologii krwi uzyskanych metodami manualnymi z wynikami

 badania w analizatorze hematologicznym 103

Temat 7. Hematopoeza (film) 103

Temat 8. Porównanie proporcji białych i czerwonych krwinek w krwi obwodowej oraz w szpiku

 kostnym 105

Temat 9. Oznaczenie składu procentowego leukocytów 106

Temat 10. Oznaczenie oporności osmotycznej erytrocytów 107

Temat 11. Oznaczenie szybkości opadania erytrocytów – odczyn Biernackiego 108

Temat 12. Oznaczenie czasu protrombinowego 109

Temat 13. Oznaczenie czasu krzepnięcia 111

Temat 14. Oznaczenie czasu krwawienia 111

Temat 15. Oznaczenie antygenów grupowych krwi A, B i D 112

Temat 16. Oznaczenie grup krwi układu ABO i Rh 113

Temat 17. Oznaczenie stężenia wapnia w krwi 114

Temat 18. Obliczanie składu procentowego i stężenia poszczególnych frakcji białek osocza 115

Temat 19. Wybrane zagadnienia czynności nerek (symulacja komputerowa)

**Krew i nerki**

**Temat 1. Podstawowe parametry morfologii krwi**

Morfologia krwi obwodowej jest badaniem laboratoryjnym najczęściej wykonywanym w celu kontroli stanu zdrowia i diagnostyki. Polega na ilościowym i jakościowym pomiarze elementów morfotycznych krwi. W latach 80-tych XX w. pojawił się pierwszy analizator hematologiczny i obecnie wykonywanie morfologii w automatycznych analizatorach wyparło zupełnie metodę liczenia krwinek w komorach (np. Bürkera, Thoma) pod mikroskopem. Analizator pobiera do badania tylko 10-200 μl krwi i może wykonywać nawet 100 oznaczeń na godzinę. Zasada automatycznego liczenia krwinek oparta jest na pomiarze zmian przewodnictwa elektrycznego rozcieńczonej krwi, które są proporcjonalne do ilości i objętości zawartych w niej elementów morfotycznych. Na podstawie rozkładu wielkości krwinek (histogramu) analizator wylicza liczbę erytrocytów (RBC), leukocytów (WBC) i płytek krwi (PLT), średnie objętości krwinek, współczynniki zróżnicowania ich wielkości, kolorymetrycznie oznacza stężenie hemoglobiny i wylicza wskaźniki: MCV, MCH, MCHC oraz hematokryt (Hct). Ponadto, na podstawie wielkości rozróżniane są poszczególne rodzaje leukocytów. Proste analizatory hematologiczne (18-parametrowe) różnicują tylko 3 rodzaje leukocytów: granulocyty, limfocyty i monocyty.

**Zadanie**

 Wykonać badanie morfologii krwi. Do tabeli wpisać pełne nazwy skrótów wybranych parametrów (patrz tabela 1 i 2 na końcu rozdziału) oraz uzyskane wyniki. Przeliczyć jednostki podane przez analizator na obowiązujace jednostki SI (liczba krwinek w litrze, stężenie Hb w mmol/l, MCH w femtomolach, Hct w postaci wskaźnika).

PRZELICZNIKI

1 g/dl x 0,62 = 1 mmol/l

1 pg x 0,062 = 1 femtomol (fmol)

1 %Hct x 0,01 = wskaźnik hematokrytu

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Symbol | Pełna nazwa | Wynik | Zakres wartości prawidłowych (SI) |
| jednostki tradycyjne | jednostki SI |
| **WBC** |  |  |  |  |
| **PLT** |  |  |  |  |
| **RBC** |  |  |  | KM |
| **Hct** |  |  |  | KM |
| **Hb** |  |  |  | KM |
| **MCV** |  |  |  |  |
| **MCH** |  |  |  |  |
| **MCHC** |  |  |  |  |

**Odpowiedz na pytania:**

1. Co to jest histogram krwinek i do czego służy?

.........................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................

1. Podaj definicję hematokrytu.

....................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................

1. Czy można w surowicy oznaczyć płytki krwi? Wyjaśnij.

.........................................................................................................................................................................................................................................................…............................................................................................................................................................................................................................................

1. Jak zmienia się wielkość erytrocytów przy niedoborze:

żelaza........................................................................................................................................................................................................................................................................................................................... witaminy B12............................................................................................................................................ ...................................................................................................................................................................

kwasu foliowego....................................................................................................................................... ...................................................................................................................................................................

# Temat 2. Oznaczenie hematokrytu

Hematokryt (Hct) to procent objętości jaki zajmuje frakcja erytrocytów w krwi pełnej. Około 1% tej objętości zajmują pozostałe elementy morfotyczne krwi. Dlatego hematokryt zależy od ilości i objętości erytrocytów w krwi.

Wartość hematokrytu oznaczana metodą wirowania różni się od hematokrytu krwi prawidłowej oznaczanego w analizatorze hematologicznym o 2-3%, ponieważ niewielka ilość osocza zostaje uwięzienia pomiędzy krwinkami podczas wirowania. W metodach automatycznych hematokryt jest obliczany na podstawie ilości i objętości RBC. Jednak bezpośredni pomiar hematokrytu jest szybką i tanią metodą oceny zdolności krwi do przenoszenia tlenu. Na podstawie hematokrytu można również obliczyć **szacunkowo** zawartość hemoglobiny oraz liczbę RBC **tylko w krwi prawidłowej** wg przeliczników:

1% Hct = 0,21 milimola Hb w litrze krwi (lub 1%Hct = 0,34 g Hb/100ml)

1% Hct = 107 000 RBC w 1l krwi

**Zadanie**

 Oznaczyć hematokryt krwi badanej metodą mikrohematokrytową.

**Wykonanie**

 Napełnić rurkę hematokrytową krwią żylną pobraną na EDTA do ¾ jej długości. Wolny koniec rurki (niewypełniony krwią) **dokładnie** zatopić w płomieniu palnika lub zakleić woskiem. Rurki hematokrytowe ułożyć symetrycznie w gniazdach wirówki hematokrytowej tak, aby się równoważyły. **Zamknięty koniec rurki musi znaleźć się na obwodzie wirówki**. Dokładnie przykryć wirówkę pokrywą, ustawić czas wirowania 5 min i włączyć wirowanie. Po zatrzymaniu się wirówki, wyjąć rurki hematokrytowe i odczytać wartość Hct w procentach przy użyciu firmowego czytnika. W tym celu należy:

* umieścić rurkę w rowku pionowej listwy czytnika, tak aby dolny koniec słupka krwinek znajdował się na wysokości poziomej linii;
* linię na ukośnym ruchomym ramieniu ustawić na górze słupka osocza;
* przesuwać listwę czytnika w lewo tak długo, aż linia ukośnego ramienia czytnika znajdzie się na granicy pomiędzy osoczem i krwinkami;
* na skali czytnika odczytać wartość hematokrytu w procentach, którą wskazuje linia na pionowej listwie

Odczytać wartość hematokrytu wszystkich rurek. Obliczyć średnią wartość i otrzymany wynik pomnożyć przez 0,95. Jest to poprawka uwzględniająca zwiększenie pomiaru masy krwinkowej o objętość osocza uwięzioną pomiędzy krwinkami.

**Hct wynosi**................................................. Kobieta/Mężczyzna

**Wskaźnik Hct [l/l**]: %Hct x 0,01 = .............................................

Oceń Hct badanego..............................................................................................................................

**Odpowiedz na pytania**

1. Podaj prawidłowy hematokryt dla dorosłych kobiet…………………………………………………………………………………………………… mężczyzn ……………………………………………………………………………………………
2. Podaj najważniejsze czynniki, od których zależy hematokryt? .……………………………………………………...……………………………………………………………………………………………………………………………………………………………

……………………………………………………………………………………………………………………………………………………..……………………..…………………………………………

# Temat 3. Oznaczenie czasu protrombinowego

**Czas protrombinowy (PT)** służy do oceny sprawności zewnątrzpochodnego mechanizmu krzepnięcia krwi. Szybkość powstania fibryny od momentu aktywacji przez tromboplastynę (czynnik tkankowy) zależy głównie od stężenia w osoczu czynników krzepnięcia: V, VII, X, protrombiny i fibrynogenu. Wydłużenie czasu PT występuje m. in. w stanach niedoboru witaminy K, chorobach wątroby, zespole rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC) oraz podczas leczenia doustnymi antykogulantami (antagoniści witaminy K).

**Zadanie**

Oznaczyć czas protrombinowy krwi metodą Quicka.

**Wykonanie**

Do wykonania oznaczenia potrzebne są: łaźnia wodna, probówki z mieszadełkiem, tromboplastyna, pipety i osocze krwi, które uzyskuje się przez odwirowanie krwi (10 min, 3000 obr/min). Włączyć łaźnię wodną, nastawić temperaturę 37C i ogrzać w niej czyste probówki, badane osocze, tromboplastynę. Do suchej probówki odmierzyć 100 l osocza i 200 l tromboplastyny z Ca2+. Natychmiast po dodaniu tromboplastyny włączyć stoper i mieszać zawartość probówki bagietką zakończoną haczykiem. W chwili pojawienia się widocznego na haczyku żelu, świadczącego o pojawieniu się włóknika, wyłączyć stoper i zanotować czas. Oznaczenie powtórzyć przynajmniej 3 razy. PT osocza prawidłowego wynosi **13‑18 sekund**. Wyniki wpisać do tabeli.

|  |
| --- |
| Czas protrombinowy (PT) |
| Pomiar | Sekundy |
| I |  |
| II |  |
| III |  |
| PT krwi badanej |  |

(1) Przedstawić wynik PT w postaci procentowego wskaźnika.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| PT osocza prawidłowego | x | 100% |
| PT osocza badanego |

**Wskaźnik protrombinowy wynosi** ......................................................

(2) Obliczyć współczynnik protrombinowy

|  |
| --- |
| PT osocza badanego |
|  PT osocza prawidłowego |

(3) Przedstawić wynik PT w postaci INR *(International Normalized Ratio)*. Jest to współczynnik umożliwiający standaryzację wyników z różnych laboratoriów, ze względu na różną aktywność produkowanej tromboplastyny. INR u osób zdrowych mieści się w granicach **0,7 – 1,3**. Oblicza się go ze wzoru:

 **INR = (Współczynnik protrombinowy)ISI**

**ISI *(International Sensitivity Index****)*, to międzynarodowy wskaźnik czułości tromboplastyny podawany przez producenta dla każdej serii odczynnika *(na opakowaniu z uwzględnieniem metody wykonania i typu analizatora)*

**INR wynosi** ....................................................................................................................................................

Oceń PT krwi badanej

……………………………………………………………………………………………………………

**Odpowiedz na pytania**

1. Jak zmieni się czas PT w stanach niedoboru witaminy K? Wyjaśnij dlaczego? ............................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................ ...............................................................
2. Które czynniki krzepnięcia mogą występować we krwi w zmienionym stężeniu przy wydłużonym PT?

........................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................

1. Który etap krzepnięcia krwi ocenia się mierząc czas protrombinowy? ...................................................................................................................................................................

# Temat 4. Oznaczenie czasu krzepnięcia

Do oceny sprawności układu krzepnięcia, aktywowanego przez czynniki kontaktu (droga wewnątrzpochodna), stosowany jest aktywowany czas częściowej tromboplastyny (APTT). W teście tym mierzy się czas powstania fibryny po dodaniu do osocza powierzchniowo czynnego aktywatora fosfolipidów oraz jonów wapnia. Prawidłowy czas krzepnięcia przy aktywacji wewnątrzpochodnej wynosi około 30 – 40 sekund (37 – 46) [[1]](#endnote-1). Metodą stosowaną do testowania sprawności wewnątrzpochodnego mechanizmu krzepnięcia był do niedawna pomiar czasu krzepnięcia. Najprostszą formą tego testu jest metoda kapilarowa, w której mierzy się czas od momentu wynaczynienia krwi do momentu wytworzenia fibryny w kapilarze włosowatej. Prawidłowy czas krzepnięcia wyznaczony tą metodą wynosi 3 – 10 minut.

**Zadanie**

Oznaczyć czas krzepnięcia krwi metodą kapilarową.

**Wykonanie**

Oznaczenie wykonuje się w dwuosobowych grupach, w których każda z osób poddaje badaniu własną krew włośniczkową. Opuszkę palca osoby badanej zdezynfekować 70% alkoholem etylowym, ucisnąć celem wywołania przekrwienia, a następnie nakłuć jałowym nożykiem. W tym momencie włączyć stoper. Do kropli swobodnie wypływającej krwi przyłożyć kapilarkę włosowatą i napełnić ją krwią przynajmniej w 2/3 długości. Następnie, co 30 sekund odłamywać mały kawałek kapilarki z krwią, aż do momentu, gdy pomiędzy dwoma fragmentami rurki pojawi się fibryna. Zanotować czas.

**Czas krzepnięcia metodą kapilarową wynosi**..............................................................................................

Oceń czas krzepnięcia krwi badanej ………………………………………………………………………………………………………………

**Odpowiedz na pytania**

1. Jaka jest przyczyna wydłużenia czasu w teście APTT w hemofilii?

………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………

# Temat 5. Oznaczenie czasu krwawienia

Czas krwawienia to czas od momentu wynaczynienie krwi na skutek standardowej skaryfikacji skóry (na przedramieniu), do chwili ustania krwawienia. Do celów diagnostycznych akceptowana jest metoda Ivy, która polega na standardowym nakłuciu bagnecikiem przedramienia i przykładaniu, co 30 s bibuły, do momentu ustania krwawienia. Oznaczenie czasu krwawienia jest najprostszą metodą badania sprawności hemostatycznej płytek krwi i małych naczyń krwionośnych. Jednakże pomiar czasu krwawienia jest mało powtarzalny, gdyż wpływa na niego wiele czynników zewnętrznych (np. temperatura) oraz inne niespecyficzne czynniki np. gęstość krwi. **Prawidłowy czas krwawienia** oznaczony **metodą Ivy** wynosi **do 10 minut**. Starszą metodą oznaczania czasu krwawienia jest nakłucie płatka ucha (metoda Duke’a). **Prawidłowy czas krzepnięcia krwi** oznaczany **metodą Duke’a** wynosi

**1 - 4 minut**.

**Zadanie**

Oznaczyć czas krwawienia metodą Duke’a.

**Wykonanie**

Oznaczenie wykonuje się w dwuosobowych grupach, w których każda z osób poddaje badaniu własną krew włośniczkową. Zamiast płatka ucha zdezynfekować (70% alkohol etylowy) opuszkę palca, lekko ucisnąć celem wywołania przekrwienia i nakłuć jałowym bagnecikiem. W tym momencie włączyć stoper. Co 30 sekund paskiem bibuły filtracyjnej usuwać wypływającą krew, aż do chwili ustania krwawienia. Zanotować czas, po którym na bibule **nie pojawi się** już ślad krwi.

**Czas krwawienia wynosi.............................................................................................................................**

Oceń czas krwawienia oznaczony zmodyfikowaną metodą Duke’a ……….……………………………………………………………………………………………………

**Odpowiedz na pytania**

1. Jakie są najważniejsze przyczyny zahamowania krwawienia po uszkodzeniu naczyń włosowatych w opuszce palca?

 .......................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................

1. Na czym polega proces adhezji płytek krwi? .........................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................
2. Na czym polega proces agregacji płytek krwi i jakie czynniki biorą w niej udział? ............................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................

1. Neumeister B, Besenthal I, Liebich H. Diagnostyka laboratoryjna. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner,

2003.

# Temat 6. Oznaczenie grup krwi układu ABO i Rh

W praktyce klinicznej największe znaczenie mają układy grupowe krwi ABO i Rh. Podstawą podziału krwi na grupy jest obecność w błonie erytrocytów immunogennych glikoprotein. Występowanie antygenów w erytrocytach oraz naturalnych przeciwciał (alloprzeciwciał) w osoczu w układzie ABO przedstawione jest (w tabeli poniżej). Układ Rh determinuje występowanie grupy antygenów, z których najbardziej immunogenny jest antygen D. Krew, której erytrocyty posiadają antygen D określa się jako Rh+. Krew, w której erytrocytach nie występuje ten antygen, jako Rh-. Prawidłowe oznaczenie grupy krwi dawcy i biorcy jest niezbędne przed wykonaniem transfuzji.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Grupa krwi** | **A1** | **A2** | **B** | **A1B** | **A2B** | **0** |
| Antygeny na krwinkach | A1 | A2 | B | A1B | A2B | brak |
| Przeciwciała w osoczu | anty-B | anty-B | anty-A1 | brak | brak | anty-Aanty-B |

**Zadanie**

Określić grupę krwi przy użyciu przeciwciał monoklonalnych anty-A, anty-B i anty-D oraz krwinek wzorcowych z antygenami A i B.

**Wykonanie**

Do wykonania potrzebne są: surowice z przeciwciałami anty-A, anty-B i anty-D, wzorcowe erytrocyty A i B oraz oznakowane płytki z wgłębieniami. Krew odwirować (10 min w 3000 obr/min), a następnie rozdzielić krwinki i osocze do oddzielnych probówek. Do oznakowanych wgłębień na płytce nanieść pipetką dużą kroplę każdej surowicy, a następnie kroplę badanych erytrocytów. Delikatnie wymieszać. Na drugiej płytce zgodnie z oznaczeniami nanieść po dużej kropli badanego osocza, a następnie erytrocyty wzorcowe. Delikatnie wymieszać. Po około 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej sprawdzić, gdzie wystąpiła aglutynacja. Wynik wpisać do tabeli oznaczając:

 **+** aglutynację

**⎯** brak aglutynacji.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Erytrocyty badane | Osocze badane | Grupa krwi |
| *plus* | *plus* |
| Przeciwciała monoklonalne | Erytrocyty wzorcowe |
| Anty-A | Anty-B | Anty-D | A | B |  |
|  |  |  |  |  |

Odpowiedz na pytania

	1. Jakie antygeny grupowe wykryto w erytrocytach badanych? ...................................................................................................................................................................
	2. Jakie przeciwciała znaleziono w badanym osoczu? ...................................................................................................................................................................
	3. Wymień antygeny występujące w erytrocytach grupy krwi:AB Rh- ......................................................................................................................................................

A Rh+........................................................................................................................................................

B Rh-........................................................................................................................................................

O Rh+ .......................................................................................................................................................

**Dlaczego nie występuje hemoliza krwinek po pierwszym przetoczeniu krwi grupy BRh+ pacjentowi z grupą BRh-**…………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………...........................................................................................................................................

# **Temat 7. Hematopoeza (film)**

 Elementy morfotyczne krwi powstają z niezróżnicowanych pluripotencjalnych komórek pnia (stem cells) znajdujących się w szpiku kostnym czerwonym. Proces intensywnego namnażania się komórek pnia oraz ich różnicowania na poszczególne rodzaje krwinek nazywany jest hematopoezą. Bierze w nim udział duża liczba czynników wzrostu. Czynniki te wytwarzane są zarówno miejscowo w szpiku kostnym, jak i produkowane poza nim (erytopoetyna i trombopoetyna). Film przedstawia schematy różnicowania się poszczególnych linii komórkowych od form nierozróżnialnych w mikroskopie świetlnym, do pierwszych komórek linii ukierunkowanych, które są już morfologicznie rozróżnialne w mikroskopie. Następnie przedstawia etapy dojrzewania poszczególnych krwinek w oparciu o cechy morfologiczne rozpoznawane w mikroskopie świetlnym.

Zadanie

 Obejrzeć film starając się zapamiętać etapy różnicowania poszczególnych rodzajów krwinek oraz czynniki wzrostu, które biorą udział w tych procesach.

Odpowiedz na pytania

	1. Gdzie odbywa się hematopoeza:w pierwszych 3 miesiącach życia płodowego...........................................................................................

pomiędzy 3 a 6 miesiącem życia płodowego............................................................................................

	1. Które krwinki różnicują się pod wpływem wymienionych czynników wzrostu?CSF-M ………………………………………………………………………………………………

TPO ………………………………………………………………………………………………

IL-7 ………………………………………………………………………………………………

EPO ………………………………………………………………………………………………

CSF-G ………………………………………………………………………………………………

	1. Gdzie dojrzewają: limfocyty B ……………………………………………………………………limfocyty T ………………………………………………………………….....

komórki NK ………………………………………………………………………

	1. Wymień czynniki wzrostu, które biorą udział w erytropoezie?…………………………………………………………………………………………………………

	1. Które stadium rozwojowe erytroblastu traci jądro komórkowe?...................................................................................................................................................................

	1. W którym erytroblaście zachodzi najintensywniej synteza hemoglobiny?…………………………………………………………………………………………………………

	1. Gdzie wytwarzana jest erytropoetyna? Jakie czynniki stymulują jej uwalnianie? …………………………..……………………………………………………………………………………………………………………………………………………..……………………………………
	2. Czym różni się retikulocyt od erytrocytu? ……………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………
	3. Jaki jest prawidłowy udział retikulocytów w ogólnej ilości RBC we krwi obwodowej?…………………………………………………………………………………………………………

	1. Jakie mogą być przyczyny zwiększenia ilości retikulocytów we krwi obwodowej?……………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………

	1. Wymień kolejne stadia rozwojowe granulocytów obojętnochłonnych, począwszy od komórekCFU-GEMM? ……………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………

	1. Z jakiego stadium rozwojowego granulocytu powstaje młodociany neutrofil z jądrem pałeczkowatym?…………………………………………………………………………………………………………

	1. Która dojrzała krwinka charakteryzuje się dwupłatowym jądrem i brunatno-czerwonymi ziarnistościami w cytoplazmie?…………………………………………………………………………………………………………

14.Która dojrzała krwinka charakteryzuje się ciemno-granatowymi ziarnistościami w cytoplazmie?

…………………………………………………………………………………………………………

 [↑](#endnote-ref-1)